

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Giovanna Barbarini Longato

Atividade anticâncer de extratos brutos e frações ativas obtidos
de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Giovanna Barbarini
Longato
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L855a

Longato, Giovanna Barbarini

Atividade anticâncer de extratos brutos e frações ativas obtidos de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* / Giovanna Barbarini Longato. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: João Ernesto de Carvalho, Mary Ann Foglio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células - Proliferação. 2. Piperaceae. 3. *Piper regnellii*. 4. Carcinoma de Ehrlich. 5. Lignans. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Anticancer activity of crude extracts and active fractions obtained from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*.

Palavras-chave em inglês: Cell proliferation; Piperaceae; *Piper regnellii*; Carcinoma, Ehrlich tumor; Lignans.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho, Frederico Argollo Vanderlinde, Luciana Konecny Kohn.

Data da defesa: 23/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

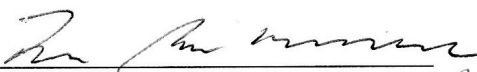
Campinas, 23 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

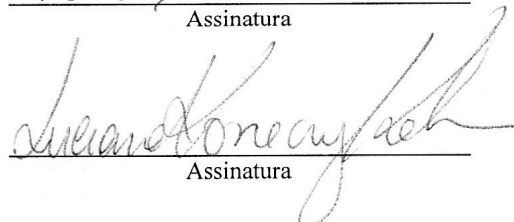
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Frederico Argollo Vanderlinde


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Konecny Kohn


Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Assinatura

Profa. Dra. Andréa Mollica do Amarante Paffaro

Assinatura

Aos meus pais, José Luiz e Mariangela,
Pelo dom da vida, pelo amor incondicional,
Pela presença em todos os momentos,
Por todo incentivo e apoio,
Dedico-lhes este trabalho.

À minha família, em especial meus avós,
Pela preocupação constante e pelo amor,
Dedico-lhes este trabalho.

Ao Fábio, pelo amor, pela companhia, pelo encorajamento,
Por me fazer acreditar que posso ir além do que penso ser capaz,
Dedico-lhe este trabalho.

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez."
Jean Cocteau

"Não poderás ser mestre na escrita e leitura sem ter sido antes aluno.
Quanto menos na vida."
Marco Aurélio

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me dá forças para superar os desafios e sem O Qual eu não seria ninguém;

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela oportunidade de trabalho, pelo profissionalismo e por ser orientador e amigo;

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio, por toda a orientação fitoquímica envolvida neste projeto e também pela amizade e carinho;

À Ana Lúcia, a quem eu sempre recorri em momentos de desespero, pelas inúmeras ajudas e sugestões, além do carinho, atenção e amizade prestados a mim;

À Sirlene, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos, pela amizade e por ser uma “mãezona”;

À Ana Possenti e à Karin, por todo apoio, por estarem sempre presentes nos momentos difíceis, tanto pessoais quanto profissionais, e por serem tão especiais;

Aos meninos Humberto e Vinícius, e às meninas da Farmacologia: Michele, Vanessa, Gabriela, Débora, Luciana e Cristiana, pela ajuda, pelo companheirismo e pelas risadas, fundamentais na convivência diária;

Ao pessoal da Fitoquímica: Johnny, Karina, Núbia e Amanda, pelo apoio técnico e amizade;

À Larissa pela amizade sincera, pelo conhecimento compartilhado, pela colaboração nos experimentos e pela companhia sempre agradável;

À Érika, sempre prestativa, pelo apoio técnico e pela ajuda nos experimentos;

À Ilza, ao Benício e ao Adilson pelo apoio prestado e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Aos professores membros da pré-banca e da banca de Mestrado pela disponibilidade e pelas sugestões que enriqueceram esta tese;

À Liliam, secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela competência, pelo profissionalismo e também pela atenção dispensada a mim e a todos os alunos deste programa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP;

À FAPESP, ao CNPq e à Capes pelo apoio financeiro;

A todos os amigos que de alguma forma colaboraram no pleno desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças que atinge milhões de pessoas, sendo a segunda causa de morte da população mundial. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de células instáveis que passam a não responder aos estímulos internos e externos que controlam a proliferação, diferenciação e morte celular. Apesar da grande quantidade de estudos relacionados ao gênero *Piper* e suas espécies, não há descrição sobre a atividade antiproliferativa *in vitro* e antitumoral *in vivo* da espécie *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*. O presente estudo avaliou a atividade antiproliferativa *in vitro* desta espécie, coletada em três épocas diferentes: junho e outubro de 2008 e fevereiro de 2009. Dentre as coletas realizadas, o extrato bruto diclorometânico de junho e suas frações de média polaridade apresentaram atividade citotóxica *in vitro* com boa correlação entre concentração e efeito e também seletividade para as linhagens hormônio-dependentes de ovário (OVCAR-3) e mama (MCF7), bem como para as linhagens de melanoma (UACC-62) e próstata (PC-3). De acordo com os nossos estudos, uma das substâncias responsáveis por esta atividade é uma neolignana denominada eupomatenóide-5. Os efeitos observados *in vitro* pela fração rica em lignanas foram comprovados em modelo *in vivo* de tumor sólido de Ehrlich. Além disso, o extrato bruto diclorometânico de *P. regnellii* reduziu o edema de pata produzido por carragenina sugerindo uma correlação entre câncer e inflamação. Este é o primeiro trabalho que relata o efeito antiproliferativo e anti-inflamatório de *P. regnellii* e os resultados obtidos incentivam a continuação dos estudos visando a elucidação do mecanismo de ação e identificando outros princípios ativos que, em sinergismo com o composto eupomatenóide-5, potencializem a atividade de *P. regnellii*.

ABSTRACT

Cancer is a pool of many diseases diagnosed in thousands of people all over the world and represents the second major cause of death worldwide. The loss of normal cell growth control is the main event in the development of cancer and includes specific steps known as cell proliferation, differentiation and apoptosis. Despite numerous studies related to *Piper* genus, there is no description of any antiproliferative (*in vitro*) or antitumoral activity (*in vivo*) of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*. The present study evaluated the antiproliferative activity of this species, collected in three different periods: June and October, 2008 and February 2009. Among the plants evaluated, the medium polarity fractions obtained from the dichloromethanic crude extract of the plants collected in June presented concentration-effect correlation and also selectivity towards hormone-dependent ovary (OVCAR-3) and breast (MCF7) cell lines, as well as melanoma (UACC-62) and prostate (PC-3). According to our studies, one of the compounds responsible for this activity is classified as eupomatenoid-5, that is a neolignan. Effects observed *in vitro* for the lignans enriched fractions were confirmed through the Ehrlich solid tumor model in mice. In addition, preliminary results with dichloromethane crude extract of *P. regnellii* in anti-inflammatory experimental model of paw edema induced by carrageenan suggest the connection between cancer and inflammation. The present study represents the first report of both antiproliferative and anti-inflammatory promising activities of this species indicating the benefits of further studies in the search of more purified compounds and active principles that in synergism with eupomatenoid-5 can potentiate anticancer activity's result, as well as their mechanisms of action.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada ao detector seletivo de massas
COX	Cicloxygenase
DOXO	Doxorrubicina
EBD	Extrato Bruto Diclorometânico
EBE	Extrato Bruto Etanólico
EBH	Extrato Bruto Hexânico
EBD _{Fev}	Extrato Bruto Diclorometânico – coleta de fevereiro de 2009
EBD _{Jun}	Extrato Bruto Diclorometânico – coleta de junho de 2008
EBD _{Out}	Extrato Bruto Diclorometânico – coleta de outubro de 2008
EPM	Erro Padrão Médio
F _{Fev}	Frações do Extrato Bruto Diclorometânico – coleta de fevereiro de 2009
F _{1Jun}	Frações obtidas da 1ª alíquota do Extrato Bruto Diclorometânico EBD _{Jun}
F _{2Jun}	Frações obtidas da 2ª alíquota do Extrato Bruto Diclorometânico EBD _{Jun}
F _{Out}	Frações do Extrato Bruto Diclorometânico – coleta de outubro de 2008
IP	Intraperitoneal
PBS	Tampão fosfato salina (Phosphate Buffered Saline)
Rf	Fator de retenção (Retention Factor)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Índice de inibição total do crescimento (Total Growth Inhibition)
VO	Via oral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer e carcinogênese	2
1.2 Câncer e apoptose	5
1.3 Invasão e metástase	6
1.4 Câncer e Inflamação	7
1.5 Modelos de estudo de atividade anticâncer <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	8
1.6 Plantas medicinais	10
1.7 Gênero <i>Piper</i> e <i>Piper regnellii</i>	11
1.8 Lignanas e Câncer	12
OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Obtenção do material vegetal	17
3.2 Obtenção dos extratos brutos	18
3.3 Fracionamento do Extrato Bruto Diclorometânico	20
3.3.1 Cromatografia em Coluna Seca	21
3.3.2 Cromatografia em Coluna Filtrante.....	21
3.4 Obtenção da neolignana eupomatenóide através de precipitação	22
3.5 Cromatografia Camada Delgada.....	23
3.6 Análises das frações e precipitado.....	23
3.6.1 CG-EM	23
3.6.2 Ressonância Magnética	24
3.7. Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i>	24
3.7.1 Cultivo celular	24
3.7.2 Atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas	25
3.8 Ensaios Farmacológicos <i>in vivo</i>	29
3.8.1 Teste de toxicidade aguda (Hipocrático)	29
3.8.2 Tumor sólido de Ehrlich	29
3.8.3 Edema de pata induzido pela injeção de carragenina	31
3.9 Análise Estatística.....	32
RESULTADOS.....	33
4.1 Escolha da espécie vegetal	34
4.2 Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i>	34
4.2.1 Atividade anticâncer <i>in vitro</i> do quimioterápico doxorrubicina	34
4.2.2 Atividade antiproliferativa dos Extratos Brutos de <i>P. regnellii</i>	36
4.2.3 Atividade antiproliferativa das frações e precipitado.....	40
Atividade antiproliferativa do composto eupomatenóide-5	52
Atividade antiproliferativa das frações do EBD _{Fev}	58
4.3 Ensaios farmacológicos <i>in vivo</i>	63

4.3.1 Teste de toxicidade aguda (Hipocrático)	63
4.3.2 Tumor sólido de Ehrlich	63
4.3.2.1 Atividade anticâncer do EBD _{Jun}	64
4.3.2.2 Atividade anticâncer da F _{2Jun} FGH	68
4.3.2.3 Atividade anticâncer do composto eupomatenóide-5	71
4.3.3 Atividade antiedematogênica do EBD _{Jun}	74
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	93
ANEXO	105

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e carcinogênese

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2009). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente surgem mais de dez milhões de novos casos de câncer com cerca de 8 milhões de mortes, tornando-se, em países desenvolvidos, a segunda causa de morte, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares e estes índices tendem a aumentar nos próximos anos (TAKACHI *et al.*, 2008; SAKLANI e KUTTY, 2008; JEMAL *et al.*, 2009; RUZZA e QUINTIERI, 2009; WHO, 2010).

O aumento da incidência de câncer é, em parte, consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido pelo envelhecimento do organismo (FERLAY *et al.*, 2007). Atualmente são conhecidas mais de cem tipos de neoplasias, diferenciadas pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento. Dentre os diversos tipos, os com maior índice de letalidade continuam sendo as neoplasias malhas de pulmão, brônquio, próstata, mama, cólon e reto (JEMAL *et al.*, 2009).

Geralmente o câncer tem início através de alterações genéticas, sendo as mutações somáticas a base para a geração de um câncer. A célula anormal, que cresce e prolifera desordenadamente, origina um tumor, que pode ser benigno, caso as células neoplásicas não sejam invasivas; ou maligno, se suas células invadirem tecidos adjacentes (ALBERTS *et al.*, 2008).

Células normais são perfeitamente sintonizadas com o ambiente em que elas se encontram e respondem a sinais reguladores externos que podem estimular ou inibir a

proliferação celular. As neoplasias caracterizam-se por ignorar os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, perdem o controle dos processos de apoptose e diferenciação, são geralmente instáveis, deficientes no reparo de danos no DNA e na correção de erros de replicação, tendendo a acumular mutações. São invasivas, sobrevivendo e proliferando em novos ambientes, produzindo metástases e angiogênese auto-sustentada. (BERTRAM, 2001; BROWN e ATTARDI, 2005; FADEEL e ORRENIUS, 2005; ALBERTS *et al.*, 2008).

Acredita-se que a transformação de uma célula normal em tumoral é um processo que pode atravessar vários estágios ao longo de vários anos ou décadas. Os estágios de carcinogênese incluem iniciação, promoção e progresso. O primeiro envolve uma reação entre a substância promotora do câncer e o DNA das células do tecido, podendo haver suscetibilidade genética. Este estágio pode permanecer latente, podendo ser um risco para o desenvolvimento de câncer em uma fase tardia. O segundo ocorre muito lentamente por um período que compreende muitos meses ou anos. Durante este estágio, as alterações na dieta e estilo de vida podem ter um efeito benéfico, podendo até não ocorrer o câncer. O terceiro estágio envolve a progressão e expansão do câncer, sendo que este processo pode ser ativado por vários carcinógenos ambientais, como o cigarro, dejetos industriais e vapores de combustíveis (REDDY *et al.*, 2003).

De maneira ampla, células tumorais possuem defeitos nos processos regulatórios que governam sua proliferação, incluindo perda na sensibilidade aos estímulos inibitórios para a proliferação. No interior de um tecido normal, múltiplos estímulos antiproliferativos operam com a finalidade de manter a célula em seu estado quiescente e também promover homeostase do tecido. Estes estímulos antiproliferativos podem bloquear a proliferação por dois mecanismos distintos: as células podem ser forçadas a permanecer em seu estado quiescente, podendo reiniciar o ciclo celular se houver estímulo suficiente para tal, ou as células podem ser induzidas a abandonar de maneira permanente seu

potencial proliferativo, sendo conduzidas a estados pós-mitóticos, usualmente associados com aquisição de traços diferenciados específicos (WEINBERG, 2008).

Nos últimos cinquenta anos a pesquisa de novas drogas anticâncer introduziu na terapêutica cerca de 200 drogas (KAMB *et al.*, 2007), sendo aproximadamente 70 com amplo uso clínico e, quando se analisa a forma como essas drogas foram obtidas, é possível indicar novos rumos para o desenvolvimento de métodos de triagem de substâncias anticâncer. Até o advento da biologia molecular durante a segunda metade do século vinte, pouco se sabia a respeito dos mecanismos biológicos referentes à transformação e à progressão do tumor (CHABNER e ROBERTS JR, 2005). Atualmente, a biologia do câncer tem sido muito estudada e uma das principais aplicações desse conhecimento é no desenvolvimento de novos quimioterápicos.

Os agentes hoje conhecidos com ação sobre o câncer podem ser classificados em dois grupos: o primeiro é constituído por drogas que inibem a iniciação do processo carcinogênico e o segundo por drogas que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer. Muitos agentes do primeiro grupo são encontrados em alimentos, como os diterpenos do café e os ácidos sulfídicos do alho. Outro exemplo clássico de quimioprevenção, como é denominada a ação desses agentes, é o elevado consumo do chá verde no oriente, cujos polifenóis possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos. Já os agentes supressores são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (DUVOIX *et al.*, 2005; LAMBERT *et al.*, 2005). O tratamento atual torna-se pouco eficaz pelo mecanismo de ação desses fármacos supressores. Muitos deles são agentes genotóxicos, danificando o DNA e podendo gerar mutações que gradualmente se refletem em tumores secundários.

1.2 Câncer e apoptose

A habilidade de populações de células tumorais de se expandir em número é determinada não somente pela taxa de proliferação celular, mas também pela taxa de atrito entre as células. A morte celular programada, ou apoptose, representa a maior fonte deste atrito (HANAHAAN e WEINBERG, 2000). A apoptose e a proliferação celular possuem uma participação importante na tumorigênese, determinando o crescimento tumoral e consequentemente sua agressividade (TERZIAN *et al.*, 2007).

Como já salientado, as células cancerosas perdem a capacidade de reconhecer os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, evitam os processos de apoptose e diferenciação, são geralmente instáveis, deficientes no reparo de danos no DNA e na correção de erros de replicação, tendendo a acumular mutações. Tais alterações podem levar à inativação de genes supressores de tumor (p53, pRb); ativação de oncogenes - myc, myb, src, ras, fos; inativação de genes que induzem a apoptose (como o Fas e o Bak); ou a ativação de genes que inibem a apoptose, como o bcl-2 (ALBERTS *et al.*, 2008; WEINBERG, 2008).

O mecanismo anticâncer mais procurado nos últimos anos tem sido o de indução seletiva de apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI *et al.*, 2005). A apoptose tem um papel importante na determinação do crescimento tumoral e sua agressividade. Sendo assim, é considerada um mecanismo celular intrínseco e regulado, através do qual há um controle entre a produção de novas células e a capacidade individual das mesmas em se autodestruírem (TERZIAN *et al.*, 2007). Uma de suas características é a ativação de proteases aspartato-específicas conhecidas como caspases. A indução de morte por apoptose através de um sinal externo é uma das tentativas da terapia contra o câncer (BROKER *et al.*, 2005; FADEEL e ORRENIUS,

2005). Alguns trabalhos demonstram que substâncias oriundas de plantas podem ativar a apoptose via caspase-3 em linhagens celulares tumorais (KIM *et al.*, 2006).

1.3 Invasão e metástase

O tumor primário é uma massa presente no local onde ocorre a conversão de uma célula normal em uma célula tumoral. Entretanto, as células tumorais nem sempre permanecem na massa tumoral primária, podendo ser deslocadas por invasão ou por metástase, onde há a formação de tumores secundários em outros órgãos localizados em pontos distantes do tumor primário (OPPENHEIMER, 2006).

Invasão é a expansão de células tumorais para o interior do tecido circundante, como resultado da divisão celular contínua. Entretanto, o movimento celular ativo pode ocorrer. Células tumorais possuem a tendência de promover fraca adesão entre si, o que facilita seu deslocamento e locomoção. Este movimento não ocorre no tecido normal. Entretanto, células tumorais não são controladas pelo contato, e continuam a crescer e se mover para o interior dos tecidos circundantes. Além disso, muitas células tumorais liberam proteases, que provavelmente atuam rompendo tecidos circundantes e, assim, facilitando a invasão (MAZZOCA *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005).

Metástase é a propagação de células tumorais para áreas não diretamente adjacentes ao tecido primário. O espalhamento pode ocorrer por invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos, por penetração das células tumorais no interior da cavidade corpórea ou espaços que circundam os órgãos. Após se desprender do tumor primário, a célula tumoral pode penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos, migrando para outros órgãos (FIDLER, 2002).

1.4 Câncer e Inflamação

A relação funcional entre câncer e inflamação não é recente. Em 1863, Virchow pressupôs que o câncer era originado em locais que apresentavam inflamação crônica e, em parte, baseou sua hipótese no aumento da proliferação celular que algumas classes de agentes irritantes causavam em conjunto com o dano tecidual e a inflamação persistente (BALKWILL e MANTOVANI, 2001). Apesar de estar claro que somente a proliferação celular não causa câncer, a divisão celular sustentada em um meio ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e agentes causadores de dano ao DNA, certamente potencializam e/ou promovem riscos de ocorrência tumoral. Durante o dano tecidual, a proliferação celular é aumentada enquanto o tecido se regenera e então o agente agressor é totalmente removido e o processo de reparo se completa. Em contraste, células em proliferação com dano em DNA continuam a proliferar em microambientes ricos em células inflamatórias e fatores de crescimento (STUELLEN *et al.*, 2008). De certo modo, é possível considerar que tumores agem como um ferimento que falhou ao cicatrizar (DVORAK, 1986).

Talvez a melhor evidência para o significado da inflamação durante a progressão neoplásica venha de estudos onde é avaliado o risco de câncer em pacientes que utilizam a aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) por um longo período. Muitos dados indicam que o uso destas drogas reduz o risco de ocorrência do câncer de cólon em 40-50%, e pode ser preventivo para os de pulmão, esôfago e estômago (BARON e SANDLER, 2000; GARCIA-RODRIGUEZ e HUERTA-ALVAREZ, 2001). A capacidade dos AINEs em inibir as ciclo-oxigenases (COX-2) é a base de seu mecanismo de prevenção (THUN *et al.*, 2004).

