



INES JULIANA MARTORANO GIARDINI

**“ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DO LÁTEX, DE
EXTRATOS BRUTOS E DE FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO
Synadenium grantii Hook. f.”**

Piracicaba
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

INES JULIANA MARTORANO GIARDINI

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DO LÁTEX, DE EXTRATOS BRUTOS
E DE FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO *Synadenium grantii* Hook. f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Mary Ann Foglio

Co-Orientadores:

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA À FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA
UNICAMP, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRA EM ODONTOLOGIA. NA ÁREA DE
FARMACOLOGIA, ANESTESIOLOGIA E
TERAPÊUTICA.

Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pela aluna,
e orientada pela Prof.^a Dra. Mary Ann Foglio

Assinatura da Orientadora

Piracicaba, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

G349a Giardini, Ines Juliana Martorano, 1963-
Atividade antiproliferativa in vitro do látex, de extratos brutos e de frações obtidas a partir do *Synadenium grantii* Hook. f. / Ines Juliana Martorano Giardini. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Mary Ann Foglio.
Coorientador: João Ernesto de Carvalho, Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Euphorbiaceae. 2. Câncer. 3. Etnofarmacologia. 4. Lanosterol. I. Foglio, Mary Ann. II. Carvalho, João Ernesto de. III. Rodrigues, Rodney Alexandre Ferreira. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: *In Vitro* Antiproliferative Activity of Latex, Crude Extracts and Fractions Obtained from *Synadenium grantii* Hook f.

Palavras-chave em Inglês:

Euphorbiaceaea

Cancer

Ethnopharmacology

Lanosterol

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Patrícia Corrêa Dias

Carina Denny

Data da defesa: 01-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

FOLHA DE APROVAÇÃO



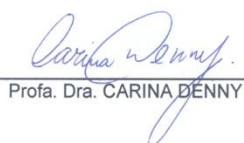
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 01 de Novembro de 2012, considerou a candidata INÊS JULIANA MARTORANO GIARDINI aprovada.


Prof. Dra. MARY ANN FOGLIO


Prof. Dra. PATRÍCIA CORRÊA DIAS


Prof. Dra. CARINA DENNY

Dedico este trabalho ao meu filho, Murilo, minha mãe Bruna e meu pai Álvaro *in memoriam*, meus irmãos Paulo Francisco e Álvaro Luiz e suas respectivas famílias, minha irmã Izabel Cristina e a todos os queridos familiares e amigos que sempre me apoiaram, incondicionalmente, na realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os seres de Luz que tão amorosamente têm me protegido e orientado, durante todos os anos de minha vida.

A toda minha família, meu filho, minha mãe, meu pai, meus irmãos, irmã e familiares pelo carinho, apoio e amor, sem os quais eu não estaria aqui.

Ao Ivo e sua família; à tia Gilda e tio Ivo; à tia Lenita e tio Rodolpho e a todos os meus ancestrais pela constante atenção e ajuda sempre que precisei.

À professora Mary Ann, pela orientação, paciência e oportunidade de estar realizando o sonho de estudar esta planta.

Ao professor Rodney, pela co-orientação e pela generosidade de estar sempre disposto a ajudar e alegrar o ambiente da sala de estudos.

Ao professor João Ernesto, pela co-orientação e oportunidade de participar dos trabalhos realizados na divisão de Farmacologia.

À querida amiga Ilza, sempre pronta a ajudar e compartilhar com muito cuidado e carinho o seu conhecimento.

Aos queridos amigos de pós-graduação: Fabrício, Leila, Patrícia, Rogério, Vanessa, Leilane, Verônica e Ilza pela ajuda, apoio, companheirismo e amizade compartilhados durante estes anos de trabalho conjunto.

À querida Núbia, por toda a assistência, paciência, amizade e dedicação na realização desta pesquisa.

A todos os funcionários da FOP, em especial às funcionárias Elisa e Eliane, ao José Carlos, sempre dispostos a ajudar; aos professores, em especial professor Pedro, Eduardo, Francisco, Maria Cristina, Cinthia e a todos os amigos de mestrado em especial Salete, Luiz, Livia, Camila, Ana Paula, Marcos, Marcelo, Fabiana, Cristina, Luciano e Clayton, pelo companheirismo e união nos bons e nos maus momentos.

A todos os funcionários, técnicos e estagiários do CPQBA, em especial: Carmem, Johnny, Márcio, Natália, Karina, Katyri, Fernando, Sidney, Ícaro, Alessandra, Jario, Suzi, Analú, Paloma e Samanta da divisão de fitoquímica; Paula, Giovanna B. e Giovana F., Larissa, Gabriela, Humberto, Viviane, Bárbara, Michelle, Sirlene, Karin, Ana P., Ana Lúcia da divisão de farmacologia; e Vera, Adilson, Marili, Sinésio da divisão de Química Farmacêutica e Orgânica do CPQBA, à Glyn pelo auxílio na pesquisa da planta, Marta da divisão de Microbiologia e à Elaine pelas análises no Laboratório ThoMson da Unicamp.

À Carmem, Adrian, Myrella, Cristina, Bárbara e Adriana pela hospedagem em Piracicaba e em Campinas.

Aos meus queridos amigos de caminhada: Maria, Thaïs, Valéria, Kátia, Eliane, Damaris, Jorge, Sérgio, Vânia, Cidinha, Ana Lúcia, Marlene, Carlos, Olga e família, Amália e família, Cristina e família e todos que de alguma forma vibraram e oraram pelo meu sucesso...

À UNICAMP (FOP e CPQBA) pela oportunidade única e especial de aprendizado e pesquisa há tanto tempo esperada.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo financiamento e bolsa concedidos.

Ao Centro Paula Souza, e todos os amigos da ETEC de Espírito Santo do Pinhal e de Mococa que também torceram e torcem por mim.

À Banca Examinadora profa. Dra. Patrícia Corrêa Dias e Dra. Carina Denny por todas as sugestões e correções finais desta dissertação.

Ao primo Marinho, sua família e ao Prof. Dr. Luís Carlos Bernacci por terem me ajudado a identificar essa planta.

E finalmente à dona Zoraide (*in memoriam*) que trouxe até meu conhecimento essa planta, sem a qual não teria realizado essa pesquisa.

Eu sou eternamente grata!

Se

Se fores capaz de manter tua calma, quando,
todo mundo ao redor já a perdeu e te culpa.
De crer em ti quando estão todos duvidando,
e para esses, no entanto achar uma desculpa.

Se és capaz de esperar sem te desesperares,
ou, enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te esquivares,
e não parecer bom demais, nem pretensioso.

Se és capaz de pensar - sem que a isso só te atires,
de sonhar - sem fazer dos sonhos teus senhores.
Se, encontrando a Desgraça e o Triunfo, conseguires,
tratar da mesma forma a esses dois impostores.

Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas,
em armadilhas as verdades que disseste
E as coisas, por que deste a vida estraçalhadas,
e refazê-las com o bem pouco que te reste.

Se és capaz de arriscar numa única parada,
tudo quanto ganhaste em toda a tua vida.
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
resignado, tornar ao ponto de partida.

De forçar coração, nervos, músculos, tudo,
a dar seja o que for que neles ainda existe.
E a persistir assim quando, exausto, contudo,
resta a vontade em ti, que ainda te ordena: Persiste!

Se fores capaz de, entre a plebe, não te corromperes,
e, entre Reis, não perder a naturalidade.
E de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes,
se a todos podes ser de alguma utilidade.

Se és capaz de dar, segundo por segundo,
ao minuto fatal todo valor e brilho.
Tua é a Terra com tudo o que existe no mundo,
e - o que ainda é muito mais - és um Homem, meu filho!

Rudyard Kipling

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* do látex, dos extratos brutos e frações extraídas das folhas frescas de *Synadenium grantii* Hook f., popularmente conhecida como janaúba, cancerosa ou cancerola, coletadas de indivíduos cultivados no campo experimental do CPQBA- UNICAMP, na cidade de Espírito Santo do Pinhal- SP e em Mogi-Mirim-SP. O estudo da atividade antiproliferativa foi realizado em dez linhagens tumorais humanas: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama, expressando fenótipo de resistência múltipla às drogas), NCI-460 (pulmão), UACC-62 (melanoma), HT-29 (côlon), PC-03 (próstata), OVCAR-05 (ovário), U251 (Glioma- SNC) e 786-0 (renal), além de uma linhagem de Queratinócito Humano Normal (Hacat) de células normais. Os resultados foram obtidos através de método da sulforrodamina B (SRB). Os extratos brutos foram obtidos a partir de folhas frescas pela extração a frio por maceração dinâmica sequencial em diclorometano, etanol e água e por turbólise. Foram empregados métodos cromatográficos para monitorar as separações por cromatografia em camada delgada (CCD) e purificação das frações com atividade biológica. As frações foram analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG-EM) e por espectrometria de massas (TOF MS ES +). Os resultados demonstraram que a fração 2FF apresentou valor de TGI (*Total Growth Inhibition*) mais seletivo para as linhagens 786-0 (20,47µg/mL) e NCI-H460 (2,02µg/mL) e a fração 2FH demonstrou maior seletividade para PC-3 (7,61µg/mL), OVCAR-3 (15,32 µg/mL), NCI-H460 (3,86µg/mL) e HT29 (25,63µg/mL), ambas provenientes do extrato diclorometânico. Enquanto a fração 2FG foi seletiva apenas para a linhagem NCI-H460 (3,85µg/mL e 3,86µg/mL, respectivamente). Os extratos brutos obtidos das folhas frescas dos exemplares com flor (CF1) e sem flor (SF2) provenientes de Espírito Santo do Pinhal – SP foram avaliados para atividade antiproliferativa *in vitro* demonstrando que as amostras de flor extraídas em diclorometano (CF DCM) apresentaram valor de TGI (*Total Growth Inhibition*) mais seletivo para as linhagens NCI-H460 (8,28µg/mL) e para PC-3 (64,39µg/mL), enquanto o extrato da amostra sem flor extraído em diclorometano foi inativo. Por outro lado, tanto o extrato bruto etanólico da amostra com flor quanto a

amostra sem flor foram inativos. Este trabalho demonstra a importância de estudos de eficácia para identificar os princípios ativos envolvidos com a atividade estudada. Porém fica evidenciado que para poder desenvolver um produto farmacêutico ainda serão necessários estudos de segurança que permitam definir as doses efetivas com o mínimo de efeitos tóxicos, como também realizar estudos de padronização para garantir a reprodutibilidade do produto final.

Palavras-chaves: *Synadenium grantii* Hook f., atividade antiproliferativa *in vitro*, sulforrodamina B.

ABSTRACT

This study aimed evaluation of in vitro antiproliferative activity on human cell lines of latex, crude extracts and fractions obtained from fresh leaves of *Synadenium grantii* Hook f., popularly known as cancerosa or cancerola. The plants were collected in CPQBA-UNICAMP experimental field, Espírito Santo do Pinhal-SP and from Mogi-Mirim- SP. Ten human tumor cell lines were used for the in vitro antiproliferativa assay: K-562 (leukemia), MCF-7 (breast), NCI-ADR (breast expressing phenotype of multiple drug resistance), NCI-460 (lung), UACC -62 (melanoma), HT-29 (colon), PC-03 (prostate), OVCAR-05 (ovarian), U251 (glioma-SNC) and 786-0 (kidney), plus a line of Normal Human keratinocyte (HaCaT) from normal cells. The results were analyzed using the sulforhodamine B method (SRB). The crude extracts were obtained from fresh leaves by extraction at room temperature with stirring. Three extracts of each sample were prepared. Initially the ground plant was extracted with dichloromethane. The extraction residue was further extracted with ethanol and last by water providing three extracts. Chromatographic methods were employed to purify fractions with biological activity. The fractions were analyzed by capillary gas chromatography coupled with a mass detector (GC-MS) and mass spectrometry (TOF MS ES +). The results demonstrated that fraction 2 FH showed TGI value (Total Growth Inhibition) with selectivity for strains 786-0 (20.47 µg / mL) and NCI-H460 (2.02 µg / mL) and fraction 2FH demonstrated greater selectivity for PC -3 (7.61 µg / mL), OVCAR-3 (15.32 µg / mL), NCI-H460 (3.86 µg / mL) and HT29 (25.63 µg / mL), both obtained from the dichloromethane extract, whereas fraction 2FG was selective only for NCI-H460 (3.85 µg / mL) cell line. The samples extracted from fresh leaves of flowering specimens (CF1) and without flowers (SF2) from Espírito Santo do Pinhal - SP demonstrated TGI more selective for NCI-H460 (8.28 mg / ml) and PC-3 (64.39 mg / ml) lines, whereas the sample without flower was inactive. Moreover, both the crude ethanol extract of the sample as the sample without flower bloom were inactive. This study demonstrated the importance of efficacy studies to identify active principles. However in order to develop a pharmaceutical product further in vivo experimental models and toxicity studies as well

as standardization procedures are needed to be undertaken to ensure safety of the final product.

Keywords: *Synadenium grantii* Hook f., *In vitro* antiproliferative activity, sulforhodamine B.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1	Câncer	5
2.2	Oncogênese	6
2.2.1	Estágio de Iniciação	7
2.2.2	Estágio de Promoção	8
2.2.3	Estágio de Progressão	10
2.3	Incidência do Câncer no Mundo e no Brasil	11
2.4	Principais características do Câncer	13
2.5	Terapias Antineoplásicas	15
2.5.1	Radioterapia	15
2.5.2	Cirurgia	16
2.5.3	Transplante de Medula Óssea	16
2.5.4	Imunoterapia	17
2.5.5	Quimioterapia	17
2.5.6	Agentes Antineoplásicos Originários de Produtos Naturais	24
2.5.7	Novos Fármacos em Estudo	29
2.6	Família Euphorbiaceae	34
2.6.1	<i>Synadenium umbellatum</i> Pax.	36
2.6.2	<i>Synadenium grantii</i> Hook. f.	39
3	PROPOSIÇÃO	55
3.1	Objetivo Geral	55
3.2	Objetivos específicos	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	Material	57

4.1.1	Drogas e Reagentes	57
4.1.2	Material Vegetal	57
4.2	Métodos	58
4.2.1	Preparação dos extratos	58
4.2.2	Métodos Cromatográficos	65
4.2.3	Análise Qualitativa em Espectrômetro de Massas	67
4.2.4	Avaliação Farmacológica	68
5	RESULTADOS	73
5.1	Estudos fitoquímicos e farmacológicos	73
5.1.1	Obtenção dos Extratos Brutos (EB) e escolha do EB em diclorometano (EBDC)	75
5.1.2	Fracionamento I do EBDC das folhas do <i>S. grantii</i> em diclorometano	78
5.1.3	Triagem fitoquímica	78
5.1.4	Fracionamento II	82
5.1.5	Extração das folhas de <i>S. grantii</i> de diferentes exemplares proveniente de diferentes regiões (Espírito Santo do Pinhal e Mogi-Mirim)	86
5.1.6	Fracionamento IIIa e IIIb	91
5.1.7	Fracionamento IV	94
5.1.8	Fracionamento V	96
5.1.9	Cromatografia Gasosa- Espectrometria de Massas (CG-EM)	98
5.1.10	Espectrometria de Massas	101
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÃO	117
8	REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. Terapias convencionais contra o câncer causam sérios efeitos colaterais e, algumas vezes, apenas ampliam o tempo de vida do paciente por alguns anos. Portanto a demanda por terapias complementares ou diferentes abordagens para o tratamento do câncer tem aumentado muito ultimamente. Ainda assim, apenas 5-15% das cerca de 250.000 das espécies estimadas foram investigadas para obtenção de compostos bioativos. Um produto fitoterápico ideal é aquele que possui propriedade antitumoral com toxicidade mínima e tem um mecanismo de ação definido (Amin, 2009).

A contínua ameaça à biodiversidade através da destruição dos ecossistemas terrestres e marinhos torna urgente a necessidade de expandir a exploração destes recursos naturais como fonte de novos agentes bioativos (Cragg & Newman, 2005a).

As plantas têm tido uma longa história de uso no tratamento do câncer. Hartwell (1982), em sua revisão de plantas usadas contra o câncer listou mais de 3000 espécies.

Outro levantamento de plantas usadas na etnofarmacologia contra o câncer foi realizado em 2000, utilizando o banco de dados mantido pelo Programa de Pesquisa Colaborativa em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Illinois - Chicago. Foram reportadas mais de 350 espécies usadas contra o câncer, que não tinham sido citadas na obra de Jonathan Hartwell. Desse total, 37 espécies são da Família Euforbiaceae, representando mais de 10,57% neste levantamento (Graham *et al.*, 2000).

No Brasil, vários artigos publicados entre 1980 e 2008, através da investigação em cinco bases de dados (SCIELO, SCIRUS, SCOPUS, BIOLOGICAL ABSTRACTS e WEB OF SCIENCE), foram analisados e um total de 84 espécies de plantas medicinais usadas para o câncer e sua prevenção foram

relatadas, das quais 69,05% foram citadas como potenciais para o tratamento de tumores e câncer em geral, e 30,95% para tumores específicos. As plantas citadas com maior frequência foram *Aloe vera* (L.) Burm. f., *Euphorbia tirucali* Boiss, e *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl. Pelo menos um estudo farmacológico foi encontrado para 35,71% das espécies. As plantas mais estudadas *in vitro* e *in vivo* foram: *Silybum. marianum* Gaertn., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl, *Polygonum. scandens* L. e *Capsicum frutescens* L. Neste estudo, a família Euphorbiaceae apresentou um total de nove espécies mais citadas, sendo estas: *Cnidocolus obtusifolius* Pohl ex Baill., *Cnidocolus phyllacanthus* (Müll. Arg.) Pax & L. Hoffm., *Cnidocolus urens* (L.) Arthur, *Croton antisyphiliticus* Mart., *Croton urucurana* Baill., *Euphorbia phosphorea* Mart., *Euphorbia prostrata* Aiton, *Euphorbia tirucalli* L. e *Manihot esculenta* Crantz, representando um total de 9,33% das plantas medicinais usadas para o tratamento e ou prevenção de câncer (de Melo *et al.*, 2011).

Apesar da contribuição dos metabólitos secundários naturais de plantas à medicina moderna estar bem clara, o porquê desses compostos serem produzidos ainda permanece um tópico de debate. Inicialmente eles eram considerados produto de desperdício, mas pesquisas posteriores revelaram que esses organismos produzem esses compostos complexos e normalmente tóxicos com a intenção de defesa do estresse e ataque de patógenos (Cragg *et al*, 2009).

A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes derivados de plantas, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional. Fundamentada nesse princípio, a indústria farmacêutica vem aplicando grandes investimentos em pesquisas de bioprospecção, mesmo tendo em conta que a pesquisa de novos fármacos é um mercado de alto risco. De acordo com a *Pharmaceutical Research and Manufactures of America* (PhRMA) dentre 5.000 a 10.000 candidatos a fármacos, apenas um passa para fase de testes pré-clínicos e clínicos e é submetido à

aprovação do FDA para comercialização. A grande contradição para o sucesso absoluto de um programa dessa natureza com plantas é que, se por um lado os países desenvolvidos detêm a tecnologia, são os países em desenvolvimento que detêm praticamente toda biodiversidade da terra. O Brasil sendo um país detentor de uma biodiversidade fantástica, abrigando o maior repositório de angiospermas do planeta, tem em princípio, as condições básicas para estruturar um programa nacional de bioprospecção em busca de novas substâncias químicas bioativas (Montanari & Bolzani, 2001).

Dos anos 1940 até dezembro de 2007, um total de 211 fármacos anticâncer têm tido uso clínico e foram originados de várias fontes: biológica, produtos naturais e vacinas. Nesta análise, ao considerar as categorias de doenças na área de tratamento de câncer, 79,8% estavam nessas categorias (Cragg *et al*, 2009).

Existem duas espécies pertencentes ao gênero *Euphorbia* já muito estudadas contra o câncer, *Euphorbia peplus* L. e *Euphorbia tirucalli* L., que segundo literatura, possuem princípios ativos em comum com a espécie estudada, o *Synadenium grantii* (Aylward *et al.*, 2003, Nielsen *et al*, 1979, Pianowski, 2011).

Além disso, outra espécie botânica, *Synadenium umbellatum*, tem sido utilizada pela população como analgésico, anti-inflamatório e antineoplásico, dentre outras utilizações (Ortêncio, 1997).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a espécie *Synadenium grantii* Hook. f., pertencente à Família Euphorbiaceae, através da avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* do látex, do extrato bruto e de suas frações, com o objetivo de confirmar seu uso etnofarmacológico, de forma a contribuir com o avanço na busca de mais um candidato anticâncer proveniente de plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida. As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender às agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida). Alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia e câncer de colo de útero. Outros estão em estudo, como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, e muitos são ainda completamente desconhecidos. Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA dos genes, chamada mutação genética. As células cujo material genético foi alterado passam

a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas cancerosas (Brasil, 2012).

A invasão e metástase são responsáveis por 90% de mortalidade associada ao câncer, e a maioria das células do câncer no momento da morte poderia ser encontrada em metástases em vez de ser no tumor primário. Células de câncer podem viajar pelos ductos da linfa até os nódulos. Entretanto, seu espalhamento via circulação do sangue é responsável pela grande maioria de metástases distantes (Weinberg, 2008).

2.2 Oncogênese

O organismo humano encontra-se exposto a múltiplos fatores carcinogênicos, com efeitos aditivos ou multiplicativos. Sabe-se que a predisposição individual tem um papel decisivo na resposta final, porém não é possível definir em que grau ela influencia a relação entre a dose e o tempo de exposição ao carcinógeno e a resposta individual à exposição. Independentemente da exposição a carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram o desenvolvimento normal da população celular como um todo. Há também que se considerar a vigilância imunológica como mecanismo de correção ou exclusão das células mutantes. Os fenômenos de mutação espontânea podem condicionar uma maior ou menor instabilidade genômica, que pode ser crucial nos processos iniciais da carcinogênese. Em síntese, a carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Em ambos os casos, verifica-se a indução de alterações mutagênicas e não-mutagênicas ou epigenéticas nas células. O tempo para a carcinogênese ser completada é indeterminável, podendo ser necessários muitos anos para que se verifique o

aparecimento do tumor. Teoricamente, a carcinogênese pode ser interrompida em qualquer uma das etapas, se o organismo for capaz de reprimir a proliferação celular e de reparar o dano causado ao genoma. A Figura 1 sintetiza as diversas etapas da carcinogênese (Brasil, 2008).



Figura 1: As etapas da carcinogênese.
Fonte: Brasil, 2002.

Ainda segundo Brasil (2008) a oncogênese química é um processo sequencial, dividido em duas fases – a iniciação e a promoção, como citado a seguir.

2.2.1 Estágio de Iniciação

A primeira etapa (iniciação) consiste de um fator iniciador ou carcinogênico que causa dano ou mutação celular. A mutação dos ácidos nucléicos é o fenômeno central da etapa de iniciação da carcinogênese. As células “iniciadas” permanecem latentes até que sobre elas atuem agentes promotores (Brasil, 2008).

2.2.2 Estágio de Promoção

A segunda etapa (promoção) estimula o crescimento da célula que sofreu mutação, e pode acontecer a qualquer momento, após a transformação celular inicial. Os fatores de promoção podem ser agentes químicos (p. ex. asbesto), processo inflamatório, hormônios, fatores que atuam no crescimento celular normal. É importante destacar que o agente promotor não tem ação mutagênica nem carcinogênica e que, para conseguir efeito biológico, deve persistir no ambiente. Isto significa que seus efeitos revertem-se, caso a exposição a ele seja suspensa, sendo esta a grande diferença existente, entre ele e o agente carcinogênico, decisiva para as ações preventivas do câncer (Brasil, 2008).

Muitos dos agentes carcinogênicos químicos encontram-se no meio ambiente humano e relacionam-se a hábitos sociais, alimentares ou ocupacionais. Nos processos de iniciação e promoção, a célula ainda pode encontrar-se sob a ação dos fatores de inibição do crescimento, e o resultado final dependerá do balanço obtido entre estes fatores e a intensidade das alterações provocadas nas células pela ação dos agentes iniciadores e promotores (Brasil, 2008).

O geneticista Bruce Ames e colaboradores (1976), enquanto trabalhavam na Universidade da Califórnia, em Berkeley, divulgaram resultados de experimentos que contribuíram em grande peso para a teoria de que carcinógenos (causadores de câncer) podem funcionar como mutagênicos (causadores de mutações). Entretanto outras pesquisas mostraram que quase todos os compostos que são mutagênicos provavelmente são cancerígenos, mas o contrário não é verdade. Então, alguns carcinógenos atuam pela sua habilidade de mutar o DNA, enquanto que outros promovem tumorigênese pelo mecanismo não genético. Tais carcinógenos não mutagênicos são chamados de promotores tumorais. Um exemplo de promotor tumoral de pele é o TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) ou também conhecido como PMA (forbol ou 12-miristato-13-acetato) (Figura 2), extraído do óleo da semente de *Croton tiglium* (Klotzsch) Baill., da família Euphorbiaceae. Ele atua como potente estimulador da

proliferação celular por meio de sua habilidade em ativar a quinase celular serina/treonina conhecida como proteína quinase α ($\text{PKC}\alpha$). Mais especificamente, o TPA age como um imitador funcional do diacilglicerol (DAG), a molécula que é gerada endogenamente pelas células como um meio de ativação da proteína quinase C. De alguma maneira esses promotores dirigem a proliferação de queratinócitos inicializados cujos descendentes formam papilomas e, em raras ocasiões, progridem formando carcinomas. O modelo experimental de carcinogênese de pele de camundongos é útil para ilustrar os princípios de inicialização, promoção e progressão tumoral (Weinberg, 2008).

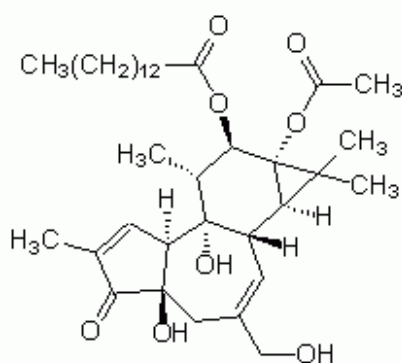


Figura 2 – 12-O-tetradecanoilforbol -13-acetato (TPA), Forbol ou 12-miristato-13-acetato (PMA)
Fonte: Merch Chemicals, 2012.

A proteína quinase C (PKC), disparou para o primeiro plano do campo de pesquisa sobre o câncer no início dos anos 1980, com a sua identificação como um efetor de ésteres de forbol, que são produtos naturais com atividade de promoção de tumor. Ésteres de forbol tinham sido de interesse para o campo de pesquisa do câncer, devido aos estudos no início do modelo de carcinogênese de pele de rato, que mostrou que a aplicação tópica prolongada de ésteres de forbol promovia a formação de tumores de pele em ratos previamente tratados com agentes mutagênicos. Pesquisas nos últimos anos estabeleceram papéis-chave para as isoenzimas PKC no controle da proliferação celular, migração, adesão e transformação maligna. Além disso, existem muitas evidências que ligam as PKC

à invasão e metástase de câncer de células. É agora bem estabelecido que a expressão de isoenzimas de PKC seja alterada em vários tipos de cânceres. A relevância de isoenzimas PKC na sinalização de câncer é, portanto, notável (Blumberg, 2010).

Na Tabela 1 estão alguns exemplos de promotores de tumores humanos conhecidos ou suspeitos e seus locais de ação (Weinberg, 2008).

Tabela 1 - Promotores de tumores humanos conhecidos ou suspeitos e seus locais de ação

Agente ou processo	Local do câncer
Estrogênio	Endométrio
Estrogênio e progesterona	Mama
Ovulação	Ovário
Testosterona	Próstata
Contraceptivos orais	Fígado
Esteroides anabolizantes	Fígado
Analgésicos	Pélvis renal
Diuréticos	Rim
Viroses da hepatite B/C	Fígado
<i>Helicobacter pylori</i>	Estômago
Parasitas da malária	Célula B
Bacilo da tuberculose	Pulmão
Mascar tabaco	Cavidade oral
Bile	Intestino delgado
Sal	Estômago
Refluxo ácido	Esôfago
Amianto	Mesotélio, Pulmão
Inflamação crônica (colite, cistite, pancreatite)	Local da inflamação (Cólon, Bexiga, Pâncreas)
Cálculos biliares	Vesícula biliar

Fonte: Weinberg, 2008 (Adaptada de Preston-Martin *et al.*, 1990).

2.2.3 Estágio de Progressão

Além destas duas etapas anteriores, fala-se também em um terceiro e último estágio que se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que

promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos. O fumo é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese. Ao longo da vida, são produzidas células alteradas, mas vários mecanismos de defesa possibilitam a interrupção desse processo, com sua eliminação subsequente. A integridade do sistema imunológico, a capacidade de reparo do DNA danificado por agentes cancerígenos e a ação de enzimas responsáveis pela transformação e eliminação de substâncias cancerígenas introduzidas no corpo são exemplos de mecanismos de defesa. Esses mecanismos, próprios do organismo, são na maioria das vezes geneticamente pré-determinados, e variam de um indivíduo para outro. Esse fato explica a existência de vários casos de cânceres numa mesma família, bem como o porquê de nem todo fumante desenvolver câncer de pulmão. Sem dúvida, o sistema imunológico desempenha um importante papel nesse mecanismo de defesa (Brasil, 1996).

O fato de que indivíduos imunocomprometidos apresentam níveis mais elevados de vários tipos de câncer sugere fortemente que o sistema imune está continuamente monitorando os tecidos do corpo para aliviar a presença de tumores e tentar eliminá-los - o processo de imunovigilância. Alguns tipos de cânceres podem progredir no organismo apesar da imunovigilância, simplesmente porque, por alguma razão, são fracamente antigênicos. As respostas do sistema imune a tumores ainda são mal compreendidas, e a multiplicidade dos reguladores imunes cria a oportunidade de ativar respostas antitumorais de muitas formas, sendo que a maior parte delas ainda não foi testada na clínica oncológica (Weinberg, 2008).

2.3 Incidência do Câncer no Mundo e no Brasil

O levantamento de 2008, *THE GLOBOCAN PROJECT*, o mais completo sobre o ônus global do câncer no mundo, divulgado dia 01 de junho de

2010, pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostra que a maioria dos 12,7 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes pela doença em todo o mundo ocorreu em países em desenvolvimento (IARC, 2012). A partir deste levantamento, gestores de saúde de diferentes regiões do mundo puderam definir prioridades para o controle do câncer. Além disso, estes dados permitem prever a incidência de câncer no futuro e a taxa de mortalidade nos próximos 20 anos, de acordo com as mudanças previstas no envelhecimento e no crescimento da população. As regiões menos desenvolvidas são as mais afetadas, tanto em termos de incidência (56% dos novos casos), quanto em termos de mortalidade (63%). Os tumores mais comumente diagnosticados em todo o mundo são: pulmão (1,61 milhão de casos ou 12,7% do total), mama (1,38 milhão ou 10,9%) e colorretal (1,23 milhão ou 9,7%). As causas mais comuns de morte por câncer se devem a tumores de pulmão (1,38 milhão ou 18,2% do total), estômago (740 mil ou 9,7%) e fígado (690 mil ou 9,2%). Diferenças marcantes são observadas nos padrões de câncer de região para região. Por exemplo: os cânceres do colo de útero e de fígado são muito mais comuns nas regiões em desenvolvimento, enquanto próstata e câncer de colorretal ocorrem mais em regiões desenvolvidas (Brasil, 2012).

A distribuição epidemiológica do câncer no Brasil sugere uma transição em andamento, envolvendo um aumento entre os tipos de câncer normalmente associados ao alto status socioeconômico - câncer de mama, próstata e colorretal - e, simultaneamente, a presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza - câncer de colo de útero e estômago (Koifman & Koifman, 2003).

Para finalizar, segundo Guerra *et al.* (2005), alguns aspectos relativos ao comportamento dos principais tipos de câncer no panorama brasileiro merecem ser enfatizados, a saber:

- a) Progressivo aumento da incidência do câncer de pulmão, especialmente em mulheres, em função do aumento da exposição deste grupo etário ao

tabaco, o que influencia também a incidência dos cânceres de boca, faringe, laringe e esôfago;

- b) Associação devida a hábitos alimentares e risco de câncer específico, observada em determinadas regiões do país como, por exemplo, o consumo de mate quente ou de churrasco com risco de câncer de esôfago e consumo diário de carne e baixa ingestão de frutas com risco de câncer de estômago;
- c) Papel da infecção por HPV e da história de outras doenças sexualmente transmissíveis no risco de câncer de colo de útero, além da importância do aumento da cobertura do exame colpocitológico (Teste de Papanicolaou) na diminuição da mortalidade por este tipo de câncer no Brasil;
- d) Importância do câncer de mama como principal causa de morte por neoplasias em mulheres no país e questões socioeconômicas, reprodutivas e ambientais que podem estar relacionadas ao risco e sobrevida locais;
- e) Relação de fatores ambientais com o risco de câncer de próstata e câncer colorretal no país.

2.4 Principais características do Câncer

Como já citado anteriormente, a habilidade de invadir tecidos adjacentes é uma marca do câncer. Hanahan & Weinberg (2000), argumentaram que todos os cânceres partilham seis traços comuns que os distinguem de outras doenças e que as vias de sinalização estão desreguladas no câncer. Nesse artigo identificaram-se as seguintes marcas:

1. Autossuficiência em sinais de crescimento: as células cancerosas não precisam de estímulo de sinais externos (sob a forma de fatores de crescimento) para se multiplicar.
2. Insensibilidade a sinais de anticrescimento: elas são geralmente resistentes aos sinais de prevenção do crescimento de seus vizinhos.

3. Invasão de tecidos e metástase: elas podem escapar de seus locais de origem e aparentemente são capazes de invadir tecidos adjacentes e se espalhar (metástase) para partes distantes.
4. Ilimitado potencial reprodutivo: as células normais morrem depois de um dado número de divisões. As células cancerosas escapam desse limite e aparentemente são capazes de crescimento e divisão ilimitados (imortalidade).
5. Angiogênese sustentada: a angiogênese é o nome dado ao processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados. As células cancerosas parecem ser capazes de alavancar esse processo, garantindo que tais células recebam um suprimento contínuo de oxigênio e outros nutrientes.
6. Evitando a apoptose: a apoptose é uma forma de morte celular programada (suicídio celular), mecanismo pelo qual as células são programadas para morrer após um determinado número de divisões ou, em caso nos quais elas se tornem danificadas. As células cancerosas são capazes de contornar esse mecanismo.

Numa atualização, os mesmos autores Hanahan & Weinberg (2011), propõem quatro novas marcas:

1. Metabolismo desregulado: a maioria das células do câncer usam vias metabólicas anormais de produção de energia, fato apreciado desde o começo do século XX, com a postulação da hipótese de Warburg *et al.* (1924), mas ganhando renovado interesse da investigação só agora (Tennant *et al.*, 2010).
2. Evitando o sistema imunitário: as células cancerosas parecem ser invisíveis para o sistema imunológico do corpo.
3. DNA instável: as células cancerosas têm, geralmente, graves anomalias cromossômicas, as quais se agravam à medida que a doença progride.

4. Inflamação: descobertas recentes têm destacado o papel da inflamação crônica local na indução de muitos tipos de câncer.

Um artigo publicado por Lazebnik (2010) apontou que cinco dessas seis marcas são também características de tumores benignos e que a única marca de doença maligna é a sua capacidade de invadir e causar metástase.

2.5 Terapias Antineoplásicas

Segundo Brasil (2012), o tratamento do câncer pode ser feito através de radioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea e quimioterapia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. Existe também a imunoterapia como será visto a seguir.

2.5.1 Radioterapia

A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada; entretanto, mesmo que sejam usados os sensibilizadores (drogas que diminuem os efeitos colaterais, como os derivados porfirínicos), o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (Murad & Katz, 1996).

A técnica antineoplásica de fotorradiação é também um importante avanço, pois permite a localização e a destruição com maior seletividade pelo uso de radiação específica com fluorescência (comprimento de onda ou $\lambda = 620-640$ nm), para detecção e destruição de tumores com uso de fibras óticas. Contudo, pelo acúmulo de porfirinas em órgãos normais ainda não se obtém uso clínico interno, só em tumores superficiais (Machado, 2000; Salmonm, 1998).

2.5.2 Cirurgia

A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase; no caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia, incluindo o transplante de medula (Murad & Katz, 1996).

A cirurgia conservadora seguida de radioterapia para o câncer de mama inicial deve ser o procedimento de escolha no controle loco-regional dessa doença (Tiezzi, 2007).

O tratamento do Câncer colorretal ainda é eminentemente cirúrgico, com as terapias adjuvantes pouco alterando a mortalidade e contribuindo para melhora da qualidade de vida. A sobrevida global em cinco anos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico gira em torno de 50% (Chiele Neto & Tarta, 2005).

2.5.3 Transplante de Medula Óssea

É um tipo de tratamento proposto para algumas doenças que afetam as células do sangue, como leucemia e linfoma. Consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula saudável. O transplante pode ser autogênico (quando a medula vem do próprio paciente), ou alogênico (quando a medula vem de um doador). O transplante também pode ser feito a partir de células precursoras de medula óssea, obtidas do sangue circulante de um doador ou do sangue de cordão umbilical. Em 2001, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) inaugurou o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP), o primeiro banco desse tipo no Brasil, visando aumentar as chances de localização de doadores, para os pacientes que necessitam de transplante de medula óssea.

As chances de um brasileiro localizar um doador em território nacional são trinta vezes maiores do que a chance de encontrar o mesmo doador no exterior, segundo pesquisa realizada pelo Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME). Isso ocorre devido às características genéticas comuns à população brasileira. Além disso, o BSCUP pretende ser um projeto piloto para a instalação de outros bancos brasileiros e para treinamento de profissionais e regulamentação desta atividade (Brasil, 2012).

2.5.4 Imunoterapia

O tratamento antineoplásico tem usado o estímulo das próprias defesas do corpo pela imunoterapia, com o interferon α , interleucina-2 e mesmo o BCG (*Bacillus Calmette-Guérin* - vacina contra a tuberculose), mas apesar de promissora, a imunoterapia é ainda uma técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (de Almeida *et al.*, 2005).

Com esses métodos de tratamento citados acima, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Todavia, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micro metástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (Spence & Jonhston, 2001; Chabner & Longo, 1996).

2.5.5 Quimioterapia

A quimioterapia é definida como o tratamento que utiliza medicamentos para combater o câncer. Eles são administrados, em sua maioria, pela via

intravenosa, podendo também ser por via oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intratecal (Brasil, 2012).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais (Murad & Katz, 1996; Salmonm, 1998), particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (Machado, 2000; Oliveira & Alves, 2002).

Um fator importante para o êxito da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do tumor (entre 10^9 e 10^{12} células tumorais, ou seja, tumor com tamanho inferior a um cm) (Spence & Jonhston, 2001; Chabner & Longo, 1996). Considerando- se um tumor de 1 g (cerca de 10^9 células), cada ciclo de terapia mata cerca de 99% das células; portanto é imprescindível repetir-se o tratamento em múltiplos ciclos para matar todas as células tumorais (Chabner & Calabresi, 1995).

Nos casos mais favoráveis, com a quimioterapia atual, pode-se obter maior expectativa de vida, tendo- se em diversos casos até cerca de 66% de pacientes livres do câncer por mais de 10 anos. No caso dramático do linfoma de Burkitt, que mata milhares de crianças na África, em até três meses após o início da metástase, pode-se ter a cura plena de 60% dos doentes, com quimioterapia especializada. Muitos estudos estão sendo feitos para a maior eficiência da quimioterapia e a combinação de diversos agentes antineoplásicos, tendo-se conseguido resultados surpreendentes com índices de cura de 75 a 90% em diversos tipos de câncer (de Almeida *et al.*, 2005).

De fato, existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna (Hahn & Weinberg, 2002), mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, assim, o conhecimento do ciclo celular (Figura 3) ou dos seus mecanismos é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer (Salmonm, 1998).



Figura 3 – Exemplos de ponto de verificação no ciclo celular
 Fonte: Sobiologia, 2011.

A célula que não está replicando apresenta-se na fase G0 (*Gap*-intervalo ou quiescência). Nesta fase, o DNA apresenta-se superenovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a fase G1, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S (Síntese). Nas fases G1 e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogênese, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (*feedback*) são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que detém a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado (Salmonm, 1998). As interleucinas, dentre outras substâncias, também afetam a replicação celular, entretanto seus mecanismos são obscuros. Outro mecanismo regulador é a apoptose, que provoca a morte da célula em detrimento da possibilidade da célula tornar-se alterada, podendo levar ao câncer (Zhou & Elledge, 2000).

Na fase G2 há a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específico da espécie) como a produção do fuso mitótico que é feita na fase M (Mitose). Após a divisão do

material nuclear há a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular (retorna à fase G₀). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G₀), assim passa da fase M para nova fase G₁ (de Almeida *et al.*, 2005).

A Figura 4 mostra a classificação de agentes antineoplásicos segundo Calabresi e Chabner (Chabner & Calabresi, 1995).

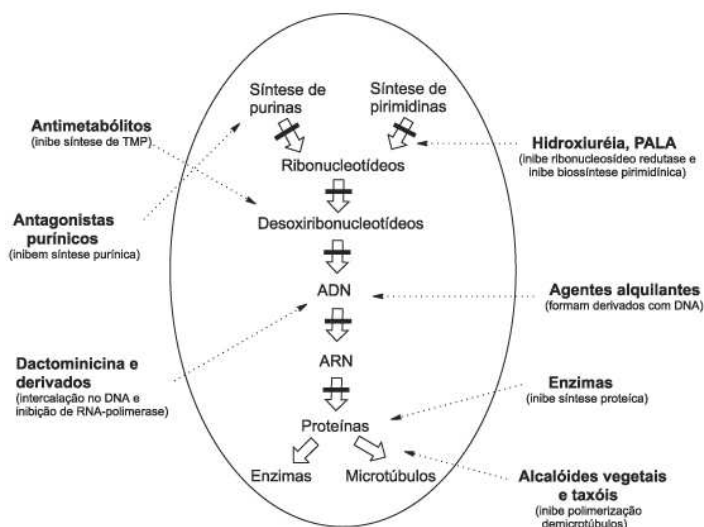


Figura 4 - Classificação de agentes antineoplásicos segundo Calabresi e Chabner
 Fonte: de Almeida *et al.*, 2005.

Como ocorre com qualquer mecanismo, a máquina que executa as várias etapas do ciclo celular está predisposta a falhas no funcionamento. Essa possibilidade de falha contrasta com as exigências da célula de ter as várias etapas do seu ciclo celular ocorrendo à prova de erros. Por isso a célula dispõe de uma série de mecanismos de vigia que se ocupam do monitoramento de cada etapa da progressão do ciclo celular, chamados pontos de verificação ou controles do ponto de verificação (Figura 3). No ponto de checagem G₁ a entrada em S (ou Fases na Figura 3) é bloqueada se o genoma for danificado. No ponto de checagem G₂ a entrada em M é bloqueada se a replicação não é completada. Na

Mitose existe um ponto de checagem (ponto M) durante a anáfase se as cromátides não estão apropriadamente montadas no fuso mitótico. Esse relógio celular utiliza uma subfamília de serina/treonina proteína quinases - as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) para executar as várias etapas do ciclo celular. As ciclinas do tipo D carregam informações sobre os sinais extracelulares mitogênicos ao cerne da maquinaria do ciclo celular, ao passo que as ciclinas remanescentes operam em um programa pré-determinado, uma vez que a decisão de ultrapassar a fase G_1 tenha sido tomada. Muitos tipos de células cancerosas têm um ou mais desses pontos de verificação inativados, o que ajuda a acumular genes mutantes e cariótipos alterados que propulsionam seu crescimento neoplásico. As decisões críticas relativas a crescimento ou quiescência (G_0) são feitas na fase G_1 do ciclo celular. Em células normais, a decisão de crescer e replicar requer sinais do meio externo (daí a dependência dos níveis de ciclinas D nos sinais mitogênicos). Existe um ponto de restrição R (ponto R) que representa um ponto no qual a célula compromete-se, de modo irrevogável, a completar o restante do ciclo celular ou, alternativamente, permanecer em G_1 e possivelmente recuar do ciclo celular ativo para G_0 , o estado de quiescência. A desregulação desse ponto acompanha a formação da maioria dos tipos de células cancerosas, uma vez que ela leva à proliferação celular sem restrições (Weinberg, 2008).

Dentro de quase todas as células dos tecidos, uma proteína denominada p53 assegura que a célula mantenha seus componentes em ordem. Se houver desordem e a proteína p53 assimilar uma gravidade na desordem metabólica ou no genoma, haverá emissão de sinais que desencadeará o suicídio das células, denominado apoptose. A consequência disso é a rápida morte celular. Os organismos tentam bloquear o desenvolvimento de câncer por meio de ações de alarme dessa proteína, a qual poderá fazer com que as células entrem em latência ou apoptose. A p53 em geral retorna rapidamente a níveis normais, a não ser que a célula esteja exposta ao estresse fisiológico (por exemplo: anóxia, dano

ao genoma e desequilíbrios de sinalização na maquinaria reguladora do crescimento celular) ou dano ao DNA (Weinberg, 2008).

A apoptose envolve uma cascata de caspases (grupo de proteases, enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico - *cysteine-aspartic-acid-proteases*), que resulta na destruição de uma célula, geralmente dentro de uma hora. As células cancerosas inventaram numerosas maneiras de inativar a maquinaria apoptótica a fim de sobreviver e se desenvolver (Weinberg, 2008).

Falhas na apoptose são uma das contribuições principais para o desenvolvimento de tumores e doenças autoimunes. Somando-se isto à apoptose indesejada que ocorre na isquemia ou mal de Alzheimer, despertou-se o interesse nas caspases como alvos terapêuticos desde que foram descobertas em meados da década de 90 (Bacskai, 2008).

Mutações em regiões diferentes da proteína p53 podem resultar em diferentes efeitos biológicos. A imunorreatividade nuclear da p53 tem sido considerada um indicador indireto de mutação do gene p53. Suas mutações constituem a anormalidade molecular mais comumente encontrada nos tumores sólidos do homem e são achadas numa alta proporção nos tumores de mama, onde estão associadas a tumores mais agressivos e a um pior prognóstico (Ozbun & Butel 1995; Elledge & Allred 1994).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos. Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G₀. Existem alguns outros tipos de agentes, como os hormonais e os produtos naturais ciclo-celular específicos (Murad & Katz, 1996; Salmon, 1998; Chabner & Calabresi, 1995).

Abaixo são destacadas as relações entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos (Machado, 2000; Chabner & Calabresi, 1995):

1. Agentes ciclo-celular específicos:
 - 1.1. Agentes Antimetabólitos
 - 1.1.1. Análogo do ácido fólico
 - 1.1.2. Antagonistas das pirimidinas
 - 1.1.3. Análogos das purinas e inibidores correlatos
 - 1.2. Agentes Hormonais
 - 1.2.1. Adrenocorticosteróides
 - 1.2.2. Progestinas
 - 1.2.3. Estrogênios
 - 1.2.4. Androgênios
 - 1.2.5. Antiestrogênio
 - 1.2.6. Antiandrogênio
 - 1.2.7. Análogo do hormônio liberador de gonadotrofina
 - 1.2.8. Inibidor da aromatase
 - 1.2.9. Inibidor do hormônio peptídico
 - 1.3. Produtos Naturais
 - 1.3.1. Alcaloides vegetais
 - 1.3.1.1. Alcaloides da vinca
 - 1.3.1.2. Podofilotoxinas (Epipodofilotoxinas)
 - 1.3.1.3. Paclitaxel (Taxol)
 - 1.3.2. Enzimas
2. Agentes ciclo-celular não específicos:
 - 2.1. Produtos Naturais
 - 2.1.1. Antibióticos naturais
 - 2.1.1.1. Antraciclinas
 - 2.1.1.2. Mitomicina
 - 2.1.1.3. Dactinomicina
 - 2.1.1.4. Plicamicina

- 2.1.1.5. Bleomicina
- 2.1.2. Alcaloides pirrolizidínicos
- 2.2. Complexos de Coordenação de Platina
 - 2.2.1. Cisplatina (cis-DDP)
 - 2.2.2. Carboplatina (CBDCA)
- 2.3. Agentes Alquilantes Diversos
 - 2.3.1. Mostardas nitrogenadas
 - 2.3.2. Nitrossuréis
 - 2.3.3. Triazenos
 - 2.3.4. Alquil sulfonatos

Os agentes ciclo-celulares específicos, originados de produtos naturais, são os que mais interessam a esse trabalho.

2.5.6 Agentes Antineoplásicos Originários de Produtos Naturais

Segundo de Almeida *et al.* (2005), entre alguns produtos naturais citotóxicos, usados clinicamente no tratamento de neoplasias, têm-se os alcaloides vegetais (produtos naturais nitrogenados derivados biossinteticamente de aminoácidos) como:

- a) Alcaloides da *Vinca* ou *Catharrantus roseus* (L.) G.Don. (vimblastina e vincristina) (Tabela 2) – possuem ação pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase (Oliveira & Alves, 2002).
- b) Taxanos- Paclitaxel (Tabela 2), éster alcaloide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia* Nutt.) e do teixo europeu (*Taxus baccata* L.) – possuem ação também pela inibição do fuso mitótico, dimerização da tubulina e

estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolimerização, o que o estabiliza resultando no bloqueio da multiplicação celular, e na perda da viabilidade celular (Oliveira & Alves, 2002).

- c) Podofilotoxinas ou epipodofilotoxinas, tendo-se como exemplos principais a etoposida e teniposida (Tabela 2), derivados semissintéticos da podofilotoxina, extraída da raiz do podófilo (*Podophyllum peltatum* L.) - possuem ação pelo bloqueio das células nas fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II, o que promove lesão no DNA (Salmonm, 1998; Oliveira & Alves, 2002; Chabner & Calabresi, 1995).
- d) Camptotecinas (Topotecana e Irinotecana) – Alcaloide extraído do caule da *Camptotheca acuminata* Decne. que atua inibindo seletivamente a enzima nuclear do DNA, a Topoisomerase tipo I (Tabela 2).
- e) Enzimas: Pode-se citar também o uso da enzima asparaginase (L-asparagina amino hidrolase), particularmente em tratamento de leucemia aguda infantil (Machado, 2000; Salmonm, 1998; Oliveira & Alves, 2002; Chabner & Calabresi, 1995), isolada de várias bactérias, que atua pela diminuição catabólica de asparagina sérica, assim como dos níveis sanguíneos de glutamina. Nas células neoplásicas, isto provoca a inibição da síntese de proteínas, resultando no bloqueio da proliferação celular.
- f) Outros agentes derivados de plantas em uso clínico são homoharringtonina isolados a partir da árvore chinesa, *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* (Sieb e Zucc.) (Cephalotaxaceae) (Itokawa *et al.*, 2005), e eliptinium, um derivado da elipticina, isolado de espécies de vários gêneros da família Apocynaceae, incluindo *Bleekeria vitensis* AC Sm., uma planta medicinal de Fiji com reputadas propriedades anticâncer. A mistura racêmica de harringtonina e homoharringtonina (HHT) tem sido utilizada

com sucesso na China para o tratamento de leucemia mielóide aguda e leucemia mielóide crônica. HHT purificada demonstrou eficácia contra vários tipos de leucemias, incluindo algumas resistentes ao tratamento padrão, e foi reportada por produzir completa remissão hematológica em pacientes com doenças crônicas como a leucemia mielóide crônica. Eliptinium é comercializado na França para o tratamento de câncer de mama (Cragg & Newman, 2005b).

A Tabela 2 demonstra um resumo dos principais fármacos anticâncer na atualidade, obtidos de plantas e seus derivados em uso clínico, adaptada de Yagiela *et al.* (2000).

Tabela 2 - Principais fármacos anticâncer em uso clínico obtidos de plantas e seus derivados

Composto Fitoquímico (ano de introdução-referência)	Componente químico	Parte da Planta	Mecanismo de ação	Uso clínico (de Almeida <i>et al.</i> , 2005).
Vimblastina (1965 - FDA)	Alcaloide	Partes aéreas da Vinca ou <i>Catharrantus roseus</i> (L.) G.Don.	Inibe a formação do microtúbulo impedindo a divisão celular na metáfase	Carcinoma de mama, testículo, bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, sarcomas, linfomas e neuroblastoma
Vincristina (1963 – FDA)	Alcaloide	Idem anterior	Idem anterior	Carcinoma de mama, ovário, cabeça e pescoço, cérvix, pulmão, sarcomas, linfomas e leucemia
Paclitaxel (1993 – ARMC29)	Diterpeno: taxano	Casca do <i>Taxus brevifolia</i>	Estabiliza os microtúbulos em sua forma polimerizada causando a morte celular	Carcinoma de mama (avançado)
Docetaxol* (1995 – ARMC 31)	Diterpeno: taxano	Idem anterior	Idem anterior	Câncer de mama avançado (Yagiela <i>et al.</i> , 2000)
Etoposida* (1980 – FDA)	Obtido a partir de lignana	Semissintéticos derivados do extrato da raiz Mandrágora ou <i>Podophylum peltatum</i> L.	Inibe síntese de DNA formando um complexo com Topoisomerase tipo II. Atua principalmente nas fases G2 e S do ciclo celular	Câncer de pulmão e testículo (Silva, 2006) e carcinoma de mama.

Composto	Componente	Parte da Planta	Mecanismo de ação	Uso clínico
Fitoquímico (ano de introdução-referência)	químico e fórmula química			(de Almeida <i>et al.</i> , 2005).
Teniposida* (1967 – FDA)	Obtido a partir de lignana	Idem anterior	Idem anterior	Leucemia linfocítica, neuroblastoma e tumor cerebral em crianças e linfomas não-Hodgkin (Silva, 2006) e carcinoma de mama
Irinotecana* (1994 – ARMC30)	Alcaloide Irinotecana	Caule da <i>Camptotheca acuminata</i>	Inibe seletivamente a enzima nuclear do DNA	Irinotecan: Carcinoma metastático do cólon e reto (Yagiela <i>et al.</i> 2000).
Topotecana (1996 – ARMC32)	Topotecana		Topoisomerase tipo I	Topotecan: Carcinoma metastático do ovário (Yagiela <i>et al.</i> 2000).

FDA-Food and Drug Administration

ARMC (Annual Reports in Medicinal Chemistry) 25, 29, 30, 31 e 32

*Produtos Naturais Derivados de Plantas

Fonte: Wall *et al.*, 1966; de Almeida *et al.*, 2005.; Silva, 2006; Cragg *et al.*, 2009.

2.5.7 Outros Fármacos em Estudo

A ciência da oncologia molecular revelou dúzias de proteínas cujo mau funcionamento contribui para a formação e manutenção do câncer. Entre essas proteínas, estão aquelas cujas propriedades moleculares as tornam alvos atrativos para novos agentes terapêuticos anticâncer, como anticorpos monoclonais ou fármacos de baixo peso molecular. A maioria das proteínas são enzimas que possuem fendas catalíticas em suas estruturas. Devem ser escolhidos alvos proteicos cuja inativação leve ao encerramento da proliferação de células tumorais ou para sua morte por apoptose. Os fármacos anticâncer desenvolvidos com maior sucesso até agora têm sido aqueles que interferem no funcionamento de várias quinases promotoras do crescimento e da sobrevivência, especificamente, da tirosina quinase associada a receptores (Weinberg, 2008). Como exemplo podemos citar o Mesilato de Imatinibe indicado para o tratamento de pacientes adultos com leucemia mielóide crônica (LMC) diagnosticada precocemente. Esse fármaco também é indicado para o tratamento de pacientes adultos com tumores estromais gastrintestinais malignos, não ressecáveis e, ou metastáticos (Bulário de medicamentos, 2011). Esse tumor é um tipo de neoplasia rara que acomete, principalmente, paciente acima de 50 anos, sem distinção por sexo. Entre suas manifestações clínicas, destacam-se anemia, hemorragia gastrintestinal, dor abdominal e massa palpável (Pinto Jr *et al.*, 2003).

Outra família de proteínas quinases muito importante é a C (PKC), sendo que a de mamíferos compreende 10 isoenzimas agrupadas em três classes: convencional (α , γ e, alternativamente, β I e β II), recente (δ , ϵ , η /L, θ) e atípica (ζ , ι / λ). PKC convencional pode ser ativado por cálcio e ésteres de forbol ou diacilglicerol (DAG), enquanto PKC recente só pode ser ativada por ésteres de forbol ou DAG. As PKC atípicas não respondem ao cálcio ou DAG (Griner & Kazanietz, 2007).

As proteínas quinases do tipo C (PKC) compreendem um grupo de proteínas quinases, cuja função e regulação são altamente conservadoras. Quinases são também chamados de fosfotransferases, e elas fosforilam resíduos de serina e treonina de seus substratos e regulam as atividades de células diferentes, incluindo a expressão do gene, a mitose, a movimentação das células, o metabolismo e a morte celular programada (apoptose). PKC estão sujeitas a fosforilação antes de serem ativadas e, tal processo ocorre durante a sua translocação do citosol para a membrana plasmática. Sua ativação e translocação do citosol para a membrana plasmática ocorrem em resposta ao aumento transitório de diacilglicerol (DAG), ou à exposição a agentes exógenos, conhecidos como ésteres de forbol, normalmente presentes nas plantas. Ésteres de forbol são derivados de diterpenos tetracíclicos e parecem estar restritos às famílias Euphorbiaceae e Thymelagaeae. . Esses compostos são frequentemente estudados devido ao seu incentivo de promoção de tumor e ações pró-inflamatórias. Os mecanismos moleculares que regulam a indução de promoção de tumor pelos ésteres de forbol são diferentes dos mecanismos que desencadeiam a atividade anti-inflamatória. O incentivo de promoção parece estar associado com a sua capacidade para substituir DAG na ativação da PKC, e também a sua capacidade de estimular a síntese de RNA e DNA, comportando-se como agentes autogênicos e estimulando o crescimento celular. Quanto à atividade pró-inflamatória, os ésteres de forbol mobilizam fosfolipídios, liberam ácido araquidônico e causam a secreção de prostaglandinas, levando a resposta inflamatória dos tecidos. A aplicação tópica de ésteres de forbol, particularmente TPA (tetradecanoylphorbol-13-acetato), têm contribuído para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com os processos inflamatórios e câncer [US 2011136773 (A1), 2011].

Em função de seu papel essencial no processo de apoptose, proliferação celular, metabolismo do glicogênio, neurotransmissão e oncogênese, a desregulação ou superexpressão de proteínas quinases está associada a

doenças como asma, câncer, desordens cardiovasculares, diabetes, doenças do sistema nervoso central, entre outras (Narayana *et al.* 1999; Koide *et al.*, 1995).

Em 1986, a estaurosporina, isolada do *Streptomyces staurosporeus*, foi identificada como um potente inibidor de PKC, o que aumentou o interesse em inibidores dessas quinases (Tamaoki *et al.*, 1986).

A briostatina 1, uma macrolactona isolada do organismo marinho *Bugula neritina*, é outro conhecido inibidor de PKC (Bridges, 2001).

A maior parte das células expressa a mistura de muitas isoformas de PKC e há grande variedade de tecido para tecido. É muito raro encontrar tecidos que expressem somente uma das isoformas ou em que somente uma delas seja mais ativada em estado de doença. Por isto, a inibição seletiva de PKC não é trivial. O entendimento completo da ação dessas proteínas na comunicação celular ainda é um desafio, devido à grande variedade de quinases que podem ser expressas pelo genoma humano. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos fármacos no tratamento quimioterápico do câncer e a busca por melhores propriedades farmacocinéticas das moléculas preparadas tornam esta área bastante atraente para muitos grupos de pesquisa (Silva *et al.*, 2009).

Apesar dos esforços consideráveis que têm sido investidos na identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento de câncer, os quimioterápicos convencionais continuam sendo as principais opções de tratamento para pacientes com câncer. No entanto, resistência intrínseca e adquirida a esses fármacos antineoplásicos é a principal causa do fracasso da terapia. Entender as bases moleculares da quimiorresistência é fundamental para gerir a doença com êxito. O(s) mecanismo (s) de quimiorresistência é (são) muitas vezes multifatorial. Numerosos estudos têm indicado os membros da família PKC como contribuintes da quimiorresistência. Assim, a via de sinalização dessas proteínas pode ser explorada para superar a quimiorresistência. O envolvimento delas na clássica resistência a múltiplas drogas (RMD), resistência à cisplatina, e resistência à apoptose, pode afetar a sensibilidade das células tumorais à numerosos quimioterápicos. Fica claro que o caminho de sinalização da PKC pode

agir em várias fases a partir da entrada dos medicamentos até a execução da morte celular. Sabe-se também que a falta de apoptose pode contribuir para quimiorresistência e PKC desempenha um papel significativo neste processo. Portanto a terapia do câncer deve ser adaptada para os pacientes individualmente. Mesmo que o alvo da via de sinalização da PKC sozinho possa não ser muito bem sucedido na clínica, a via de sinalização da PKC poderia intervir em combinação com agentes quimioterápicos convencionais que já estão na clínica para combater a quimiorresistência, o problema mais significativo na terapia do câncer (Basu, 2010).

Um marco importante foi a descoberta de que as substâncias promotoras de tumores conhecidas coletivamente como ésteres de forbol são potentes ativadores da PKC. Esses ésteres de forbol, como PMA (forbol ou 12-miristato-13-acetato) são os componentes biologicamente ativos da fitotoxina em seivas da família Euphorbiaceae de plantas tropicais (Toker, 2010).

Castagna *et al.* (1982), informaram que ésteres de forbol ligam-se e ativam a PKC. Isso foi possível pela síntese de versões hidrofílicas destes compostos, como dibutirato forbol, por Driedger & Blumberg (1980). Isso também levou à identificação de alta afinidade de pontos de ligação da PKC que se ligam a ambos os DAG e PMA, sugerindo que, apesar de uma estrutura completamente diferente, ésteres de forbol ativam PKC por mimetismo molecular da DAG. Logo depois, Kraft *et al.* (1982), concluíram que a exposição de células a ésteres de forbol resultou na redistribuição rápida da PKC para a membrana plasmática, levando à ativação enzimática. Durante décadas, esse mecanismo de translocação de membrana serviu como uma efetiva leitura molecular para o estado de ativação de PKC (Violino *et al.*, 2003).

Um mecanismo chave que controla com precisão os níveis da proteína quinase C na célula é o equilíbrio entre fosforilação e desfosforilação da enzima: espécies de enzima que não são fosforiladas serão degradadas. Assim, alterações nos mecanismos que impulsionam a fosforilação ou as reações de desfosforilação afetam os níveis da proteína quinase C. Esses níveis são alterados em diversos

estados fisiopatológicos principalmente do câncer (Griner & Kazanietz 2007), sugerindo que mecanismos que controlem a fosforilação / desfosforilação são potenciais alvos terapêuticos (Newton, 2010).

Pode-se afirmar, finalmente, que enquanto a PKC apresenta o paradigma para os promotores de tumor, algumas PKC de fato funcionam como inibidores de promoção do tumor. Refletindo o papel central da PKC na sinalização celular, as mesmas emergiram como um alvo terapêutico promissor para o câncer com vários ligantes de PKC atualmente em ensaios clínicos (Blumberg *et al.*, 2010).