Células que medeiam a resposta inflamatória liberam fatores parácrinos e autócrinos que estimulam a proliferação celular, inibem apoptose e induzem a

angiogênese. Estes fatores podem acelerar a mutagênese, promover a sobrevivência e a proliferação de células mutadas e aumentam a probabilidade de um clone particular de células adquirir mutações genéticas para se tornar invasivo e metastático (THUN *et al.*, 2004). Os anti-inflamatórios não esteroidais estimulam a apoptose e inibem a angiogênese, dois mecanismos que suprimem o crescimento tumoral (THUN *et al.*, 2002).

Muitos tipos de câncer se desenvolvem a partir de sítios de inflamação, sendo esta muitas vezes responsável pela tumorigênese, transformação celular, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (COUSSENS e WERB, 2002; AGGARWAL *et al.*, 2006; MANTOVANI, 2007).

1.5 Modelos de estudo de atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo*

Para a descoberta de quimioterápicos, duas metodologias são amplamente utilizados em pesquisa: os testes *in vitro* e os *in vivo*. Nos modelos *in vitro*, a linha de estudo segue para os testes de toxicidade, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células neoplásicas em cultura, numa correlação entre a concentração e a resposta seletiva para alguma célula tumoral (CHABNER e ROBERTS Jr, 2005).

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que atualmente conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético. Dessa maneira, essa metodologia permite a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de fármacos com maior

especificidade. Outra vantagem dessa triagem é a rapidez e eficiência do método, que em apenas uma semana pode avaliar um número elevado de drogas (RUBISTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990; MONKS *et al.*, 1991). Atualmente os métodos de triagem *in vitro* em cultura de células tumorais são os mais utilizados para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas (CHEN *et al.*, 2009).

Embora essa metodologia utilizando cultura de células tumorais humanas seja muito prática e eficiente para identificação de princípios ativos e para estudos do mecanismo de ação, a etapa fundamental no desenvolvimento de uma nova droga anticâncer é a comprovação de sua atividade em modelos experimentais utilizando animais de laboratório. A atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Muitas substâncias apresentam excelente atividade em cultura de células, porém, quando administradas em um animal, perdem sua atividade por metabolização ou problemas de biodisponibilidade. O modelo *in vivo* permite a obtenção de informações sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica do novo composto. Portanto, um estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão mais definitiva a respeito do potencial anticâncer de uma nova substância (SMITH *et al.*, 2005).

Diversos modelos *in vivo* de estudo do câncer foram desenvolvidos com o uso de animais de laboratório para confirmação dos testes *in vitro*. O modelo de tumor sólido de Ehrlich é um exemplo de metodologia utilizada por ser prático e transponível para a análise de efeitos antineoplásicos de diversas moléculas e compostos. É um tumor murino, transplantável, originado de um adenocarcinoma mamário (NASCIMENTO *et al.*, 2006), atualmente muito utilizado nas suas formas ascítica e sólida (SAKAI *et al.*, 2009). Segundo FECCHIO *et al.* (1990), a presença de células tumorais de Ehrlich promove um aumento nos níveis de prostaglandina E2, sugerindo uma relação entre câncer e inflamação.

1.6 Plantas medicinais

As descobertas de novas drogas anticâncer de origem vegetal têm incentivado as pesquisas nessa área. A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998).

Plantas têm sido utilizadas como medicamentos por milhares de anos, inicialmente em sua forma bruta, como tinturas, chás, e outras formulações (BALICK e COX, 1996; MALHOTRA e SINGH, 2009). Frequentemente são utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar terapias convencionais no tratamento de várias doenças. Entre outros fatores, a preferência no uso das plantas medicinais decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (SIMÕES *et al.*, 2003), justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos.

A descoberta de medicamentos de plantas medicinais tem exercido um papel importante no tratamento do câncer. A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos remonta os tempos antigos na história da humanidade, e apesar do enorme desenvolvimento da síntese química, ainda cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal, sendo que 121 princípios ativos são de uso corrente (CALIXTO *et al.*, 1998; BALUNAS e KINGHORN, 2005; KOEHN e CARTER, 2005). Atualmente cerca de 60% dos quimioterápicos são produtos naturais ou derivados desses (CRAGG e NEWMAN, 2009).

A maioria das substâncias ativas são compostos isolados, incluindo muitos alcalóides como morfina, codeína (analgésicos); papaverina (inibidor de fosfodiesterase); efedrina, cafeína (estimulantes); ajmalina, quinidina (antiarrítmicos); quinina

(antimalárico); reserpina (antihipertensivo); capsaicina (dores reumáticas); colchicina (tratamento de gota); yoimbina (afrodisíaco), entre outros (WINK *et al.*, 2005).

As plantas têm sido um excelente recurso para o desenvolvimento de potenciais fármacos, principalmente contra o câncer. De 1961 a 1999 nove compostos foram aprovados como fármacos anticâncer nos EUA, sendo eles: vinblastina, vincristina, vinorelbina, etoposida, teniposida, paclitaxel, docetaxel, topotecan e irinotecan (LEE, 1999).

Tendo-se em vista a elevada incidência de câncer no mundo, os estudos visando à busca de novas drogas anticâncer devem se intensificar, abordando a química dos compostos, os mecanismos de ação e a busca pela seletividade.

1.7 Gênero *Piper* e *Piper regnellii*

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, apresentando cerca de 700 espécies. As espécies do gênero *Piper*, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, são usadas medicinalmente para diversos fins e apresentam importância econômica por serem pimentas, usadas mundialmente como “temperos picantes” (PARMAR *et al.*, 1997). Além disso, são fontes de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas (SILVA e MACHADO, 1999).

Substâncias isoladas de diferentes espécies de *Piper* têm aumentado o interesse por este gênero, devido às atividades biológicas apresentadas. Investigações fitoquímicas revelaram o acúmulo de diversas classes de princípios ativos, sendo que os compostos isolados de diferentes espécies foram classificados em 12 categorias: alcalóides/amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, cavapironas, piperolidas, chalconas e dihidrochalconas, flavonas, flavanonas e compostos miscelânicos (PARMAR *et al.*, 1997). Diversas substâncias isoladas de

espécies de Piperaceae apresentaram atividades biológicas como anti-PAF (fator de ativação plaquetária), antifúngica, antimicrobiana, moluscicida, anti-inflamatória, antiparasitária e inseticida (PESSINI *et al.*, 2005; ATJANASUPPAT *et al.*, 2009; CÉLINE *et al.*, 2009; LAGO *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2009). Além disso, vários alcalóides têm sido apresentados como agentes citotóxicos em várias linhagens tumorais (BALACHANDRAN e GOVINDARAJAN, 2005; TSAI *et al.*, 2005; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007), evidenciando o potencial anticâncer destas espécies (LAMPE, 2003; SELVENDIRAN *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2008).

Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. *regnellii* é uma espécie herbácea conhecida popularmente como caapeba e pariparoba e está amplamente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais (BENEVIDES *et al.*, 1999). As folhas e raízes são usadas na forma de extratos, infusões ou emplastros para o tratamento de feridas, redução de inchaços, irritações na pele e infecções (CORRÊA, 1984; HOLETZ *et al.*, 2002; SCHIMIDT *et al.*, 2009). Triagem realizada com plantas medicinais reportou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e sobre os fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e dermatófitos do gênero *Trichophyton* e *Microsporum* (CONSTANTIN *et al.*, 2001; HOLETZ *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 2007; FELIPE *et al.*, 2008; KOROISHI *et al.*, 2008).

1.8 Lignanas e Câncer

Lignanas são compostos fenólicos formados pela união de dois resíduos de ácido cinâmico (SETCHELL, 1995). De acordo com THOMPSON (1998), geralmente as lignanas apresentam um esqueleto de dibenzilbutano e são formados como um bioproduto da síntese de lignanas nas plantas. Devido à sua estrutura fenólica, as

lignanas têm propriedades antioxidantes (PRASAD, 1997). Diversos estudos epidemiológicos sugerem que os fitoestrógenos, incluindo as lignanas, tenham um efeito protetor contra diversos tipos de câncer, particularmente os hormônio-dependentes (mama, ovário e próstata) e atuem tanto na fase inicial quanto promotora do câncer, evidenciando um papel importante no processo de carcinogênese (THOMPSON, 1998).

Dentre as lignanas, podemos citar a podofilotoxina, proveniente da espécie vegetal *Podophyllum peltatum*, que possui um efeito antitumoral comprovado cientificamente. O maior efeito citotóxico da podofilotoxina é a inibição da divisão celular na metáfase, detendo a duplicação dos cromossomos e retendo a divisão celular no estado mitótico do ciclo celular. Seus derivados etoposídeo e teniposídeo (Figura 1) induzem a quebra das ligações simples e duplas de DNA e apresentam atividade sobre a topoisomerase II. Esses compostos são derivados semi-sintéticos que foram desenvolvidos em 1970 na tentativa de obtenção de derivados com menor potencial tóxico gastrointestinal, permanecendo até hoje como importantes quimioterápicos no tratamento do câncer (DAVID *et al.*, 2001; DAYAN *et al.*, 2003; WINK *et al.*, 2005; NITISS, 2009).

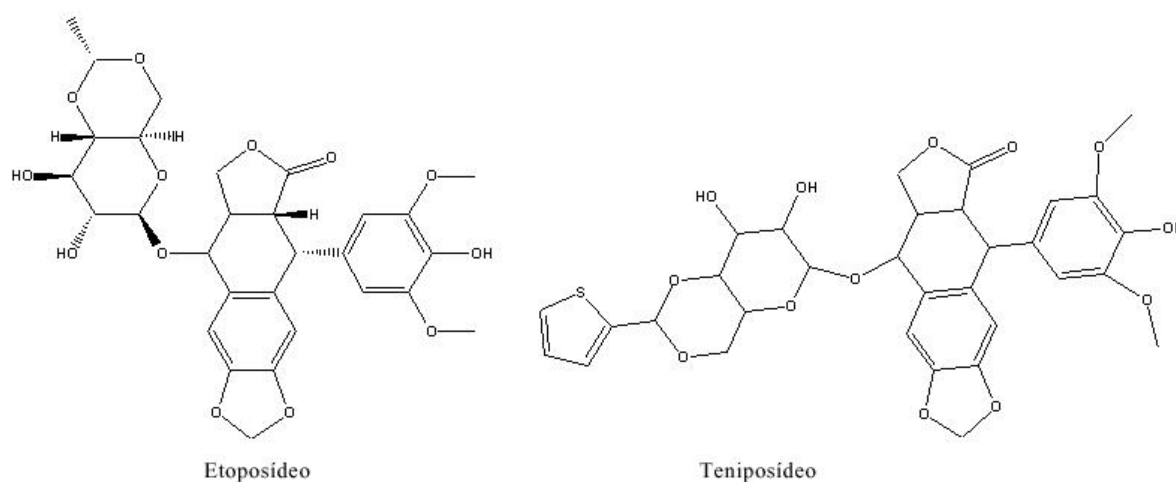


Figura 1. Estrutura química dos compostos etoposídeo e teniposídeo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a propriedade anticâncer de extratos brutos, frações e compostos isolados de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* através de ensaios *in vitro*, utilizando cultura de células tumorais humanas, bem como ensaios *in vivo* em modelos experimentais de câncer, utilizando animais de laboratório.

2.2 Objetivos Específicos

- Coleta do material vegetal cultivado no CPQBA em diferentes épocas do ano;
- Obtenção de extratos brutos e triagem de atividade anticâncer *in vitro*;
- Fracionamento dos extratos ativos por biomonitoramento;
- Isolamento dos compostos responsáveis pela atividade citotóxica e anticâncer;
- Avaliação da atividade observada *in vitro* em animais via tumor sólido de Ehrlich;
- Teste de atividade antiedematogênica em modelo de edema de pata induzida pela carragenina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Figura 2) foram coletadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, sob supervisão da Dra. Glynn Mara Figueira e identificadas pela Dra. Elsie Franklin Guimarães. Sua exsicata está depositada no herbário do CPQBA (nº 221).



Figura 2. *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*

3.2 Obtenção dos extratos brutos

A obtenção dos extratos e as etapas de fracionamento foram realizadas na Divisão de Fitoquímica do CPQBA, sob orientação da Dra. Mary Ann Foglio.

Foram realizadas três coletas das folhas de *P. regnellii*: Duas em 2008 (junho e outubro) e uma em 2009 (fevereiro). Como esta planta tem um teor de umidade de aproximadamente 78%, foram coletados 900g de folhas frescas, a fim de obter cerca de 200g de folhas secas. O material vegetal foi seco em estufa (Fabbe, modelo 170) a 45 °C e moídos em triturador de facas (Metalúrgica Roma, modelo RM-20).

Primeiramente a amostra de junho de 2008 foi submetida a um processo de maceração dinâmica com diclorometano (Merck®, Darnstadt, Germany) na proporção 1:5 (peso seco:eluente) durante 2 horas. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes, sendo que ao final de 6 horas os volumes resultantes foram reunidos e filtrados. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo, em temperatura de aproximadamente 37 °C, fornecendo então o Extrato Bruto Diclorometânico (EBD).

Os resíduos vegetais deste processo foram retomados em etanol 70% (Merck) e extraídos novamente por três vezes (2h cada, maceração dinâmica, 1:5). O solvente orgânico foi evaporado (37 °C) até a eliminação do etanol e em seguida o resíduo vegetal foi liofilizado, fornecendo o Extrato Bruto Etanólico (EBE), conforme Figura 3.

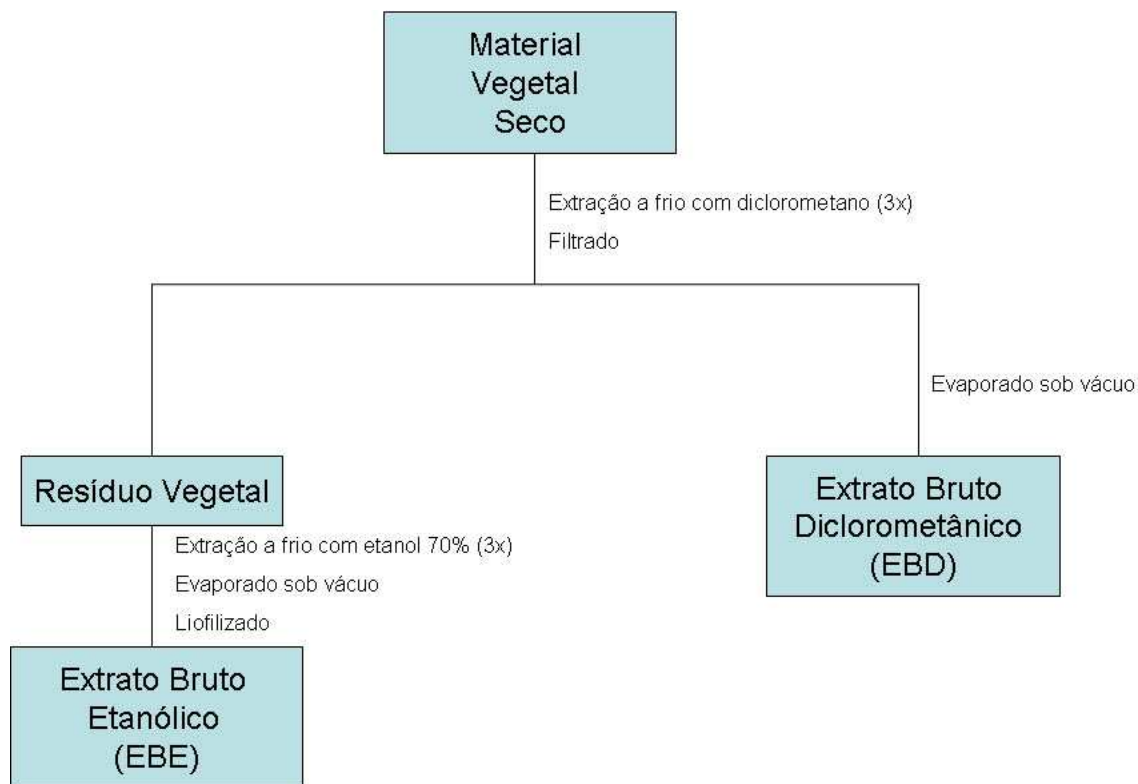


Figura 3. Fluxograma do processo de extração diclorometânica e etanólica de *P. regnellii*

Após o primeiro teste de atividade antiproliferativa *in vitro*, em que foram testados os EBD e EBE, o material vegetal de junho foi recoletado e passou a ser primeiramente macerado com hexano (Merck), para remoção de compostos graxos e clorofilas. bem como as outras amostras de outubro e fevereiro, originando os Extratos Brutos Hexânicos (EBH) e, em seguida, prosseguiu-se a extração com diclorometano (Figura 4).

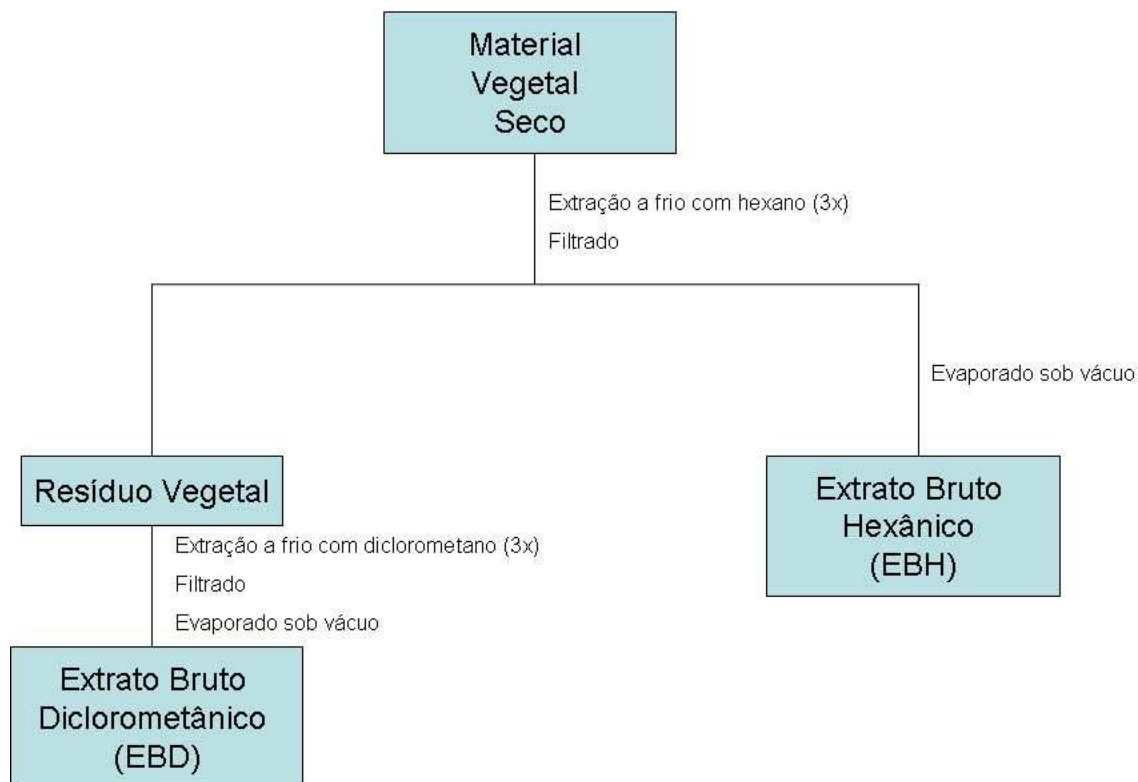


Figura 4. Fluxograma do processo de extração hexânica e diclorometânica de *P. regnellii*

3.3 Fracionamento do Extrato Bruto Diclorometânico

Os extratos brutos que apresentaram atividade biológica foram submetidos a dois tipos de fracionamento: um fracionamento através de cromatografia em coluna seca utilizando membrana de celulose como suporte e sílica-gel como fase estacionária, e outro fracionamento por cromatografia em coluna filtrante.

3.3.1 Cromatografia em Coluna Seca

Parte do EBD da planta coletada em junho (EBD_{1Jun}) e todo o EBD da planta coletada em outubro (EBD_{Out}) foram fracionados por meio de cromatografia em coluna seca.

A técnica de fracionamento por coluna seca consiste na separação de extratos brutos, possibilitando a separação da amostra em largas faixas de polaridades (COLLINS *et al.*, 2006). Tal técnica de fracionamento foi realizada em membrana de celulose, na proporção de 20 cm de membrana de celulose, 1 cm de diâmetro, para cada grama de amostra. A membrana foi empacotada com sílica-gel G60 (Merck®, Darmstadt, Germany) e a mistura de solventes foi determinada através da análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo selecionado o eluente hexano/diclorometano 60%:

Uma vez eluída a coluna seca, apoiou-se esta numa superfície plana e cortou-se no número desejado de frações, de acordo com a coloração. Cada fração foi colocada em um erlenmeyer para maceração dinâmica por 1h com solvente orgânico apropriado. O conteúdo referente a cada fração foi filtrado e o solvente eliminado sob vácuo utilizando rotaevaporador. As alíquotas foram separadas para avaliação em células tumorais humanas.

3.3.2 Cromatografia em Coluna Filtrante

A outra parte do EBD_{Jun} foi fracionada por cromatografia em coluna filtrante, bem como todo o EBD da planta coletada em fevereiro de 2009 (EBD_{Fev}).

A técnica de fracionamento por coluna filtrante consiste em rechear um funil de placa porosa e acoplar este a um kitassato que, com a ajuda do sistema de vácuo, elui a fase móvel através do mesmo. Esta técnica é rápida, de fácil execução e propicia uma

forma de limpeza na amostra, permitindo a retirada de graxas e partes muito apolares que geralmente não são de interesse (COLLINS *et al.*, 2006).

O gradiente de solventes utilizado para eluir a coluna envolveu os solventes hexano, diclorometano e metanol em proporções crescentes de polaridade (Tabela 1).

As frações foram coletadas e agrupadas conforme perfil observado por Cromatografia em Camada Delgada.

Tabela 1. Gradiente de solventes, em porcentagem, utilizado para o fracionamento em coluna filtrante do EBD_{1Jun} e EBD_{Out}.

Hexano (%)	Diclorometano (%)	Metanol (%)
100	0	0
90	10	0
80	20	0
70	30	0
60	40	0
50	50	0
40	60	0
30	70	0
20	80	0
10	90	0
0	100	0
0	99	1
0	97	3
0	95	5
0	0	100

3.4 Obtenção da neolignana eupomatenóide através de precipitação

As frações ativas oriundas do extrato bruto diclorometânico com perfis cromatográficos semelhantes foram agrupadas. O composto eupomatenóide-5 foi obtido através de precipitação com hexano deste agrupamento de frações. Este composto foi

identificado por comparação de seus dados espectrais com dados da literatura (PESSINI *et al.*, 2005).

3.5 Cromatografia Camada Delgada

Todas as extrações e os fracionamentos foram monitorados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica com tamanho de 20 cm x 20 cm (cromatofolha–alumínio CCF-C/25, Merck) com pontos de aplicação a 1 cm da margem inferior da placa. Como fase móvel foi utilizada a mistura de hexano/diclorometano 60%. Os componentes da amostra foram visualizados sob luz ultra-violeta (254nm) e a cromatofolha revelada com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50:1:0,5) com posterior aquecimento a 100 °C durante 5 minutos. As frações com compostos de R_f (retention factor) próximos foram agrupadas.

3.6 Análises das frações e precipitado

3.6.1 Cromatografia a gás acoplada ao detector seletivo de massas (CG-EM)

A técnica de cromatografia gasosa é utilizada para separar gases ou substâncias volatilizáveis. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária, sólida ou líquida, e uma fase móvel gasosa (COLLINS *et al.*, 2006).

A coluna utilizada para análise foi a HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane, 30cm de comprimento, 0,25mm de espessura e 0,25µm de espessura de filme. A análise por CG-EM das amostras foi realizada empregando-se injetor a 250 °C, coluna a 110 °C, com razão de aquecimento de 5 °C/min. até 280 °C e mantendo-se essa temperatura por 26

min., resultando em tempo de corrida de 1h. A interface com o detector foi mantida a 300 °C e o gás de arraste utilizado foi o Hélio, com fluxo de 1mL/min. (DUARTE *et al.*, 2007). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os dados de biblioteca espectral NIST (National Institute of Standards and Technology) e aqueles descritos na literatura para compostos previamente identificados para o gênero *Piper* (PESSINI *et al.*, 2005; POTZERNHEIM *et al.*, 2006).

3.6.2 Ressonância Magnética

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Brüker, modelo Avance DRX-500, operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e a 125 MHz na frequência do carbono-13. O sinal residual do solvente ou do TMS foi usado como referência interna. O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃, Isotec - INC). Os resultados foram comparados com dados espectrais descritos para compostos isolados de *Piper regnellii* (PESSINI *et al.*, 2005).

3.7. Ensaios farmacológicos *in vitro*

3.7.1 Cultivo celular

As linhagens celulares cedidas pelo NCI (National Cancer Institute, EUA) ao CPQBA/Unicamp, utilizadas na triagem da atividade anticâncer (Tabela 2), foram cultivadas em frascos de 25mL (T25) com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco®) a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência, as

linhagens eram repicadas sob condições estéreis. Rotineiramente, dois frascos de cada linhagem celular foram sempre mantidos em cultura.

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade anticâncer.

Tipo Celular	Nome	Origem	DI (x 10⁴ células/ mL)
Pulmão	NCI-H460	Endoderme	4,0
Mama	MCF7	Ectoderme	6,0
Ovário resistente*	NCI/ADR-RES	Mesoderme	5,0
Cólon	HT29	Endoderme	4,0
Próstata	PC-3	Mesoderme	5,0
Melanoma	UACC-62	Ectoderme	5,0
Ovário	OVCAR-3	Mesoderme	7,0
Rim	786-0	Mesoderme	4,5
Leucemia	K-562	Endoderme	6,0

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

3.7.2 Atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/penicilina-estreptomicina, evitando-se assim a toxicidade do DMSO.

Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL/compartimento de células em meio RPMI/SFB/ acrescido de 1mL/L de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL: 1000 µg/mL, Nutricell®), nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos que a seguir foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após este período, uma placa controle (T₀) foi fixada através da adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (p/v) para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição das drogas. Nas demais placas, as amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100

μL/compartimento) em triplicata, e a seguir foram incubadas por 48 horas. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 μg/mL (100 μL/compartimento) em triplicata. Após este período, as células foram fixadas com 50 μL de ácido tricloroacético a 50% (TCA). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C e, em seguida, submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

As placas foram então coradas pela adição de 50 μL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1% e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1%. Após secagem à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de Trizma Base (10μM, pH 10,5). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas (SACOMAN *et al.*, 2008).

A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (SKEHAN *et al.*, 1990). Os desenhos das placas controle (T0) e tratada estão ilustrados nas Figuras 5 e 6.

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

Figura 5. Placa T0. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio, contendo apenas meio com soro fetal bovino). Cada coluna colorida corresponde a uma linhagem em sua densidade de inoculação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
B		Célula	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
C		Célula	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
D		Célula	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
E		Célula	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	25	0,25
F		Célula	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	25	0,25
G		Célula	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	25	0,25
H			250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	25	0,25

Figura 6. Placa teste. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio). A segunda coluna cinza-escura representa o controle de células tumorais. As cores claras indicam as substâncias-teste, e as cores escuras respectivas o controle das substâncias-teste (branco da amostra) nas concentrações de 250; 25; 2,5 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias dos compartimentos contendo células + amostras, descontando-se seus respectivos brancos, que são compartimentos contendo apenas amostra. Já a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada de acordo com as seguintes fórmulas:

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

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

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

Onde:

T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T_1 = absorbância do branco de células

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Com esses valores, foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra teste. Os valores abaixo de 50 e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática), sendo que os valores que atingem o zero representam inibição total de crescimento (TGI – total growth inhibition). Os valores negativos, abaixo de zero, representam morte celular (atividade citocida), pois a quantidade de células aferida pela absorbância no final do experimento, nesse caso, é menor da que iniciou o experimento (absorbância do T_0).

A concentração efetiva necessária para inibir 100% do crescimento celular (TGI) foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software Origin versão 7.5.

3.8 Ensaios Farmacológicos *in vivo*

Os ensaios farmacológicos *in vivo* foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA/Unicamp), segundo os protocolos 1963-1, 1964-1 e 1965-1 (Anexo).

3.8.1 Teste de toxicidade aguda (Hipocrático)

Grupos de três camundongos fêmeas, da linhagem BALB/C foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com as doses únicas de 500, 1000 e 2000 mg/kg do EBD de *Piper regnellii*. Os grupos foram observados continuamente por período de 4 horas e então diariamente, por período de 14 dias. Foram avaliados sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade (LAPA *et al.*, 2008).

3.8.2 Tumor sólido de Ehrlich

Manutenção e preparo das células

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

Foram coletados 2 mL de líquido ascítico, adicionados a 2 mL de ficoll, e a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min., a 18 °C, para precipitar granulócitos e eritrócitos e obter as células tumorais. Nessas condições formou-se um anel celular, que foi coletado, ressuspensionado em PBS e submetido à centrifugação, nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet livre de hemácias e células brancas ressuspensionado em PBS em quantidade suficiente para a inoculação de $2,5 \times 10^6$ células/60 μ L na pata direita de cada animal.

Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/C, pesando entre 20-25 g, oriundos do Biotério Central (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os grupos experimentais (n experimental = 10) foram mantidos em gaiolas individuais identificadas e mantidos com ração e água fornecidos *ad libitum*.

Procedimento

Os animais foram pesados e o volume basal das patas traseiras direitas foi mensurado em pletismômetro. As células tumorais, obtidas como descrito anteriormente, foram diluídas em tampão fosfato (PBS) e inoculadas no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos, na densidade de $2,5 \times 10^6$ / animal. Após 24 horas, os animais foram divididos em grupos (n=10) e tratados por via i.p., sendo os grupos: controle negativo (salina), controle positivo (doxorrubicina, 3mg/kg ou 5-Fluoracil, 15mg/kg) e os grupos experimentais, que receberam o EBD_{Jun}, fração ativa ou composto isolado (neolignana eupomatenóide-5) de *P. regnellii*. O EBD_{Jun} foi administrado nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg; a fração ativa nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg; e o composto isolado na dose de 30 mg/kg. Os tratamentos foram feitos a cada três dias, bem como a avaliação da variação do volume das patas traseiras direitas e o peso corporal dos

animais. No 15º dia de teste, aproximadamente, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e suas patas traseiras foram retiradas e pesadas (NASCIMENTO *et al.*, 2006; VERÇOSA JR *et al.*, 2007). Dessa forma, foram avaliados os seguintes parâmetros:

a) Variação do volume da pata traseira direita, tendo como controle o volume basal antes da indução do tumor. Para cálculo da % de redução do volume do tumor, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\begin{aligned} &(\text{Volume}_{\text{pata final}} - \text{Volume}_{\text{pata basal}}) \times 100 = \text{Volume}_{\text{tumor}} \\ &[(V_{\text{tumor veículo}} - V_{\text{tumor grupo}}) / V_{\text{tumor veículo}}] \times 100 = \% \text{ de redução} \end{aligned}$$

b) Variação do peso corporal dos animais;

c) Avaliação do peso úmido relativo de órgãos como: rins, pulmão, baço, coração e fígado (para o teste experimental com o EBD) e rins, pulmão, baço, coração, fígado e testículos (para os testes com a fração e o composto), de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Peso relativo} = \text{Peso órgão fresco} / \text{Peso animal}$$

3.8.3 Edema de pata induzido pela injeção de carragenina

Animais

Foram utilizados 50 camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 25-30 g, oriundos do Biotério Central (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas individuais identificadas e com ração e água fornecidos *ad libitum*.

Procedimento

Os animais foram pesados e o volume basal de suas patas traseiras direitas mensurado em pletismômetro. A inflamação foi induzida nas patas por meio de carragenina, na concentração de 2%, diluída em salina e administrada em 60 µL. Uma hora antes da indução de inflamação pela carragenina, os animais foram divididos em cinco grupos (n=10) e tratados por via oral (v.o.): controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam, 20 mg/kg) e três experimentais, que receberam o EBD_{Jun} de *P. regnellii* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. A leitura da variação do volume das patas traseiras direitas foi feita nos tempos 0h (basal), 2h, 4h e 6h (fase inicial) e 24h, 48h e 72h (fase tardia), seguindo protocolo de NUNES *et al.* (2007). Após 72 horas os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Dessa forma, foi avaliada a variação do volume da pata traseira direita, tendo como controle o volume basal antes da indução da inflamação.

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

$$\begin{aligned} & (\text{Volume}_{\text{pata direita}} - \text{Volume}_{\text{pata direita basal}}) \times 100 = \text{Volume}_{\text{edema}} \\ & [(V_{\text{edema veículo}} - V_{\text{edema grupo}}) / V_{\text{edema veículo}} \times 100] = \% \text{ de redução} \end{aligned}$$

3.9 Análise Estatística

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

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Escolha da espécie vegetal

Através da análise dos resultados obtidos no projeto Fapesp-Bioprospecta (2004/07943-9), foram selecionadas inicialmente espécies cujos extratos produziram efeitos em modelo de cultura de células tumorais humanas *in vitro*. Para isso foram consideradas a potência (TGI) e a seletividade dos extratos brutos diclorometânico (EBD) e etanólico (EBE) de cada espécie, preparados conforme protocolo preconizado pela metodologia do NCI (National Cancer Institute) para triagem de extratos oriundos de produtos naturais. A estratégia para escolha da *Piper regnellii*, objeto de estudo, foi baseada considerando o perfil de atividade e a disponibilidade de material vegetal no campo experimental do CPQBA-UNICAMP, que garantissem quantidade suficiente para os estudos de isolamento e identificação de princípios ativos, aliados aos estudos em modelo de câncer murino *in vivo*. Além disso, a espécie pertence ao gênero *Piper*, que apresenta uma diversidade de classes de compostos com atividades biológicas distintas, descritas na literatura.

4.2 Ensaios farmacológicos *in vitro*

4.2.1 Atividade anticâncer *in vitro* do quimioterápico doxorrubicina

O gráfico a seguir (Figura 7) se refere à ação do quimioterápico doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas e relaciona a porcentagem de crescimento das células com a concentração do quimioterápico.

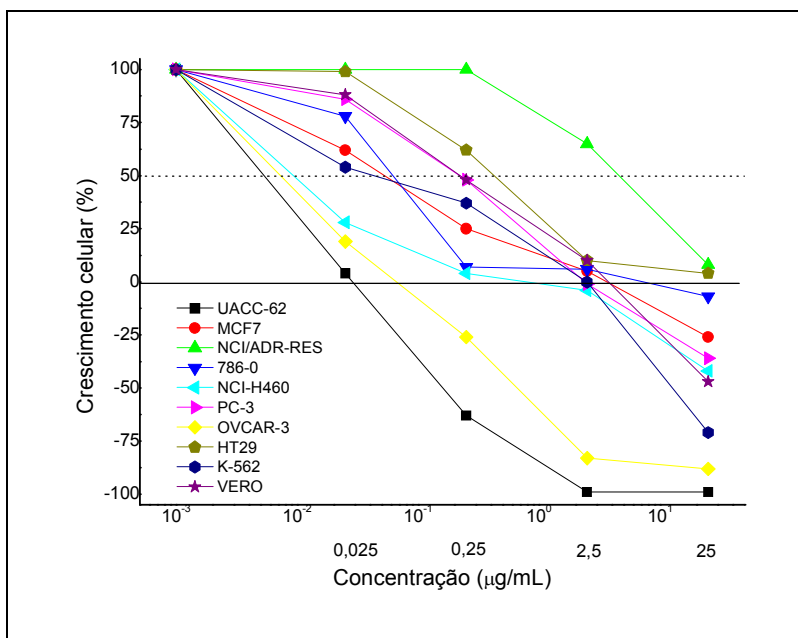


Figura 7. Atividade anticâncer do quimioterápico doxorrubicina relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon, K-562 – leucemia e VERO – linhagem de células não-tumorais).

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

	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	VERO
Doxo	0.05	3.10	30.59	4.97	0.81	3.19	0.07	14.88	1.29	3.22

A doxorrubicina (Tecnofarma International® Uruguai), controle positivo, demonstra elevada potência e seletividade em baixas concentrações para a maioria das linhagens. A linhagem NCI/ADR-RES (linhagem de ovário, resistente a múltiplos fármacos) apresenta-se mais resistente a este quimioterápico, enquanto a linhagem UACC-62 (melanoma) é a mais sensível. Em todos os experimentos a doxorrubicina é utilizada para avaliar se houve alteração de sensibilidade das linhagens durante o cultivo. A partir do gráfico, foi

construída uma tabela com os valores de TGI de cada amostra. O TGI indica a concentração necessária para inibir 100% do crescimento celular.

4.2.2 Atividade antiproliferativa dos Extratos Brutos de *P. regnellii*.

O procedimento inicial de extração está esquematicamente representado na Figura 3. A Figura 8 mostra as atividades dos EBD e EBE de *P. regnellii*, coleta de junho de 2008. Os valores de TGI e de rendimento de cada amostra encontram-se na Tabela 4.

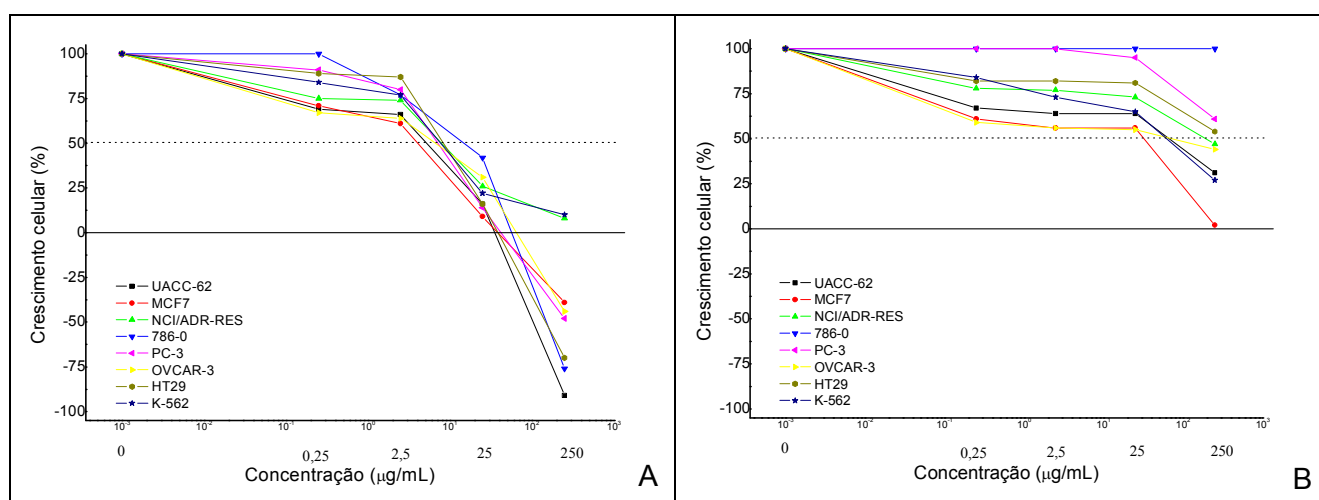


Figura 8. Gráficos da atividade anticâncer dos Extratos Brutos Diclorometânico (A) e Etanólico (B) da espécie *Piper regnellii*, coleta de junho de 2008, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

Tabela 4. Rendimentos dos EBD e EBE e valores de TGI obtidos de cada amostra em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

	Rend.	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562
EBD	9%	26.01	39.80	>250	50.11	44.85	54.76	36.33	>250
EBE	9%	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Os valores em negrito destacam as linhagens em que os extratos foram mais ativos. Rend: rendimento (%).

O EBD de *P. regnellii* apresentou TGI baixo para as linhagens de melanoma (UACC-62), mama (MCF7) e cólon (HT29), sendo mais seletivo para a linhagem de melanoma, com TGI = 26,01 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, o EBE não apresentou atividade citostática/citocida. Desta forma o EBD foi selecionado para a continuidade do estudo. A fim de intensificar a potência e a seletividade deste extrato bruto, as folhas secas de *P. regnellii* foram inicialmente extraídas com hexano para remoção dos compostos mais apolares, bem como das graxas. Este procedimento, considerado para a extração das folhas secas de todas as coletas, está esquematicamente representado na Figura 4.