Outros trabalhos mostraram que essa diversidade de resposta estende-se ainda mais, com os compostos tais como prostratina (12-deoxiforbol 13-acetato) sendo um inibidor de promoção de tumor (Szallasi *et al.* 1993) e a briostatina 1, anteriormente citada, sendo um antagonista de muitas das respostas biológicas induzidas pela PMA, incluindo a promoção de tumor (Blumberg *et al.* 2000; Hennings *et al.* 1987).

Outro novo composto de interesse é o Ingenol 3- angelato também conhecido como PEP005. Ele é um éster diterpênico hidrofóbico isolado a partir da seiva da planta *Euphorbia peplus*, também da Família da Euphorbiaceae. Estudos recentes têm mostrado que PEP005 tem potentes efeitos antineoplásicos contra linhagens celulares *in vitro* e *in vivo*, e o composto está agora entrando em ensaios clínicos de fase II para o tratamento de câncer de pele não melanoma e queratoses actínicas (Ogbourne *et al.*, 2004). PEP005 tem se mostrado um potente ativador da proteína quinase C (PKC), ativando PKC convencionais e PKC recentes abaixo da taxa nano molar (Kedei *et al.*, 2004). Posteriormente foi mostrado que ele é capaz de induzir a apoptose em uma série de linhagens de células leucêmicas, um efeito dependente da expressão e ativação de PKC δ (Hampson *et al.*, 2005).

Aylward *et al.* (2003), relaciona pela primeira vez, em sua patente, que a espécie estudada neste trabalho, *Synadenium grantii*, possa também conter esse composto, assim como outras gêneros da família Euphorbiaceae.

2.6 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae encontra-se hierarquicamente na taxonomia de Lineu, como descrita a seguir:

Reino: Plantae;
Divisão: Magnoliophyta;
Classe: Magnoliopsida;
Ordem: Malpighiales;
Família: Euphorbiaceae.

Euphorbiaceae é uma família complexa e heterogênea consistindo de aproximadamente 322 gêneros e 8900 espécies em todo o mundo. É uma família essencialmente tropical que ocorre em diferentes habitats desde regiões áridas até regiões úmidas dos trópicos. Como resultado, as plantas desta família desenvolveram várias formas adaptativas (Balakrishnan & Chakraborty, 2007).

O nome Euphorbiaceae vem da homenagem feita pelo rei mouro Juba II, em 30 a.C., ao seu médico Euphorbus, o qual descobriu as propriedades medicinais da *Euphorbia resinifera* O. Berg., planta que ainda ocorre naturalmente no norte africano. Podem se apresentar como arbóreas, arbustivas, subarbustos e ervas. As espécies mais conhecidas são: a seringueira (*Hevea sp.*), a mamona (*Ricinus communis* L.) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). As Euphorbiaceae destacam-se como uma das famílias mais importantes economicamente. A seringueira (de onde se extrai o látex usado para a manufatura de borracha natural) é nativa da floresta amazônica, onde gerou o ciclo da borracha até ser cultivada com mais produtividade e custos menores no Sri Lanka e nas florestas do arquipélago malaio. A mamona, nativa da África, é fonte de óleo de rícino, fibras vegetais e compostos químicos usados na medicina, além de óleo lubrificante aplicado em propulsores de ônibus espaciais e foguetes. A mandioca, nativa da América do Sul, é fonte primária de alimento (principalmente de amido)

em boa parte do nordeste brasileiro, e sua farinha é consumida em larga escala em todo o país. Algumas espécies de *Croton* e *Euphorbia* são reputadas como plantas medicinais. Muitas espécies movimentam grandes somas de dinheiro no mercado de plantas ornamentais, como a Poinsetia ou Bico de papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) (Watson & Dallwitz, 1992).

Existem duas espécies pertencentes ao gênero *Euphorbia* muito estudadas contra o câncer, *Euphorbia peplus* L. e *Euphorbia tirucalli* L., que segundo literatura, possuem princípios ativos em comum com a espécie estudada, o *Synadenium grantii*, sendo eles: a) Ingenol 3-angelato (PEP005) (Aylward *et al.*, 2003); b) Eufol (Tabela 4r) e Tirucalol (Tabela 4s) (Nielsen *et al.*, 1979) e c) isômeros de Lanosterol (Pianowski, 2011) (Tabela 4z).

O avelós (*Euphorbia tirucalli* L.) está sendo pesquisado no IIEP (Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa) e pode tornar-se princípio ativo do primeiro medicamento nacional para o tratamento de câncer. O que se sabe é que o avelós age inibindo enzimas relacionadas à multiplicação dos tumores, além de ter potencial anti-inflamatório e analgésico (Sociedade Beneficiente Israelita Brasileira, 2011).

Finalmente, outro gênero desta mesma família utilizado contra o câncer é o *Synadenium*. O gênero *Synadenium* Boiss (Boissier, 1862), pertencente à família Euphorbiaceae, possui mais de 20 espécies (e subespécies), sendo o *Synadenium umbellatum* Pax e o *Synadenium grantii* Hook. f. duas espécies de interesse (Tropicos, 2011).

O *Synadenium umbellatum* foi considerado sinonímia heterótipo de *Synadenium grantii* e homótipo de *Euphorbia pseudograntii* Pax (Eggli, 2002), porém de acordo com três fontes de consulta deste trabalho, essas duas espécies são distintas, portanto serão relatadas separadamente. As três fontes pesquisadas que confirmam esse fato são: 1) IPNI (*The International Plant Names Index*); 2) USDA/GRIN (*United States Department of Agriculture / Germplasm Resources Information Network*) e 3) Tropicos®, sendo que esta última pode ser vista na Tabela 3.

Tabela 3 - Espécies distintas pertencentes ao gênero *Synadenium*

Família	Nome científico	Autor	Referência	Data
Euphorbiaceae	<i>Synadenium</i>	Boiss.	Prodr. 15(2): 187	1862
Euphorbiaceae	<i>Synadenium grantii</i>	Hook. f.	Bot. Mag. t. 5633	1867
Euphorbiaceae	<i>Synadenium umbellatum</i>	Pax	Bot. Jahrb. Syst. 19: 125	1894
Euphorbiaceae	<i>Synadenium umbellatum</i> <i>var. puberulum</i>	N.E. Br.	Fl. Trop. Afr. 6(1): 465	1911

Fonte: adaptada de Tropicicos, 2011.

2.6.1 *Synadenium umbellatum* Pax.

A espécie botânica *Synadenium umbellatum* (Figura 5) conhecida como "avelós-de-folha", "cancerola", "gota milagrosa", etc., encontrada no centro-oeste brasileiro, tem sido utilizada pela população como analgésico, anti-inflamatório e antineoplásico, dentre outras utilizações. É utilizado empiricamente da seguinte forma: 18 gotas do látex em 1 litro de água e conservar em geladeira. Tomar pela manhã, à tarde e à noite, um cálice de licor ou uma xícara de café (Ortêncio, 1997).



Figura 5 - *Synadenium umbellatum*
Fonte: Ortêncio, 1997.

Resultados demonstraram que o extrato etanólico de *S. umbellatum* possui potencial efeito citotóxico e mutagênico, de forma dose-dependente, sobre as células da medula óssea de camundongos, *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Valadares *et al.*, 2007).

Nogueira *et al.* (2008) avaliaram a atividade antitumoral e antiangiogênica *in vitro* e *in vivo* de extratos etanólicos extraído de partes aéreas secas de *Synadenium umbellatum* utilizando linhagens de células de leucemia (K-562) e teste com células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), e observaram diminuição da viabilidade de ambas as linhagens de uma maneira concentração-dependente e uma significativa ação dose-dependente da eficácia antitumoral da planta contra o crescimento do TAE. Os melhores resultados em prolongar a vida foram produzidos até 25 mg/kg de extrato etanólico da planta. Além disso, apresentou atividade sobre a angiogênese do tumor reduzindo os níveis do fator de crescimento endotelial vascular.

Num estudo da avaliação aguda e subaguda do látex e do extrato etanólico (EEF) das folhas, não se observou letalidade nem alterações fisiológicas e comportamentais das ratas Wistar na dose de 2000 mg/kg, sendo praticamente atóxico. Porém, na análise histopatológica, o látex ocasionou congestão e infiltrado leucocitário nos rins, fígado e pulmões, efeitos não observados com o EEF. Na toxicidade subaguda, doses de 50, 100 e 200 mg/kg de EEF administradas por grupo, através de gavagem, diariamente, pela manhã, por 30 dias, não produziram alterações dose-dependentes significativas nos parâmetros laboratoriais e fisiológicos, nem alterações macroscópicas e histopatológicas nos órgãos das ratas (Cunha *et al.*, 2009).

A atividade angiogênica do látex de *S. umbellatum* foi avaliada pelo ensaio da membrana corio-alantóide (MCA) ovo embrionado de galinha. Os resultados mostraram aumento significativo da rede vascular ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo (H_2O). A análise histológica esteve em concordância com os resultados obtidos, concluindo que o látex de *S. umbellatum* exibiu efeito angiogênico (Melo-Reis *et al.*, 2010).

Em outro estudo, os efeitos mutagênico, antimutagênico e citotóxico do látex dessa planta foram investigados pela mensuração da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos. Para avaliar a mutagenicidade, os animais foram tratados com quatro doses do látex (10, 30, 50 e 100 mg/kg). Para o estudo da atividade antimutagênica, os animais foram tratados com o látex e mitomicina C (4 mg/Kg) simultaneamente. A citotoxicidade foi avaliada pela razão de eritrócitos policromáticos e normocromáticos. Os resultados mostraram um aumento significativo da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Na avaliação da atividade antimutagênica do látex, as doses de 10 e 30 mg/kg coadministradas com mitomicina C mostraram uma diminuição significativa na frequência de EPCMN comparada com o grupo controle positivo ($p < 0,05$). Entretanto, não houve redução significativa na frequência de EPCMN ($p > 0,05$) detectada nas doses de 50 e 100 mg/kg. Nessas condições experimentais, os resultados obtidos indicaram forte atividade mutagênica e citotóxica do látex do *S. umbellatum*, com exceção na dose de 10 mg/kg e moderado efeito antimutagênico nas doses mais baixas (Melo-Reis *et al.*, 2011).

Finalmente em outro estudo foram investigados a citotoxicidade e os mecanismos de indução de apoptose de *S. umbellatum* sobre células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), bem como o potencial mielotóxico da planta. Os estudos de citotoxicidade foram realizados por meio dos ensaios de exclusão do azul de tripano e redução do tetrazolium (MTT). Os mecanismos de indução de apoptose celular foram investigados por microscopia de luz e de fluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo e a investigação do potencial mielotóxico foi feita por ensaio clonogênico de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM). Os resultados sugerem que *S. umbellatum* induziu apoptose em células de tumor ascítico de Ehrlich e parece ser mais tóxico para as células tumorais do que para as células da medula óssea normal (da Mota *et al.*, 2011).

2.6.2 *Synadenium grantii* Hook. f.

Autor: Hooker, Joseph Dalton (1817-1911)

Forma padrão: Hook. f.

Publicado em: Botanical Magazine t. 5633. 1867. (Bot. Mag.)

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Rosanae Takht.

Ordem: Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl.

Família: Euphorbiaceae Juss.

Gênero: *Synadenium* Boiss (Tropicos, 2011).

Protólogo: Taxon 55 (2): 414 (2006).

Número de cromossomos: $2n = 36$

Sinonímia: *Euphorbia pseudograntii* Bruyns

Nomes vulgares: leite de arbusto africano (*African Milkbush*), maria-mole, cancerola ou cancerosa, janaúba, etc.

Origem e distribuição geográfica: *Euphorbia pseudograntii* ou *Synadenium grantii* ocorre a partir da Etiópia do Sul ao leste do Congo e Tanzânia, e provavelmente também no Malawi, Zâmbia e Zimbábue (Nicholson, 2008), de acordo com a Figura 6.

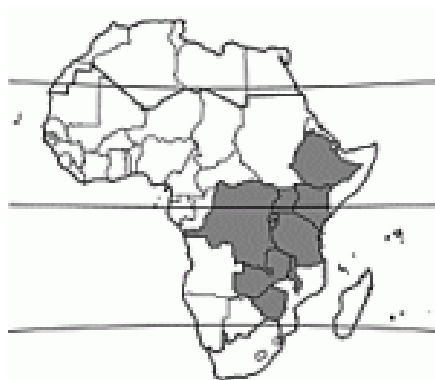


Figura 6 - Origem e distribuição geográfica do *S. grantii*
Fonte: Nicholson, 2008.

2.6.2.1 Descrição botânica macroscópica

Arbusto suculento ou árvore pequena espessa de 5 -10 m de altura, caule cilíndrico, hastes mais velhas tornam-se cinza pálido, com cicatrizes foliares proeminentes em hastes verdes e látex abundante. Folhas dispostas em espiral, simples e completas; estípulas modificadas em pequenas glândulas marrons; pecíolo até 8 mm de comprimento; lâmina elíptica a oblanceolada, até 15 cm x 6-8 cm, base longa cuneada obtusa, ápice curto-acuminado, carnuda, a margem enrolada para baixo, quase glabras, nervura central proeminente abaixo, arredondada, verde ou vermelho, por vezes, tingidas por baixo. Inflorescência em cimeira frouxa axilares, consistindo de cachos de flores; pedúnculo até 5 cm de comprimento, ramos curto-peludos, 1-3 cm de comprimento, vermelho, cada um contendo uma flor feminina rodeada por flores masculinas. Flores unissexuais, sésseis, com flores masculinas bractéolas lineares, com franjas, com as pontas vermelhas, perianto ausente, estame 4 mm de comprimento; flores femininas com pedicelo de até 5 (-9) mm em frutas, ovário superior, estilos densamente curto-peludos (Nicholson, 2008) (Figura 7).



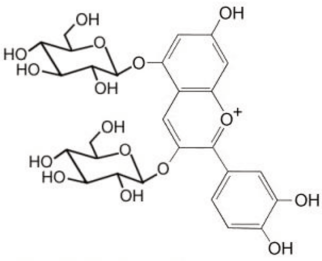
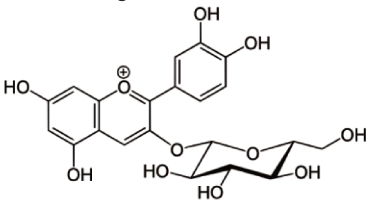
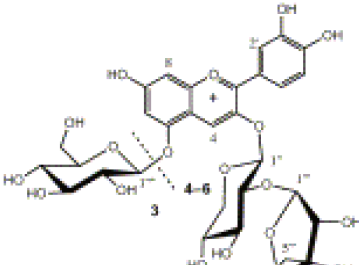
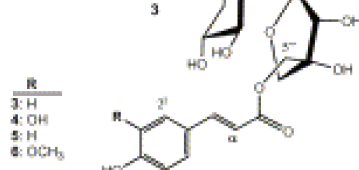
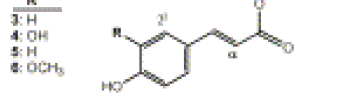

Figura 7 - Fotos do exemplar de *Synadenium grantii* Hook. f. existente no CPQBA / Unicamp (primavera de 2011).

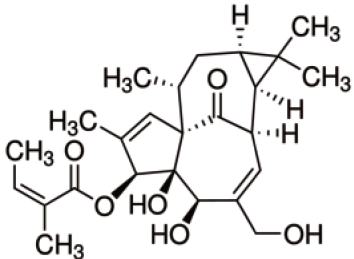
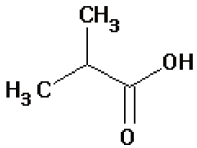
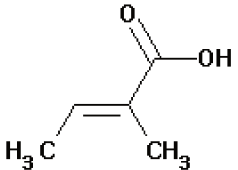
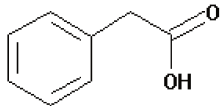
2.6.2.2 Estudos Fitoquímicos

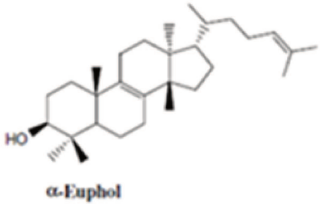
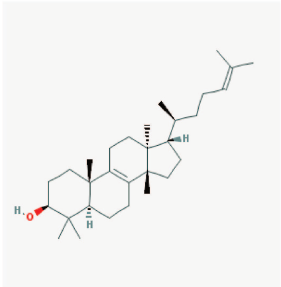
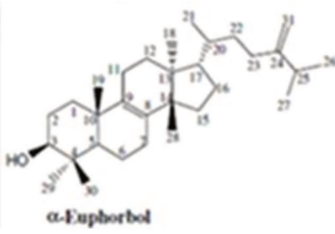
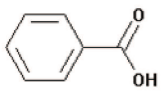
Estudos fitoquímicos desta espécie revelaram a presença de seis antocianinas (Andersen, 2010) (Tabela 4 a, b, c, d, e, f) alcaloide, glicosídeo cianogênico, compostos fenólicos e saponinas (Mahajan & Badgujar, 2008), glicoproteínas (Rajesh *et al.*, 2006), enzimas proteolíticas (Menon *et al.*, 2002), trans e cis poli-isoprenos (Marinho & Monteiro, 2000), ésteres de diterpenos e ácidos isobutírico, tíglico e fenilacético (Bagavathi *et al.*, 1988) (Tabela 4 j, k, l, m, n, o, p) carboxilesterases e colinesterases (Govindappa *et al.*, 1987), triterpenóides: eufol, tirucalol, euforbol; ionol, ácido benzóico, ácido fenilacético (Uzabakiliho *et al.*, 1987) (Tabela 4 r, s, t, u, o), derivados do forbol (12-0-2Z-4E-Octadienoil 4-deoxiforbol-13-acetato e 12-0-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato) (Kinghorn, 1979, 1980; Hickey *et al.*, 1981) (Tabela 4 x, y), isômeros de lanosterol (Nielsen *et al.*, 1979) (Tabela 4z) e lecitinas (Premaratna *et al.*, 1981) também foram detectadas.

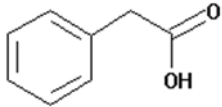
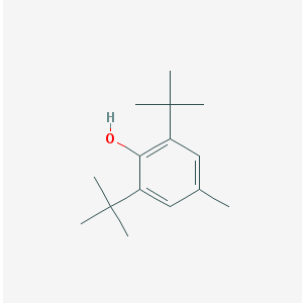
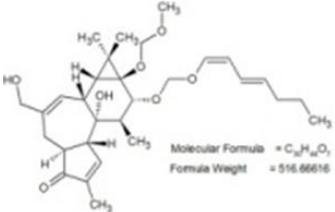
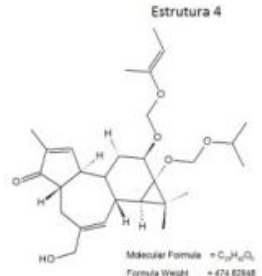
A Tabela 4 resume todos os componentes químicos do *S. grantii* já identificados descritos em literatura, a parte do vegetal estudada, sua fórmula química, a massa molecular e a referência pesquisada.

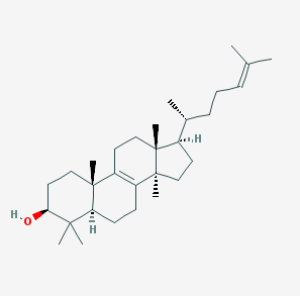
Tabela 4 - Componentes químicos identificados do *S. grantii* descritos em literatura

Parte vegetal	Fórmula estrutural	Nome do componente químico	Massa molecular ou m/z	Referência
Folha	 <p>(1) cianidina 3,5-diglucosídeo</p>	(a)(1) cianidina 3,5-diglucosídeo	(1) 581,1523 m/z	Andersen <i>et al.</i> , 2010
	 <p>(2) cianidina 3-glicosídeo</p>	(b)(2) cianidina 3-glucosídeo	(2) 419,0978 m/z	
	 <p>(3) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-p-coumaroil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)-5-O-b-glucopiranosida</p>	(c)(3) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-p-coumaroil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)-5-O-b-glucopiranosida	(3) 859,2297 m/z	
	 <p>(4) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-caffeoil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)</p>	(d)(4) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-caffeoil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)	(4) 713,1718 m/z	
	 <p>(5) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-p-coumaroil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)</p>	(e)(5) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-p-coumaroil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)	(5) 697,1785 m/z	
	 <p>(6) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-feroil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)</p>	(f)(6) cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-feroil)-b-apiofuranosil)-b-xilopiranosida)	(6) 727,1874 m/z	
Látex		(g) Látex glicoproteína (LGP)	34,4 kDa	Rajesh <i>et al.</i> , 2006

Parte vegetal	Fórmula estrutural	Nome do componente químico	Massa molecular ou m/z	Referência
Látex		(h) Ingenol 3-angelato presente em <i>Euphorbia peplus</i> (PEP005), provavelmente também presente em <i>S. grantii</i> .	430,53386 g/mol	Aylward <i>et al.</i> , 2003
Látex	-	(i) Duas serinas proteases	76±2 kDa	Menon <i>et al.</i> , 2002
Látex		(j) 12,13-diéster do tipo tigliane quimicamente similar ao álcool 4-deoxiforbol (k) 4,20-dideoxi-5α-hidroxforbol, (l) 20-deoxi-5α-hidroxforbol,		Bagavathi <i>et al.</i> , 1988
	(m) ácido isobutírico	(m) ácido isobutírico,	(m) Ácido isobutírico = 88.10512 g/mol	
		(n) ácido tíglico	(n) Ácido tíglico = 100.11582 g/mol	
	(o) ácido fenilacético	(o) ácido fenilacético (p) 4-deoxiforbol-13-(fenilacetato)-12-tiglato.	(o) ácido fenilacético = 136,14792 g/mol	
				

Parte vegetal	Fórmula estrutural	Nome do componente químico	Massa molecular ou m/z	Referência
Látex		(q) Múltiplas formas de carboxilesterases e colinesterases	A enzima consiste de uma cadeia polipeptídica simples com massa molecular igual a 14,000 kDa	Govindappa <i>et al.</i> , 1987
Latex	 <p>α-Euphol</p>	Fração 2b (34%): Triterpenóides tetracíclicos: (r) eufol (59%)	426,7174 g/mol	Uzabakiliho <i>et al.</i> , 1987
		(s) tirucalol		
		(s) tirucalol (33%)		
	 <p>α-Euphorbol</p>	(t) euphorbol (8%)		
Latex		Ácidos aromáticos: (u) ácido benzóico (1,7%),	122,12134 g/mol	Uzabakiliho <i>et al.</i> , 1987

Parte vegetal	Fórmula estrutural	Nome do componente químico	Massa molecular ou m/z	Referência
Latex		(o) ácido fenilacético (36,1%), citado acima	136,14792 g/mol	Uzabakiliho <i>et al.</i> , 1987
Latex		(v) Ionol- 1,3-ditertibutil-2-hidroxi-5-metil-benzeno (4,2%).	220,35046 g/mol	Uzabakiliho <i>et al.</i> , 1987
Latex	 Estrutura 3 Molecular Formula = C ₃₂ H ₄₈ O ₅ Formula Weight = 516.66616	Compostos 3 e 4: (x) (3) 12-O-2Z-4E-Octadienoil 4-deoxiforbol-13-acetato	(3) 516,66616	Hickey <i>et al.</i> , 1981
	 Estrutura 4 Molecular Formula = C ₃₂ H ₄₈ O ₅ Formula Weight = 471.62948	(y) (4) 12-O-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato	(4) 490,62948	
Latex		(y) 12-O-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato		Kinghorn, 1980

Parte vegetal	Fórmula estrutural	Nome do componente químico	Massa molecular ou m/z	Referência
Látex	 <p>(z) Isômeros do lanosterol</p>	Quantidade relativa de esteroides: (r) Eufol = 0,25 (citado acima) (s) Tirucalol = 0,20 (citado acima) (t) Euforbol = 0,10 (citado acima) (z) Isômeros do lanosterol = 0,40	426,7174 g/mol	Nielsen <i>et al.</i> , 1979

Fonte das estruturas químicas: (a) CR Scientific, 2012; (b) Wikipedia, 2012; (h) Sigma-Aldrich Co. LLC, 2012; (m), (n), (o) e (u) Merck-chemicals, 2012; (r) e (t) Mazoir et al., 2008; (s), (v) e (z) National Center for Biotechnology Information, 2012; (x) e (y) Desenho próprio, 2011.

2.6.2.3 Estudos farmacológicos e de toxicidade do *S. grantii*

Dayanand & Krishna (2010) avaliaram a atividade proteolítica total e fibrinolítica *in vitro* do látex de *Synadenium grantii*. Essas atividades foram comparadas às conhecidas enzimas trombolíticas estreptoquinase (100unidades/mL) e papaína (100unidades/mL). A principal característica da enzima purificada foi a estabilidade térmica com temperatura ótima de 50°C; estabilidade alcalina com um pH ótimo 8,0 e completa inibição por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) confirmando a presença de resíduos de serina no local ativo. A atividade específica em látex bruto foi de 15,8, com 82 por cento de atividade fibrinolítica. Da mesma forma, estreptoquinase e papaína possuem atividade específica 45,0 e 40,0, respectivamente (Tabela 5). A estreptoquinase foi considerada como enzima fibrinolítica padrão para comparação, com 92 por cento de atividade fibrinolítica. Embora a papaína tenha potente atividade proteolítica e larga aplicação industrial terapêutica, não mostrou qualquer atividade fibrinolítica.

Tabela 5 - Comparação da atividade proteolítica total e atividade fibrinolítica da enzima do *S. grantii* com papaína e estreptoquinase.

Nº	Fração de enzima	Atividade específica (atividade/mg de proteína)	Atividade fibrinolítica (%)
1	Enzima do látex <i>Synadenium grantii</i>	15,8	82
2	Papaína (100U/mL)	40	-
3	Estreptoquinase (100U/mL)	45	92

Fonte: Dayanand & Krishna, 2010.

Recentemente foi avaliado o potencial moluscicida de 17 espécies vegetais nativas e exóticas consideradas tóxicas, dentre elas o *Synadenium grantii*, frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, com o objetivo de encontrar substâncias nocivas contra moluscos transmissores da esquistossomose. Os resultados mais significativos foram observados para os látex das espécies *Euphorbia milii* var. *beonii* (CL₅₀ = 1,0 ppm), *E. milii* var. *hislopilii* (CL₅₀ = 1,0 ppm) e *Synadenium grantii* (CL₅₀ = 12,8 ppm). A espécie *S. grantii* também apresentou atividade significativa para o extrato alcoólico das folhas (CL₅₀ = 40,0 ppm). Observou-se que a atividade moluscicida pode variar muito nas diferentes partes do mesmo vegetal. A atividade moluscicida da espécie *S. grantii* foi relatada pela primeira vez (Hartmann, 2010).

Estudos do extrato de folhas de *S. grantii* mostraram forte atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas *S. aureus* e *Streptococcus spp.* e gram negativas *E. coli*, *S. dysenterae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. A análise em infravermelho da fração ativa mostra a presença de amins secundárias, grupos amida, CO-NH₂-C-N na vibração do anel. Isso prova sua correlação com o estudo antimicrobiano (Adhav *et al.*, 2010).

Na Argentina, recentemente, foi relatado o caso de uma menina de quatro anos, que manipulou e engoliu parte da planta *Synadenium grantii* que progrediu para a resolução paulatina dos sintomas (Docampo *et al.*, 2010). A toxicidade das espécies de Euphorbiaceae se deve aos ésteres diterpênicos

(tiglianos, dafnanos, ingenanos), responsáveis por lesões nas mucosas (Bruneton, 2001) e pele (Stata, 1996). Como outras plantas da família Euphorbiaceae o *S. grantii* produz um látex, cujo principal princípio tóxico é um éster de 4-deoxiforbol (Bruneton, 2001). Este éster produz, ao ser esfregado na pele ou ingerido, intensa reações locais, tais como: erupção eczematosa que agride os queratinócitos e provoca inflamação, sem desenvolver mecanismos alérgicos (Mássimo, 1999). Progridem com formação de bolhas, angioedema, disfagia que podem persistir por até 24-48h (Spoerke *et al.*, 1985). Por contato ocular produz irritação, conjuntivite, irite e já descreveram úlcera de córnea e cegueira temporal. Os primeiros sintomas, eritema e edema, podem ocorrer em 2-8 h, com formação de vesículas e bolhas com um pico entre 4-12h. A gravidade depende da quantidade de látex da planta e duração do contato. Reações da pele, geralmente desaparecem em 3-4 dias sem cicatriz, mas as bolhas podem demorar vários dias para curar (Klasco, 2010).

Mahajan & Badgujar (2008), realizaram análises em látex obtido a partir de 21 espécies de plantas pertencentes à região Khandesh de Maharashtra, na Índia, para a presença de possíveis metabólitos secundários, ou seja, alcaloides, flavonoides, terpenoides, glicosídeos cianogênicos, fenólicos, taninos e saponinas. Na espécie *S. grantii* foram encontrados alcaloides, glicosídeos cianogênicos, polifenóis e saponinas.

Em outro estudo, foram comprovadas as propriedades de indução e de dissolução de coágulo com o látex de *Calotropis gigantea* R. Br. (Asclepiadaceae), *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae) e *Wrightia tinctoria* R. Br. (Apocynaceae). Estes extratos de látex hidrolisaram a caseína, o fibrinogênio e a fibrina de forma dose-dependente. Eles exibiram atividade pró-coagulante quando analisadas por tempo de recalcificação. No entanto, a atividade de trombina foi restrita à *C. gigantea*. Os valores das atividades fibrinolíticas e fibrinogênica dos extratos foram na ordem crescente de *C. gigantea* > *S. grantii* > *W. tinctoria*. Entre os três, o extrato do látex *C. gigantea* é tóxico com dose mínima hemorrágica > 75 µg, enquanto que *S. grantii* e *W. tinctoria* foram atóxicos e não

induziram qualquer efeito hemorrágico na dose testada (> 200 µg). A dose mínima hemorrágica foi definida como a concentração necessária para induzir uma mancha hemorrágica de 1 cm de diâmetro a partir do local de injeção dos látex nas concentrações de 50- 200 µg . Este estudo forneceu uma provável ação das proteases de plantas com látex para estancar o sangramento e favorecer a cicatrização de feridas, efeito esse já explorado na medicina popular (Rajesh *et al.*, 2007).

Proteases também têm uma importante aplicação na indústria farmacêutica. Extratos de plantas com alto teor de enzimas proteolíticas têm sido usados na medicina tradicional por um longo tempo (Gonzalez-Rabadea *et al.*, 2011). Eles têm sido usados para o tratamento de câncer (Batkin *et al.*, 1988; Targoni *et al.*, 1999), como antitumorais (Guimaraes-Ferreira *et al.*, 2007; Otsuki *et al.*, 2010), para distúrbios de digestão (Kelly, 1996; Mello *et al.*, 2008), e problemas de inchaço e imunomodulação (Leipner *et al.*, 2001; Lotti, 1993; Melis, 1990; Otsuki *et al.*, 2010). Um bom exemplo é a bromelina, derivado do abacaxi, que tem se mostrado capaz de evitar edema, agregação plaquetária e metástase devido à sua capacidade de modificar estruturas de superfície celular por clivagem de peptídeo. Foi relatada a purificação e caracterização de uma glicoproteína do látex (LGP) do *Synadenium grantii* com atividade fibrino (geno) lítica humana. LGP é uma proteína termoestável, mesmo a 80°C. A massa molecular relativa dessa LGP é 34,4 kDa. Essa LGP reduz o tempo de recalcificação de 165 para 30s com plasma humano tratado com citrato. Essa LGP é uma serina protease inibida por PMSF (Rajesh *et al.*, 2006).