Os EBH e EBD das coletas de junho e outubro de 2008 foram enviados para teste *in vitro*, e os resultados encontram-se nas Figuras 9 e 10. Os valores de TGI e os rendimentos encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

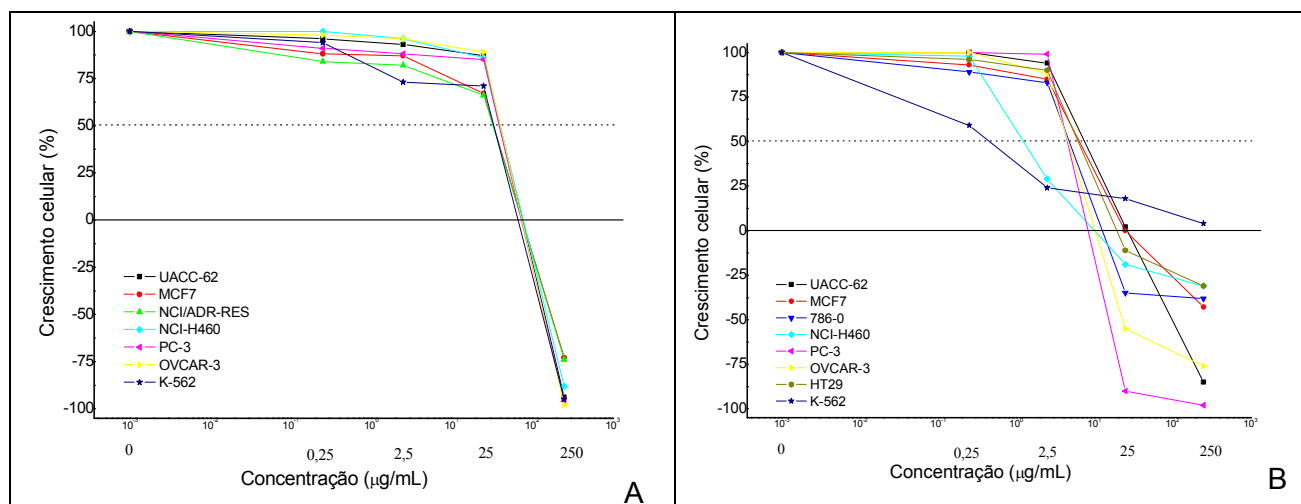


Figura 9. Gráficos da atividade anticâncer dos Extratos Brutos Hexânico (A) e Diclorometânico (B) de *P. regnellii*, coleta de junho de 2008, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

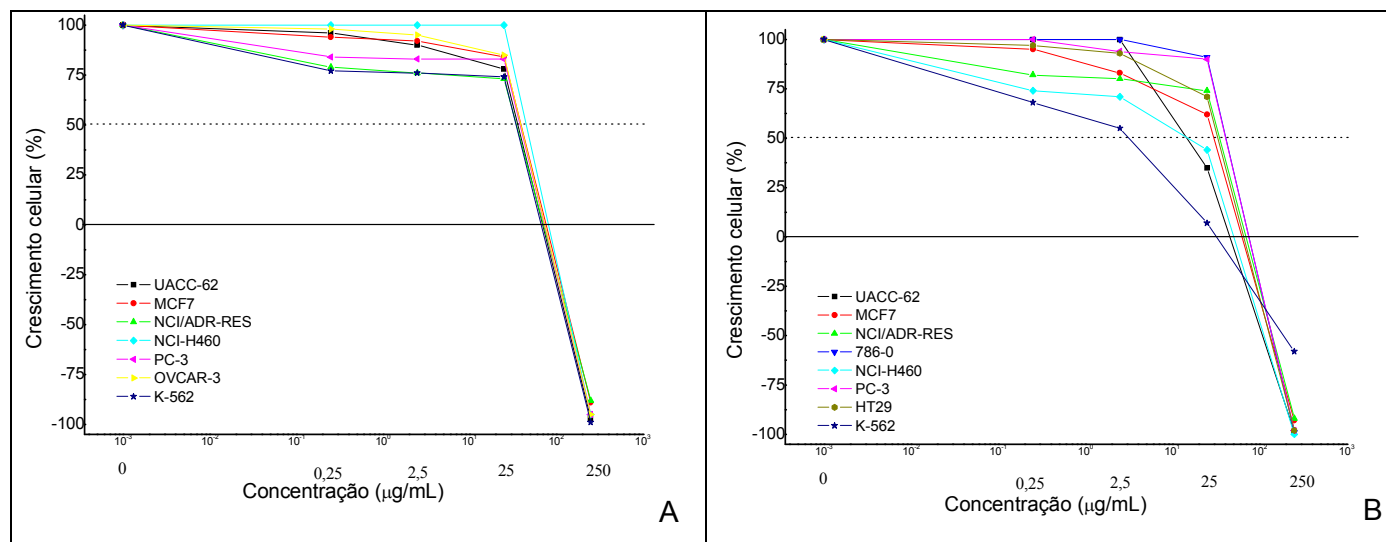


Figura 10. Gráficos da atividade anticâncer dos Extratos Brutos Hexânico (A) e Diclorometânico (B) de *P. regnellii*, coleta de outubro de 2008, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

Uma vez constatado que o Extrato Bruto Hexânico apresenta atividade citotóxica inespecífica, os EBH posteriores não foram avaliados em cultura de células tumorais. Portanto, foi avaliada a atividade anticâncer apenas do Extrato Bruto Diclorometânico da coleta de fevereiro de 2009 (Figura 11). O cálculo do TGI e de seu rendimento estão nas Tabelas 5 e 6.

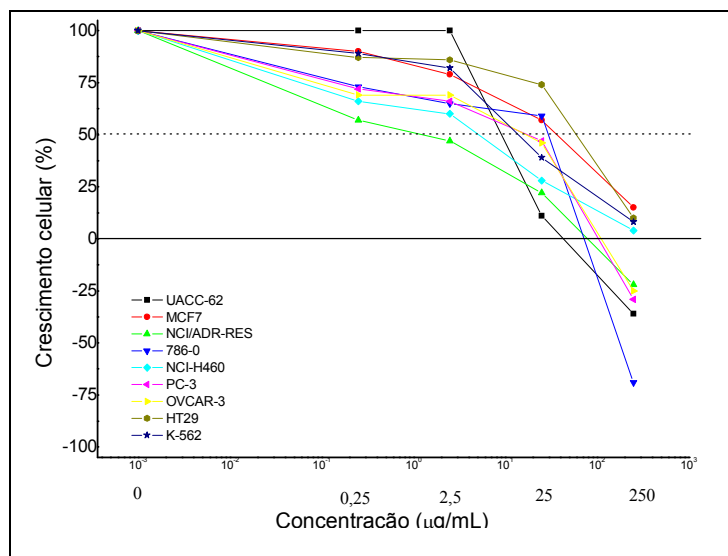


Figura 11. Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Diclorometânico de *P. regnellii*, coleta de fevereiro de 2009, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

Tabela 5. Valores de TGI de cada amostra obtidos em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562
Doxo	0.05	3.10	30.59	4.97	0.81	3.19	0.07	14.88	1.29
EBH_{Jun}	67.94	72.70	70.70	-	76.27	61.82	60.33	-	53.97
EBD_{Jun}	26.45	39.58	-	21.93	20.39	10.97	12.05	42.09	158.44
EBH_{Out}	54.15	72.42	63.45	-	>250	62.05	63.83	-	47.75
EBD_{Out}	32.97	51.16	59.56	58.06	39.46	61.9	-	47.94	25.18
EBD_{FeV}	58.29	>250	71.96	66.78	>250	103.69	116.38	>250	>250

Os valores em negrito destacam as linhagens em que os extratos foram mais ativos. As linhagens em que a amostra não foi testada estão marcadas com "-".

Tabela 6. Rendimentos dos Extratos Brutos de *P. regnellii*.

	Junho/08	Outubro/08	Fevereiro/09
EBH	3.9%	3.9%	4.5%
EBD	3.3%	3.2%	4.1%

O EBD da planta coletada em junho, após extração com hexano, foi mais potente, com seletividade para as linhagens aderidas de melanoma, rim, pulmão, próstata e ovário. Já o EBD da planta coletada em outubro foi pouco potente.

4.2.3 Atividade antiproliferativa das frações e precipitado

Atividade antiproliferativa das frações dos EBD_{Jun} e EBD_{Out}

Do EBD_{Jun} foram separadas duas amostras, sendo a primeira (EBD_{1Jun}) fracionada por meio de cromatografia em coluna seca, bem como a amostra coletada em outubro (EBD_{out}); a fim de comparar, por meio de suas frações, o perfil de atividade dos dois extratos. Neste processo foram fracionados 500mg de cada amostra, obtendo-se três frações de baixa, média e alta polaridade. Os gráficos das frações de junho (F_{1Jun}A - F_{1Jun}C) e outubro (F_{out}A - F_{out}C) estão apresentados nas Figuras 12 e 13, e os valores de TGI encontram-se na Tabela 7.

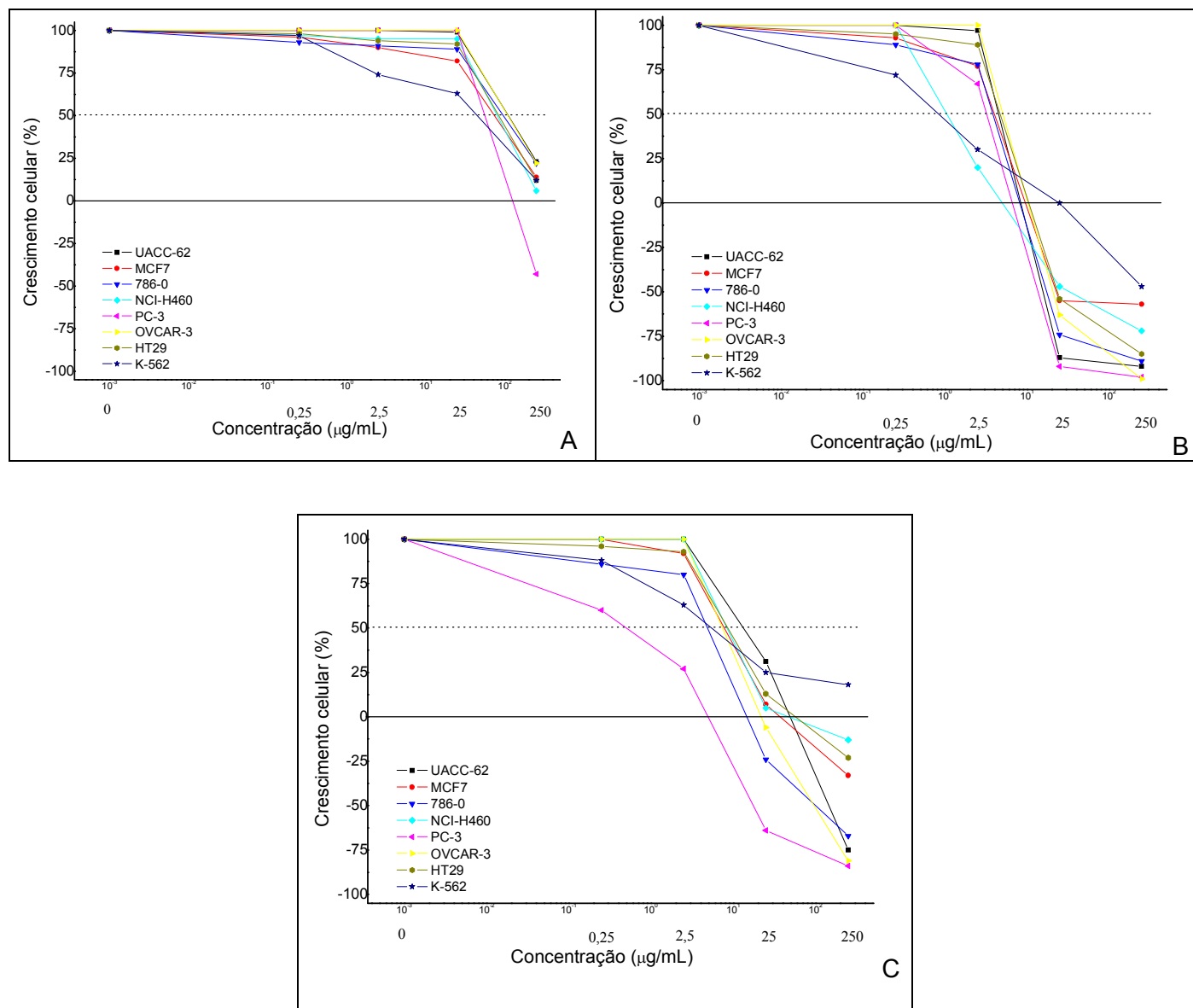


Figura 12. Gráficos da atividade anticâncer das frações F_{1Jun} A (A), F_{1Jun} B (B), F_{1Jun} C (C) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

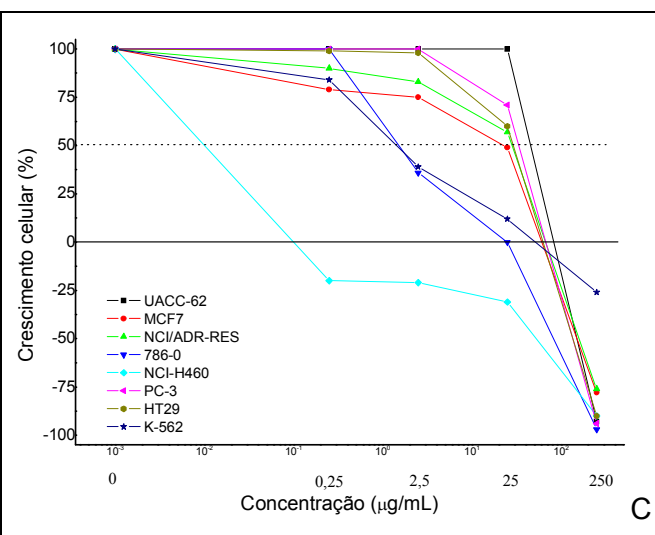
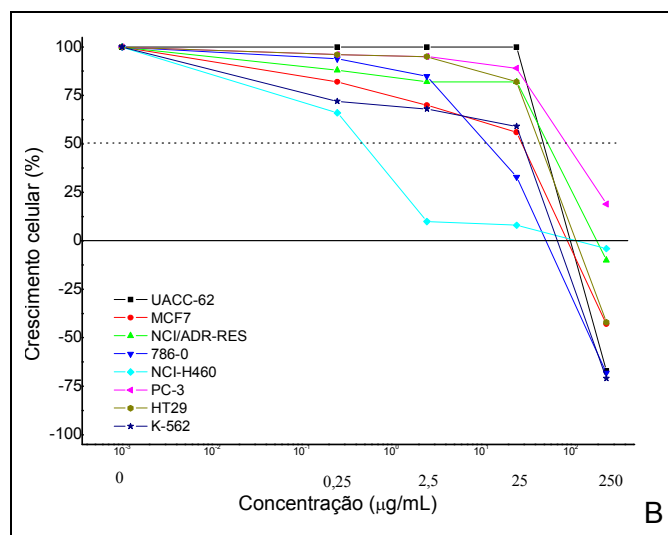
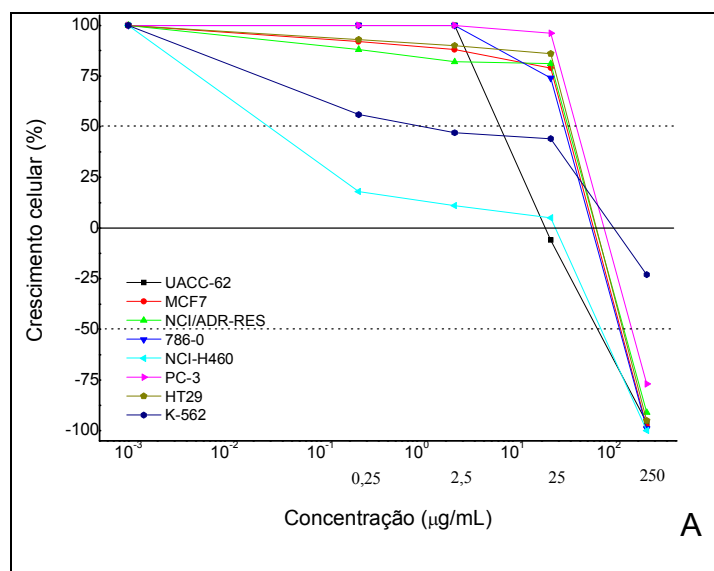


Figura 13. Gráficos da atividade anticâncer das frações F_{OutA} (**A**), F_{OutB} (**B**) e F_{OutC} (**C**) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

Tabela 7. Valores de TGI das frações F_{1Jun} e F_{Out}, obtidos em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562
F_{1Jun}A	>250	>250	-	>250	>250	223,65	>250	>250	>250
F_{1Jun}B	10.18	10.77	-	8.33	6.09	5.44	17.61	12.39	19.21
F_{1Jun}C	44.49	56.08	-	18.06	89.52	3.94	24.04	77.22	>250
F_{Out}A	23.61	52.44	66.55	45.93	3.38	113.22	-	64.90	120.26
F_{Out}B	207.41	87.84	207.52	48.26	59.66	>250	-	130.94	65.87
F_{Out}C	176.74	54.03	61.60	14.12	0.44	54.42	-	52.29	48.26

Os valores em negrito destacam as linhagens em que as frações foram mais ativas. As linhagens em que a amostra não foi testada estão marcadas com “-”.

A análise por CCD (Figura 14) revelou diferenças entre os compostos presentes nas frações F_{1Jun} e F_{Out}.

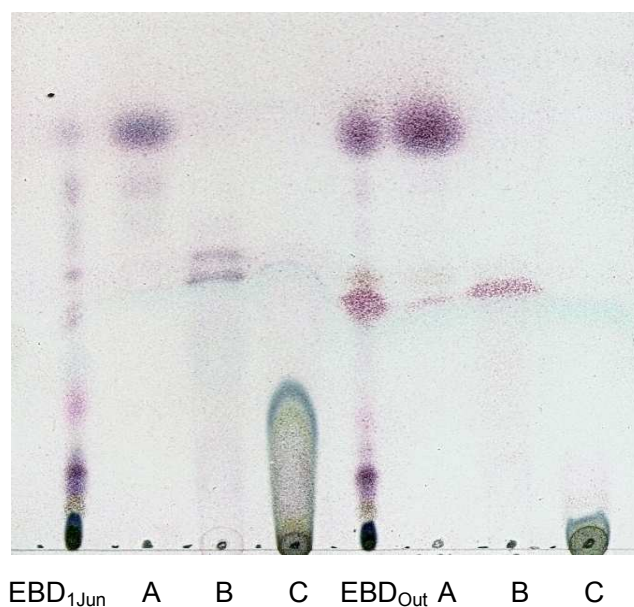


Figura 14. CCD comparando os EBD_{1Jun} e EBD_{Out} e as frações obtidas em coluna seca (Fase Móvel: hexano/diclorometano: 60:40 e revelador: anisaldeído).

Através de análise por cromatografia a gás acoplada ao detector seletivo de massas (CG-EM) foi possível identificar alguns dos compostos presentes nas frações de média polaridade dos EBD_{1Jun} e EBD_{Out} (Figura 15) quando comparados seus espectros de massas com dados da literatura (PESSINI *et al.*, 2005).