Um levantamento cronológico mundial de eventos químicos, biológicos e radionucleares ocorridos entre 1950 e 2005, descreve a revolta de Mau Mau como uma insurreição de rebeldes do Quênia contra a administração colonial inglesa, que começou em 1951. As autoridades britânicas argumentaram que os rebeldes usaram toxinas de plantas na tentativa de matar animais em uma estação missionária, localizada numa área tribal reservada para a tribo Kikuyu (onde é hoje o Quênia). Esta toxina foi provavelmente do látex de *Synadenium*

grantii, também conhecido como leite Africano (ou lápis-cactus), através da inserção do látex em incisões feitas na pele dos animais (Carus, 2002). Thorold (1953) descreveu os efeitos da toxina sobre os animais, especificamente de bois: grandes inchaços edematosos desenvolvidos em 33 bois, dos quais oito morreram (Mohtadi & Murshid, 2005).

Outro levantamento etnofarmacológico, entre junho de 2000 e junho de 2001, revelou que a aplicação tópica do látex de *S. grantii* foi utilizada no tratamento de inflamação de dedo do pé e da mão pelos habitantes de Bulamogi, Uganda (Tabuti *et al.*, 2003).

Duas frações mostrando enzimas proteolíticas foram obtidas a partir do látex de *Synadenium grantii* Hook. f., usando cromatografia de filtração em gel ou de exclusão e técnicas de cromatografia de troca aniônica. Ambas as proteases têm a mesma massa molecular de 76 ± 2 kDa cada. Elas exibem atividade máxima em pH 7,0 e a uma temperatura de 60°C. Exibem estabilidade em uma faixa de pH 5-10 e também são altamente termoestáveis. Inibição irreversível por PMSF indica que são serina proteases. Além disso, resíduos de histidina também parecem desempenhar um papel importante na catálise como evidenciado pela inibição com DEPC (dietilpirocarbonato). Elas também apresentam semelhança em relação ao pH e temperatura ótimos, propriedades cinéticas e estabilidade térmica (Menon *et al.*, 2002).

Em outro estudo, observou-se a propriedade de aglutinação da lecitina purificada da raiz do *Synadenium grantii* ao sangue de pacientes com diferentes tipos de câncer e em pacientes normais. Essa lecitina foi grupo não específico de sangue (preferencialmente grupo O) e sua utilidade como ferramenta de diagnóstico em malignidade foi estudada. Hemaglutinação (unidades/mL) de glóbulos vermelhos de diferentes tipos de câncer foram comparados com as células do controle normal de glóbulos vermelhos. Do total de 113 pacientes com câncer, um grupo de 29 pacientes com câncer de mama mostrou aumento significativo no valor em título ($p < 0,05$) em relação ao controle normal, podendo servir para auxiliar no diagnóstico do câncer de mama (Durgawale *et al.*, 2001).

Em virtude de suas capacidades de ligação, as lecitinas estão envolvidas em diversos mecanismos, tais como endocitose, translocação intracelular de glicoproteínas, regulação celular, migração e adesão, fagocitose e da ligação de micro-organismos para células hospedeiras (Sharon & Lis, 1993). Muitas lecitinas galactose-específicas têm sido isoladas a partir de plantas. Uma fonte especialmente rica de tais lecitinas é o látex dos membros da Euphorbiaceae dentre eles o *Synadenium grantii* (Premaratna *et al.*, 1981).

A fitoterapia tradicional da população da área de Bushi, da República Democrática do Congo, foi revisada de 1980-90. Um novo recorde de 170 espécies de plantas medicinais representando 139 gêneros e 68 famílias foi feita. Detalhes sobre a preparação e administração de drogas vegetais foram dados. “O látex da folha *Synadenium grantii* Hook. f. é aplicado localmente sobre verrugas. Duas gotas do suco espremido das cascas do caule esmagado são instiladas em cada orelha para tratar a otite. Para acalmar a tosse é indicado para lambr o pó seco de hastes jovens misturado com sal. Além disso, o látex da casca do caule e folhas é usado pelas meninas para tatuagem” (Kusamba Chifundera, 2001).

A partir do látex de *Synadenium grantii* Hook. f. também foram isolados, por métodos cromatográficos, alguns diterpenos: 12,13-diéster do tipo tiglane quimicamente similar ao álcool 4-deoxiforbol, 4,20-dideoxi-5 α -hidroxiforbol, 20-deoxi-5 α -hidroxiforbol e 4-deoxiforbol-13-(fenilacetato)-12-tiglato. Destes, o 4-deoxiforbol-13-(fenilacetato)-12-tiglato provou ser altamente irritante ao ouvido de ratos, enquanto os outros ésteres tinham baixa ou nenhuma atividade irritante; ele também foi analisado na atividade promotora de tumor e provou ser quase inativo (Bagavathi *et al.*, 1988), conforme Tabela 4 (j, k, l e p).

Análises quantitativas e qualitativas foram realizadas no látex de quatro espécies da família Euphorbiaceae de ocorrência natural no leste da África. A borracha (unidades cis-1, 4) foi o único poliisopreno detectado nos látex. No entanto grande diferença nos níveis de borracha foi observada entre as espécies e a origem do látex. Ceras, cetonas de cadeia longa, principalmente, foram os constituintes minoritários. Devido às grandes variações de solubilidade,

provavelmente relacionada às diferenças na massa molecular média da borracha (máximo no *Synadenium grantii* e mínimo na *Euphorbia grantii*), a borracha foi mais ou menos eficientemente separada das ceras contaminantes no extrato em diclorometano. Produtos solúveis em acetona (resinas) são os principais constituintes dos látex e, principalmente, compreendem compostos insaponificáveis. No caso de *S. grantii* o extrato de acetona foi dominado por compostos triterpenóides (cetonas, álcoois, polifuncionais), com o eufol, tirucalol e euforbol como principais constituintes (Tabela 4 r, s, t). Esses dados corroboram com outro estudo que reportou a ocorrência de dois isômeros do lanosterol no látex do *S. grantii*, com espectros de massas idênticos em Cromatografia Gasosa (CG), apenas diferenciados pelo tempo de retenção (Nielsen *et al.*, 1979). O látex também contém pequenas quantidades de n-alcenos, cuja distribuição difere muito dos hidrocarbonetos cuticulares (formados nas células epidermais). A fração saponificável do extrato de acetona contém n-ácidos graxos e ácidos aromáticos. Ionol, um antioxidante que pode desempenhar um papel importante na estabilização do látex do *S. grantii*, também foi detectado (Uzabakiliho *et al.*, 1987), conforme Tabela 4(v).

O látex de *Synadenium grantii* possui atividade esterolítica. Estudos eletroforéticos em gel de poliacrilamida combinada com substrato e estudos de especificidade inibidora revelaram a presença de múltiplas formas de carboxilesterases e colinesterases em seu látex. Uma das carboxilesterases do látex purificada é composta por uma única cadeia polipeptídica com uma massa molecular de 14.000 Da. A análise de aminoácidos da enzima revelou que ela contém um maior número de resíduos de aminoácidos neutros e ácidos, em comparação com os básicos. O pH isoelétrico encontrado foi de 4,0. A enzima foi definida como uma glicoproteína, como revelado pela técnica de coloração pelo ácido periódico de Schiff. Estudos com diferentes inibidores organofosforados e carbamatos mostraram que esta enzima foi sensível aos organofosforados. Os estudos de inibição de produtos com esta enzima mostraram inibição competitiva

linear com acetato e inibição não competitiva linear com 1-naftol (Govindappa *et al.*, 1987).

Carboxilesterases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases que catalisam a hidrólise de vários tipos de ésteres tanto os endógenos como os exógenos. Elas são amplamente distribuídas na natureza, encontrada em animais, plantas e microrganismos (Chandrashekharaiyah *et al.*, 2011). Elas ocorrem em múltiplas formas moleculares e apresentam um número de características únicas, tais como especificidade ao substrato, especificidade de região e especificidade quiral (Jung *et al.*, 2003).

Em outro estudo foi feita a aplicação de um procedimento de triagem, que utiliza o efeito sinérgico de ácidos graxos e ésteres de diterpenos de cadeia curta, capazes de promover tumor, permitindo a detecção rápida e fácil de substâncias ambientais com potência de ativação de tumor pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Mais de 500 amostras foram testadas e mais de 30 substâncias com tais atividades foram identificadas. A maioria, senão todos são ésteres de diterpenos derivados de plantas das famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae e alguns foram alcaloides indólicos de origem microbiana. Tentou-se ligar esses achados laboratoriais com os estudos de campo epidemiológico sobre as três doenças associadas a vírus: linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo e linfoma e leucemia de células T do adulto, que são conhecidos por ter uma distribuição geográfica peculiar. As substâncias promotoras de EBV e tumor podem estar em abundância nas áreas onde tais doenças são endêmicas. Percebeu-se que muitos ativos de plantas contendo ésteres de diterpenos são amplamente utilizados como medicamentos fitoterápicos na África e na China. Os ésteres de diterpenos ativos foram purificados e seus possíveis mecanismos foram estudados do ponto de vista de ligação aos receptores, ativação de proteína quinase C e sinalização transmembrana. A espécie *S. grantii* foi considerada como tendo atividade relativa de indução de EBV igual a 0,8, comparada ao óleo da semente de *Croton tiglium* igual a 1,0 (Ito *et al.*, 1983).

Nove compostos, com base em quatro esqueletos policíclicos de diterpenos biogeneticamente relacionados foram submetidos ao teste de contato aberto e fechado em voluntários humanos. Apenas três compostos 12-O-2Z-4E-octadienoil-4-deoxiforbol-13-acetato, 12-O-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutimato e dafnetoxina, produziram toxicidade dermatológica em testes nas doses utilizadas, sendo os dois primeiros presentes no *S. grantii*. Sinais inflamatórios e sintomas para os vários compostos em testes persistiram por mais de quatro dias em teste de contato aberto e por uma semana ou mais após a aplicação em testes de contato fechado. Neste estudo, Hickey *et al.* (1981), isolaram os dois primeiros compostos acima citados de *Euphorbia tirucalli* L. e *Synadenium grantii* Hook. f., conforme citados na Tabela 4(x, z).

Kinghorn (1980) identificou esse irritante da pele, 12-O-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato presente no látex de *Synadenium grantii* Hook. f. A identidade do álcool de diterpeno e as posições relativas dos grupos de esterificação foram estabelecidas por análise espectral e experimentos conduziram à hidrólise e acetilação do composto, que foi identificado como derivado de forbol, o primeiro a ser relatado a partir do gênero *Synadenium* (Kinghorn, 1980) conforme Tabela 4(y).

Pelo menos sete espécies (*Chrozophoraplicata*, *Jatropha gossypifolia*, *Ricinus communis*, *Tragiainvolucrata*, *Trewianudiflora*, *Acalypha hispida*, *Synadenium grantii*) da família Euphorbiaceae mostraram atividade enzimática oxidante (Fu & Robinson, 1970).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar e identificar a atividade antiproliferativa *in vitro* do látex, extrato bruto e frações de *Synadenium grantii* Hook. f. em células tumorais humanas.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Obter os extratos brutos de diferentes polaridades por extração a frio das folhas frescas através de maceração dinâmica e suas frações por métodos cromatográficos clássicos;
- b) Empregar métodos cromatográficos para monitorar as separações;
- c) Estudar a atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais humanas do látex, dos extratos brutos e das frações obtidas a partir de folhas frescas e do látex de *Synadenium grantii* Hook. f.
- d) Avaliar como a técnica de microencapsulação por atomização pode contribuir para a estabilidade do extrato bruto e de frações obtidas desta espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Drogas e Reagentes

Penicilina/ Estreptomicina (Vitrocell[®]), doxorrubicina (Eurofarma[®]), sulforrodamina B (Sigma[®]), meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]), dimetilsulfóxido - DMSO (Merk[®]), ácido tricloroacético (TCA- Merk[®]), trizma base (Sigma[®]), ácido acético (Synth[®]), água destilada, diclorometano (Synth[®]), metanol (Synth[®]), etanol (Chemco[®]), solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído [50:1:0,5]) e n-hexano (Synth[®]). Todos os reagentes utilizados foram grau P.A.

4.1.2 Material Vegetal

Foram coletadas amostras em três localidades distintas da espécie *Synadenium grantii* Hook. f. (Figura 8):

- a) Partes aéreas proveniente da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA-UNICAMP sob responsabilidade da curadora Dra. Glyn Mara Figueira, e depositada nesta coleção sob o número de exsicata 1327, coletada no dia 18/11/2010.
- b) Partes aéreas proveniente de Espírito Santo do Pinhal- SP, coletadas no dia 14/03/2011, dois exemplar diferentes, um com flor (CF1) e outro sem flor (SF2), cuja identificação botânica foi confirmada pelo Dr. Luís Carlos Bernacci do Instituto Agrônômico de Campinas-SP.
- c) Partes aéreas proveniente de Mogi-Mirim-SP, identificada por comparação à exsicata 1327 com data da coleta 09/05/11.



Figura 8 - Foto de *S. grantii* florida do CPQBA/UNICAMP

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos extratos

As folhas frescas de *S. grantii* Hook. f. foram coletadas no CPQBA-UNICAMP e imediatamente trituradas em gelo seco em liquidificador industrial Poli LS-06. O material foi extraído utilizando-se diclorometano como solvente extrator, três vezes, em períodos de duas horas cada, na proporção de 5:1 (solvente: material vegetal), em agitador oscilatório, à temperatura ambiente. O extrato foi seco sobre Na_2SO_4 anidro, filtrado em funil de Büchner e concentrado, sob vácuo, em rotaevaporador Buchi RE 215 à temperatura máxima de 40°C.

O resíduo vegetal da extração com diclorometano foi re-extraído com etanol, de modo análogo à extração anterior. Por último o resíduo dessa segunda extração foi retomado em água. Logo após cada extração foi feita a filtração do extrato e a evaporação do solvente em rotaevaporador, conforme Figura 9, com exceção do extrato aquoso que foi evaporado em liofilizador Virtis modelo 8 litros.



Figura 9 - Foto ilustrativa dos equipamentos e vidrarias utilizados durante o processo extrativo: (A) Liquidificador industrial Poli LS-06; (B) Agitador oscilatório e (C) Rotaevaporador Buchi RE 215.

Um segundo método de extração foi realizado com as folhas frescas dos exemplares com flor e sem flor coletados em Espírito Santo do Pinhal. O exemplar com flor (CF1) e o exemplar sem flor (SF2) foram, separadamente, coletados, pesados e cortados com o auxílio de tesoura, imediatamente imersos em diclorometano e trazidos para o laboratório. Após chegar ao laboratório foi feita a extração a frio sob agitação por 2 horas, três vezes em cada líquido extrator (diclorometano, etanol e água sequencialmente) como citado anteriormente com o exemplar do CPQBA-UNICAMP.

Já o exemplar recebido de Mogi-Mirim (galhos e folhas- parte aérea) foi congelado de um dia para o outro, triturado em liquidificador industrial Poli LS-06. A primeira extração foi feita em maceração dinâmica em diclorometano durante 2 horas por uma vez. Depois foi realizada a extração por turbilhonamento ou turbólise (no aparelho de Marca Polytron – Dispensor Extratur[®] Modelo Quimis) três vezes por 3 min. para cada solvente para melhor trituração dos galhos e estruturas mais rígidas da planta. A sequência de solventes foi mantida a mesma, primeiro diclorometano, depois etanol e por último a água. Após cada extração foi feita a filtração a vácuo e posterior secagem do extrato por rotaevaporação, com exceção do extrato aquoso que foi evaporado em liofilizador Virtis modelo 8 litros.

Por último a extração do látex foi feita após secção da folha e coleta deste látex em eppendorf para posterior avaliação da atividade antiproliferativa do látex.

Foi realizada uma triagem fitoquímica com reagentes específicos para os grupos químicos com os extratos brutos diclorometânico, etanólico e aquoso e com as frações obtidas no primeiro fracionamento FA, FB, FC, FD, FE, FF e ponto de partida do extrato bruto diclorometânico (PP), a saber:

- a) Solução de Anisaldeído: Solução de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5): Identificação de açúcar, esteroides e terpenos.
Resultado : é considerado um revelador universal.
- b) Cloreto férrico: Identificação de polifenóis, sugestivo para taninos.
Resultado positivo: Coloração azul ou verde azulada (Simões *et al.* 2004).
- c) Dragendorff: Identificação de alcaloides e compostos nitrogenados heterocíclicos.
Resultado positivo: Formação de complexos insolúveis (precipitados ou manchas) de cor alaranjada (Simões *et al.*, 2004).
- d) Hidróxido de amônia 5%: Identificação de Cumarinas
Resultado positivo: As cumarinas em solução alcalina desenvolvem cor amarela devido ao rompimento do anel lactônico (Simões *et al.*, 2004).
- e) Solução de NP-PEG: (difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol). Identificação de compostos fenólicos (flavonoides).

Resultado positivo: Na luz ultravioleta (250 nm), glicosídeos de flavonas mostram coloração verde escuro e os glicosídeos de flavonol coloração alaranjada ou amarela (Dourado, 2008).

- f) DPPH: Solução de Difenil-picril-hidrazil 0,2% em metanol eluído em solução de BAW (Butanol: Água: Ácido acético, 40: 50: 10).

Identificação: Atividade antioxidante de radicais livres

Resultado positivo: O DPPH é um radical cromóforo, dessa forma, ele pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente. Possui coloração violeta intenso e quando aplicado em placa cromatográfica na forma de solução alcoólica, adquire coloração amarelo ouro característica em presença de substâncias com atividade antioxidante, não apresentando alteração de cor na ausência destas (Conforti *et al.*, 2002).

Foram utilizados diferentes gradientes de concentração para obtenção das frações resultantes dos vários fracionamentos:

- No fracionamento I os gradientes seguiram as concentrações especificadas na Tabela 6.
- No fracionamento II os gradientes seguiram as concentrações especificadas na Tabela 7.
- No fracionamento IIIb os gradientes seguiram as concentrações especificadas na Tabela 8.
- No fracionamento IV os gradientes seguiram as concentrações especificadas na Tabela 9.
- No fracionamento V os gradientes seguiram as concentrações especificadas na Tabela 10.

Tabela 6 - Diferentes gradientes de solventes com n-hexano, diclorometano e metano utilizados no fracionamento I

Frasco	Hexano (mL)	Diclorometano (mL)	Metanol (mL)
1	10,0	0	0
2	5,0	5,0	0
3	2,5	7,5	0
4	2,0	8,0	0
5	8,5	1,5	0
6	1,0	9,0	0
7	0,5	9,5	0
8	0	10,0	0
9	0	9,9	0,1
10	0	9,8	0,2
11	0	9,7	0,3
12	0	9,6	0,4
13	0	9,5	0,5
14	0	9,4	0,6
15	0	9,3	0,7
16	0	9,2	0,8
17	0	9,1	0,9
18	0	9,0	1,0
19	0	8,9	1,1
20	0	8,8	1,2
21	0	8,7	1,3
22	0	8,6	1,4
23	0	8,5	1,5
24	0	8,4	1,6
25	0	8,3	1,7
26	0	8,2	1,8
27	0	8,1	1,9
28	0	8,0	2,0
29	0	7,9	2,1
30	0	7,8	2,2
31	0	7,7	2,3
32	0	7,6	2,4
33	0	7,5	2,5
34	0	7,4	2,6
35	0	7,3	2,7
36	0	7,2	2,8
37	0	7,1	2,9
38	0	7,0	3,0
39	0	6,9	3,1
40	0	6,8	3,2
41	0	6,7	3,3
42	0	6,6	3,4
43	0	6,5	3,5
44	0	6,4	3,6
45	0	6,3	3,7
46	0	6,2	3,8
47	0	6,1	3,9
48	0	6,0	4,0

Tabela 7- Gradientes de n-hexano, diclorometano e metanol utilizados no fracionamento II

Frasco	Hexano (mL)	Diclorometano (mL)	Metanol (mL)
1	50,0	0	0
2	25,0	25,0	0
3	12,5	37,5	0
4	10,0	40,0	0
5	7,5	42,5	0
6	5,0	45,0	0
7	2,5	47,5	0
8	0	50,0	0
9	0	49,95	0,05
10	0	49,90	0,10
11	0	49,85	0,15
12	0	49,80	0,20
13	0	49,75	0,25
14	0	49,70	0,30
15	0	49,65	0,35
16	0	49,60	0,40
17	0	49,55	0,45
18	0	49,50	0,50
19	0	49,45	0,55
20	0	49,40	0,60
21	0	49,35	0,65
22	0	49,30	0,70
23	0	49,25	0,75
24	0	49,20	0,80
25	0	49,15	0,85
26	0	49,10	0,90
27	0	49,05	0,95
28	0	49,00	1,00

Tabela 8 - Diferentes gradientes de concentração de solventes: n-hexano, diclorometano e metanol utilizados no fracionamento IIIb

Frasco	Hexano (mL)	Diclorometano (mL)	Metanol (mL)
1	150	0	0
2	75	75	0
3	37,5	112,5	0
4	30	120	0
5	22,5	127,5	0
6	15	135	0
7	7,5	142,5	0
8	0	150	0
9	0	149,85	0,15
10	0	149,7	0,30
11	0	149,55	0,45
12	0	149,4	0,6
13	0	149,25	0,75
14	0	149,1	0,9
15	0	148,95	1,05

Tabela 9 - Diferentes gradientes de concentração de solventes: n-hexano, diclorometano e metanol utilizados no fracionamento IV

Frasco	Hexano (mL)	Diclorometano (mL)	Metanol (mL)
1	50	0	0
2	47,5	2,5	0
3	45	5	0
4	42,5	7,5	0
5	40	10	0
6	37,5	12,5	0
7	35	15	0
8	32,5	17,5	0
9	30	20	0
10	27,5	22,5	0
11	25	25	0
12	22,5	27,5	0
13	20	30	0
14	17,5	32,5	0
15	15	35	0
16	12,5	37,5	0
17	10	40	0
18	7,5	42,5	0
19	5	45	0
20	2,5	47,5	0
21	0	50	0
22	0	49,75	0,25
23	0	49,5	0,5
24	0	49,25	0,75
25	0	49	1
26	0	48,75	1,25
27	0	48,5	1,5
28	0	48,25	1,75
29	0	48	2
30	0	47,75	2,25
31	0	47,5	2,5
32	0	47,25	2,75
33	0	47	3,0

Tabela 10- Diferentes gradientes de concentração de solventes: n-hexano, diclorometano e metanol, para realizar o fracionamento V.

Frasco	Hexano (mL)	Diclorometano (mL)	Metanol (mL)
1	50	0	0
2	25	25	0
3	20	30	0
4	15	35	0
5	10	40	0
6	5	45	0
7	0	50	0
8	0	49,95	0,05
9	0	49,9	0,1
10	0	49,85	0,15
11	0	49,80	0,2
12	0	49,75	0,25
13	0	49,70	0,3
14	0	49,65	0,35
15	0	49,60	0,4

4.2.2 Métodos Cromatográficos

4.2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em Cromatofolhas de Alumínio CCF-C/25, Silicagel 60 F254, 20x20 cm (artigo Merck® 105554).

Como fase móvel foi utilizada uma mistura de diclorometano / metanol, na proporção 97:3 (v/v). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada UV, a 264 e 365 nm (Câmara UV Marca Solab), com posterior pulverização com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído, 50:1:0,5), seguida de aquecimento a 100°C, por 10 minutos, em estufa *Precision GCA Corporation*.

4.2.2.2 Cromatografia em Coluna Filtrante

As cromatografias em coluna filtrante foram efetuadas em suporte de vidro recheado com Silicagel 60 (Merck, 0,063- 0,200 mm), com diâmetros variados dependendo da massa de amostra. Foi utilizada a proporção de 1 parte de amostra / 3 partes de Silicagel para a montagem da coluna (1:3) (Coluna Filtrante) (Figura 10a) (Collins *et al.*, 2006). Como fases móveis foram usadas gradientes de n-hexano, diclorometano e metanol. O gradiente de solventes foi aumentando de acordo com o perfil das frações monitoradas por CCD.

4.2.2.3 Cromatografia em Coluna Clássica

As cromatografias em coluna clássica foram efetuadas em suporte de vidro, com diâmetros variando de acordo com a massa de amostra, recheado com Silicagel 60[®] (Merck, 0,063-0,200 mm) numa proporção variando de 1:30 até 1:100 (amostra: silicagel) (Figura 10b). Foram utilizadas, como fase móvel, gradientes de n- hexano, diclorometano e metanol.



(a)



(b)

Figura 10- (a) Foto ilustrativa da coluna filtrante e (b) da coluna clássica.

4.2.2.4 Análise Qualitativa e Quantitativa Por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas CG-EM

As amostras (aproximadamente 30 mg. mL⁻¹) solubilizadas em 1 mL de acetato de etila ou metanol foram analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 6890, série II, acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett Packard 5975, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, HP-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250°C, temperatura do detector: 300°C, programa de temperatura da coluna: 110°C, 5°C/min, 280°C, 26 min, com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra), gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min (Figura 11).



Figura 11 - Foto ilustrativa do aparelho utilizado na análise qualitativa CG/EM (HP6890/HP5975)

4.2.3 Análise Qualitativa em Espectrômetro de Massas

As amostras (aproximadamente 30 mg. mL⁻¹) foram dissolvidas em 1 mL de metanol. A partir destas soluções foi tomada uma alíquota de 10 µL que foi diluída em 1 mL de metanol / água (1:1) (v:v) com 0,1% de ácido fórmico. O tempo total para a aquisição foi fixado em 1 minuto. Espectros ESI-MS e ESI-MS/MS foram adquiridos no modo positivo, em equipamento QToF Micromass (Manchester - UK) ESI - Configuração QqToF. As condições de operação do equipamento

foram: tensão capilar: 3,5 kV, temperatura da fonte: 100 ° C, temperatura de dessolvatação: 100 ° C e tensão do cone: 35 V. As amostras diluídas foram infundidas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus), com um fluxo contínuo de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de varredura completa foram adquiridos na faixa de 100 - 1000 m/z e os espectros ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de colisão de 10-30 eV de m/z 50 até m/z do íon em estudo (Cabral, 2010).

4.2.4 Avaliação Farmacológica

4.2.4.1 Atividade Antiproliferativa *in vitro*

A atividade antiproliferativa foi avaliada utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (Monks *et al.*, 1991). Foram empregadas dez linhagens de células tumorais humanas (Tabela 11). Estas linhagens são mantidas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA, e foram cedidas pelo NCI (*National Cancer Institute- USA*). As linhagens são mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm^3 (Nunc[®]) com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco[®]), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida, com 5% de CO_2 .

Foram inoculados 100 μL /compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc[®]), de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ em meio RPMI/SFB (*Roswell Park Memorial Institute / Soro fetal bovino*). Após 24h de incubação, a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , foram adicionados 100 μL /compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 12).

Para o preparo das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 μL dessa solução mãe foram dispersos em 950 μL de meio RPMI/5% SFB, para o preparo

da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para o preparo das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração final de DMSO não interferiu no crescimento celular.

Tabela 11 - Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa

Linhagem	Órgão/Doença	Morfologia
UACC-62	Pele; melanoma	Fibroblástica
U251	Glioma (SNC)	Epitelial
NCI-ADR/RES*	Ovário; adenocarcinoma	Epitelial
786-O	Rim; adenocarcinoma	Epitelial
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo células não pequenas	Epitelial
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Epitelial
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Epitelial
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Epitelial
K562	Medula óssea; Leucemia	Linfoblástica
MCF-7	Mama; adenocarcinoma	Epitelial
Aca	Queratinócito Humano Normal	Epitelial

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina. Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T_0 , que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 μL /compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1 h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com 50 μL /compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvidas em ácido acético 1%, e mantidas por 60 min., a 4°C; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10 μM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorvância para cada concentração de cada amostra, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se $T \leq T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorvância da célula tratada - absorvância da amostra sem célula.

T_1 = absorvância do branco de células.

T_0 = absorvância do controle de células na placa T_0 .

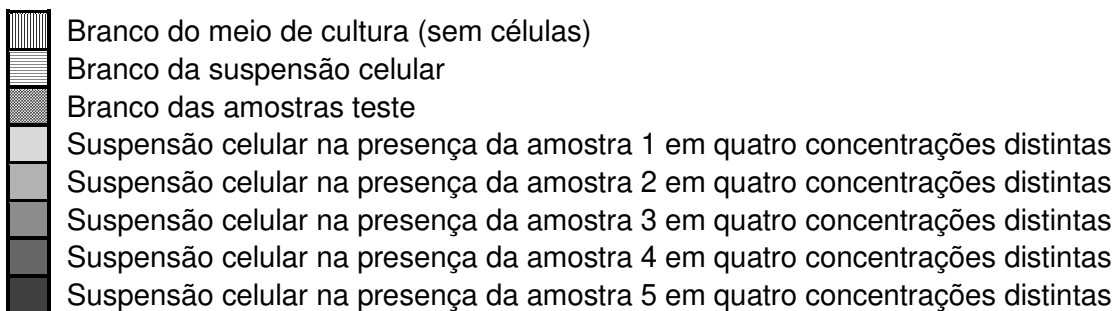
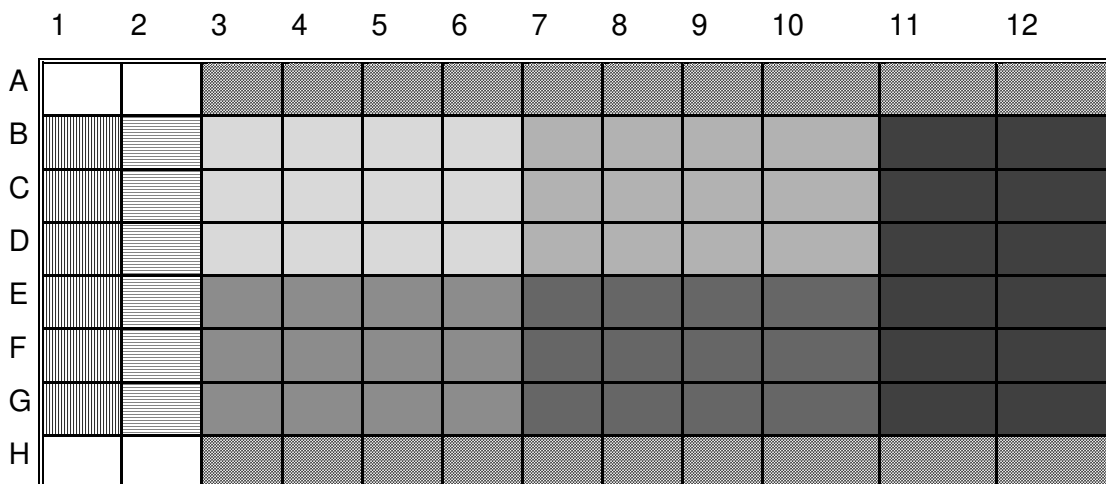


Figura 12 - Esquema demonstrativo da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste.

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada. A concentração efetiva denominada TGI (*Total Growth Inhibition*) que representa a concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular (Shoemaker, 2006), foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin[®], versão 7.5.

5 RESULTADOS

5.1 Estudos fitoquímicos e farmacológicos

O fluxograma abaixo resume todos os passos de obtenção dos extratos brutos e fracionamento das frações ativas a partir das folhas de *S. grantii* (Figura 13a e 13b).