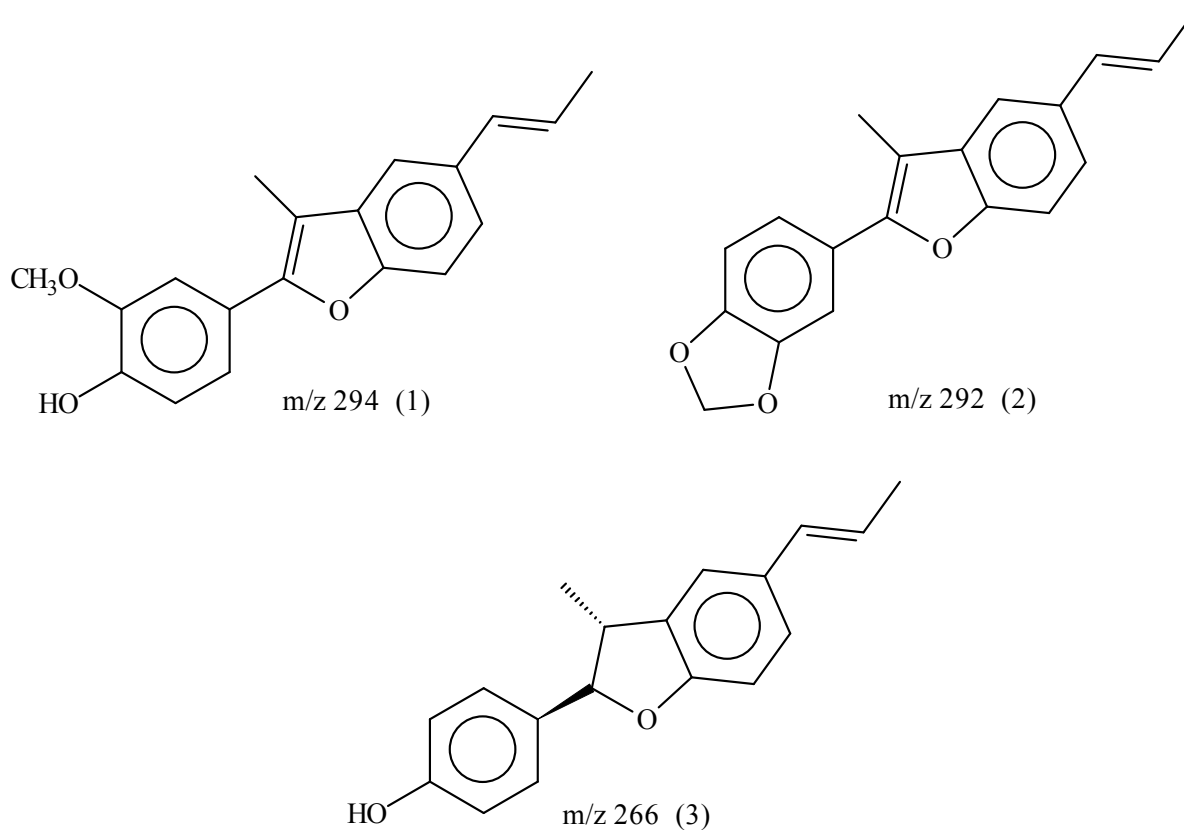


Figura 15. Neolignanas 1, 2 e 3 identificadas por CG/EM (HP 6890/HP 5975) na fração F_{1Jun}B.

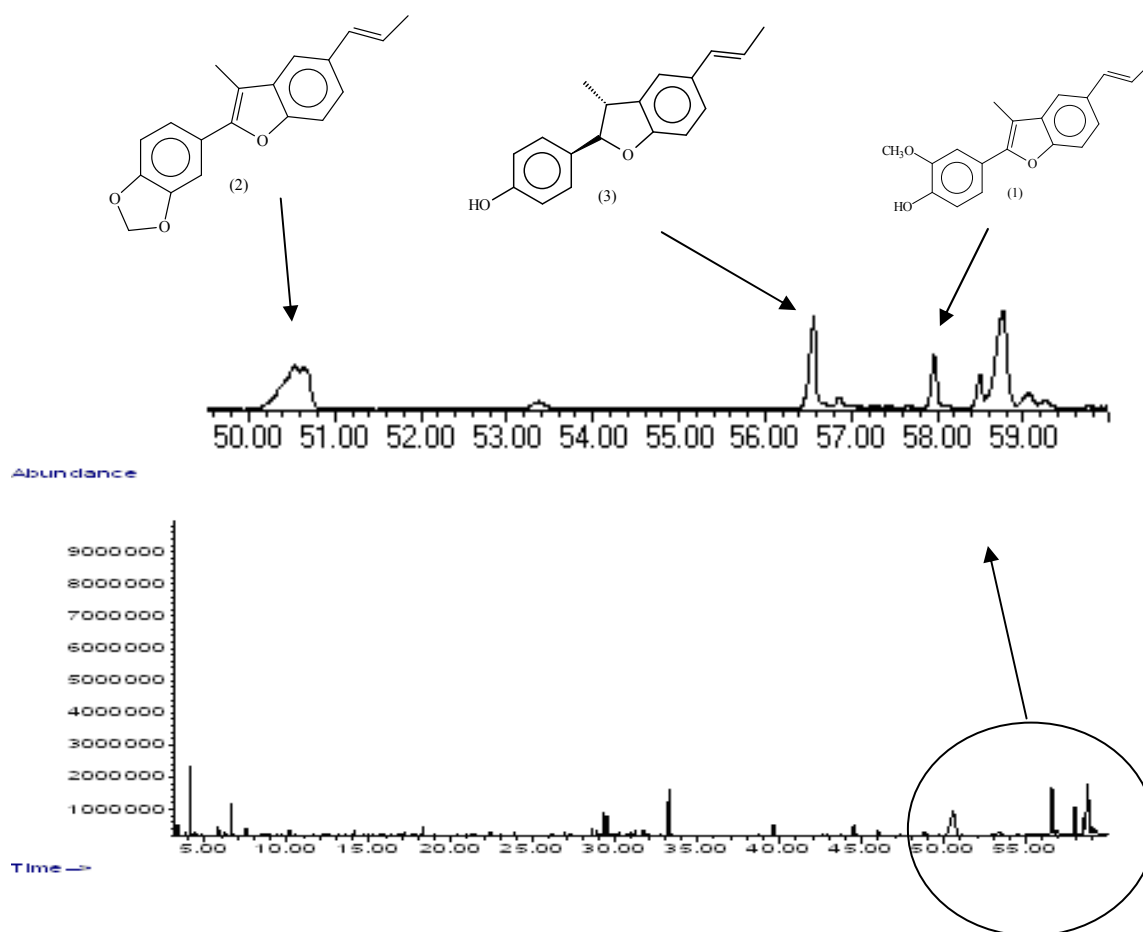


Figura 16. Cromatograma adquirido com programação de temperatura 60 °C, (3 °C/min), 240 °C, da fração F_{1Jun}B com indicação onde foram detectados os compostos 1, 2 e 3

A segunda amostra (3g) do EBD da planta coletada em junho (EBD_{2Jun}) e todo o EBD (5,8g) da planta coletada em fevereiro (EBD_{Fev}) foram fracionados por meio de cromatografia em coluna filtrante. Do EBD_{2Jun} foram obtidas 33 frações, agrupadas com base na análise por CCDs (Figura 17). Os rendimentos das frações encontram-se na Tabela 8 e os gráficos e valores de TGI estão apresentados na Figura 18 e Tabela 9, respectivamente.

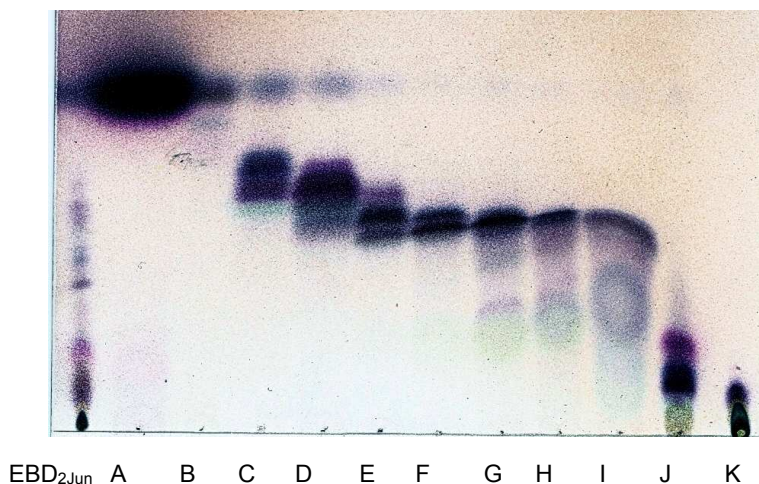


Figura 17. CCD das frações de EBD_{2Jun} agrupadas de acordo com fator de retenção (Fase Móvel: hexano/diclorometano: 60:40 e revelador: anisaldeído).

Tabela 8. Agrupamento e rendimentos parcial (RP) e total (RT) das frações do EBD_{2Jun}.

Grupo	1-5	6-9	10-11	12-13	14-15	16	17-18	19	20-21	22-28	29-33
F _{2Jun}	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
RP(%)	1.55	0.16	0.65	0.61	0.31	0.60	2.73	1.18	1.72	10.71	59.96
RT(%) = 80.18											

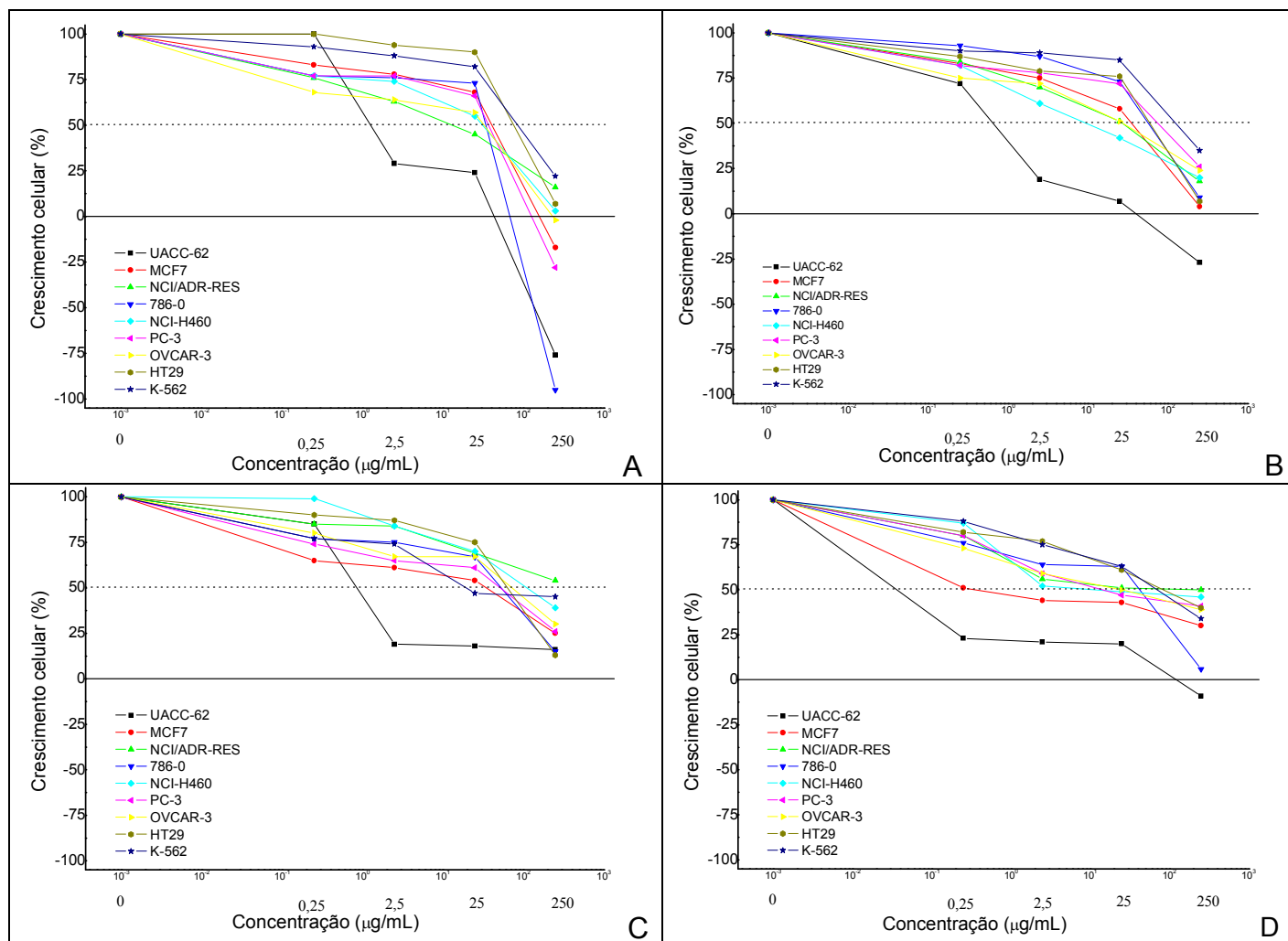


Figura 18. Gráficos da atividade antiproliferativa das frações do EBD_{Jun} de *P. regnellii*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. **A-D.** F_{2Jun}A, B, C e D. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

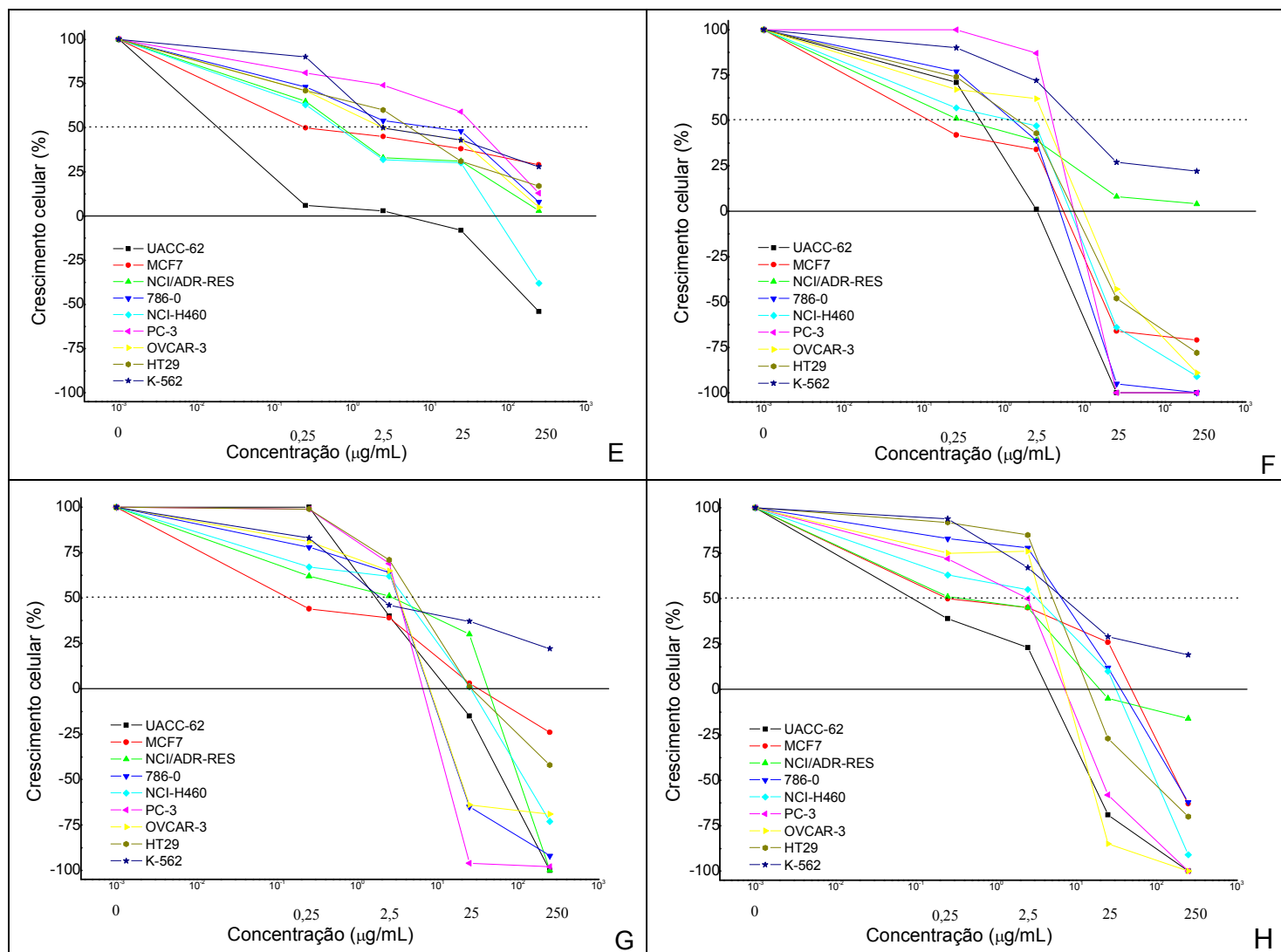


Figura 18. Gráficos da atividade antiproliferativa das frações do EBD_{Jun} de *P. regnellii*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. **E-H.** F_{2Jun}E, F, G e H. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

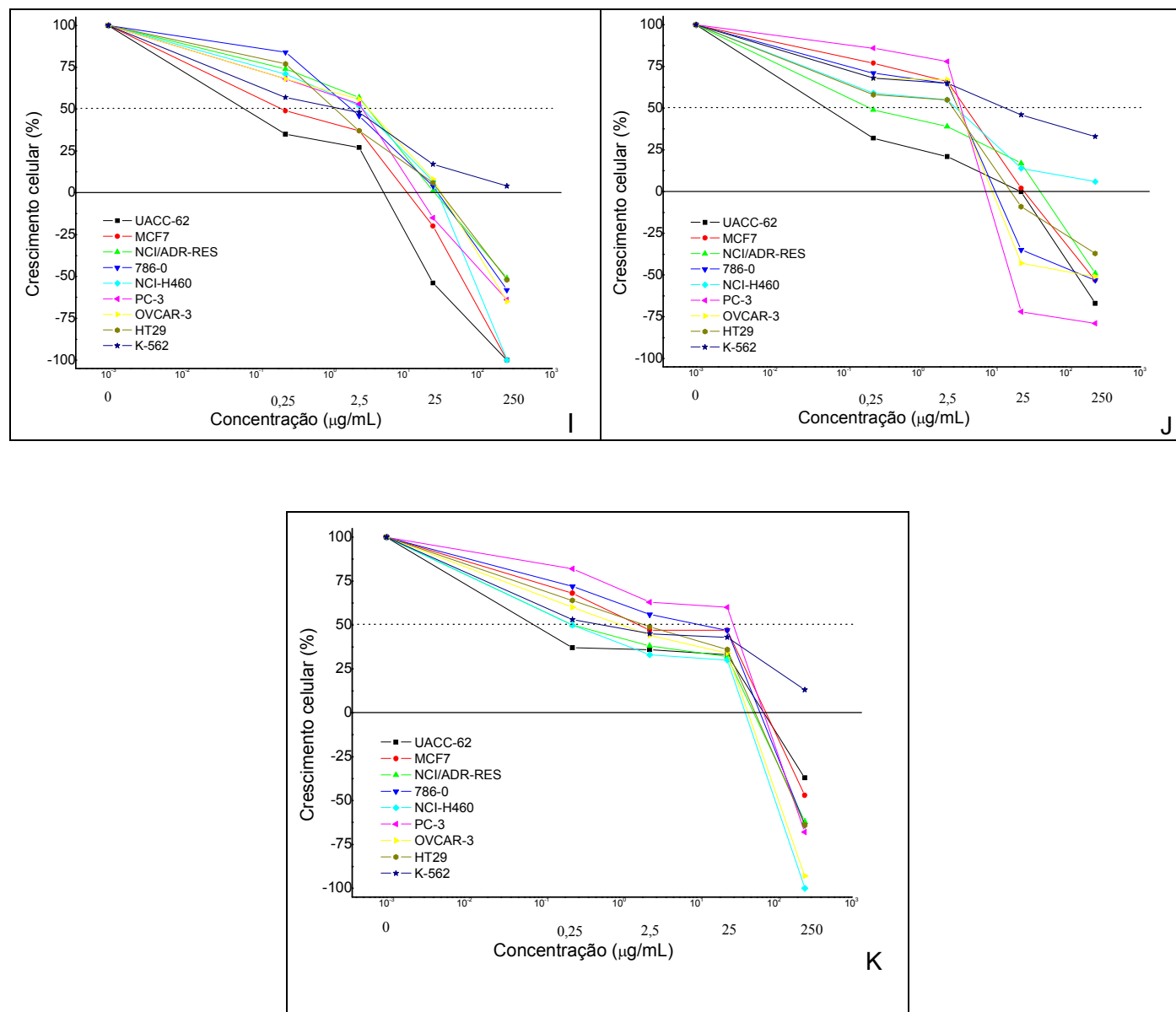


Figura 18. Gráficos da atividade antiproliferativa das frações do EBD_{Jun} de *P. regnellii*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. I-K. F_{2Jun}I, J e K. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

Tabela 9. Valores de TGI da frações do EBD_{2Jun} obtidos em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCIH460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562
F _{2Jun} A	23.24	169.67	>250	55.01	>250	131.52	>250	>250	>250
F _{2Jun} B	30.51	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
F _{2Jun} C	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
F _{2Jun} D	64.93	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
F _{2Jun} E	3.19	>250	>250	>250	44.15	>250	>250	>250	>250
F _{2Jun} F	2.22	3.63	139.41	4.02	5.46	3.17	9.52	7.19	>250
F _{2Jun} G	11.52	34.28	24.48	7.69	20.71	5.03	8.14	37.63	>250
F _{2Jun} H	2.52	25.48	41.75	34.91	18.67	6.63	6.91	17.27	>250
F _{2Jun} I	2.93	6.79	26.49	23.15	17.10	15.24	23.66	22.62	213.47
F _{2Jun} J	7.31	29.22	25.21	14.42	229.54	8.56	12.95	25.36	>250
F _{2Jun} K	45.20	59.42	26.26	49.89	14.23	68.26	22.76	35.58	>250

Os valores em negrito destacam as linhagens em que as frações foram mais ativas.