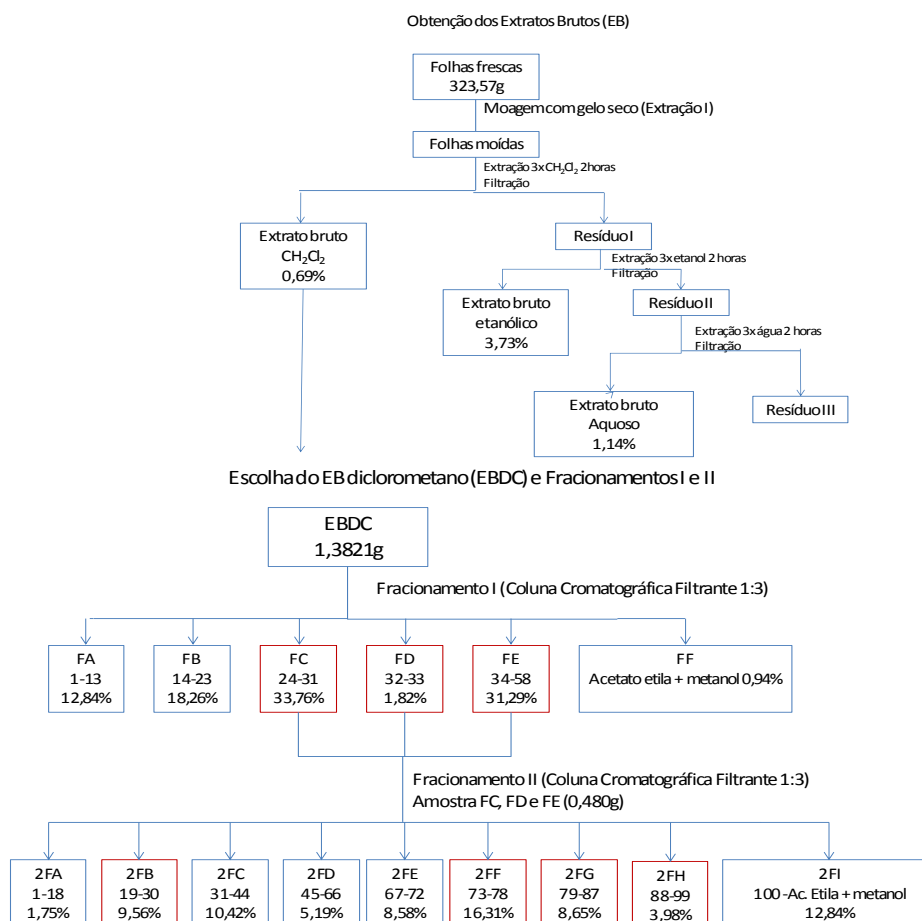


Figura 13a-

Fluxograma de todos os passos de obtenção dos extratos brutos e fracionamentos das frações ativas a partir das folhas de *S. grantii* do exemplar do CPQBA, destacando-se em vermelho as frações avaliadas e escolhidas pela atividade antiproliferativa *in vitro* e cromatografias (CCD, CG/EM e Espectrometria de Massas)

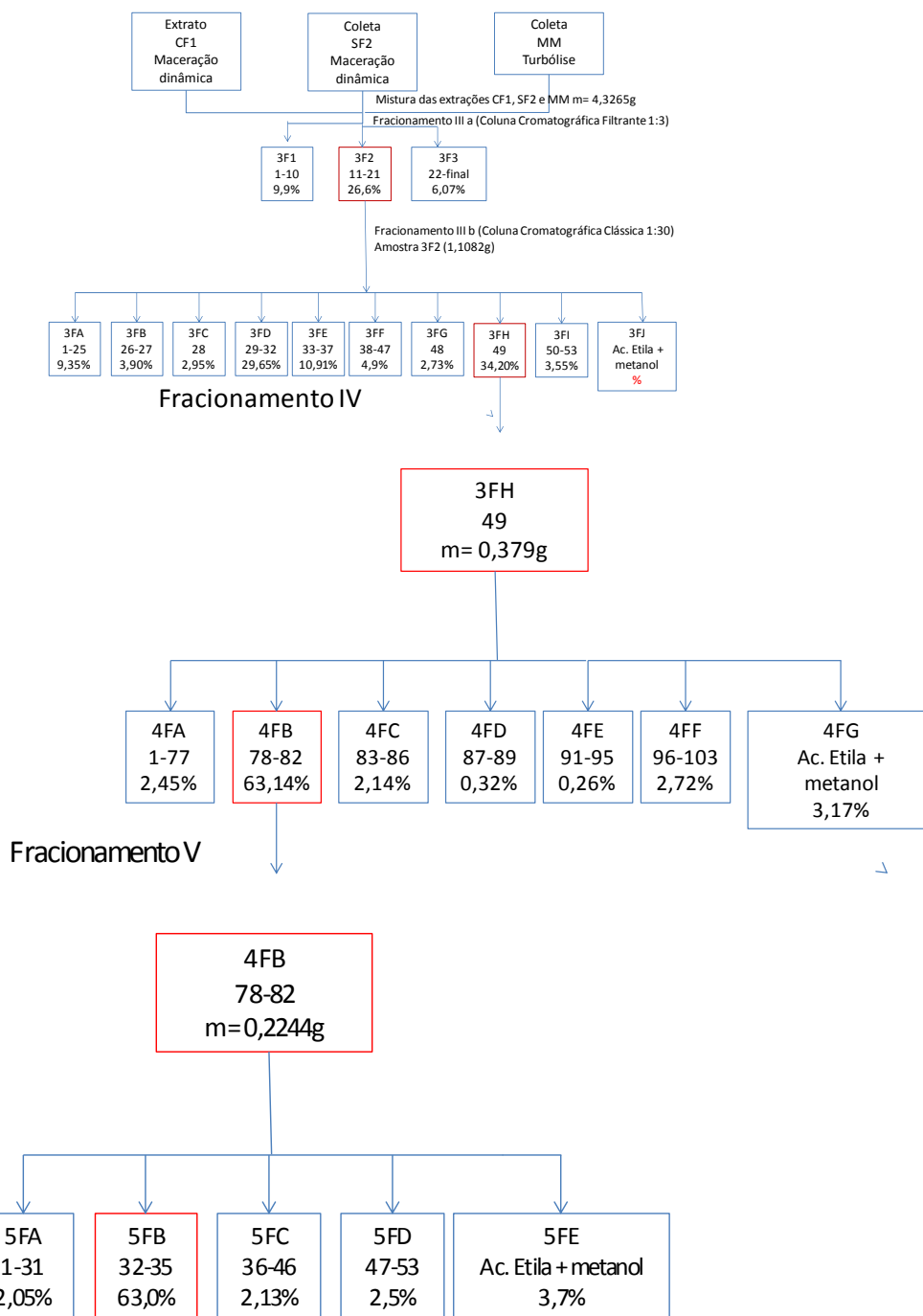


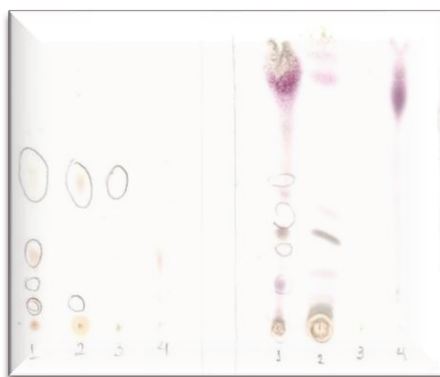
Figura 13b- Fluxograma de todos os passos de obtenção dos extratos brutos e fracionamentos das frações ativas a partir das folhas de *S. grantii* dos exemplares originários de Espírito Santo do Pinhal com flor (CF1) e sem flor (SF2) e de Mogi-Mirim (MM), destacando-se em vermelho as frações escolhidas e avaliadas na atividade antiproliferativa *in vitro* e cromatografias (CCD, CG/EM e Espectrometria de Massas)

5.1.1 Obtenção dos Extratos Brutos (EB) e escolha do EB em diclorometano (EBDC)

As folhas frescas moídas, em gelo seco, de *Synadenium grantii*, procedente do CPQBA- UNICAMP, foram extraídas (extração I) em solventes de diferentes polaridades (diclorometano, etanol e água) por maceração dinâmica a frio, sequencialmente, de acordo com o fluxograma descrito na Figura 13a.

As folhas foram coletadas no CPQBA-UNICAMP, no dia 18 de novembro de 2010 (primavera).

A Figura 14 demonstra o perfil observado por cromatografia em camada delgada (CCD), dos três extratos brutos e do látex bruto separados nos eluentes: a) diclorometano / metanol 99:1 (v/v) e b) diclorometano / metanol 97:3 (v/v). A partir do perfil observado por CCD, foi possível escolher a segunda fase móvel como mais eficiente para observar uma separação dos componentes da mistura.



1 2 3 4
Figura 14 -

1 2 3 4
CCD dos extratos brutos em (1) diclorometano, (2) etanol, (3) aquoso e (4) látex em diferentes fases móveis (a) diclorometano / metanol 99:1 (v/v), b) diclorometano / metanol 97:3 (v/v), revelado com solução de anisaldeído.

Esses extratos foram analisados no ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais humanas (Figura 15). Aquele que apresentou o melhor perfil de seletividade foi o EB diclorometano (EBDC), procedente do CPQBA-UNICAMP, com seletividade para as linhagens de células UACC-62, NCI-H460, PC-3 e K-562, conforme valores de GI₅₀ apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos de *Synadenium grantii* (folhas e látex), sobre linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição.

Linhagens	GI ₅₀				
	Dox	EBDC	EBEC	EBAqC	LC
U251 glioma	1,24	81,31	141,22	*	*
UACC-62 pele melanoma	0,72	9,04	4,74	*	*
NCI/ADR-RES ovário resistente	6,91	56,74	*	*	37,18
786-0 rim	5,86	59,54	111,52	*	*
NCI-H460 pulmão	0,50	<0,25	3,95	*	1,25
PC-3 próstata	0,18	1,14	17,66	*	5,30
OVCAR-3 ovário	1,93	78,33	55,25	*	*
HT29 cólon	0,34	57,52	175,22	*	*
K-562 leucemia	5,71	<0,25	3,02	*	0,33

*= > 250,00 µg/mL

GI₅₀ - Inibição de 50% do crescimento (µg/mL)

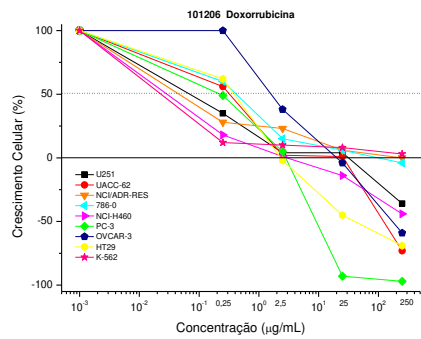
Dox- Doxorubicina

EBDC- Extrato bruto em diclorometano

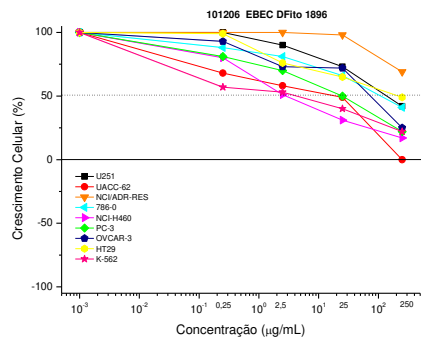
EBEC- Extrato bruto em etanol

EBAqC- Extrato bruto aquoso

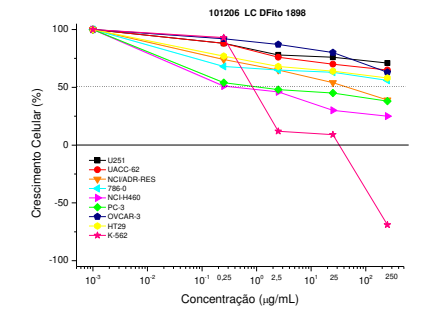
LC- Látex bruto extraído no dia anterior ao teste



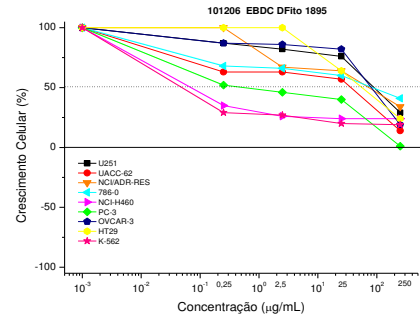
Doxorrubicina



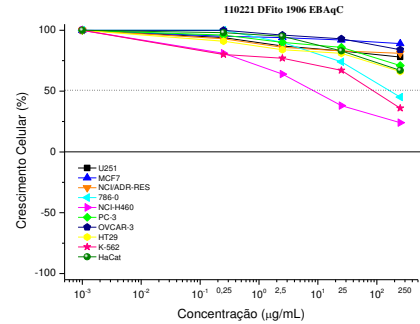
EBEC- Extrato Bruto em Etanol



LC- Látex extraído no dia anterior ao teste



EBDC- Extrato Bruto em Diclorometano



EBAqC- Extrato Bruto Aquoso

Figura 15 - Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos em diclorometano, etanol e água e do látex de *S. grantii*, em células tumorais humanas (U251, UACC-62, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.

5.1.2 Fracionamento I do EBDC das folhas do *S. grantii* em diclorometano

O extrato bruto de diclorometano (EBDC) foi prepurificado por cromatografia em coluna filtrante (1:3) (Figura 13a), utilizando-se diferentes gradientes de solventes com n-hexano, diclorometano e metanol (Tabela 6).

O perfil cromatográfico das 58 frações resultantes do Fracionamento I foi monitorado por CCD (Figura 16) agrupadas de acordo as suas semelhanças em seis grupos: FA(F1-13); FB(F14-23); FC(F24-31); FD(F32-33); FE(F34-58); FF(F lavagem com acetato de etila e metanol).

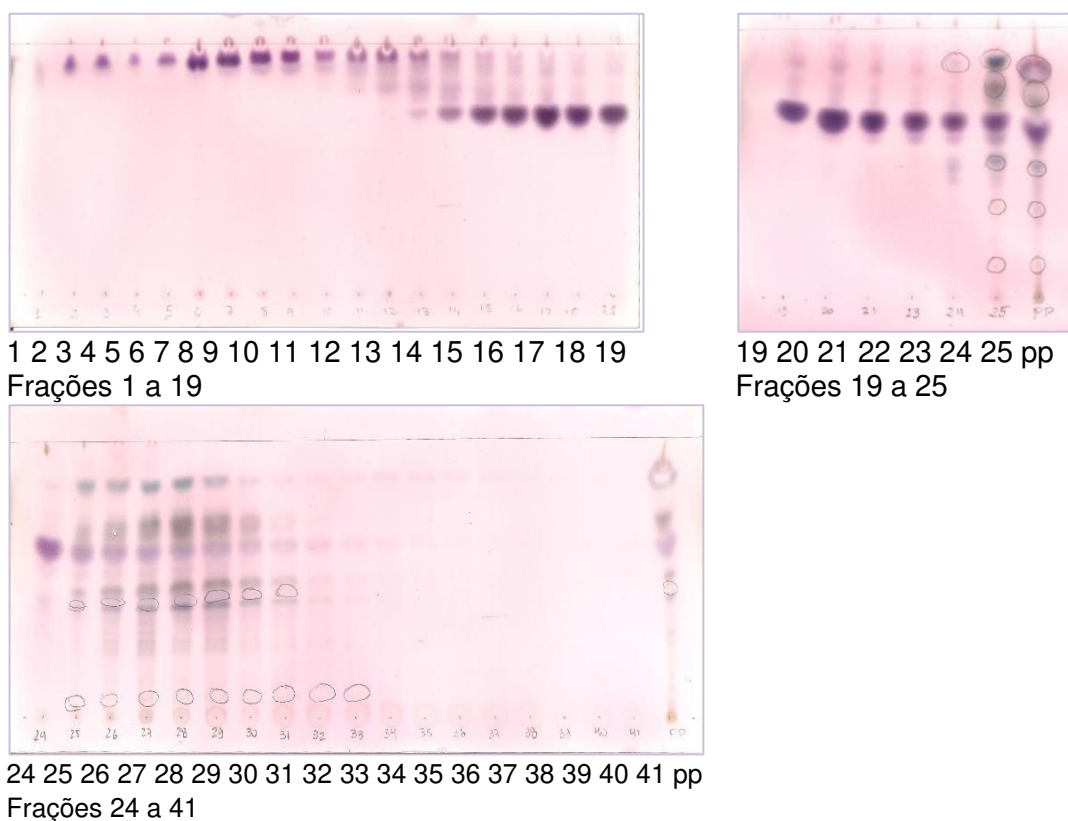


Figura 16 - Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento I do extrato EBDC de *S. grantii*. Fase móvel: CH₂Cl₂/ metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

5.1.3 Triagem fitoquímica

Foi realizada triagem fitoquímica dos extratos brutos diclorometânico, etanólico e aquoso (Figura 17f) e com as frações obtidas no primeiro fracionamento FA, FB, FC, FD, FE, FF e ponto de partida do extrato bruto diclorometânico (PP) (Figuras 17a, 17b, 17c, 17d e 17e), com reagentes específicos para os grupos químicos conforme segue:

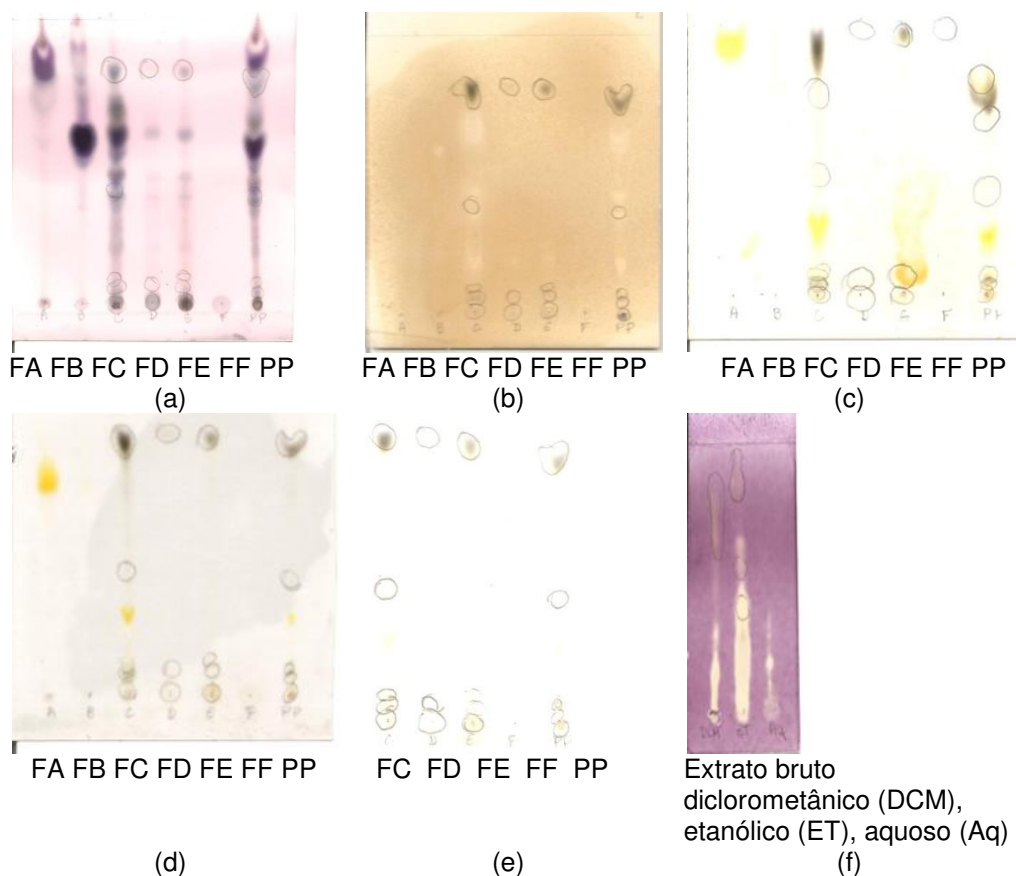


Figura 17- Triagem de grupos químicos com reagentes específicos em CCD, realizada com fase móvel Diclorometano/ Metanol (97:3) (v/v): a) Anisaldeído; b) Cloreto férrico: Identificação de polifenóis (+); c) Dragendorff Identificação de alcaloides e compostos nitrogenados heterocíclicos (-); d) Hidróxido de amônia 5% Identificação de Cumarinas (+); e) Solução de NP-PEG. Reagente para detecção de flavonoides (+) no UV 366nm; f) DPPH Identificação: Atividade antioxidante (+).

A partir da avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* dessas seis frações (Figura 18a e 18b), as frações foram reagrupadas e repurificadas em coluna cromatográfica filtrante, escolhendo-se as frações FC(F24-31), FD(F32-33) e FE(F34-58) que demonstraram seletividade para as linhagens tumorais humanas 786-0 e NCI-H460 (Tabela 13).

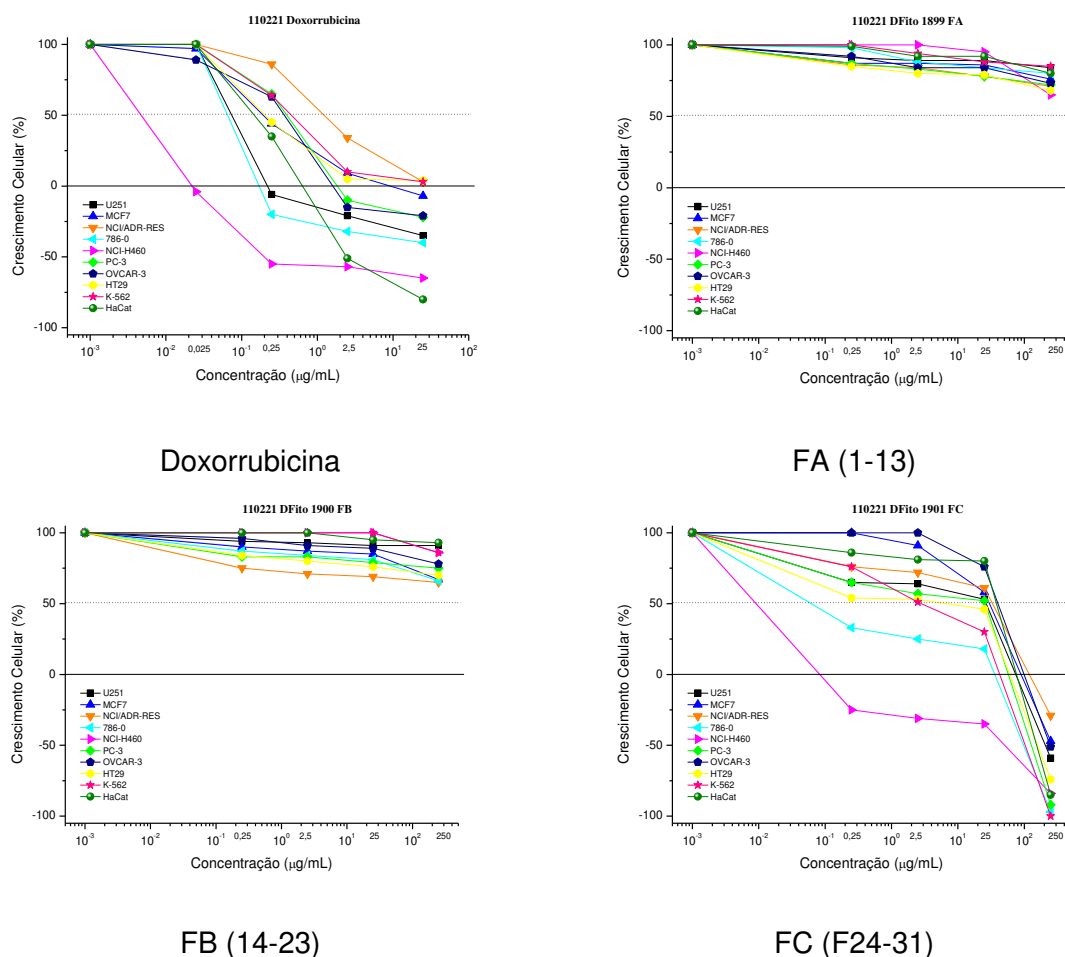
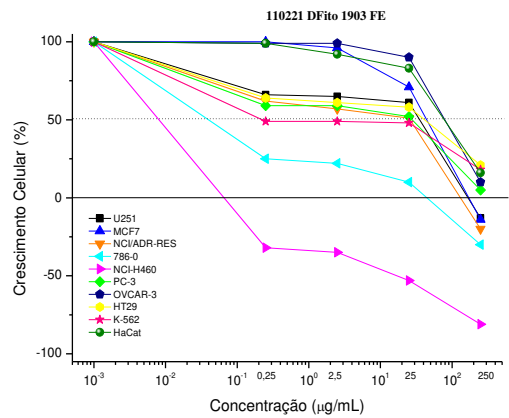
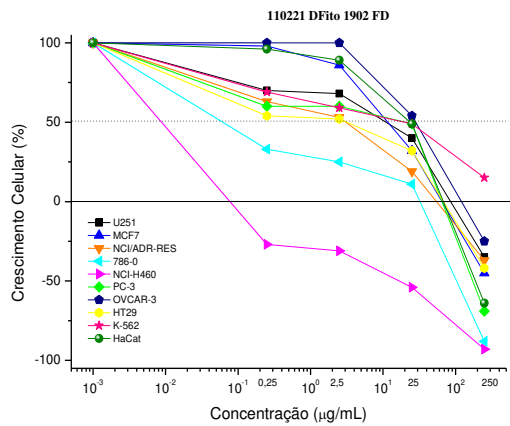
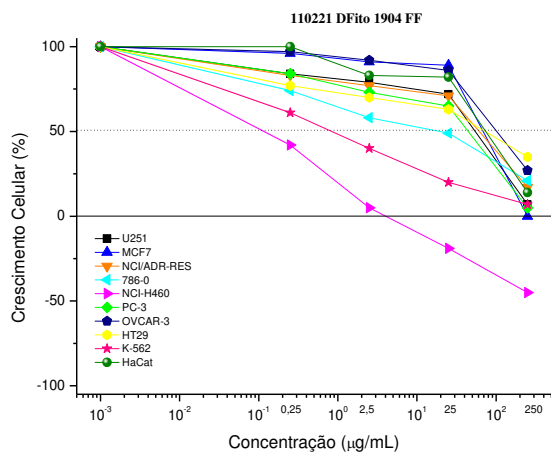


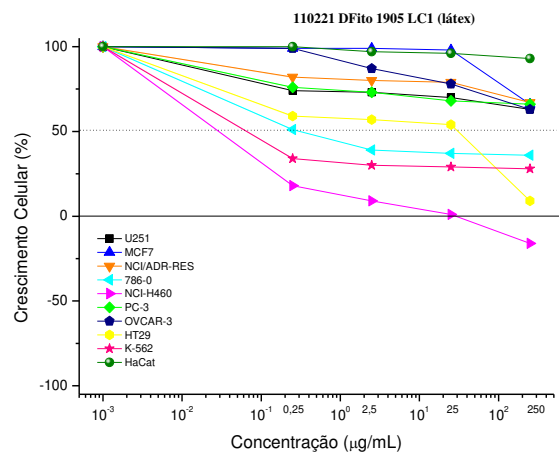
Figura 18a - Atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do EB diclorometano, e do látex extraído e diluído no momento do teste em células tumorais humanas (U251, MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCA-3, HT29, K-562), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.



FD (F32-33)



FE (F34-58)



FF (34-58) LC1 Látex diluído imediatamente
 Figura 18b- Atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do EB diclorometano, e do látex extraído e diluído no momento do teste em células tumorais humanas (U251, MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.

Tabela 13- Atividade antiproliferativa *in vitro* das frações e látex de *Synadenium grantii* (folhas e látex), sobre linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição.

Linhagens	TGI							
	DOX	FA	FB	FC	FD	FE	FF	LC1
U251 glioma	1,11	*	*	63,32	80,28	234,97	*	*
MCF7 mama	8,63	*	*	91,13	64,94	182,35	*	*
NCI/ADR-RES ov res	22,20	*	*	122,51	45,68	158,97	*	*
786-0 rim	0,63	*	*	7,77	7,55	20,12	*	*
NCI-H460 pulmão	0,04	*	*	0,31	0,23	0,20	6,00	16,44
PC-3 próstata	4,44	*	*	48,52	49,79	*	*	*
OVCAR-3 ovário	3,97	*	*	109,02	128,05	*	*	*
HT29 cólon	11,94	*	*	37,50	50,59	*	*	*
K-562 leucemia	14,39	*	*	27,59	*	*	*	*
Aca	0,68	*	*	73,07	64,29	*	*	*

TGI – Inibição Total do Crescimento (µg/mL)

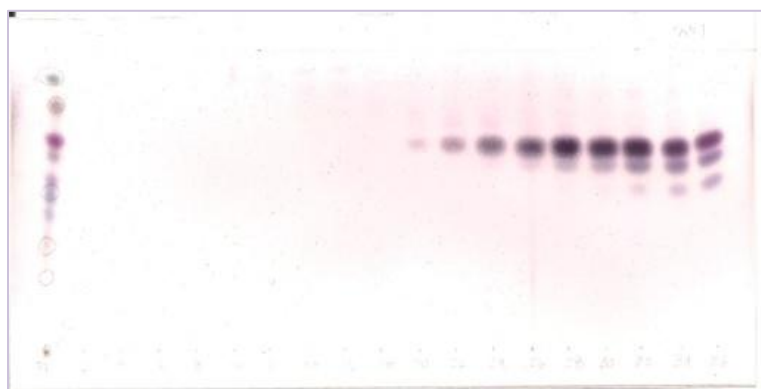
*= > 250,00

Hacat- queratinócito humano normal

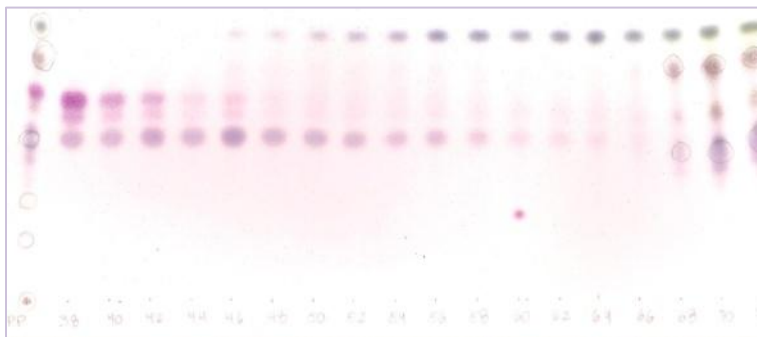
Frações do fracionamento I: FA, FB, FC, FD, FE, FF e látex imediatamente diluído (LC1)

5.1.4 Fracionamento II

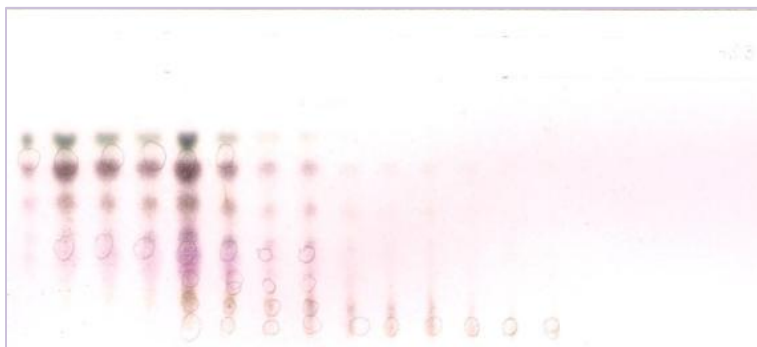
O fracionamento II das frações FC, FD e FE agrupadas foram realizados em coluna filtrante com gradiente de n-hexano, diclorometano e metanol (Tabela 7), resultando em 104 frações que foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 19a) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em nove frações: 2FA(F1-18); 2FB(F19-30); 2FC(F31-44); 2FD(F45-66); 2FE(F67-72); 2FF(F73-78); 2FG(F79-87); 2FH(F88-99) e 2FI (F100- lavagem com acetato de etila e metanol).



2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36

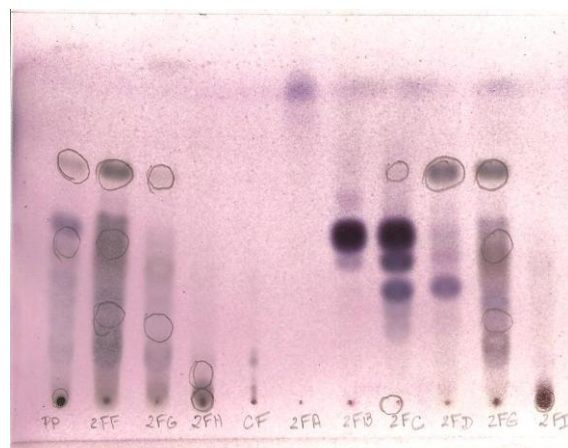


PP38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72



74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 e lavagem

Figura 19a - Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento II do agrupamento das frações FC, FD e FE de *S. grantii*. Fase móvel: CH_2Cl_2 / metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído



PP 2FF 2FG 2FH CF 2FA 2FB 2FC 2FD 2FE 2FI

Figura 19b- Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento II do agrupamento das frações FC, FD e FE de *S. grantii*. Fase móvel: CH₂Cl₂/metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

As frações foram avaliadas por CCD (figura 19a), agrupadas conforme seu perfil cromatográfico (Figura 19b) sendo selecionadas as frações 2FB, 2FF, 2FG e 2FH para avaliação no ensaio de atividade antiproliferativo *in vitro* (Figura 20 e Tabela 14), que demonstraram maior seletividade para as linhagens NCI-H460 e PC-3.

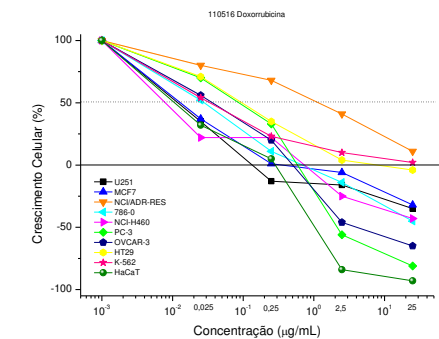
Tabela 14 -Atividade antiproliferativa *in vitro* das frações de *S. grantii*, sobre linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição.

Linhagens	TGI				
	DOX	2FB	2FF	2FG	2FH
MCF7 mama	1,04	*	19,22	40,20	19,71
NCI/ADR-RES ov.res.	>25,00	*	42,15	47,12	37,43
786-0 rim	0,93	*	20,47	22,63	24,07
NCI-H460 pulmão	0,65	*	2,02	3,85	3,86
PC-3 próstata	0,53	*	10,07	9,45	7,61
OVCAR-3	0,48	*	27,39	18,11	15,32
HT29 cólon	7,67	*	41,81	38,14	25,63
K-562 leucemia	9,89	*	71,23	109,23	30,09
Aca	0,15	*	38,21	32,06	30,90

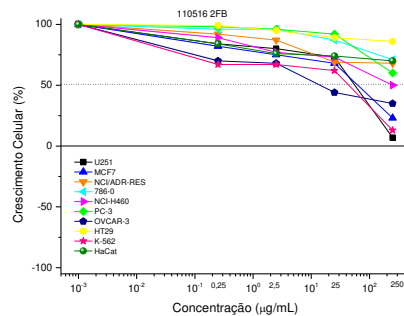
TGI – Inibição Total do crescimento (µg/mL)

*= > 250,00

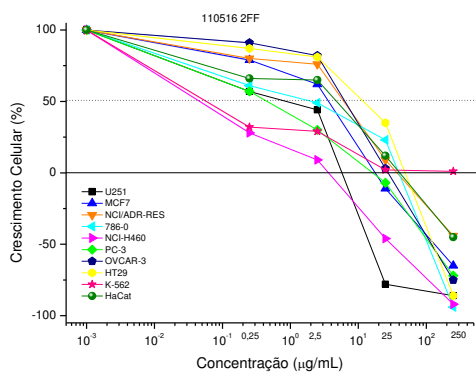
Frações do fracionamento II: 2FB, 2FF, 2FG e 2FH.



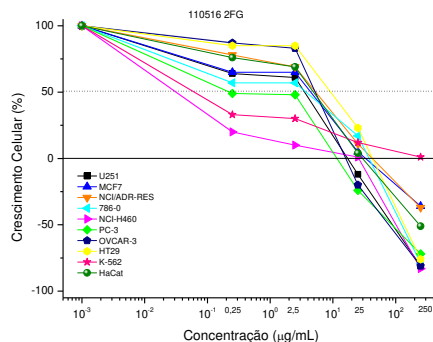
Doxorrubicina



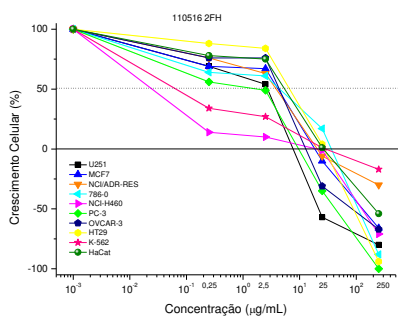
2FB



2FF



2FG



2FH

Figura 20 - Atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do segundo fracionamento das frações FC, FD e FE, em células tumorais humanas (MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562, Aca), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.

5.1.5 Extração das folhas de *S. grantii* de diferentes exemplares proveniente de diferentes regiões (Espírito Santo do Pinhal e Mogi-Mirim)

Foi realizada uma segunda coleta de material vegetal de dois exemplares em Espírito Santo do Pinhal- SP, no dia 14/03/2011, sendo que um exemplar estava com flor (CF1) e o outro sem flor (SF2), cuja identificação botânica foi confirmada pelo Dr. Luís Carlos Bernacci do Instituto Agrônômico de Campinas-SP.

O material fresco e cortado foi extraído em diclorometano imediatamente após coleta às 9 h da manhã, seguida de maceração dinâmica, três vezes por 2 h cada em diferentes solventes sequenciais: Diclorometano, Etanol e Água. Após cada processo de extração, filtrou-se o solvente em papel de filtro e eliminou-se o solvente sob vácuo.

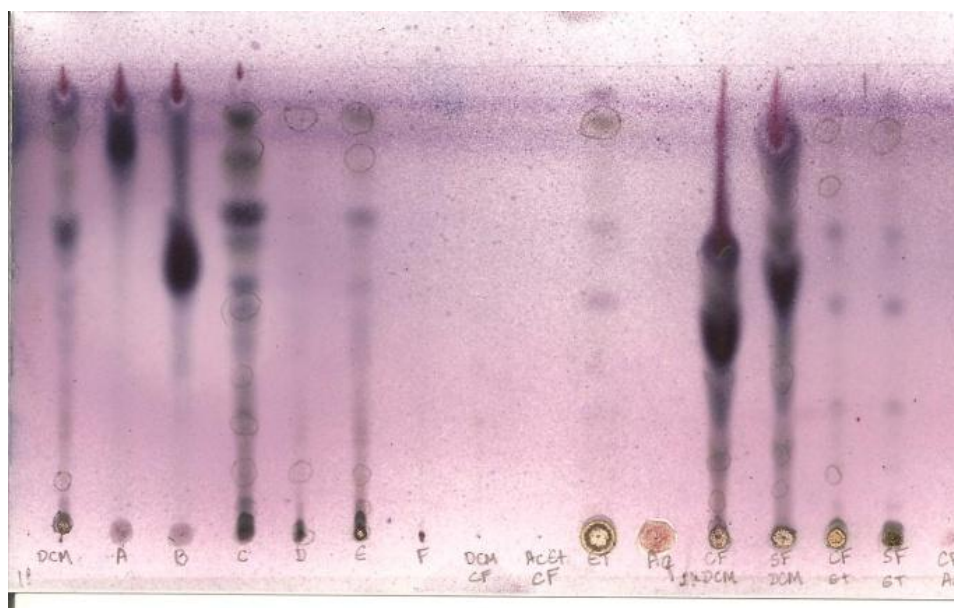
No dia 09/05/2011 houve o recebimento de outro exemplar de *S. grantii* de Mogi-Mirim- SP (MM), que foi processado de forma diferente, para avaliar a influencia do processo extrativo sobre a atividade antiproliferativo *in vitro*. Primeiramente congelou-se a planta inteira de um dia para o outro. No dia seguinte triturou-se em liquidificador industrial Poli LS-06 (galhos e folhas). Procedeu-se à maceração dinâmica 3x2h com diclorometano, depois as outras duas extrações em etanol e água, sequencialmente, foram realizadas extração por turbólise no aparelho Polytron – Dispensor Extratur[®] Modelo Quimis (3 vezes por 3min. para cada solvente) para melhor triturar os galhos. Os solventes utilizados foram os mesmos: Diclorometano, Etanol e Água. Finalmente, os extratos foram e o solvente eliminado sob vácuo.

Os extratos brutos CF1, SF2 e MM forneceram os seguintes rendimentos comparados à primeira coleta realizada no CPQBA (EBDC) (Tabela 15).

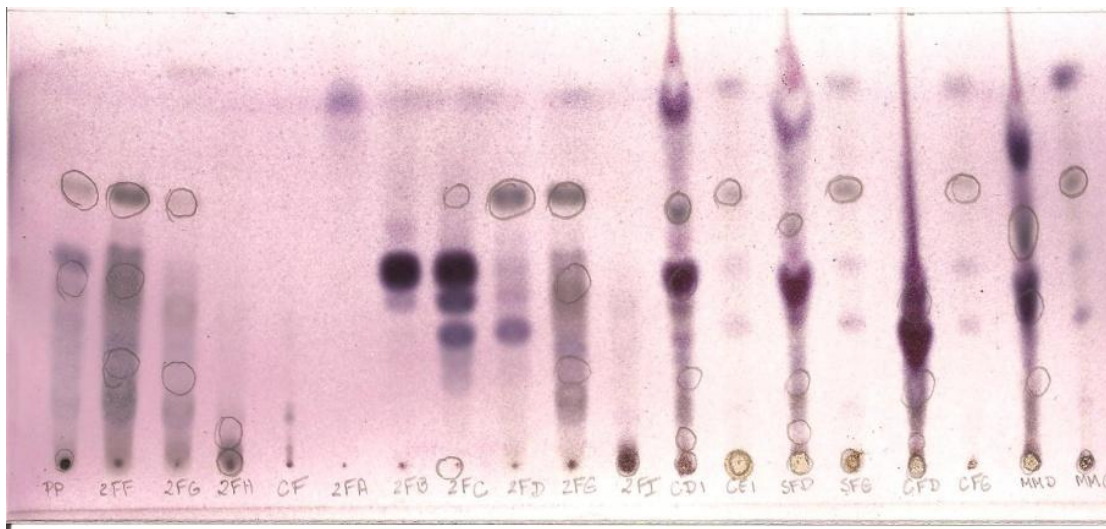
Tabela 15 - Resumo dos rendimentos em massa e % dos extratos brutos dos diferentes exemplares

Solventes extratores	Exemplar CPQBA (EBDC) (m= 283,29g)	Exemplar com flor ESP (CF1) (m= 153g)	Exemplar sem flor ESP (SF2) (m=163g)	Exemplar Mogi-Mirim (MM) (m= 308,37g)
CH ₂ Cl ₂	0,7% (m= 2,22g)	1,50% (m= 2,31g)	1,49% (m= 2,43g)	1,46% (m= 4,50g)
Etanol	3,73% (m= 12,08g)	2,91% (m= 4,45g)	3,73% (m= 6,09g)	2,98% (m=9,17g)
Aquoso	1,14% (m= 3,69g)	0,94% (m= 1,44g)	0,95% (m= 1,53g)	1,06% (m=3,40g)

A análise por CCD comparativas dos extratos brutos permitiu agrupar as amostras por semelhança (Figura 21 e Figura 22), para dar prosseguimento com o processo de fracionamento por cromatografia em coluna.

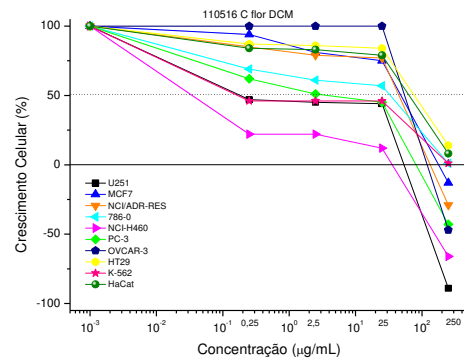
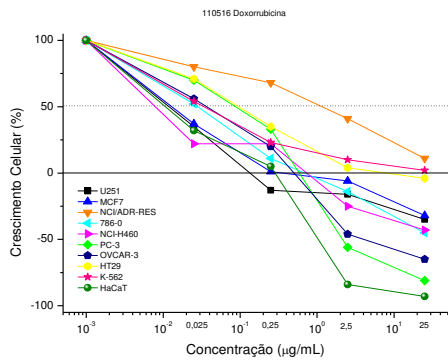


DCM FA FB FC FD FE FF DCMCF AcetCF ET Aq CFDCM SFDCM CFet SFEt CFAq
 Figura 21 - CCD comparativa dos extratos brutos obtidos das diferentes coletas (CF1 e SF2) nos diferentes extratos (diclorometano, etanol e água) com as frações FA, FB, FC, FD, FE, FF (fracionamento I) e pp (DCM) do fracionamento I. Fase móvel: CH₂Cl₂/ metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

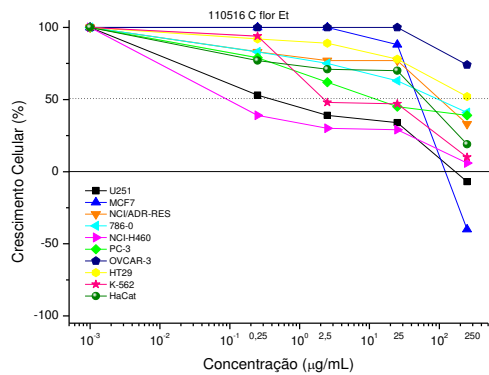


pp 2FF 2FG 2FH CF 2FA 2FB 2FC 2FD 2FE 2FI CD1 CE1 SFD SFE CFD CFE MMD MME
 Figura 22 - CCD comparativa dos extratos brutos obtidos das diferentes coletas (CF1, SF2 e MM) nos diferentes extratos (diclorometano, etanol e água) com as frações 2FA, 2FB, 2FC, 2FD, 2FE, 2FF, 2FG, 2FH e 2FI. Fase móvel: CH₂Cl₂/ metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

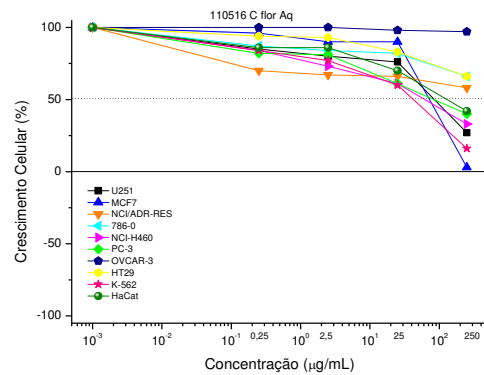
A análise da atividade antiproliferativa *in vitro* dos três extratos brutos (diclorometano, etanol e aquoso) resultante das duas coletas diferentes (CF1 e SF2) foram avaliadas conforme os resultados expressos nos gráficos (Figura 23a e 23b) e Tabela 16.



Doxorrubicina



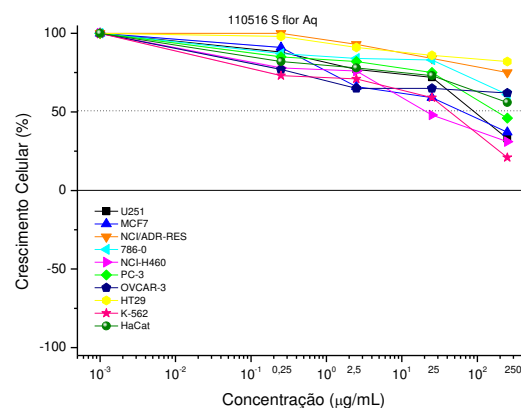
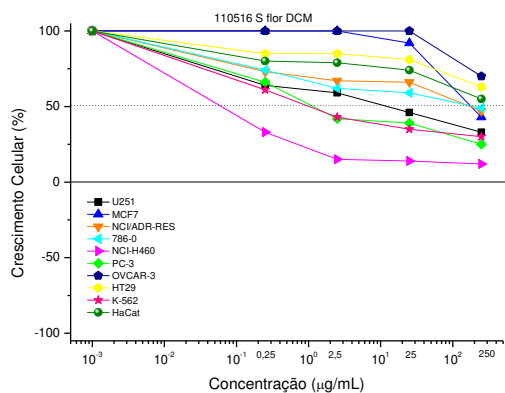
CF1 DCM



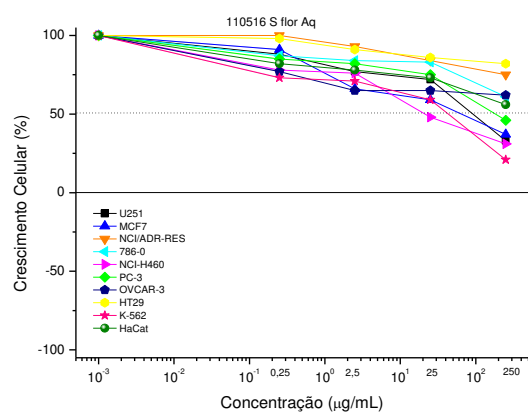
CF1 Etanol

CF1 aquoso

Figura 23a - Atividade antiproliferativa *in vitro* dos látex CF1 e SF2 nos diferentes líquidos extratores (diclorometano, etanol e água), em células tumorais humanas (MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.



SF2 DCM



SF2 Etanol

SF2 aquoso

Figura 23b - Atividade antiproliferativa *in vitro* dos látex CF1 e SF2 nos diferentes líquidos extratores (diclorometano, etanol e água), em células tumorais humanas (MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT29, K-562), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.

Tabela 16 - Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos de *Synadenium grantii* (folhas e látex), sobre linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição.

Linhagens	TGI						
	DOX	CF1 DCM	CF1 et	CF1 aq	SF2 DCM	SF2 et	SF2 aq
MCF7 mama	1,04	190,18	145,42	*	*	*	*
NCI/ADR-RES ov.res.	>25,00	144,55	*	*	*	*	*
786-0 rim	0,93	*	*	*	*	*	*
NCI-H460 pulmão	0,65	8,28	*	*	167,36	*	*
PC-3 próstata	0,53	64,39	*	*	*	*	*
OVCAR-3	0,48	227,65	*	*	*	*	*
HT29 cólon	7,67	*	*	*	*	*	*
K-562 leucemia	9,89	*	*	*	*	*	*
HaCat	0,15	*	*	*	*	*	*

TGI – Inibição Total do crescimento ($\mu\text{g/mL}$)

*=>250,00 $\mu\text{g/mL}$

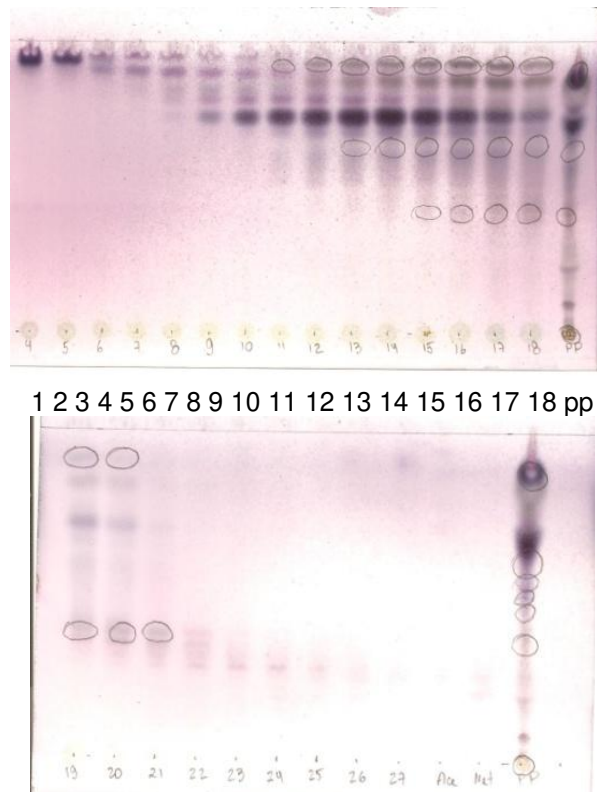
Frações: Com flor em diclorometano (CF1 DCM), Com flor etanólico (CF1 et), Com flor aquoso (CF1 aq), Sem flor em diclorometano (SF2 DCM), Sem flor etanólico (SF2 et) e Sem flor aquoso (SF2 aq).

A partir desses dados pode-se avaliar que houve seletividade das amostras com flor em diclorometano (CF1 DCM) na linhagem de célula NCI-H460.

5.1.6 Fracionamento IIIa e IIIb

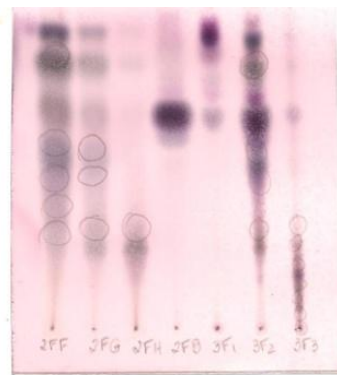
Deu-se continuidade aos processos de purificação dos extratos diclorometânicos de CF1, SF2 e MM reunidos, conforme fluxograma descrito na Figura 13b, utilizando-se para esse segundo fracionamento diferentes gradientes de solventes com n-hexano, diclorometano e metanol (Tabela 8).

As 27 frações resultantes do fracionamento IIIa foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 24) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em três grupos: 3F1(F1-10); 3F2(F11-21); 3F3(F22-final).



19 20 21 22 23 24 25 26 27 acetato de etila e metanol
 Figura 24 - Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento IIIa de *S. grantii*. Fase móvel: CH₂Cl₂/ metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

Após esse fracionamento, separou-se a fração 3F2 como sendo a escolhida por seu perfil cromatográfico, comparando-se as CCD dos fracionamentos II e IIIa, como mostrada na Figura 25. Logo a seguir procedeu-se ao fracionamento IIIb, conforme fluxograma (Figura 13b).



2FF 2FG 2FH 2FB 3F1 3F2 3F3

Figura 25 - CCD comparativa entre os fracionamentos II e IIIa. Fase móvel: CH_2Cl_2 / metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

As 53 frações resultantes do fracionamento IIIb foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 26) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em dez grupos: 3FA(F1-25); 3FB(F26-27); 3FC(F28); 3FD(F29-32); 3FE(F33-37); 3FF(38-47), 3FG(48), 3FH(49), 3FI(50-53) e 3FJ(lavagem com acetato de etila e metanol).

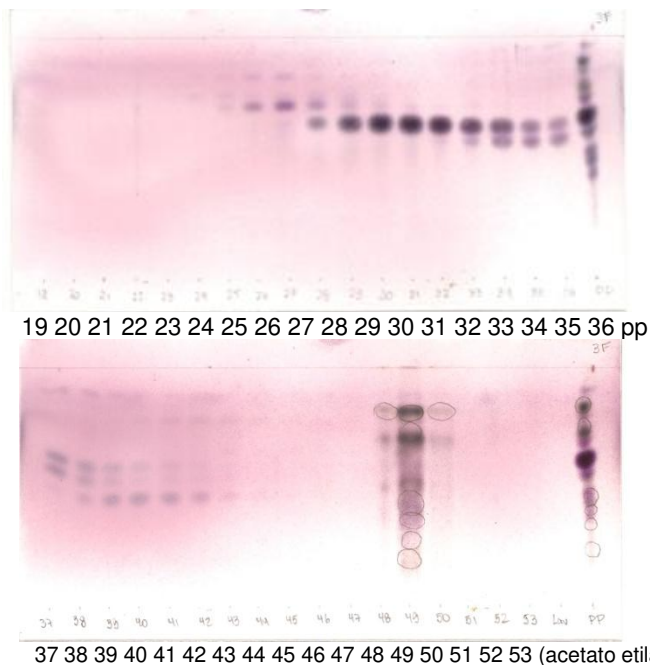


Figura 26 - Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento IIIb de *S. grantii*. Fase móvel: CH_2Cl_2 / metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

5.1.7 Fracionamento IV

Após análise das CCD separou-se a fração 3FH(49) na intenção de isolar os compostos presentes nessa fração e procedeu-se ao quarto fracionamento em coluna clássica (1:30) com diferentes gradientes de concentração de solventes: n-hexano, diclorometano e metanol (Figura 13b e Tabela 9).

As 103 frações resultantes do fracionamento IV foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 27) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em sete grupos: 4FA(F1-77); 4FB(F78-82); 4FC(F83-86); 4FD(F87-89); 4FE(F91-95); 4FF(96-103), e 4FG (lavagem com acetato de etila e metanol).

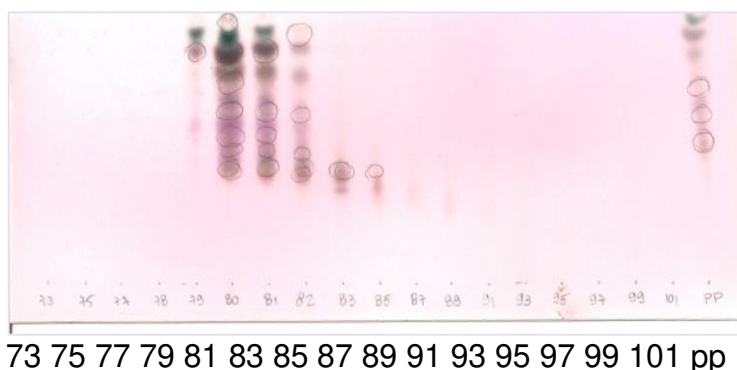
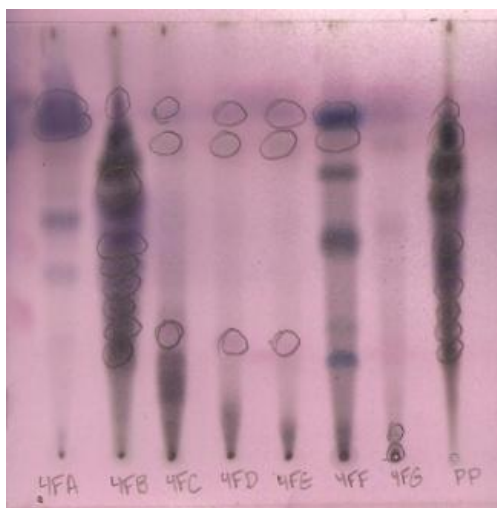


Figura 27 – Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento IV de *S. grantii*. Fase móvel: CH₂Cl₂/ metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

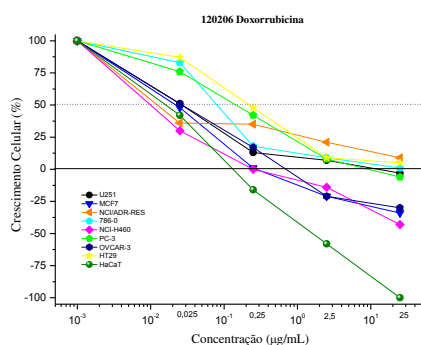
A fração 4FB (F78-82) foi escolhida para o próximo fracionamento conforme a Figura 28, por sugerir a presença dos compostos em estudo.



4FA 4FB 4FC 4FD 4FE 4FF 4FG pp

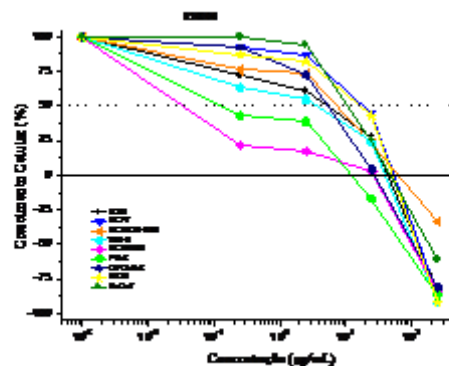
Figura 28 - CCD das frações do fracionamento IV. Fase móvel: CH₂Cl₂/ metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

A análise da atividade antiproliferativa *in vitro* da fração 4FB foi avaliada conforme os resultados expressos nos gráficos (Figura 29) e Tabela 17.



Doxorrubicina

Figura 29 -



4FB

Atividade antiproliferativa *in vitro* da fração 4FB nos diferentes líquidos extratores (diclorometano, etanol e água), em células tumorais humanas (U251 Glioma- SNC, MCF7 mama, NCI/ADR-RES ov. res., 786-0 rim, NCI-H460 pulmão, PC-3 próstata, OVCAR-3, HT29 cólon, HaCat) relacionando porcentagem de crescimento versus concentração de compostos. Ensaio de sulforrodamina B após 48h de exposição.

Tabela 17 - Atividade antiproliferativa *in vitro* da fração 4FB sobre linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição

Linhagens	TGI	
	DOX	4FB
U251 Glioma- SNC	8,29	32,04
MCF7 mama	0,65	47,25
NCI/ADR-RES ov. res.	*	65,34
786-0 rim	10,40	24,14
NCI-H460 pulmão	0,40	4,24
PC-3 próstata	9,31	7,30
OVCAR-3	1,08	24,94
HT29 cólon	15,89	43,19
HaCat	0,14	47,69

TGI – Inibição Total do crescimento ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

*=>250,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$

5.1.8 Fracionamento V

A fração 4FB foi escolhida para ser fracionada em coluna clássica (1:30) (Figura 13b), com diferentes gradientes de concentração de solventes: n-hexano, diclorometano e metanol (Tabela 10).

As frações resultantes do fracionamento V foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 30) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em cinco grupos: 5FA(F1-31); 5FB(F32-35); 5FC(F36-46); 5FD(F47-55) e 5FE (lavagem com acetato de etila e metanol).

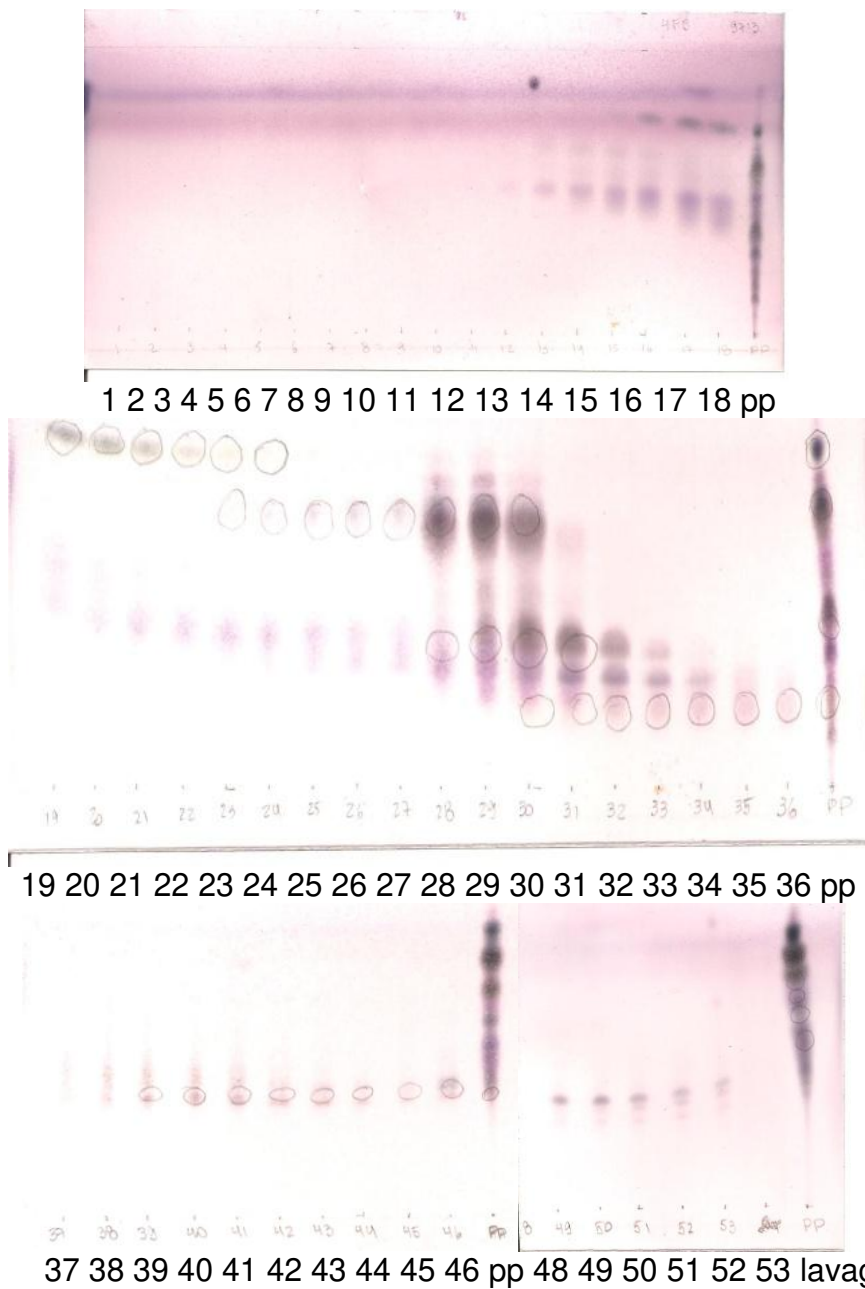


Figura 30 - Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento V de *S. grantii*. Fase móvel: CH_2Cl_2 / metanol 97:3 (v/v) e revelado com solução de anisaldeído.