Com base na análise por meio de CCD e da interpretação dos resultados dos testes antiproliferativos *in vitro*, as frações F_{2Jun} F, G e H foram agrupadas (Figura 19A). A fim de tentar separar os compostos presentes, a fração sofreu cristalização e recristalização por meio do solvente hexano, originando um cristal branco (precipitado). Este precipitado é facilmente visualizado por meio físico sob luz UV (254nm) e reage quimicamente com solução de anisaldeído, resultando em uma coloração azul-esverdeada (Figuras 19A, B e C, asterisco). O composto foi isolado (0,1 % em relação à folha seca da planta) conforme a metodologia indicada no fluxograma da Figura 20.

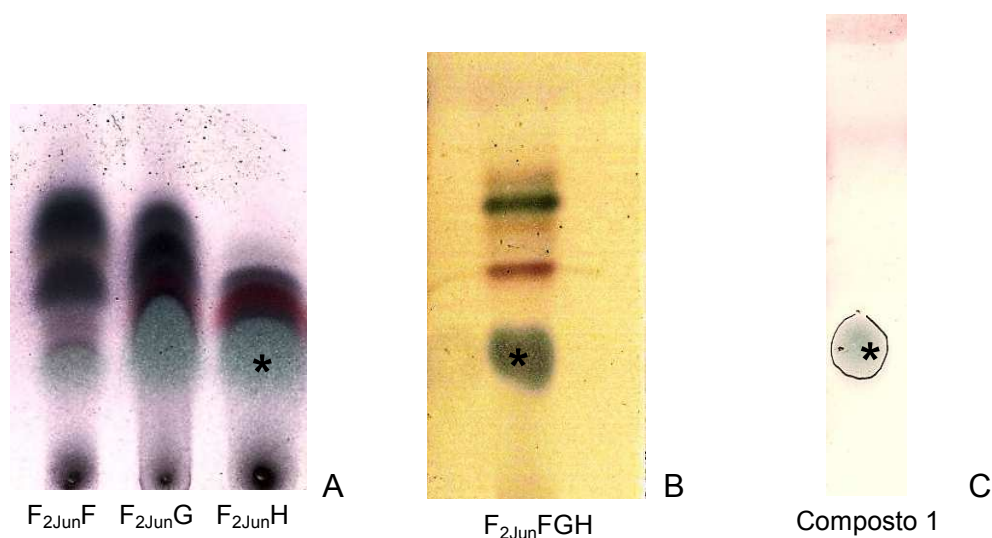


Figura 19 **A.** CCD comparando as frações diclorometânicas F_{2Jun}F, G e H. **B.** Frações ativas agrupadas (F_{2Jun}FGH). **C.** Composto 1 (Fase Móvel: hexano/diclorometano: 60:40 e revelador: anisaldeído). *composto eupomatenóide

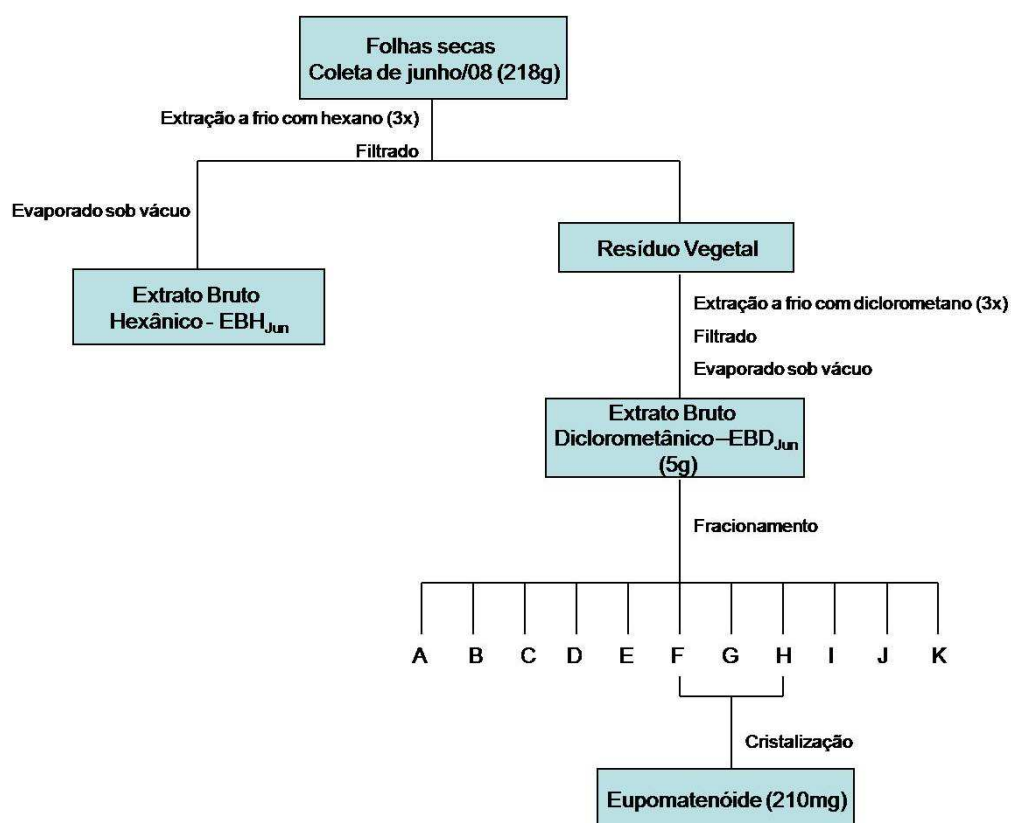


Figura 20. Fluxograma do processo de obtenção do eupomatenóide-5 (composto 1).

Atividade antiproliferativa do composto eupomatenóide-5

O composto eupomatenóide-5 foi avaliado em cultura de células tumorais humanas. O gráfico de sua atividade antiproliferativa e os valores de TGI encontram-se na Figura 21 e Tabela 10. Além das linhagens tumorais, neste experimento o precipitado foi avaliado em linhagem de células normais provenientes de rim de macaco verde (VERO).

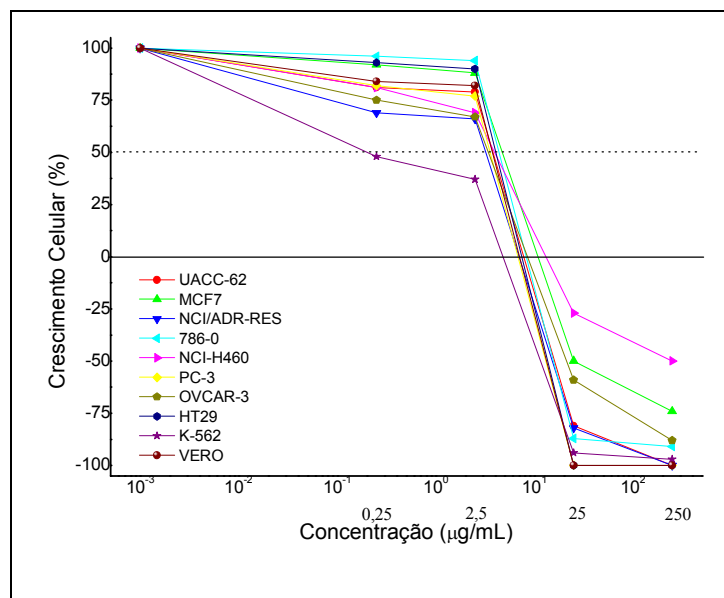


Figura 21. Gráfico da atividade antiproliferativa do composto eupomatenóide-5 em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do composto. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon, K-562 – leucemia e VERO – não tumoral).

Tabela 10. Valores de TGI do eupomatenóide-5 (Eup-5) e do quimioterápico doxorrubicina (doxo) obtidos em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

	UACC-62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCIH460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	VERO
Doxo	0.32	10.04	42.24	0.16	1.59	0.56	4.18	13.21	19.01	2.06
Eup-5	8.21	6.27	14.05	1.93	10.26	6.47	5.50	14.28	99.63	5.77

Os valores em negrito destacam as linhagens em que o precipitado foi mais ativo.

O composto foi analisado por CG-EM e RMN. Através de seus dados espectrais (Figuras 22 a 29 e Tabela 11) e dados da literatura foi identificado como sendo uma neolignana, denominada eupomatenóide-5 (PESSINI *et al.*, 2005).

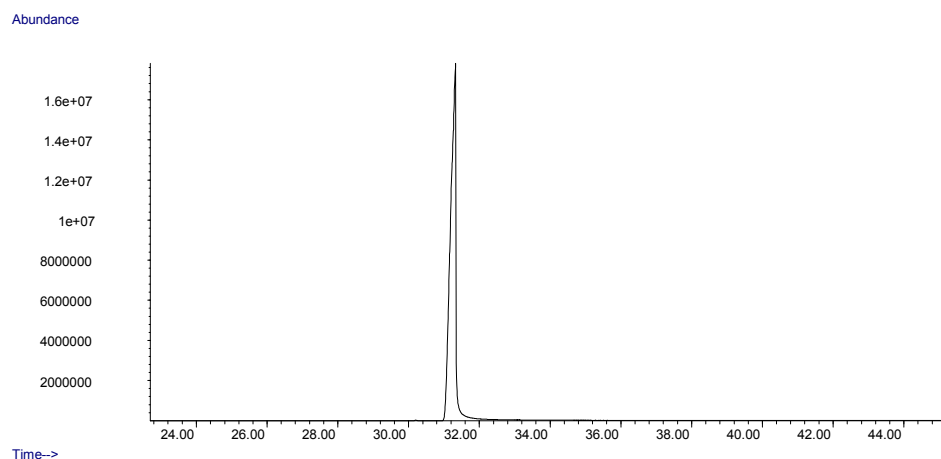


Figura 22. Cromatograma observado por CG/EM (HP 6890/HP 5975) para o composto-1 obtido por precipitação com hexano da fração FD_{2Jun} FGH.

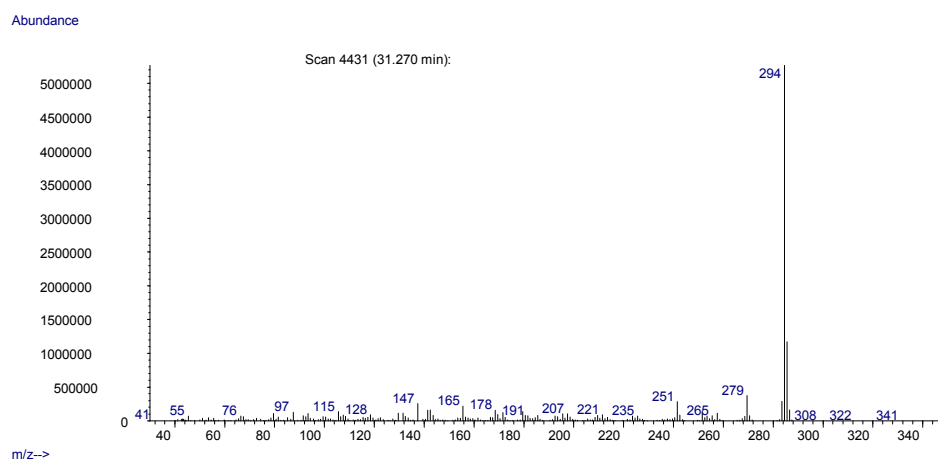


Figura 23. Fragmentograma observado no CG/ EM (HP 6890/HP 5975) do composto-1 (m/z = 294), obtido no tempo retenção de 31.270 min.

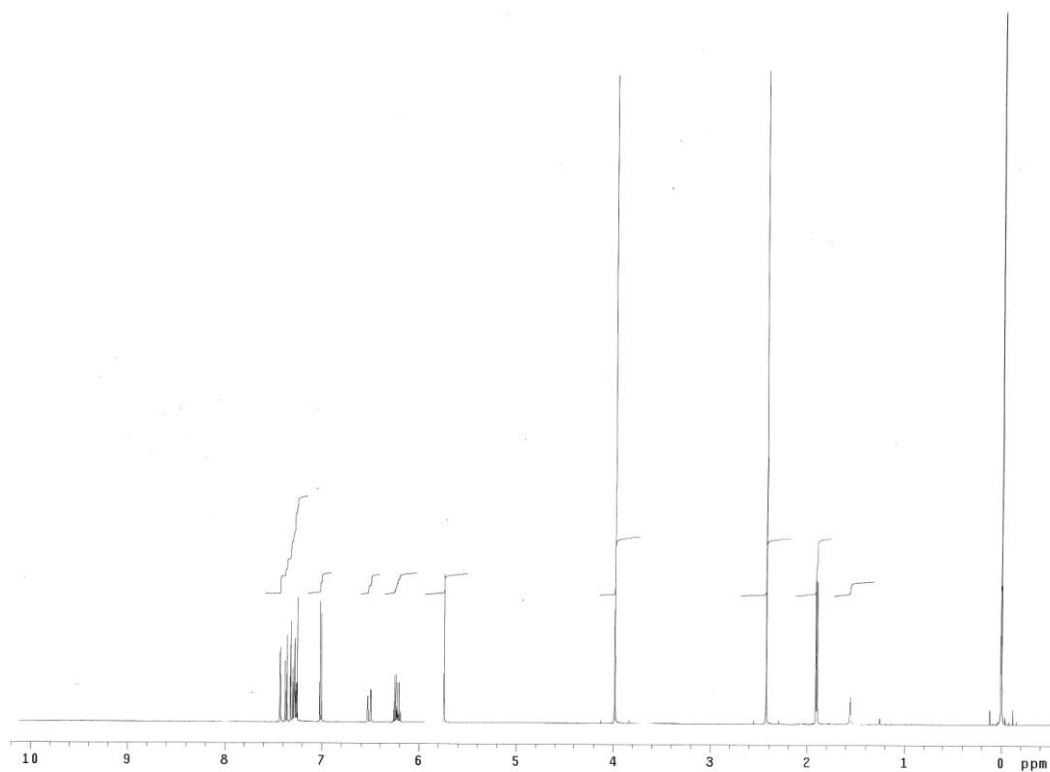


Figura 24. Espectro de RMN^1H (499,88 MHz) em CDCl_3 do composto 1.

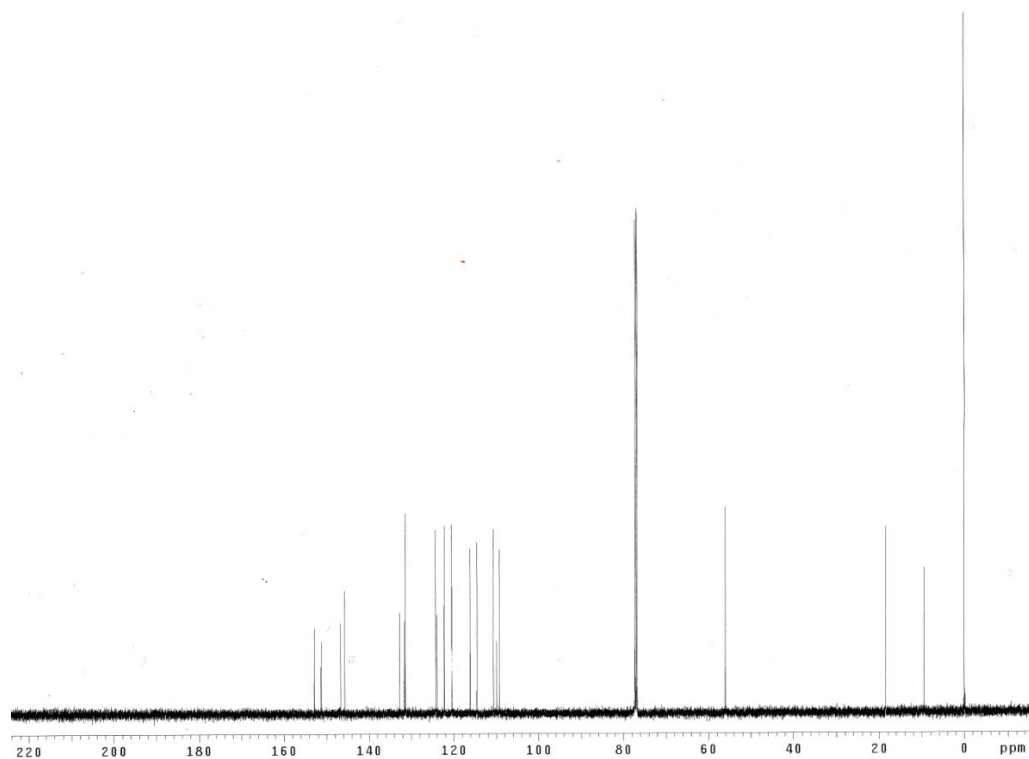


Figura 25. Espectro de RMN^{13}C (125,69 MHz) em CDCl_3 do composto 1.

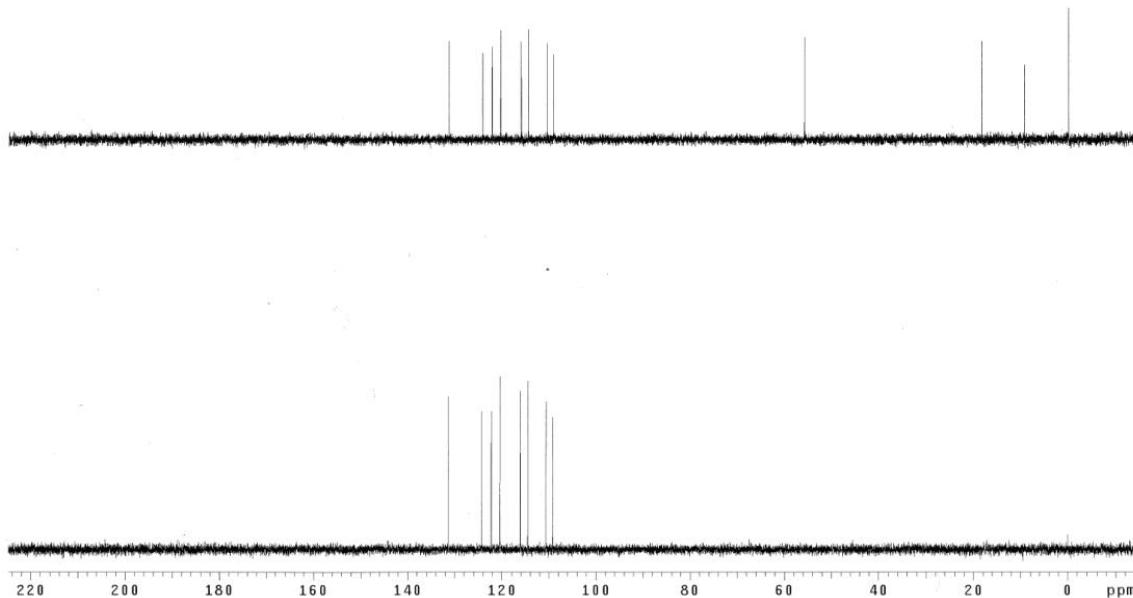


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (125,69 MHz) em CDCl_3 obtido na sequência de pulso DEPT do composto 1.