A Tabela 18 apresenta o rendimento global de todos os fracionamentos em porcentagem.

Tabela 18- Rendimento global de todos os fracionamentos em porcentagem

Fração I %	Fração II %	Fração IIIa %	Fração IIIb %	Fração IV %	Fração V %
FA= 12,84	2FA= 1,75	3F1= 9,9	3FA= 9,35	4FA= 2,45	5FA= 2,05
FB= 18,26	2FB= 9,56	3F2= 26,6	3FB= 3,90	4FB= 63,14	5FB= 63,0
FC= 33,76	2FC= 10,42	3F3= 6,07	3FC= 2,95	4FC= 2,14	5FC= 2,13
FD= 1,82	2FD= 5,19		3FD= 29,65	4FD= 0,32	5FD= 2,5
FE= 31,29	2FE= 8,58		3FE= 10,91	4FE= 0,26	5FE= 3,5
FF= 0,94	2FF= 16,31		3FF= 4,9	4FF= 2,72	
	2FG= 8,65		3FG= 2,73	4FG= 3,17	
	2FH= 3,98		3FH= 34,20		
	2FI= 6,06		3FI= 0,55		
Total= 98,91	Total= 70,50	Total= 42,57	Total= 99,14	Total= 74,20	Total= 73,18

5.1.9 Cromatografia Gasosa- Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os resultados referentes aos cromatogramas das frações 2FB, 2FF, 2FG e 2FH estão apresentados nas figuras abaixo, respectivamente, Figura 31a, 31b, 31c e 31d.

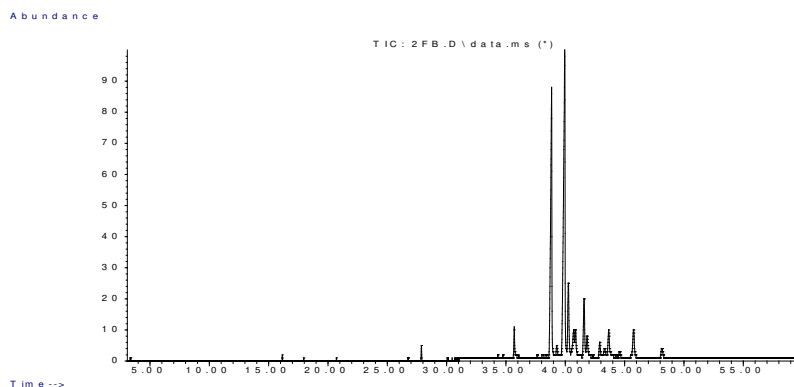


Figura 31a- Perfil observado por CG/EM da fração 2FB do *S. grantii*.

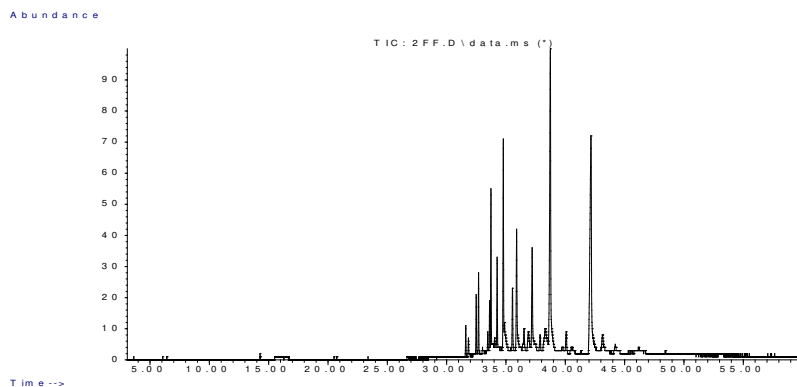


Figura 31b- Perfil observado por *CG/EM* da fração 2FF do *S. grantii*.

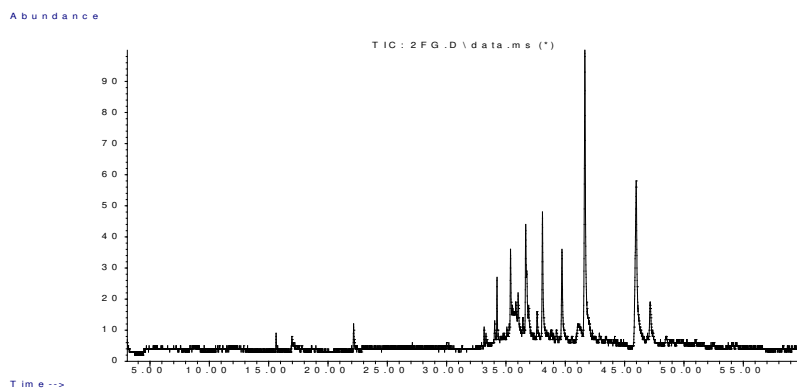


Figura 31c - Perfil observado por *CG/EM* da fração 2FG do *S. grantii*.

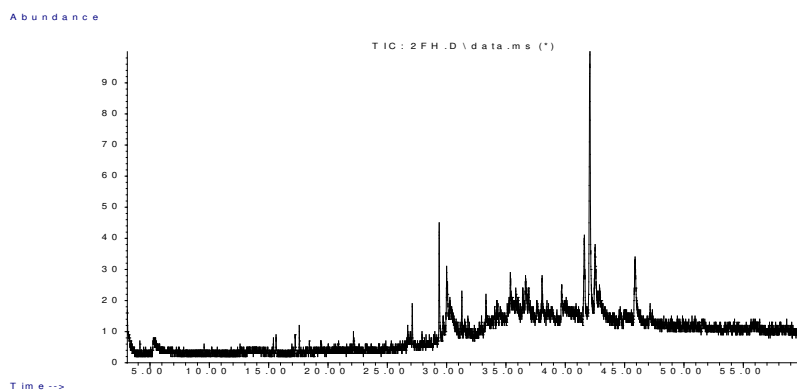


Figura 31d - Perfil observado por *CG/EM* da fração 2FH do *S. grantii*.

A sobreposição das quatro amostras em *CG-EM* (2FB, 2FF, 2FG e 2FH) pode ser visualizada na Figura 32.

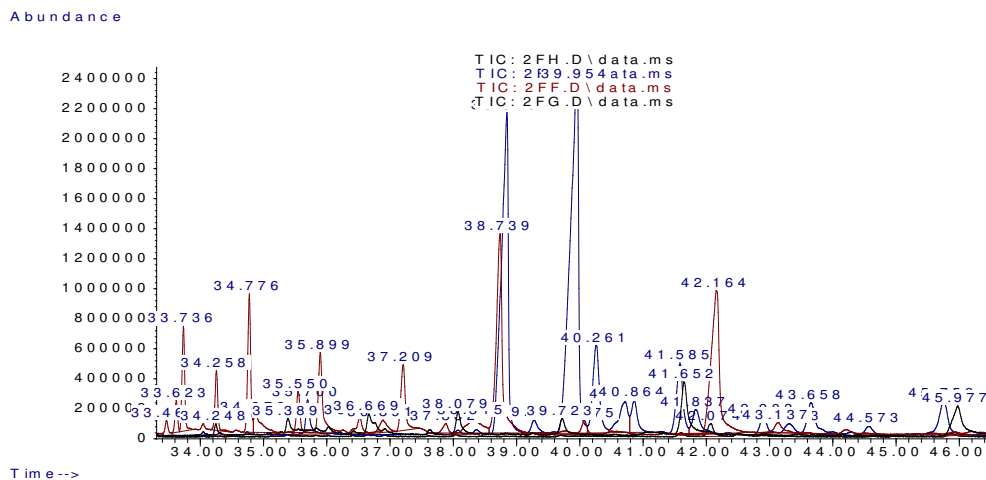


Figura 32 - Perfil observado por CG/EM (HP6890 / HP5975) da sobreposição das quatro amostras em CG- EM (2FB, 2FF, 2FG e 2FH).

O único resultado encontrado com correspondência acima de 90% em relação à biblioteca NIST foi o fragmentograma correspondente ao 4º pico da fração 2FB (Figura 31a) com tempo de retenção igual a 41.583min. obtendo-se a denominação 9,19-CICLOLANOST-24 EN-3OL, [3BETA], com 99% de correspondência, número do banco de dados 176585 e PM=426 (Figura 33).

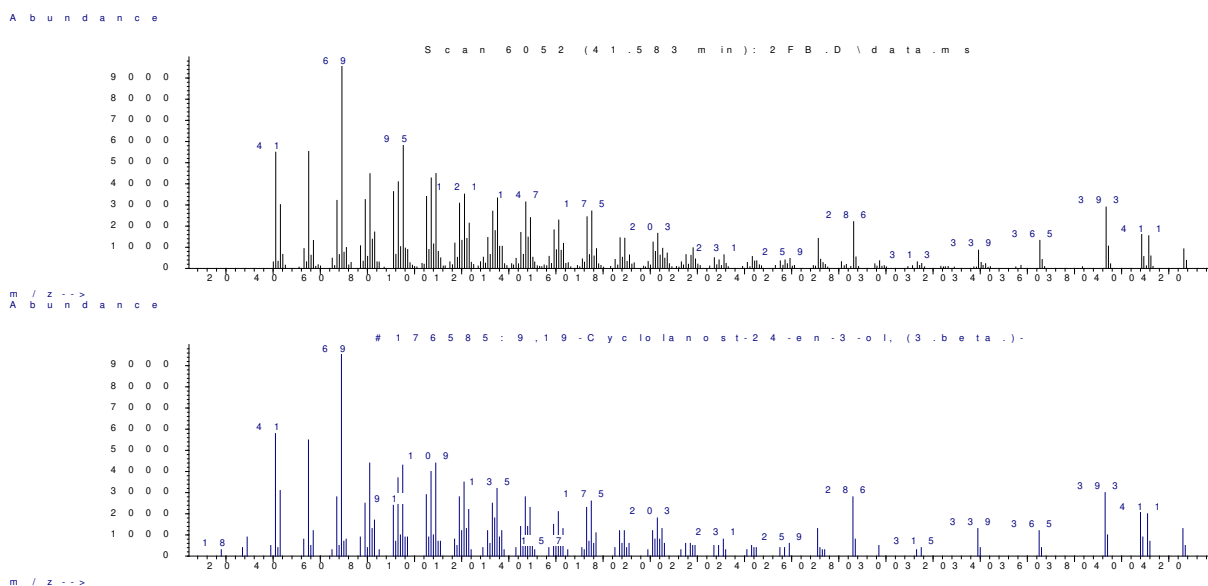


Figura 33- Fragmentograma pico do cromatograma (região entre 5 e 55 min.) com tempo de retenção 41,583 min. da fração 2FB do *S. grantii*.

5.1.10 Espectrometria de Massas

A metodologia analítica envolveu EM (Espectrometria de Massas) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) nos modos positivos e experimentos de fragmentação de íons de interesse (MS/MS) por inserção direta das frações de *S. grantii*. No ESI, a ionização foi obtida através da protonação, ou desprotonação, ou ainda pela adição de íons como Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Cl^- , formando adutos (produtos da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto de reação contendo todos os átomos de todos os componentes iniciais), a partir de uma solução líquida. Nesta técnica de ionização considerada branda, a informação estrutural é pouca ou inexistente, pois os íons gerados têm baixas energias internas, o que resulta em espectros de massas com sinais intensos relativos a moléculas protonadas ou desprotonadas, com pouca ou nenhuma informação sobre os íons relativos a fragmentos. Essa ausência de informação estrutural impulsionou o desenvolvimento de técnicas de fragmentação induzidas, e com isso surgiu a espectrometria de massas *tandem* ou sequencial (MS/MS), onde geralmente os fragmentos são gerados por dissociação induzida por colisão (CID - *Collision-Induced Dissociation*), ou seja, pela colisão do íon gerado na fonte de ionização com uma molécula de gás (tipicamente Argônio) em uma câmara de colisão (Cabral, 2010).

A análise em Espectrometria de Massas, dos espectros de massas adquiridos no equipamento QToF Micromass (Manchester - UK) ESI - Configuração QqToF, forneceu os resultados descritos na Tabela 19:

Tabela 19- Análise em Espectrometria de Massas dos Extratos Brutos em diclorometano das diferentes coletas (EBDC, CF1 DCM e SF2 DCM) e das frações 2FB, 2FF, 2FG, 2FH e 4FB.

m/z	EBDC	CF1 DCM	SF2 DCM	2FB	2FF	2FG	2FH	4FB
145,1240	-	-	-	-	-	-	-	+
147,1434	++	++	++	-	-	+++	++++	-
148,1483	+	-	-	-	-	+	+	-
149,1512	-	-	-	-	+	-	-	-
163,0435	-	-	-	+	-	-	-	-
163,1334	-	-	-	-	-	-	-	+
173,0758	-	+	+	-	-	-	-	-
181,0579	-	-	-	+	-	-	-	-
205,0925	-	-	-	+	-	-	-	-
215,1167	-	+	++	-	-	-	+	-
231,1008	+	+	-	-	-	-	+	-
237,1564	-	-	-	-	+	-	-	-
239,1481	-	-	-	-	+	-	-	-
247,0596	-	-	+	-	-	-	-	-
247,0781	-	-	-	-	-	++	+	-
249,1760	-	-	-	-	+	-	-	-
261,1236	-	-	+	-	-	-	-	-
273,1753	-	-	-	-	-	-	-	+
277,1010	-	+	-	-	-	-	-	-
279,1613	-	-	-	+	-	-	-	-
286,2715	-	-	-	-	-	-	+	-
288,2918	-	-	-	++++	++++	-	-	-
291,0529	-	+	-	-	-	-	-	-
304,2860	-	-	-	++	++	-	-	-
311,1812	-	-	-	-	-	-	-	+
316,3354	-	-	-	++	++	-	-	-
317,2126	-	-	-	-	-	-	-	++
332,3304	-	-	-	+	-	-	-	-
339,2512	-	-	-	-	-	+	-	-
339,2729	-	-	-	-	-	+	-	-
353,2661	-	-	-	-	-	+	-	-
355,1916	-	-	-	-	+	-	-	-
361,2958	-	-	-	-	-	-	+	-
363,1323	-	-	+	-	-	-	-	-
383,2702	+	-	-	-	-	-	+++	-
391,2922	-	-	-	+	-	-	-	-
397,2850	+	-	-	-	-	-	-	-
397,3085	-	-	-	-	-	+	-	-

m/z	EBDC	CF1 DCM	SF2 DCM	2FB	2FF	2FG	2FH	4FB
399,2572	-	+	-	-	-	-	-	-
409,3921	-	-	-	++	-	-	-	-
413,1995	-	-	-	-	++	-	-	+
415,2294	-	-	-	-	+	-	-	-
427,3054	+	-	-	-	-	-	-	-
435,3118	-	-	-	-	+	-	-	+++
441,3798	-	-	-	++	+	-	-	-
450,3165	-	-	-	-	-	+	+	-
452,3430	-	-	-	-	++	-	-	+++
455,2719	+	+	-	-	-	++++	+++	-
455,2970	-	-	+	-	-	-	-	-
456,2763	-	-	-	-	-	+	++	-
457,2726	-	-	-	-	-	-	-	++++
457,2977	-	-	-	+	+++	-	-	-
458,3020	-	-	-	-	+	-	-	++
471,2441	-	++	++	-	-	+	-	-
471,3207	+	-	-	-	-	-	-	-
473,2425	-	-	-	-	+	-	-	-
481,3945	-	-	-	+	-	-	-	-
485,3639	+	-	-	-	-	-	-	-
495,3373	-	-	+	-	-	-	-	-
503,2895	-	-	-	-	+	-	-	-
513,2668	+	-	-	-	-	+	-	-
515,2583	-	-	-	-	+++	-	-	-
515,2850	-	-	-	-	-	-	-	+
515,3469	+	-	-	-	-	-	-	-
515,8275	-	-	-	-	-	-	+	-
517,2845	-	-	-	-	++	-	-	-
527,3206	-	-	+	-	-	-	-	-
529,3746	+	-	-	-	-	-	-	-
531,3242	-	+	-	-	-	-	-	-
551,2922	-	-	-	-	++	-	-	-
559,2714	-	-	-	-	-	+	-	-
569,2413	-	+	-	-	-	-	-	-
575,2970	-	-	-	-	+++	-	-	+
591,2722	++	-	-	-	-	++	+	-
591,2722	+	-	-	-	-	+	+	-
593,2791	-	-	-	-	+++	-	-	-
597,2902	-	+	-	-	-	-	-	-
599,2454	-	+	-	-	-	-	-	-
603,3964	+	-	-	-	-	-	-	-

m/z	EBDC	CF1 DCM	SF2 DCM	2FB	2FF	2FG	2FH	4FB
m/z								-
611,2471	-	-	+	-	-	-	-	-
613,2540	-	+	-	-	-	-	-	-
617,4530	+	-	-	-	-	-	-	-
631,2277	-	++	-	-	-	-	-	-
631,2572	-	-	+	-	-	-	-	-
636,3174	+	-	-	-	-	+	-	-
638,3478	-	-	-	-	+++	-	-	+
641,2787	+	-	-	-	-	+++	+	-
643,2787	-	-	-	-	+++	-	-	-
652,3580	-	-	-	-	+++	-	-	-
655,2842	+	-	+	-	-	++	-	-
656,3077	+	-	-	-	-	+	-	-
657,2415	-	++++	++++	-	-	-	-	-
657,2824	-	-	-	-	+++	-	-	-
657,3125	-	-	-	-	-	-	-	+
658,3056	-	-	-	-	+	-	-	-
663,4942	-	-	-	+	-	-	-	-
670,3428	-	-	-	-	+	-	-	-
671,2665	-	+++	+++	-	-	-	-	-
673,2778	-	-	-	-	-	+	+	-
675,3041	-	-	-	-	+	-	-	-
686,3264	-	-	-	-	+	-	-	-
689,2601	-	++	++	-	-	-	+	-
690,3096	-	-	-	-	-	+	-	-
691,4834	+	-	-	-	-	-	-	-
692,3031	-	-	-	-	+	-	-	-
697,3058	-	-	-	-	-	+	-	-
705,2418	-	+	+	-	-	-	-	-
705,4916	+	-	-	-	-	-	-	-
706,2409	-	+	-	-	-	-	-	-
706,2722	-	-	+	-	-	-	-	-
707,4595	+	-	-	-	-	-	-	-
735,4890	+	-	-	-	-	-	-	-
747,2960	-	+	+	-	-	-	-	-
749,4821	+	-	-	-	-	-	-	-
751,4780	+	-	-	-	-	-	-	-
765,2962	-	-	+	-	-	-	-	-
765,3287	-	-	+	-	-	-	-	-
779,5025	+	-	-	-	-	-	-	-

m/z	EBDC	CF1 DCM	SF2 DCM	2FB	2FF	2FG	2FH	4FB
795,4954	+	-	-	-	-	-	-	-
869,5563	++++	+	-	-	-	-	-	-
869,5909	-	-	+	-	-	++	-	-
870,5613	+++	-	-	-	-	-	-	-
870,5960	-	-	-	-	-	+	-	-
680,5285	-	-	-	+	-	-	-	-
793,5742	+	-	-	-	-	-	-	-
871,5948	-	-	-	-	++	-	-	-
872,6344	-	-	-	-	+	-	-	-
901,5485	+	-	-	-	-	-	-	-
929,5996	+	-	-	-	-	-	-	-
929,6354	-	-	-	-	-	+	-	-
930,6029	+	-	-	-	-	-	-	-
930,6388	-	-	-	-	-	+	-	-
931,6069	+	-	-	-	-	-	-	-
931,6634	-	-	-	-	+	-	-	-
961,5756	+	-	-	-	-	-	-	-
961,6121	-	-	-	-	-	+	-	-
962,6326	-	-	-	-	-	+	-	-
975,6186	-	-	-	-	-	+	-	-
1217,8553	-	-	-	-	-	+	-	-
1275,9314	-	-	-	-	-	+	-	-
1277,9919	-	-	-	-	-	+	-	-

Os valores estão expressos em abundância relativa: - (zero), + (0 a 25%), ++ (25% a 50%), +++ (50% a 75%) e ++++ (75% a 100%).

6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos e frações de *Synadenium grantii*, planta popularmente conhecida como cancerosa, coletada no campo experimental do CPQBA- UNICAMP, em Espírito Santo do Pinhal- SP e em Mogi-Mirim-SP. O estudo da atividade antiproliferativa foi realizado em dez linhagens tumorais humanas: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama, expressando fenótipo de resistência múltipla às drogas), NCI-H460 (pulmão), UACC-62 (melanoma), HT-29 (cólon), PC-03 (próstata), OVCAR-05 (ovário), U251 (Glioma- SNC) e 786-0 (renal), além de uma linhagem Hacat (Queratinócito Humano Normal) de células normais. Os resultados foram obtidos através de método colorimétrico utilizando o corante específico para proteína, a sulforrodamina B (SRB). As porcentagens de inibição de crescimento celular de cada linhagem diante da adição da amostra sob avaliação foram calculadas e expressas graficamente em uma curva concentração versus inibição de crescimento celular. Além de determinar a atividade antiproliferativa *in vitro*, os testes orientaram o processo de isolamento e identificação das frações ativas.

Inicialmente as folhas da espécie coletada no CPQBA foram extraídas em diclorometano, etanol e por último com água.

O látex da primeira coleta (LC) foi coletado após a retirada da folha seguida de coleta do látex e pesagem em eppendorf na segunda- feira, no dia anterior ao teste antiproliferativo, já o látex da segunda coleta (LC1) foi coletado após a retirada da folha seguida de coleta do látex e pesagem em eppendorf na terça feira, no dia do teste antiproliferativo e imediatamente dissolvido em DMSO, na tentativa de evitar a polimerização do mesmo.

Os extratos brutos resultantes foram avaliados no ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* para identificar em que extrato estava concentrado os

componentes capazes de inibir o crescimento celular das linhagens oriundas de tumores de câncer. Observou-se que o extrato diclorometânico foi capaz de inibir seletivamente as linhagens NCI-H460, com GI₅₀ de 0,20 µg/mL, enquanto o extrato alcoólico apresentou para esta mesma linhagem um valor de GI₅₀ 3,95 µg/mL. O látex desta espécie também demonstrou capacidade de inibir o crescimento celular desta linhagem, com GI₅₀ de 1,25 µg/mL. Porém nenhuma das amostras avaliadas foi capaz de demonstrar um efeito citocida sobre as células avaliadas.

Portanto foi selecionado o extrato diclorometânico para dar continuidade aos estudos de avaliação química e da atividade antiproliferativa *in vitro*. Através de cromatografia em coluna preparativa filtrante foram obtidas 58 frações, que através do perfil observado por cromatografia de camada delgada foram reagrupados em seis frações, que foram submetidos à avaliação de atividade antiproliferativa nas células tumorais humanas, destacando-se o aparecimento do efeito citocida para as frações denominadas FC, FD e FE.

Observou-se que a fração FC apresentou menores valores de TGI para as linhagens U251 (63,32 µg/mL), OVCAR-3 (109,02 µg/mL) e HT-29 (37,50 µg/mL) comparado à fração FD para as linhagens U251 (80,28 µg/mL), OVCAR (128,05 µg/mL) e HT-29 (50,59 µg/mL). Contrariamente a fração FD demonstrou maior seletividade para MCF-7 (64,94 µg/mL) e NCI/ADR-RES (45,68 µg/mL) comparado ao FC que apresentou TGI de 91,13 µg/mL para MCF-7 e 122,51 µg/mL para NCI/ADR-RES. Enquanto tanto as frações FC e FD demonstraram valores de TGI próximos para as linhagens 786-0 (7,77 e 7,55 µg/mL respectivamente) e NCI-H460 (0,31 e < 0,25 respectivamente) e PC-3 (48,52 e 49,79 µg/mL respectivamente). A fração E apresentou o menor valor de TGI para a linhagem NCI-H460 (<0,25 µg/mL).

Após a junção das frações FC, FD e FE e do seu fracionamento em coluna filtrante (1:3) com diferentes gradientes de n-hexano, diclorometano e metanol foram obtidas 104 frações as quais foram monitoradas por cromatografia

em camada delgada (CCD) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em nove frações: 2FA(F1-18); 2FB(F19-30); 2FC(F31-44); 2FD(F45-66); 2FE(F67-72); 2FF(F73-78); 2FG(F79-87); 2FH(F88-99) e 2FI (F100- lavagem com acetato de etila e metanol). As frações 2FF, 2FG e 2FH foram as mais ativas no teste antiproliferativo. Observou-se que a fração 2FF apresentou valor de TGI mais seletivo para as linhagens 786-0 (20,47 μ g/mL) e NCI-H460 (2,02 μ g/mL) comparado às frações 2FG para as linhagens 786-0 (22,63 μ g/mL) e NCI-H460 (3,85 μ g/mL). Contrariamente, a fração 2FH demonstrou maior seletividade para PC-3 (7,61 μ g/mL), OVCAR-3 (15,32 μ g/mL) e HT29 (25,63 μ g/mL) comparado ao 2FG que apresentou TGI de 9,45 μ g/mL para PC-3, 18,11 μ g/mL para OVCAR-3 e 38,14 μ g/mL para HT29. Enquanto tanto a fração 2FG e 2FH demonstraram valores de TGI próximos para a linhagem NCI-H460 (3,85 μ g/mL e 3,86 μ g/mL, respectivamente).

Os extratos brutos dos exemplares CF1 e SF2 vindos de Espírito Santo do Pinhal – SP também foram testados em sua atividade antiproliferativa sendo que o exemplar com flor extraído em diclorometano (CF DCM) apresentou valor de TGI para a linhagem NCI-H460 (8,28 μ g/mL), comparado ao exemplar sem flor extraído em diclorometano e ao extrato bruto do exemplar com flor em etanol (CF et) que foram inativos, confirmando que a melhor extração foi a realizada com o exemplar com flor em diclorometano. Deve-se destacar a influência da floração na atividade antiproliferativa *in vitro*, sugerindo que a época da coleta, a origem do exemplar e o método de extração interferiram na atividade antiproliferativa *in vitro* desta planta.

Foi possível comparar os rendimentos, em porcentagem, dos diferentes métodos de extração. Os melhores rendimentos em diclorometano foram obtidos pela maceração a frio, sem trituração em gelo seco, realizada imediatamente após coleta, com exemplar com flor (CF1) apresentando o valor de 1,50%, seguido pelos valores de 1,49% com o exemplar sem flor (SF2), 1,46% para o exemplar extraído com turbólise (MM) (valores muito próximos) e 0,69 % com a extração feita com gelo seco. Esse resultado sugere que a imediata colocação das folhas

no solvente diclorometano aumentou o rendimento no processo com os exemplares CF1 e SF2, assim como a turbólise com o exemplar MM, porém a extração com gelo seco não apresentou rendimento tão bom (0,69%), resultado este que pode estar relacionado também com a época da coleta do exemplar e não somente com o método de extração.

Os melhores rendimentos utilizando etanol também foram obtidos com as macerações a frio, realizadas imediatamente após coleta com o exemplar sem flor (SF2) e com o exemplar coletado no CPQBA (EBDC), ambas apresentando os valores de 3,73%, comparados com o extrato bruto proveniente de Mogi-Mirim obtido por turbólise com o valor de 2,97% e o exemplar com flor (CF1) no valor de 2,90%.

Finalmente, o melhor rendimento do extrato aquoso foi obtido por maceração a frio com trituração em gelo seco (EBAqC), com o valor de 1,14%, enquanto o extrato bruto proveniente de Mogi-Mirim obtido por turbólise apresentou o valor de 1,05%, e os resultados dos exemplares com flor (CF1) e sem flor (SF2) apresentaram valores muito próximos, de 0,94% e 0,95% respectivamente, sugerindo que a temperatura baixa (gelo) aumentou o rendimento do extrato aquoso das folhas de *S. grantii*, provavelmente por favorecer a polimerização de seus compostos extraídos na água, devido ao maior tempo gasto no processo de extração.

Esses resultados sugerem que existem componentes na mistura que sofrem influência da temperatura podendo ocorrer polimerização do látex, diminuindo o rendimento da extração dos compostos de interesse quanto maior for o tempo gasto no processo entre a coleta e a extração.

Inicialmente, na tentativa de identificar os grupos químicos responsáveis pela atividade estudada, foi realizada triagem fitoquímica dos extratos brutos diclorometânicos e das frações obtidas do primeiro fracionamento (FA, FB, FC, FD, FE e FF) com diferentes reveladores químicos. Vale salientar que estes ensaios são apenas indicativos de grupos químicos, podendo

apresentar resultados falso positivos, portanto devem ser interpretados com cautela.

Os resultados positivos nas revelações por Cloreto Férrico e DPPH sugeriram a presença de polifenóis, e confirmam o resultado descrito em literatura (Mahajan & Badgujar, 2008). O teste com Cloreto Férrico sugeriu a presença de taninos. Os polifenóis sugeriram a presença dos ácidos aromáticos (ácido benzóico, ácido fenilacético e ionol), presentes no látex desta planta corroborando com a descrição da literatura (Uzabakiliho *et al.*, 1987).

Os resultados positivos nas revelações por Hidróxido de Amônia sugeriram presença de cumarinas nas frações FA e FC, que em soluções alcalinas desenvolvem cor amarela, devido ao rompimento do anel lactônico que leva aos isômeros cis e trans que são visíveis a 366nm no UV-VIS (Simões *et al.*, 2004).

Os resultados positivos nas revelações por NP-PEG nas frações FC e FE sugeriram a presença de flavonoides, que constituem uma importante classe de polifenóis, dentre os quais podemos citar os antocianos, responsáveis pelas cores laranja, rosa, escarlata, vermelho, violeta e azul das pétalas de flores e frutos de vegetais superiores (Simões *et al.*, 2004), sugerindo a presença das antocianidinas nas folhas desta planta conforme literatura (Andersen *et al.*, 2010).

Os resultados positivos nas revelações por DPPH sugeriram presença de atividade antioxidante, pequena no látex, média no extrato bruto em diclorometano e maior no extrato bruto etanólico (Figura 17f), sugerindo que o extrato etanólico possua maior atividade antioxidante, provavelmente pela presença de taninos e cumarinas. Esse resultado também sugere a presença de Ionol (Tabela 4v) , um antioxidante que pode desempenhar um papel importante na estabilização do látex do *S. grantii* (Uzabakiliho *et al.*, 1987).