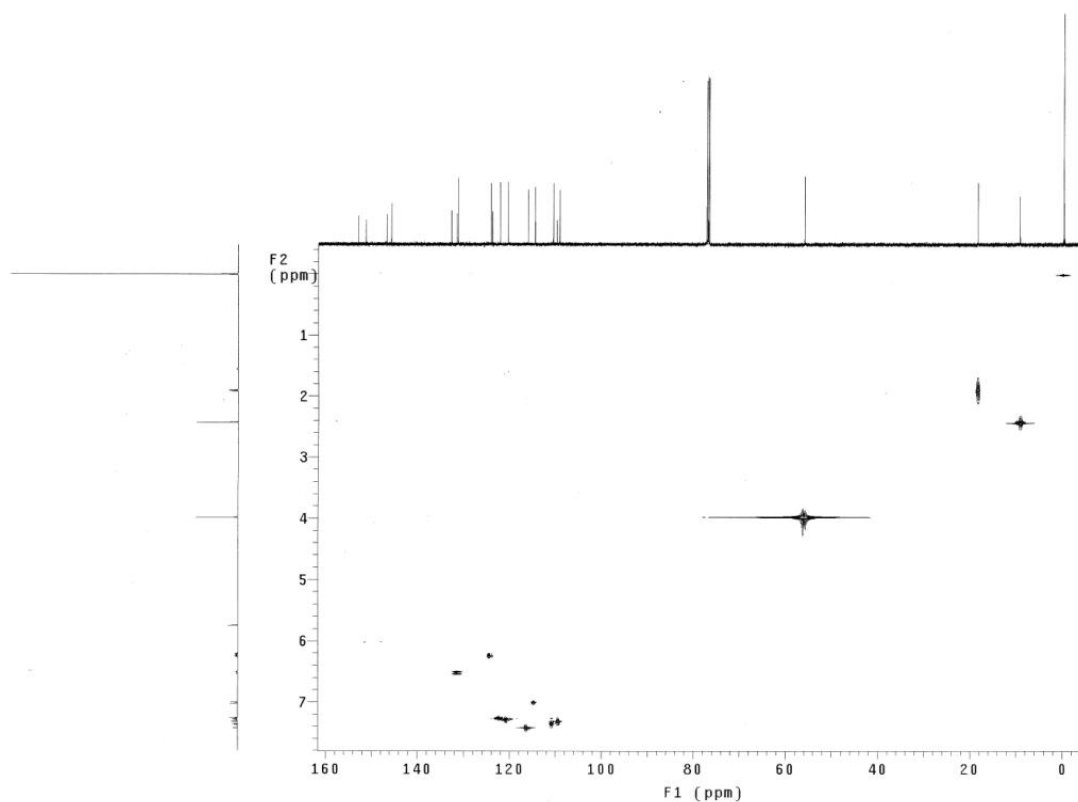


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (499,88 MHz) x ^{13}C (125,69 MHz) em CDCl_3 obtido na sequência de pulso HSQC do composto 1.

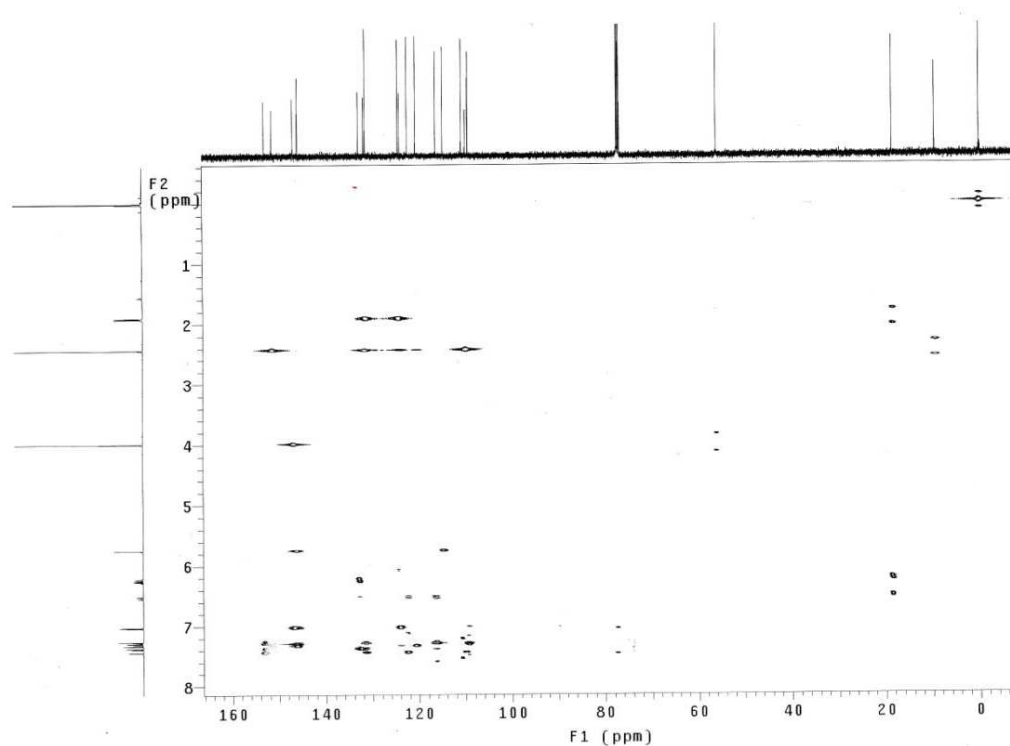


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (499,88 MHz) x ^{13}C (125,69 MHz) em CDCl_3 obtido na sequência de pulso HMBC do composto 1.

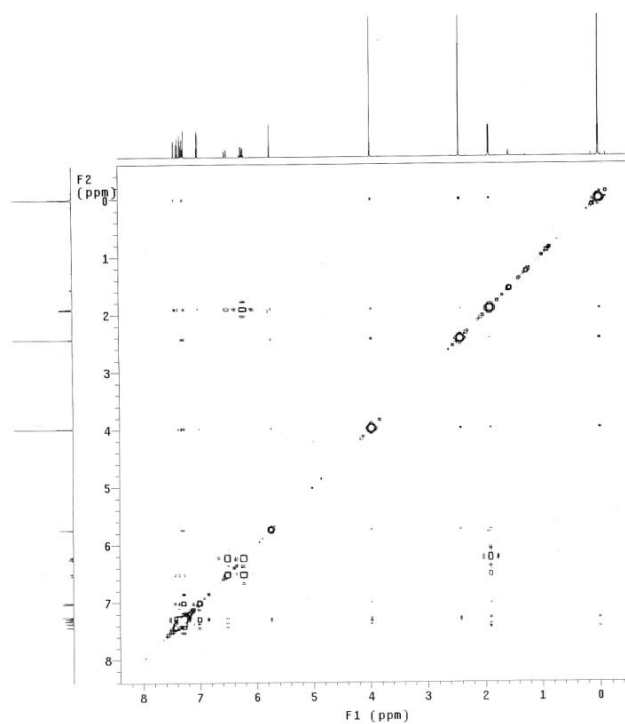


Figura 29. Espectro de RMN ^1H x ^1H (499,88 MHz) em CDCl_3 obtido na sequência de pulso HMBC do composto 1.

O composto obtido pela precipitação da FD_{2Jun}FGH apresentou pico íon molecular em 341 m/z, com pico base em 294 m/z (Figuras 24 e 25). A fim de identificar o composto, este foi analisado por meio da técnica de RMN no Instituto de Química da Unicamp (Figuras 24 a 29). Por comparação de seus dados de ponto de fusão, massas, RMN¹H e RMN¹³C com os da literatura (PESSINI *et al.*, 2005), a sua estrutura foi confirmada. O composto apresentou ponto de fusão numa faixa de 113.9 – 115.2 °C, consistente com dados de literatura (CHAURET *et al.*, 1996) de 114 – 115 °C. No espectro de massas observou-se o íon molecular em m/z 294. Os dados de RMN¹H e RMN¹³C demonstraram consistência com a estrutura do eupomatenóide-5 (Tabela 11).

Tabela 11. Dados espectrais de RMN¹H e ¹³C do eupomatenóide-5 (11 Tesla, CDCl₃).

Carbono	δ C (experimental)	δ C (PESSINI <i>et al.</i> , 2005)	δ H (mult; JH,H in Hz)
---------	--------------------	------------------------------------	------------------------

1'	123,9	123,9	
2'	120,4	120,5	7,29 (dd, 8,1 e 1,8)
2	151,3	151,4	
3	109,8	109,9	
3'	114,6	114,6	7,03 (d, 8,1)
3a	131,6	131,7	
4	116,1	116,2	7,43 (d, 1,8)
4'	146,7	146,8	
5	132,7	132,8	
5'	145,7	145,8	
6	109,2	109,3	7,29 (dd, 8,4 e 1,8)
6'	122,2	122,3	7,32 (d, 1,8)
7	110,6	110,7	7,37 (d, 8,4)
7a	152,9	153,2	
8	131,3	131,4	6,52 (dd, 15,9 e 1,8)
9	124,2	124,3	6,23 (m, 15,6 e 6,6)
10	18,5	18,4	
CH3O	56,1	56,0	3,98 (s)
CH ₃ -3	9,4	9,2	2,42 (s)
OH-4'			5,8

Atividade antiproliferativa das frações do EBD_{Fev}

Do EBD_{Fev} foram obtidas 38 frações (Figura 30) através de cromatografia em coluna filtrante. Estas foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico (F_{Fev}A - F_{Fev}J).

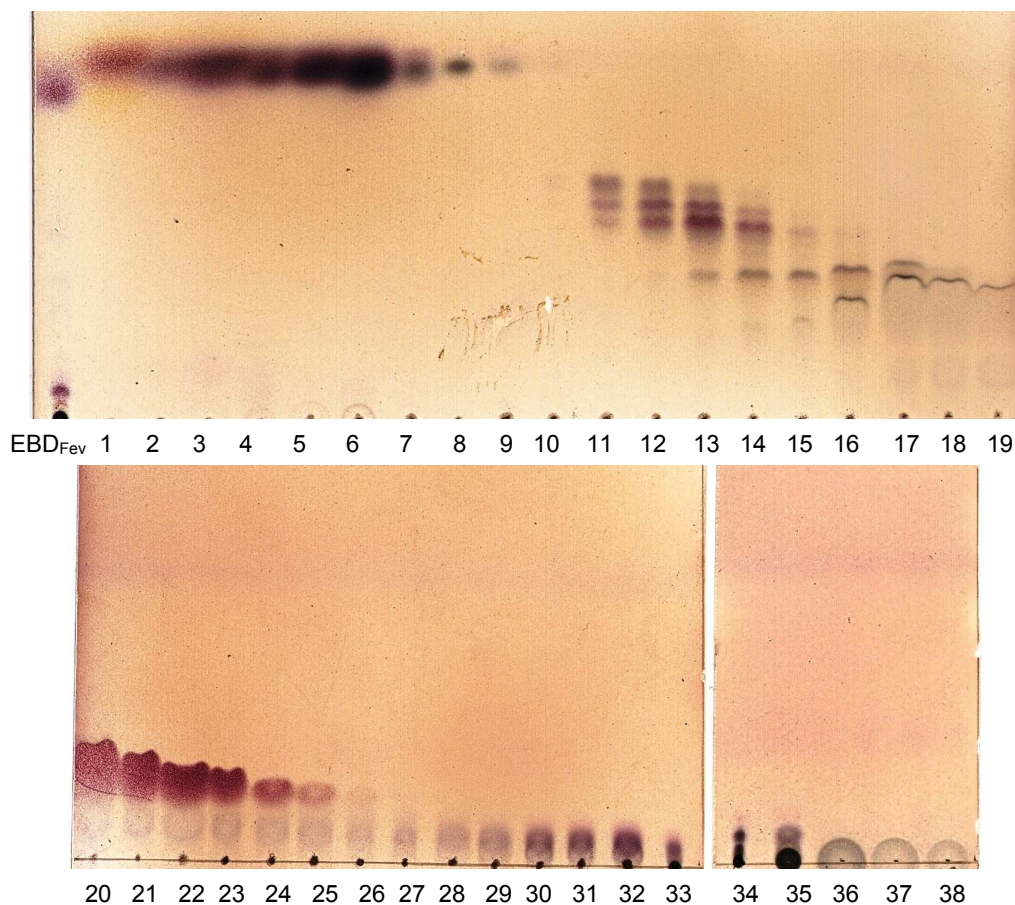


Figura 30. CCD das frações 1-38 de EBD_{Fev} (Fase Móvel: hexano/diclorometano: 60:40 e revelador: anisaldeído).

Tabela 12. Agrupamento e rendimentos parcial (RP) e total (RT) das frações do EBD_{Fev}

Grupo	1-10	11	12	13-15	16-17	18-24	25-28	29-32	33-35	36-38
F _{Fev}	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
RP (%)	6,20	0,23	0,45	2,70	5,05	19,05	0,94	1,36	23,30	25,20
RT(%) = 84,48										

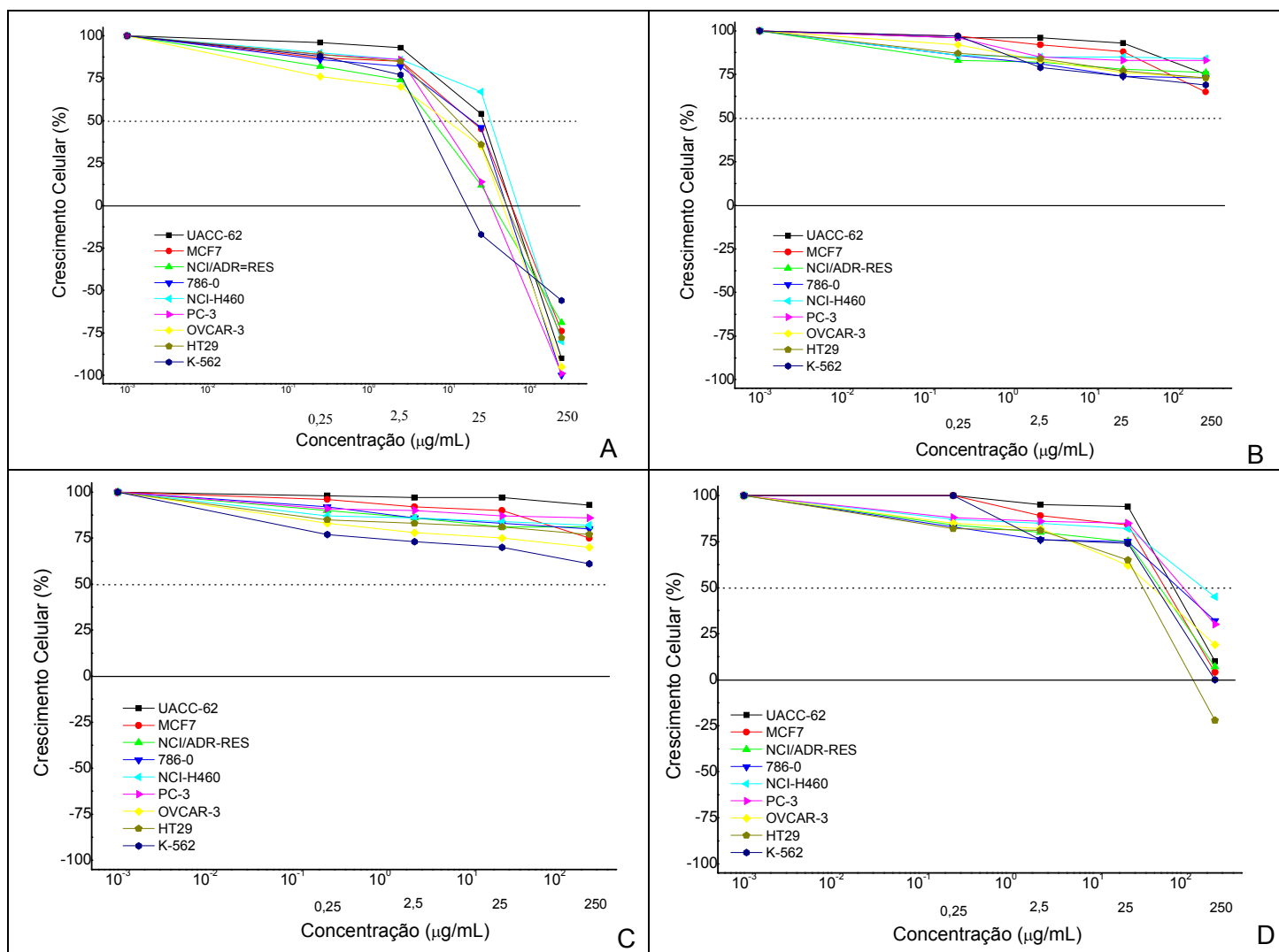


Figura 31. Gráficos da atividade anticâncer das frações do EBD_{Fev} de *P. regnellii*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. **A-D.** F_{Fev} A, B, C e D. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

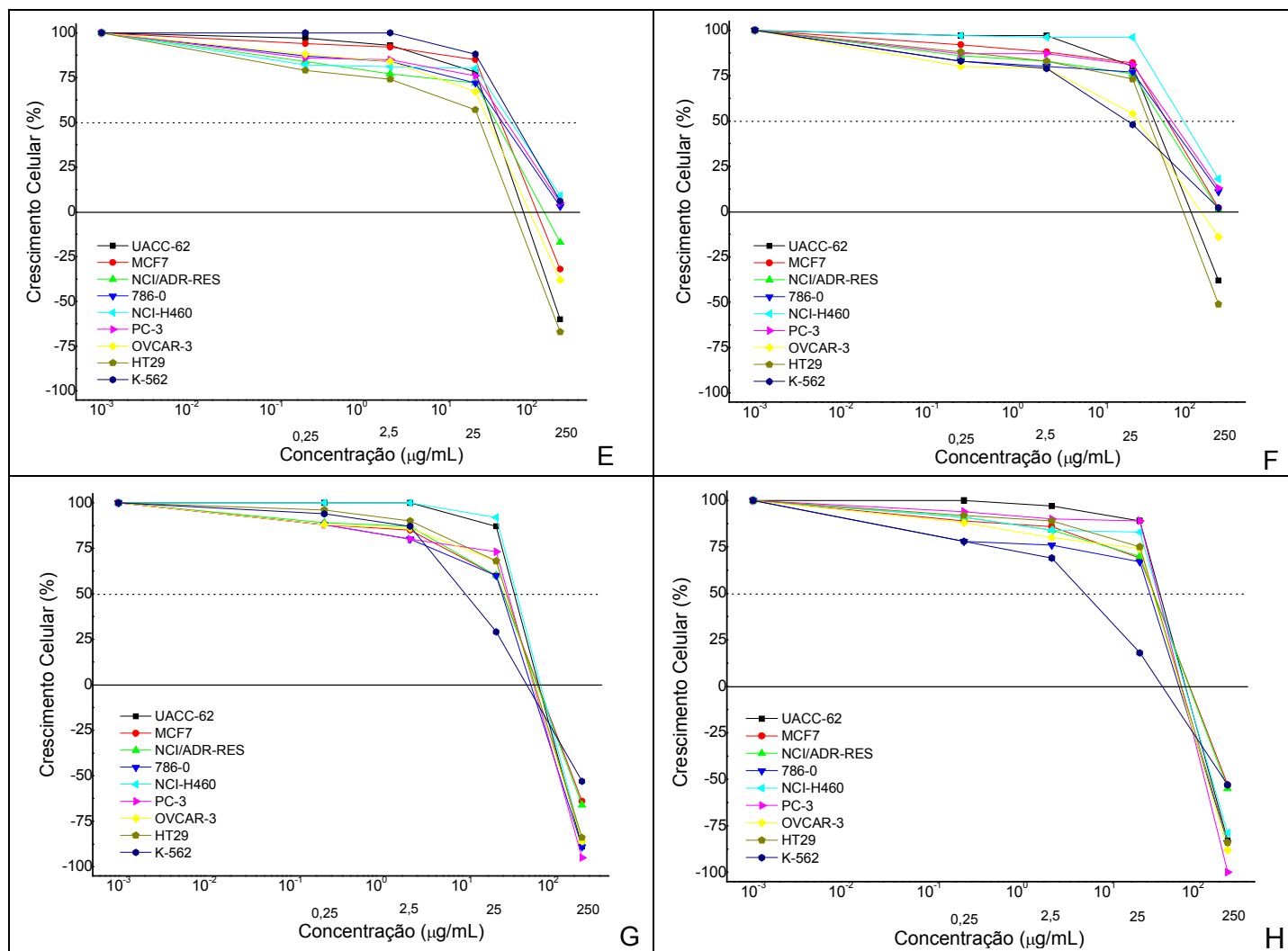


Figura 31. Gráficos da atividade anticâncer das frações do EBD_{Fev} de *P. regnellii*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. **E-H.** F_{Fev} E, F, G e H. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

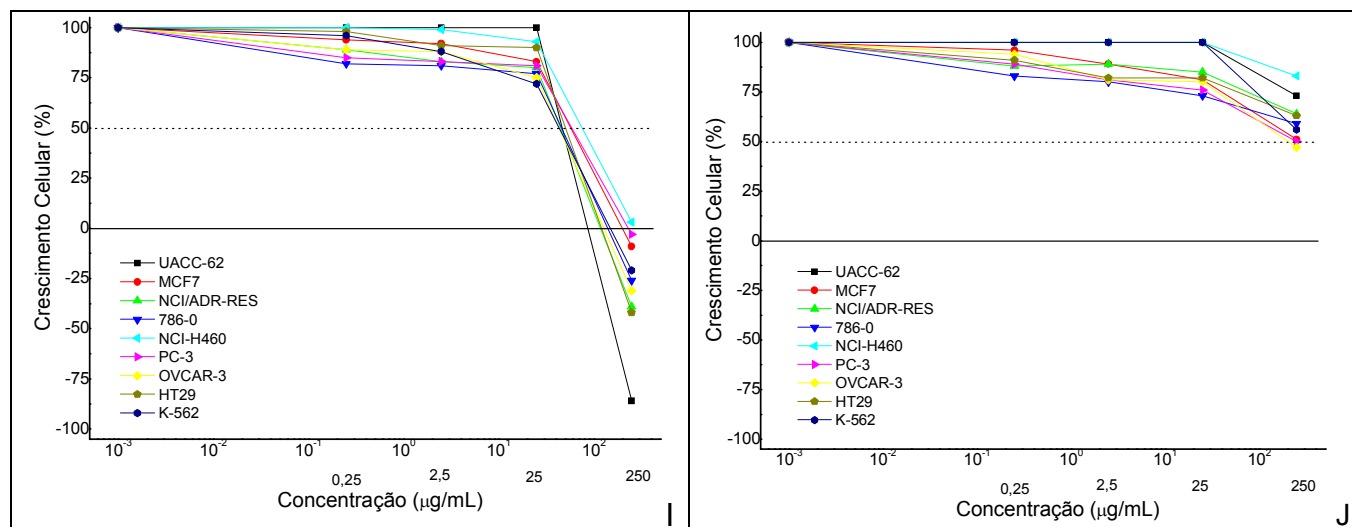


Figura 31. Gráficos da atividade anticâncer das frações do EBD_{Fev} de *P. regnellii*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração das frações. **I e J.** F_{FevI} e F_{FevJ}. (UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT29 – cólon e K-562 – leucemia).