As frações 2FB, 2FF, 2FG e 2FH, obtidas a partir do extrato bruto diclorometânico, foram avaliadas por CG/EM e por ESI (MS) para tentar identificar os componentes presentes nas frações ativas. Além destas frações ativas também foram analisadas por ESI (MS), as frações dos extratos brutos diclorometânicos

obtidos a partir de diferentes métodos de extração dos exemplares do CBQBA (EBDC), do exemplar com flor (CF1 DCM) e do exemplar sem flor (SF2 DCM), ambos vindos de Espírito Santo do Pinhal.

O espectro de massas (EM) de uma substância pode fornecer importantes informações relacionadas com a estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. A massa molecular permite estabelecer a fórmula molecular da substância, enquanto o padrão de fragmentação pode ajudar a caracterizar a presença, bem como a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais. O espectrômetro de massas pode ser acoplado a um aparelho de cromatografia gasosa (CG/EM), que permite a separação de componentes de baixa massa molecular, mesmo em misturas complexas. Essa técnica é muito usada para análise de óleos voláteis (Collins *et al*, 2006).

Foi utilizada a Espectrometria de Massas com detectores de tempo de voo de íons- TOF/MS (*time of flight/ mass spectrometry*) na qual os compostos polares e termicamente lábeis podem ser analisados por técnicas de ionização brandas, que operam em pressão atmosférica, com grande rapidez, sensibilidade de picomol a femtomol, seletividade e preparo mínimo das amostras. As vantagens mais importantes desta técnica são a alta sensibilidade e seletividade combinadas com a possibilidade de confirmar a identidade de componentes presentes em amostras biológicas complexas. Apesar da alta produtividade, a Espectrometria de Massas apresenta algumas limitações. Os isômeros não podem ser diferenciados por terem a mesma fórmula molecular e pode haver o mascaramento devido à presença de clorofila no caso da matriz ser muito complexa (Cabral, 2010).

Os valores de m/z dos compostos obtidos nas frações por Espectrometria de Massas puderam ser comparados com aqueles descritos em literatura (Nielsen *et al.*, 1979), obtendo-se correspondência para os compostos de m/z igual a 427,3054, descritos em literatura como eufol, tirucalol e isômeros do lanosterol (Tabela 4r, s, z) respectivamente, com $M = 426,7174$, encontrado no extrato bruto em diclorometano (EBDC), descontando a soma da carga do H^+ igual a 1, usado para protonação.

Outro valor encontrado foi o m/z igual a 697,3058, comparado ao descrito em literatura (Andersen *et al.*, 2010) como cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-p-coumaroil)- β -apiofuranosil)-b-xilopiranosida) com m/z igual a 697,1785, presente na fração 2FG.

O único resultado encontrado por CG/EM com correspondência acima de 90% em relação à biblioteca NIST foi o fragmentograma correspondente ao 4º pico da fração 2FB (Figura 31a) com tempo de retenção igual a 41.583min. obtendo-se a denominação 9,19-CICLOLANOST-24 EN-3OL, [3BETA], com 99% de correspondência, número do banco de dados 176585 e PM=426 (Figura 33).

Os fatores críticos para o emprego clínico de fitoterápicos envolvem, especialmente, dificuldades de controle de qualidade e da estabilidade destes produtos. Sabe-se que algumas plantas podem possuir centenas de constituintes, alguns deles presentes em concentração mínimas. Assim, mesmo considerando os avanços ocorridos nas últimas décadas, em relação aos métodos analíticos de isolamento e identificação química de constituintes de plantas, raramente essas metodologias permitem a identificação e a caracterização de todos os princípios ativos presentes nos extratos de plantas. Além dessas dificuldades, o teor dos constituintes presentes nas plantas varia consideravelmente em função de fatores externos, incluindo: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, métodos de coleta e de extração e parte da planta usada. Cada um desses fatores pode afetar diretamente a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, o produto final e a eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Além disso, existem nas plantas muitos sistemas enzimáticos próprios que, mesmo depois da coleta, podem continuar ativos e degradar os princípios ativos, afetando a qualidade e a eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Esses aspectos, em conjunto, justificam as dificuldades que as indústrias vêm enfrentando em manter em boas condições a qualidade, eficácia clínica e segurança para os medicamentos fitoterápicos (Calixto, 2001).

Entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destaca-se a microencapsulação. As

vantagens da microencapsulação motivam a continuidade de estudos aplicados à preservação das características de produtos naturais, dentro da estratégia de padronização desses produtos na busca de um produto final com qualidade (Servat, 2010).

Neste trabalho ficou claro a importância da Família Euphorbiaceae como fonte promissora de novos agentes anticâncer, não só da espécie estudada, o *Synadenium grantii*, mas também de outras Euphorbiaceae que já se encontram em estudo clínico, confirmando desta forma a relevância do estudo etnofarmacológico dessa família (de Melo *et al.*, 2011; Pianowski, 2011; Toker, 2010; Ogbourne *et al.*, 2004; Aylward *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 1979).

Resta salientar também a necessidade de estudos posteriores *in vivo* desta espécie, que possam confirmar sua atividade antiproliferativa em animais, e de estudos clínicos, buscando obter uma melhor elucidação das estruturas envolvidas nessa atividade, através da comparação com padrões, e dos diferentes mecanismos de ação farmacológicos, possibilitando o uso desta espécie na prevenção e no tratamento do câncer.

Para viabilizar o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir desta espécie será necessário desenvolver estudos de padronização com esta espécie, para viabilizar um produto que atenda aos parâmetros de reprodutibilidade, eficácia e segurança.

Portanto o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos requer estudos que devem considerar desde a padronização do material vegetal, que requer seleção da melhor variedade, com maiores teores de princípios ativos para a patologia que o produto está sendo dimensionado. Até identificação dos princípios ativos, estudos de estabilidade e desenvolvimento de formulação que posteriormente será submetida a estudos pré-clínicos e clínicos.

Neste trabalho contribuimos com dados preliminares sobre a atividade da espécie vegetal identificando as classes químicas envolvidas com os efeitos benéficos ou nocivos.

Sabe-se que os medicamentos fitoterápicos são utilizados por automedicação ou por prescrição médica e a maior parte não tem o seu perfil toxicológico bem conhecido. Atualmente estão incorporados aos vários Programas de Fitoterapia como opção terapêutica eficaz e pouco custosa. A importância da inclusão dos medicamentos fitoterápicos nos programas de farmacovigilância vem sendo reconhecida nos últimos anos por vários países da Europa, como Reino Unido e Alemanha, onde várias plantas foram submetidas à farmacovigilância e muitas delas foram retiradas do mercado devido a importantes efeitos tóxicos e risco para uso humano. O aumento no número de reações adversas reportado é possivelmente justificado pelo aumento do interesse populacional pelas terapias naturais observado nas últimas décadas. A farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos são uma preocupação emergente e através do sistema internacional será possível identificar os efeitos indesejáveis desconhecidos, quantificar os riscos e identificar os fatores de riscos e mecanismos, padronizar termos, divulgar experiências, entre outros, permitindo seu uso seguro, eficaz (Silveira *et al.*, 2008).

Trabalhos futuros serão necessários para estabelecer parâmetros para produção de matéria prima padronizada para alcançar um produto com características definidas permitindo a reprodutibilidade dos efeitos observados.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu identificar a variabilidade na composição química e de atividade em células tumorais humanas dos extratos brutos produzidos a partir da espécie *Synadenium grantii*. de diferentes procedências.

- a) Os resultados a partir dos diferentes métodos de extração sugerem que existem componentes no extrato bruto que se decompõem pela temperatura e que se polimerizam com o tempo prolongado de extração, sendo que o melhor método de extração em diclorometano foi o realizado imediatamente após a trituração sem utilização de gelo seco do exemplar com flor (CF1) proveniente de Espírito Santo do Pinhal.
- b) A variabilidade da composição química dos extratos brutos obtidos a partir do *S. grantii* de diferentes procedências após utilização de diferentes métodos de extração (trituração com gelo, sem gelo, maceração dinâmica e turbólise) forneceu diferentes resultados: no rendimento geral do extrato bruto, na resposta da atividade antiproliferativa *in vitro* e nas análises monitoradas por ESI (MS), sugerindo diferentes compostos químicos e diferentes mecanismos de ação farmacológicos.
- c) A fração que apresentou melhor valor de TGI foi a 2FF= 2,02 µg / mL para a linhagem de célula NCI-H460 (Pulmão- carcinoma tipo não pequenas células), coincidentemente para o tipo de câncer mais comumente diagnosticado em todo o mundo (1,61 milhão de casos ou 12,7% do total) e a causa mais comum de morte por câncer (1,38 milhão ou 18,2% do total).
- d) O monitoramento por ESI (MS) permitiu comparar os dados obtidos com alguns dados de literatura, obtendo-se duas correlações, porém não foi possível finalizar essa análise por falta de resultados de três análises (2FB, 2FF e 5FB).

- e) Por falta de tempo hábil e pelo baixo rendimento do extrato bruto obtido em diclorometano (0,69%), não foi possível fazer o micro encapsulamento e o estudo de estabilidade acelerada que estavam previstos no projeto inicial.

Portanto este trabalho demonstrou a importância e a necessidade de pesquisa em desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais para permitir a produção de medicamentos fitoterápicos de qualidade que sejam confiáveis para uso humano, principalmente no tratamento do câncer.

8 REFERÊNCIAS

Adhav M, Patel B, Gharia A. Evaluation of antimicrobial agent from leaves of *Synadenium grantii* Hook.f. Bot. Mag. Biosciences Biotechnology Research Asia, 2010; 7 (2): 919-924.

Adolf W, Chanai S, Hecker E. 3-O-angeloylingenol, the toxic and skin irritant factor from latex of *Euphorbia antiquorum* L. (Euphorbiaceae) and from a derived Thai purgative and anthelmintic (vermifuge) drug. Journal of the Science Society of Thailand, 1983; 9: 81-8.

Ames BN, McCann J, Sawyer C. Mutagens and carcinogens. Science, 1976; 8; 194(4261): 132-3.

Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. Overview of Major Classes of Plant-Derived Anticancer Drugs. Int J Biomed Sci. 2009; 5(1): 1-11.

Andersen OM, Jordheim M, Byamukama R, Mbabazi A, Ogweng G, Skaar I, Kiremire B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). Phytochemistry, 2010; 71(13): 1558-63.

Aylward JH, Parsons PG, Suhrbier A, Turner KA. United States Patent and Trademark Office Pre-grant Publication. US20030166613. 2003.

Bacsikai B. How Amyloid Plaques May Damage Brain Cells In Alzheimer's Disease. [acesso 2009 May 25]. Disponível em: <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/07/080730140623.htm>.

Bagavathi R, Sorg B, Hecker E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. Planta medica, 1988; 54 (6): 506-510.

Balakrishnan NP & Chakraborty T. The Family Euphorbiaceae in India. A Synopsis of Its Profile, Taxonomy and Bibliography. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun. 2007. 500pp.

Basu A. Chapter 21 - PKC and Resistance to Chemotherapeutic Agents. M.G. Kazanietz (ed.), In: Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy. Current Cancer Research, 2010. p. 409-422.

Batkin S, Taussig S, Szekerezes R. Modulation of pulmonary metastases (Lewis lung carcinoma) by bromelain, an extract of the pineapple stem (*Ananas comosus*). Cancer Invest, 1988; 6: 241-2.

Benhadji KA, Serova M, Ghoul A, Cvitkovic E, Tourneau CL, Ogbourne SM, Lokiec F, Calvo F, Hammel P, Faivre S, Raymond E. Antiproliferative activity of PEP005, a novel ingenol angelate that modulates PKC functions, alone and in combination with cytotoxic agents in human colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, 2008; 99: 1808 – 15.

Blumberg PM, Acs P, Bhattacharyya DK, Lorenzo PS. Inhibitors of protein kinase C and related receptors for the lipophilic messenger sn-1, 2-diacylglycerol. In Gutkind JS (Ed.), Totowa, NJ: Humana Press. *Signal Transduction and Cell Cycle Inhibitors*, 2000. p. 347–64.

Blumberg PM, Kedei N, Lewin NE, Yang D, Tao J, Telek A, Geczy T. Chapter 3 - Phorbol Esters and Diacylglycerol: The PKC Activators. M.G. Kazanietz (ed.), In: *Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy*. Current Cancer Research, 2010. p. 25-53.

Boissier, P E. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 15(2): 187. 1862.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. / Instituto Nacional de Câncer. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. / Instituto Nacional de Câncer. – 3. ed. rev. atual. ampl. – Rio de Janeiro: INCA, 2008. 628 p. [acesso 2012 Jun 24]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/enfermagem>

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). [acesso 2012 Jun 24]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee+/>

Bridges AJ. Chemical inhibitors of protein kinases. *Chem Rev*. 2001; 101(8): 2541-72.

Bruneton J. Euphorbiaceae. Euforbiáceas. En: Bruneton J. *Plantas tóxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. 2001. p. 251-67.

Cabral, EC. Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por Espectrometria de Massas para Análise de Extrato de Produtos Naturais [tese]. São Paulo: Instituto de Química/Universidade de São Paulo; 2010.

Calixto JB. In: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Yunes R A, Calixto J B, eds. 1ª ed. Ed. Argos: Chapecó; 2001. p. 297- 315.

Carus SW. Bioterrorism and Biocrimes: The Illicit Use of Biological Agents since 1900. Fredonia Books, 2002, 220 p.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J Biol Chem. 1982; 257(13): 7847-51.

Central X Bulas- Bulário de medicamentos. [acesso 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://www.bulas.med.br/bula/12801/glivec.htm>.

Chabner BA, Calabresi P. Em: As Bases Farmacológicas da Terapêutica; Goodman LS, Gilman A, eds. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-49.

Chabner BA, Longo DL. In: Cancer chemotherapy and biotherapy; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.

Challacombe JM, Suhrbier A, Parsons PG, Jones B, Hampson P, Kavanagh D, Rainger GE, Morris M, Lord JM, Le TT, Hoang-Le D, Ogbourne SM. Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate. J Immunol. 2006 ; 177(11): 8123-32.

Chandrashekharaiiah KS, Ramachandra Swamy N, Siddalinga Murthy KR. Carboxylesterases from the seeds of an under utilized legume, *Mucunapruriens*; isolation, purification and characterization. Phytochemistry. 2011; 72(18): 2267-74. Epub 2011 Oct 1.

Chiele Neto C, Tarta C. Câncer colorretal. In: ROHDE L; *et al.* Rotinas em cirurgia digestiva. 1ª. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.187 – 92.

Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Unicamp. 2006. p.87-101, p. 203-72.

Conforti F, Statti GA, Tundis R, Menichini F, Houghton P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium*, Turra aerial part. Fitoterapia, 2002; 73: 479-83.

Cragg GM & Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. 2005a; 100: 72–9.

Cragg GM & Newman DJ. International collaboration in drug discovery and development from natural sources. *Pure Appl Chem*. 2005b; 77(11): 1923–42.

Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem Rev*. 2009; 109(7): 3012-43.

CRScientific. [acesso 2012 Jan 25]. Disponível em: <http://www.crscientific.com/newsletter10-anthocyanins.html>

Cunha LC, Azeredo FS, Mendonça ACV, Vieira MS, Pucci LL, Valadares MC,1 Freitas HOG, Sena AAS, Lino Jr R de S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2009; 19(2A): 403-11.

da Mota MF, Benfica PL, Batista AC, Martins FS, de Paula JR, Valadares MC. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of Ethnopharmacology*. In Press, Uncorrected Proof.

Dayanand CD & Krishna Murthy N. Evidence of Fibrinolytic Protease in the Latex of *Synadenium grantii* Hook. f. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 2010; 6(4): 645–55.

de Almeida VL, Leitão A, Reina L del CB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova*, 2005; 28 (1):118-29.

de Melo JG, Santos AG, de Amorim EL, do Nascimento SC, de Albuquerque UP. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011:365359. Epub 2011 Mar 8.

Docampo PC, Cabrerizo S, Paladino N, Parreño ML, Ruffolo V, Mutti O. Erythroderma secondary to latex-producing plants (*Synadenium grantii*). *Archivos Argentinos de Pediatría*, 2010; 108 (6): 126-9.

Dourado RS & Ladeira AM. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Revista Brasil. Bot.*, 2008; 31(4): 611 -20.

Driedger PE & Blumberg PM. Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980; 77, 567–71.

Durgawale PP, Shukla PS, Sontakke SD, Chougule PG. Differential erythrocyte agglutination pattern in normal and cancer patients with *Synadenium grantii* root (Hook. f.) Lectin. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2001; 16 (1): 110-2.

Eggl U. Illustrated handbook of succulent plants: Dicotyledons, 2002. [acesso 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=ffBRAyZLuh0C&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>.

Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor supressor gene in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1994; 32: 39-47.

EMDChemicals. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2012. [acesso 2012 Jan 25]. Disponível em: http://www.emdchemicals.com/life-science-research/phorbol-12-myristate-13-acetate/EMD_BIO-524400/p_SCCb.s1LdtMAAAEWdmEfVhTm

Fu P, Robinson T. Pyridinium oxidases in the family Euphorbiaceae. Phytochemistry, 1970; 9(12): 2443-6.

González-Rábadea N, Badillo-Coronab JA, Aranda-Barradasb JS, Oliver-Salvador MC. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* — A review. Biotechnology Advances, 2011; 29(6): 983-96.

Govindappa T, Govardhan L, Jyothy PS, Veerabhadrapa PS. Purification and characterisation of a carboxylesterase from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f. Journal of Biosciences, 1987; 12(1): 71-86.

Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell- Review. J Ethnopharmacol. 2000; 73: 347–77.

Griner EM & Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nature Reviews Cancer, 2007; 7(4): 281–94.

Guerra MR, Gallo CV de M, Mendonça GA e S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. Revista Brasileira de Cancerologia 2005; 51(3): 227-234.

Guimaraes-Ferreira CA, Rodrigues EG, Mortara RA, Cabral H, Serrano FA, Ribeiro-dos-Santos R, *et al.* Antitumor effects *in vitro* and *in vivo* and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. Neoplasia, 2007; 9: 723–33.

Hahn WC & Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Rev. Cancer.* 2002; 2: 331-41.

Hampson P, Chahal H, Khanim F, Hayden R, Mulder A, Assi LK, Bunce CM, Lord JM. PEP005, a selective small-molecule activator of protein kinase C, has potent antileukemic activity mediated via the delta isoform of PKC. *Blood*. 2005; 106(4): 1362-8. Epub 2005 Apr 21.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646–74.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100 (1): 57–70.

Hartmann DB. Avaliação da atividade moluscicida de plantas tóxicas. Mestrado em Biotecnologia aplicada a Agricultura. [dissertação]. Paraná: Universidade Paranaense- UNIPAR; 2010.

Hartwell JL. *Plants Used Against Cancer: A Survey*. Lawrence, Mass.: Quarterman Publications; 1982. p. 438-9.

Hennings H, Blumberg PM, Pettit GR, Herald CL, Shores R, Yuspa, SH. Bryostatin 1, an activator of protein kinase C, inhibits tumor promotion by phorbol esters in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis*, 1987; 8: 1343–46.

Hickey TA, Worobec SM, West DP, Kinghorn AD. Irritant contact dermatitis in humans from phorbol and related esters. *Toxicol*. 1981; 19(6): 841-50.

IARC- International Agency for Research on Cancer- World Health Organization. [acesso 2012 jun 24]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=76#KEY>

IPNI - The International Plant Names Index. [acesso 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>.

Ito Y, Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K. Distribution and characterization of environmental promoter substances as assayed by synergistic Epstein-Barr virus-activating system. *Princess Takamatsu Symp*. 1983; 14: 125-37.

Itokawa H, Wang X, Lee KH. Homoharringtonine and related compounds. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. (Eds.). *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL; 2005. p. 47–70.

Jung YJ, Lee JK, Sung CG, Oh TK, Kima HK. Nonionic detergent induced activation of an esterase from *Bacillus megaterium* 20–1. *J. Mol. Catalysis B Enzymatic*. 2003; 26: 223–9.

- Kedei N, Lundberg DJ, Toth A, Welburn P, Garfield SH, Blumberg PM. Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C. *Cancer Res.* 2004; 64: 3243–55.
- Kelly GS. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications. *Altern Med Rev.* 1996; 1: 405–10.
- Kinghorn AD. Characterization of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *J Nat Prod.* 1979; 42: 112-5.
- Kinghorn AD. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1980; 69(12): 1446-7.
- Klasco RK (Ed). POISINDEX® System. Thomson Reuters, Greenwood Village, Colorado. Plants-Euphorbiaceae, 2010.
- Koide K, Bunnage ME, Gomez Paloma L, Kanter JR, Taylor SS, Brunton LL, Nicolaou KC. Molecular design and biological activity of potent and selective protein kinase inhibitors related to balanol. *Chem Biol.* 1995; 2(9): 601-8.
- Koifman S, Koifman R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res.* 2003; 544(2-3): 305-11.
- Kraft AS, Anderson WB, Cooper HL, Sando JJ. Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *J Biol Chem.* 1982; 257(22): 13193-6.
- Kusamba Chifundera. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. *Fitoterapia*, 2001; 72: 351-68.
- Lazebnik Y. "What are the hallmarks of cancer?". *Nat. Rev. Cancer*, 2010; 10 (4): 232–3.
- Leipner J, Ilen F, Saller R. Therapy with proteolytic enzymes in rheumatic disorders. *BioDrugs*, 2001; 15: 779–89.
- Lotti T. Controlled clinical studies of bromeline in the treatment of urogenital inflammation. *Drugs*, 1993; 46: 144–6.
- Machado AED. Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. *Quim. Nova*, 2000; 23, 237-43.

Mahajan RT & Badgujar SB. Phytochemical Investigations of some Laticiferous Plants belonging to Khandesh Region of Maharashtra. *Ethnobotanical Leaflets*, 2008; 12: 1145-52.

Marinho JRD & Monteiro EEC. Analysis of natural cis- and trans-polyisoprene mixtures by near-infrared spectrophotometry. *Polymer Testing*, 2000; 19(6): 667-72.

Máximo JA. Patología exantemática. En: Pueyo SF, Máximo JA. *Dermatología infantil en la clínica pediátrica*. Buenos Aires: Artes Gráficas Buschi S.A. 1999; 5: 141-82.

Mazoir N, Benharref A, Bailén M, Reina M. Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry*, 2008; 69: 1328–38.

Melis G. Clinical experience with metoxybutropate vs bromelain in the treatment of female pelvic inflammation. *Minerva Ginecol*. 1990; 42: 309–12.

Mello VJ, Gomes MTR, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MTP, *et al.* The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, 2008; 15: 237–44.

Melo-Reis PR, Andrade LS, Silva CB, Araújo LMM, Pereira MS, Mrue F, Chen-Chen L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. *Braz. J. Biol.*, 2010; 70(1): 189-94.

Melo-Reis PR, Bezerra LSA, Vale MAAB, Canhête RFR, Chen-Chen, L. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.*, 2011; 71(1): 169-74.

Menon M, Vithayathil PJ, Raju SM, Ramadoss CS. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f. *Plant Science*, 2002; 163 (1): 131-9.

Merck Chemicals. [acesso 2012 Jan 25]. Disponível em: <http://www.merck-chemicals.com>

Mohtadi H & Murshid A. A Global Chronology of Incidents of Chemical, Biological, Radioactive and Nuclear Attacks: 1950-2005. 2006. [acesso 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://www.ncfpd.umn.edu/Ncfpd/assets/File/pdf/GlobalChron.pdf>

Monks A, Scudiero D, Skekan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-wolff A, Gray-goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel

of Cultured Human Tumor Cell Lines. Journal of the National Cancer Institute, 83: 757-66, 1991.

Montanari CA, Bolzani VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Quim. Nova; 2001, 24(1): 05-11.

Murad AM, Katz A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento. Guanabara: Rio de Janeiro; 1996. p. 41

Narayana N, Diller TC, Koide K, Bunnage ME, Nicolaou KC, Brunton LL, Xuong N, Eyck T, Taylor SS. Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry, 1999; 23, 38(8): 2367-76.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database [acesso 2011 Feb 22]. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Newton AC. Chapter 2- Regulation of Conventional and Novel Protein Kinase C Isozymes by Phosphorylation and Lipids. M.G. Kazanietz (ed.), In: Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy. Current Cancer Research, 2010; 9-23.

Nicholson MJ. *Euphorbia pseudograntii* Bruyns. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). Prota 11(1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands. 2008.

Nielsen PE, Nishimura H, Liang Y, Calvin M. Steroids from *Euphorbia* and other latex-bearing plants. Phytochemistry, 1979; 18: 103-4.

Nogueira IAL, Leão ABB, Vieira M de S, Benfica PL, Cunha LC da, Valadares MC. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. J Ethnopharmacol. 2008; 120: 474-8.

Ogbourne SM, Hampson P, Lord JM, Parsons P, De Witte PA, Suhrbier A. Proceedings of the First International Conference on PEP005. Anti-Cancer Drugs, 2007; 18: 357-62.

Ogbourne SM, Suhrbier A, Jones B, Cozzi SJ, Boyle GM, Morris M, McAlpine D, Johns J, Scott TM, Sutherland KP, Gardner JM, Le TT, Lenarczyk A, Aylward JH, Parsons PG. Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. Cancer Res. 2004; 64(8): 2833-9.

Oliveira RB & Alves RJ. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. Quim. Nova, 2002; 25: 976-84.

Opferkuch HJ & Hecker E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae) IV. Skin irritant and tumor promoting diterpene esters from *Euphorbia ingens*. E. Mey. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1982; 103: 255–68.

Ortêncio WB. Medicina popular do Centro-Oeste. 2.ed. Brasília: Thesaurus, 1997. 59p.

Otsuki N, Dang NH, Kumagai E, Kondo A, Iwata S, Morimoto C. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. J Ethnopharmacol. 2010; 127: 760–7.

Ozbun MA, Butel JS. Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. Adv Cancer Res. 1995; 66: 71-141.

Pianowski LF, Calixto JB, Chaves CP. Amazonia Fitomedicamentos Ltda. Active Fraction of a Polar Solvent Extract from the Latex of Euphorbiaceae Plants. WO2007000618. 2007.

Pianowski LF, Calixto JB, Leal PC, Chaves CP. Amazonia Fitomedicamentos Ltda. Pharmaceutical uses of lanosta-8,24-dien-3-ols. US 2011136773 (A1). 2011 Jun 09.

Pinto Jr FEL, de Oliveira AJF, de Oliveira AGF, Ramos CCF, Carlos Ramos C de O, Medeiros A da C. Tumor estromal gástrico apresentando-se com quadro de hemoperitônio. Revista Brasileira de Cancerologia, 2003; 49(1): 55-8.

Premaratna A, Shadaksharaswamy M, Nanjappa S. Isolation, purification & properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f. Indian J Biochem Biophys. 1981; 18(1): 32-5.

Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. Cancer Res. 1990; 50: 7415-21.

Rajesh R, Nataraju A, Gowda CDR, Frey BM, Frey FJ, Vishwanath BS. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. Biochimie, 2006; 88 (10): 1313-22.

Rajesh R, Shivaprasad HV, Gowda CDR, Nataraju A, Dhananjaya BL, Vishwanath BS. Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: A special emphasis on clot inducing and dissolving properties. Planta Medica, 2007; 73 (10): 1061-7.

Salmonm, S.E. In: Farmacologia Básica & Clínica. Katzung BG. ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-55.

Scirus- for Scientific Information only. [acesso 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://www.scirus.com/>

Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Foglio MA. Microencapsulação: uma Alternativa Promissora para Preservação de Produtos Naturais. Revista Fitos, 2010, 5(02): 52-57.

Sharon N & Lis H. Carbohydrates in cell recognition. Sci. Am., 1993; 268: 82-9.

Shoemaker RH. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. Nat Rev Cancer. 2006; 6: 813-23.

Sigma Aldrich. [acesso 2012 Jan 25]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>

Silva BV, Horta BAC, de Alencastro RB, Pinto AC. Proteínas cinases: características estruturais e inibidores químicos. Quim. Nova, 2009; 32(2): 453-462.

Silva, P. Farmacologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Silveira PF da, Bandeira MAM ; Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(4): 618-626, Out./Dez. 2008.

Simões CM de O, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Editora da UFSC. 2004. p. 229- 45, p. 577- 614.

Sobiologia. [acesso 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br>.

Sociedade Beneficiente Israelita Brasileira Albert Einstein. [acesso 2011 Nov 03]. Disponível em: <http://www.einstein.br/espaco-saude/tecnologia-e-inovacao/Paginas/avelos-um-aliado-contra-o-cancer.aspx>.

Spence RAJ, Jonhston PG. In: Oncology; Jonhston, P. G., Ed; Oxford University Press: Oxford; 2001. p. 1-14, 121-32.

Spoerke DG, Montanio CD, Rumack BH. Pediatric exposure to the house plant *Synadenium grantii*. Vet Hum Toxicology, 1985; 28: 283-4.

Stata N. Toxic effects of plants. En: Casarett & Doulls: Toxicology. The basic science of poisons. 8ª Ed. Nueva York: McGraw-Hill, 1996; 27: 841-4.

Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, 2003; 3:55-63.

Szallasi Z, Krsmanovic L, Blumberg PM. No promoting 12-deoxyphorbol 13-esters inhibit phorbol 12-myristate 13-acetate induced tumor promotion in CD-1 mouse skin. *Cancer Research*, 1993; 53: 2507-12.

Tabuti JRS, Dhillon SS, Lye KA. Ethno veterinary medicines for cattle (*Bos indicus*) in Bulamogicounty, Uganda: Plant species and mode of use. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; 88 (2-3): 279-86.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; March 13; 135(2): 397-402.

Targoni O, Tary L, Lehmann P. Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment. *J Autoimmun*, 1999; 12: 191-8.

Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10: 267-277.

Thorold PW. Suspected Malicious Poisoning. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 1953; 24: 215-7.

Tiezzi DG. Cirurgia conservadora no câncer de mama. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007; 29(8): 428-34.

Toker A. Chapter 1- Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy: Introduction and Historical Perspective M.G. Kazanietz (ed.), In: *Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy*. Current Cancer Research, 2010. p. 3-8.

Tropicos. Missouri Botanical Garden.[acesso 2011 Nov 8]. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/12804781>.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?460226> (2011 Nov 20).

Uzabakiliho B, Largeau C, Casadevall E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. 1987 *Phytochemistry*, 1987; 26(11): 3041-5.

Valadares MC, de Castro NC, da Cunha LC. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007; 43(4): 631-8.

Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. J Cell Biol. 2003; 161(5): 899-909. Epub 2003 Jun 2.

Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant antitumor agents, the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. J Am Chem Soc. 1966; 88: 3888–90.

Warburg O, Posener K, Negelein E: "Ueber den Stoffwechsel der Tumoren" Biochemische Zeitschrift, 1924; 152: 319–344 (German). Reprinted in English in the book on metabolism of tumors by Warburg, O. Publisher: Constable, London, 1930.

Watson L & Dallwitz MJ (1992 onwards). The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 14th December 2000. [acesso 2011 nov 20]. Disponível em: <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.

Weinberg RA. A biologia do câncer. Porto Alegre: Artmed; 2008.

Wikipedia [acesso 2012 Jan 25]. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cyanidin_3-O-glucoside.svg

Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.533-48.

Zayed SMAD, Farghaly M, Taha H, Gotta H, Hecker E. Dietary cancer risk conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (Euphorbiaceae) I. Skin irritant and tumor-promoting ingenane-type diterpene esters in *E. peplus*, one of several herbaceous *Euphorbia* species contaminating fodder of livestock. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1998; 124: 131–40.

Zhou BB. & Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 2000; 408: 433-39.