Tabela 13. Valores de TGI do EBD_{Fev} e suas frações obtidos em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

	UACC62	MCF7	NCI/ADR	786-0	NCIH460	PC-3	OVCAR3	HT29	K-562
F _{FevA}	49,17	53,92	31,37	38,23	66,35	29,36	38,97	45,67	22,59
F _{FevB}	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
F _{FevC}	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
F _{FevD}	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	147,91	>250
F _{FevE}	99,34	153,48	173,06	>250	>250	>250	114,08	67,45	>250
F _{FevF}	134,90	>250	>250	>250	>250	>250	169,57	102,81	>250
F _{FevG}	76,17	74,01	72,41	53,83	88,96	54,88	61,60	63,47	55,02
F _{FevH}	87,60	95,61	94,20	62,77	83,55	44,12	64,20	69,36	40,05
F _{FevI}	188,75	212,18	130,92	151,80	>250	240,19	139,30	145,28	159,97
F _{FevJ}	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Quando comparados os extratos brutos em CCD, foram observadas diferenças nos perfis cromatográficos das amostras, o que justifica as diferentes atividades obtidas em teste *in vitro* (Figura 32).

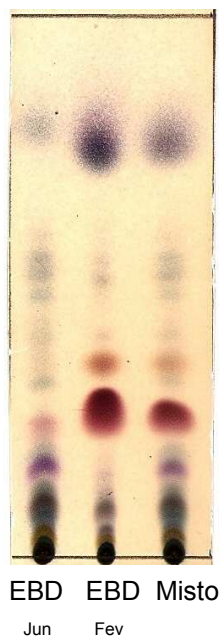


Figura 32 CCD comparando os EBD_{Jun} e EBD_{Fev} (Fase Móvel: hexano/diclorometano: 60:40 e revelador: anisaldeído).

Na tentativa de elucidar as diferenças entre as atividades dos EBD_{Jun}, EBD_{Out} e EBD_{Fev}, estes extratos foram comparados por análise em CG-EM (HP 6890/HP5975), avaliando o teor relativo do composto 1, ou eupomatenóide-5 (m/z 294). Observou-se que a amostra coletada no mês de junho de 2008 apresentou 6,03% do composto no extrato bruto diclorometânico, enquanto que os EBD_{Out} e EBD_{Fev} continham, respectivamente, 0,21% e 0,22% do eupomatenóide-5, refletindo numa diminuição significativa na atividade antiproliferativa *in vitro*. Os resultados demonstram que a atividade anticâncer *in vitro* é afetada pela concentração do referido composto na amostra.

4.3 Ensaios farmacológicos *in vivo*

4.3.1 Teste de toxicidade aguda (Hipocrático)

Grupos de três camundongos fêmeas, da linhagem Swiss, foram tratados via i.p. com as doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg do EBD_{Jun}. Nessas três doses não foram observados sinais de toxicidade durante todo o período de observação (15 dias).

4.3.2 Tumor sólido de Ehrlich

Após demonstração de atividade em cultura de células tumorais a próxima etapa foi a comprovação dessa atividade em modelo experimental de câncer, utilizando animais de laboratório. Dessa forma, foi utilizado o modelo de tumor de pata induzido pela injeção de células tumorais de Ehrlich. Com este objetivo, foram realizados três experimentos visando avaliar o potencial de redução do volume tumoral do extrato bruto diclorometânico (EBD_{Jun}), de uma de suas frações ativas (F_{2Jun}FGH) e do eupomatenóide-5 (composto 1), administrados via i.p.

4.3.2.1 Atividade anticâncer do EBD_{Jun}Avaliação do Volume tumoral

O gráfico apresentado na Figura 33 representa a atividade do EBD_{Jun} sobre o crescimento tumoral em modelo de câncer de pata induzido pela célula de Ehrlich. A Tabela 14 apresenta os dados do volume do tumor no 13º dia de experimento, bem como o seu percentual de redução em relação ao grupo controle salina.

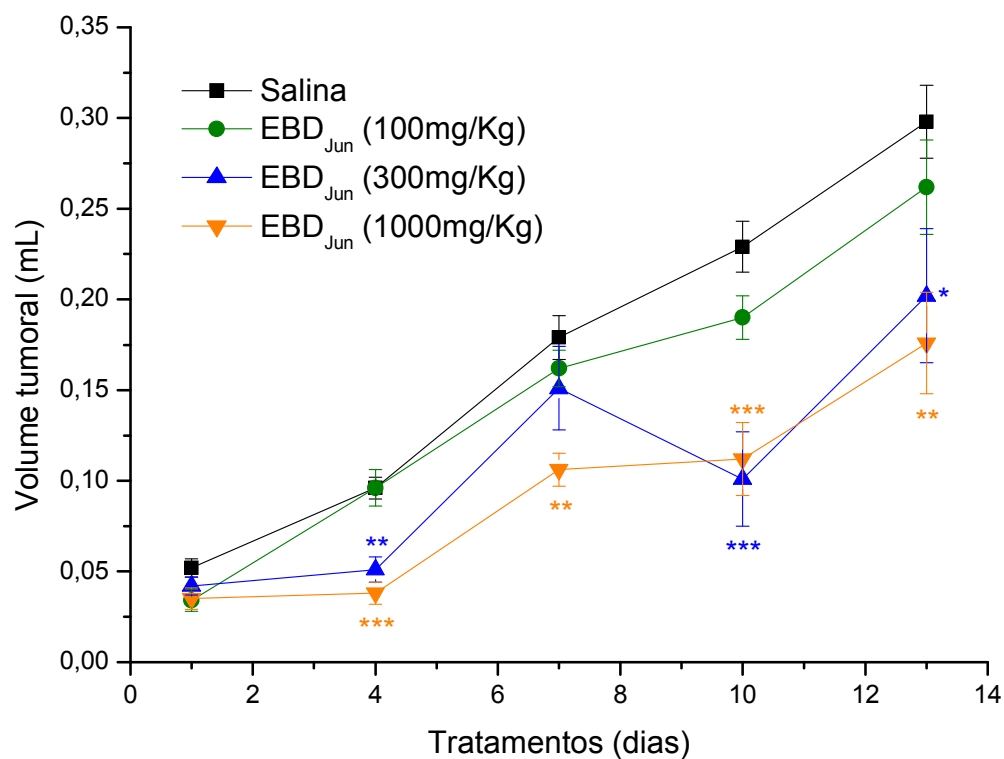


Figura 33. Variação do volume do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento, via i.p., dos diversos grupos experimentais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

Tabela 14. Volume tumoral (μL) e percentual de redução tumoral obtidos no 13º dia de experimento.

Grupos	Volume tumoral (μL) $\pm$ EPM	Redução do tumor (%)
Salina	302,9 $\pm$ 14,3	
EBD _{Jun} 100mg/kg	262,2 $\pm$ 17,3	18,5%
EBD _{Jun} 300mg/kg	202,0 $\pm$ 37,2 *	33,3%
EBD _{Jun} 1000mg/kg	176,0 $\pm$ 28,2 **	41,9%

*p<0,05; **p<0,01. Teste de Duncan, p<0,001 (ANOVA).

De acordo com os resultados obtidos pela análise do gráfico de volume tumoral (Figura 33) e pelo cálculo da porcentagem de redução do tumor (Tabela 14), foi observada inibição do crescimento tumoral para os grupos que receberam EBD_{Jun} nas doses de 300 e 1000 mg/kg, com redução do volume tumoral de 33,3 e 41,9%, respectivamente.

Avaliação da Toxicidade

Embora o teste de toxicidade aguda não tenha evidenciado qualquer sinal de toxicidade, quando a amostra foi administrada em doses repetidas alguns destes sinais apareceram, bem como letalidade.

Os animais tratados com 300 e 1000 mg/kg perderam peso (Figura 34). Além disso, nestes grupos ocorreu um aumento da evacuação. Após a terceira dose, 50% dos animais dos grupos tratados com 300 e 1000 mg/kg morreram, o que justificou o término do experimento no 13º dia.

Avaliação do Peso corporal

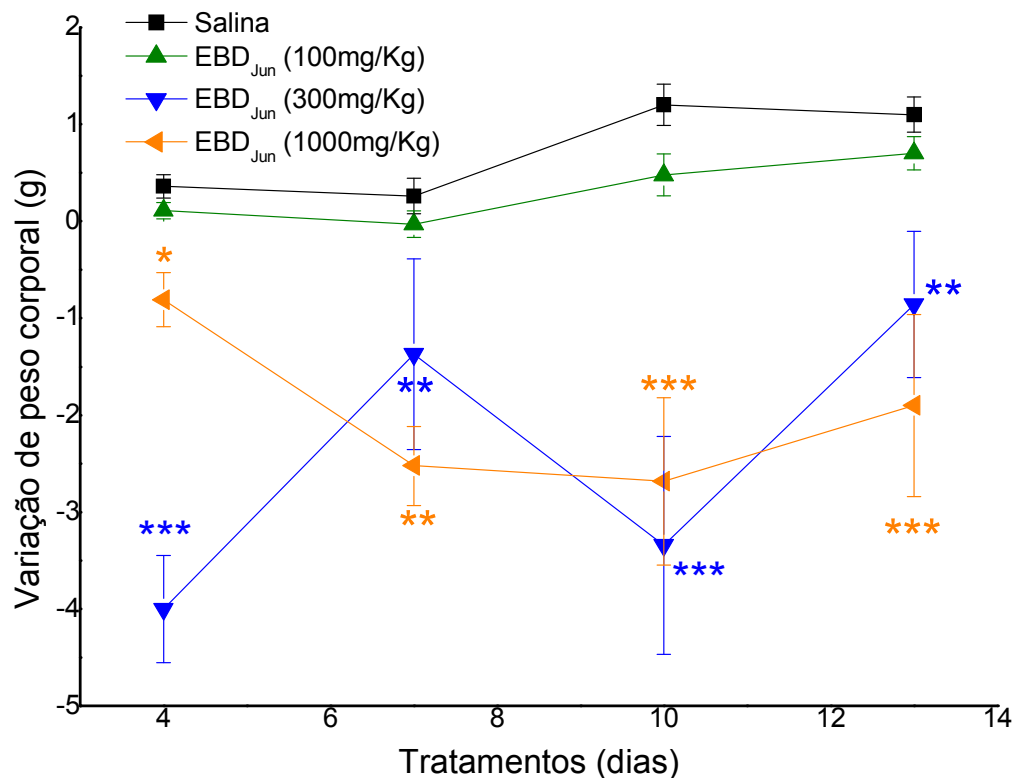


Figura 34. Variação do peso corporal produzido pelos diferentes tratamentos em animais com tumor de pata induzido por células de Ehrlich. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

A Figura 34 representa a evolução do ganho e perda de peso dos animais durante o experimento. Não houve variação de peso no grupo de 100 mg/kg, tendo este apresentado perfil semelhante ao controle negativo salina. Já os grupos de maiores doses se mostraram bastante tóxicos, apresentando variação do peso corporal.

Avaliação Macroscópica dos órgãos

Através de exame macroscópico dos órgãos (fígado, coração, pulmão, rins e baço) dos animais tratados com o EBD_{Jun} não foram observadas alterações evidentes. Entretanto, houve uma diminuição no valor de peso úmido do coração dos animais tratados com 100 mg/kg e do peso úmido do baço dos animais tratados com 1000 mg/kg (Figura 35).

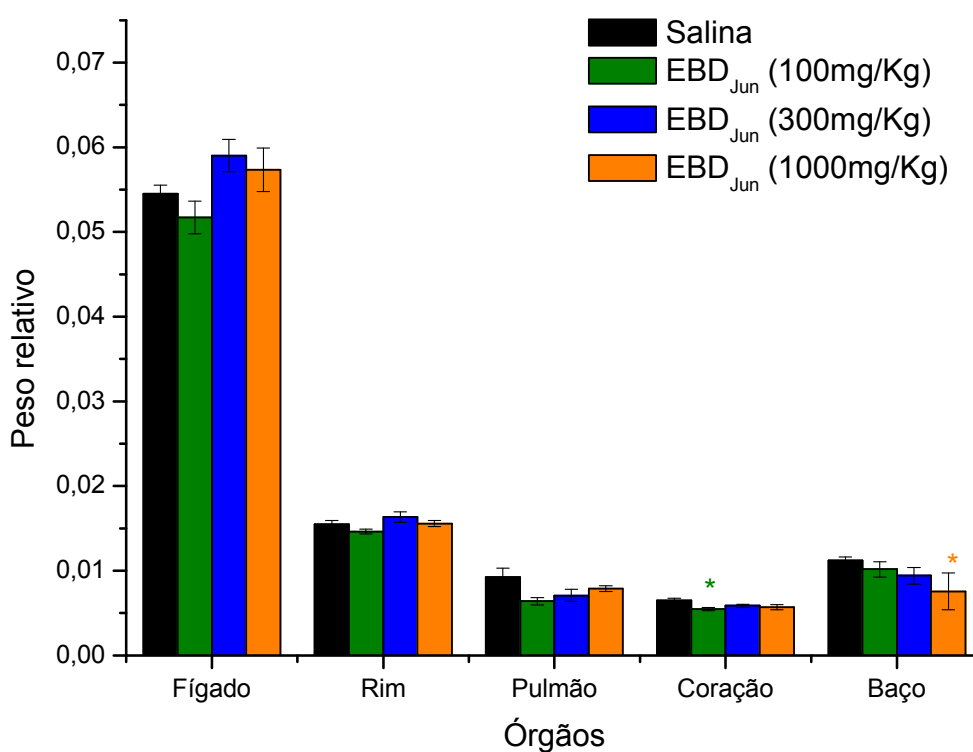


Figura 35. Gráfico do peso úmido dos órgãos dos grupos experimentais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

4.3.2.2 Atividade anticâncer da F_{2Jun}FGHAvaliação do Volume tumoral

A análise da Figura 36 revela que a dose de 100 mg/kg da fração ativa do EBD (F_{2Jun}FGH) reduziu o desenvolvimento tumoral a partir do quarto dia de experimento, reduzindo o tumor em 30,9%, enquanto a dose de 30 mg/kg foi eficaz a partir do décimo dia (26,6%). A doxorrubicina apresentou atividade antiproliferativa a partir do sétimo dia, mantendo o controle do desenvolvimento tumoral até o encerramento do experimento, com redução de 60,6%.

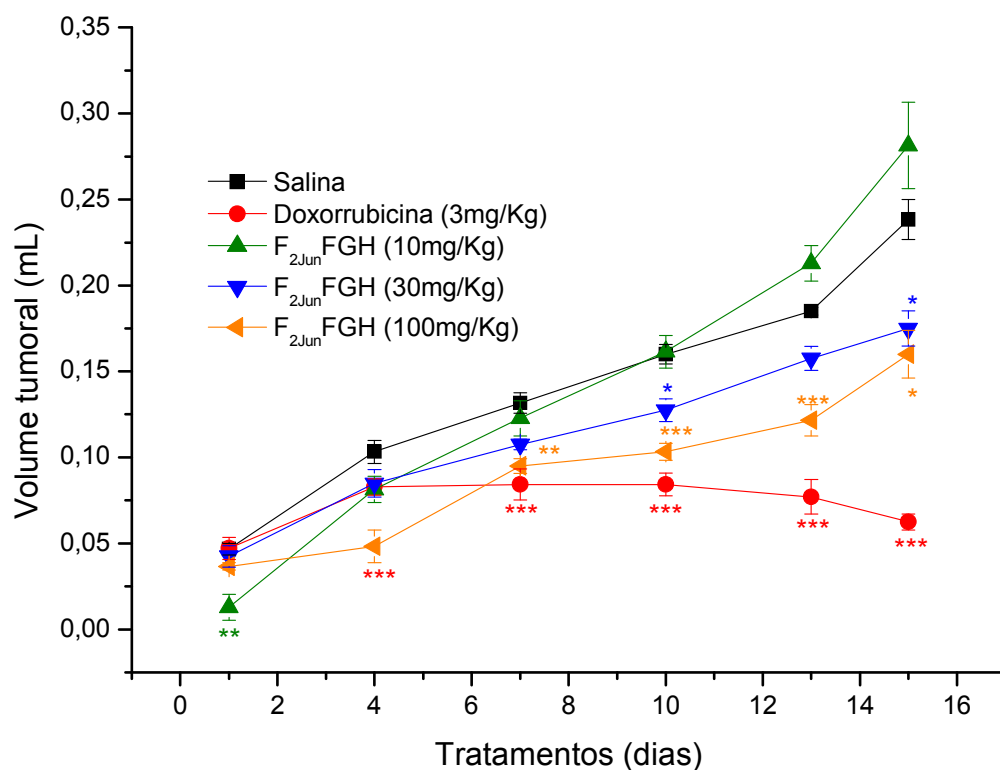


Figura 36. Variação do volume do tumor de pata de camundongo induzido por células de Ehrlich durante o tratamento, via i.p., dos diferentes grupos experimentais. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Teste de Duncan, p<0,001 (ANOVA).

De acordo com os resultados obtidos pela análise de volume tumoral e pelo cálculo da porcentagem de redução do tumor (Tabela 15), o quimioterápico doxorrubicina reduziu o tumor em 60,6%, enquanto os grupos tratados com 30 e 100 mg/kg reduziram o tumor em 26,6% e 30,9%, respectivamente. O pré-tratamento com a dose de 10 mg/kg não apresentou atividade antiproliferativa.

Tabela 15. Volume tumoral (mL) e percentual de redução do tumor nos diversos grupos experimentais após quinze dias de experimento.

Grupos	Volume tumoral (μ L) $\pm$ EPM	Redução do tumor (%)
Salina	238,3 $\pm$ 11,7	
Doxorrubicina (3mg/kg)	94,0 $\pm$ 4,8 ***	60,6%
F _{2Jun} FGH (10mg/kg)	281,4 $\pm$ 25,1 *	
F _{2Jun} FGH (30mg/kg)	175,0 $\pm$ 10,2 *	26,6%
F _{2Jun} FGH (100mg/kg)	165,7 $\pm$ 13,1 ***	30,9%

*p<0,05; ***p<0,001. Teste de Duncan, p<0,001 (ANOVA).

Avaliação da Toxicidade e Peso Corporal

Os animais do grupo controle positivo doxorrubicina apresentaram piloereção, perda de peso, diminuição da locomoção e resposta a estímulos. No início do experimento os animais apresentaram perda de peso que foi recuperada no décimo dia (Figura 37). Embora os animais do grupo tratado com 30 mg/kg tenham apresentado diferença estatística em relação ao grupo salina no último dia (15º), os animais aparentemente não estavam debilitados e não apresentavam sinais de toxicidade como piloereção, movimentos descoordenados ou outros distúrbios.

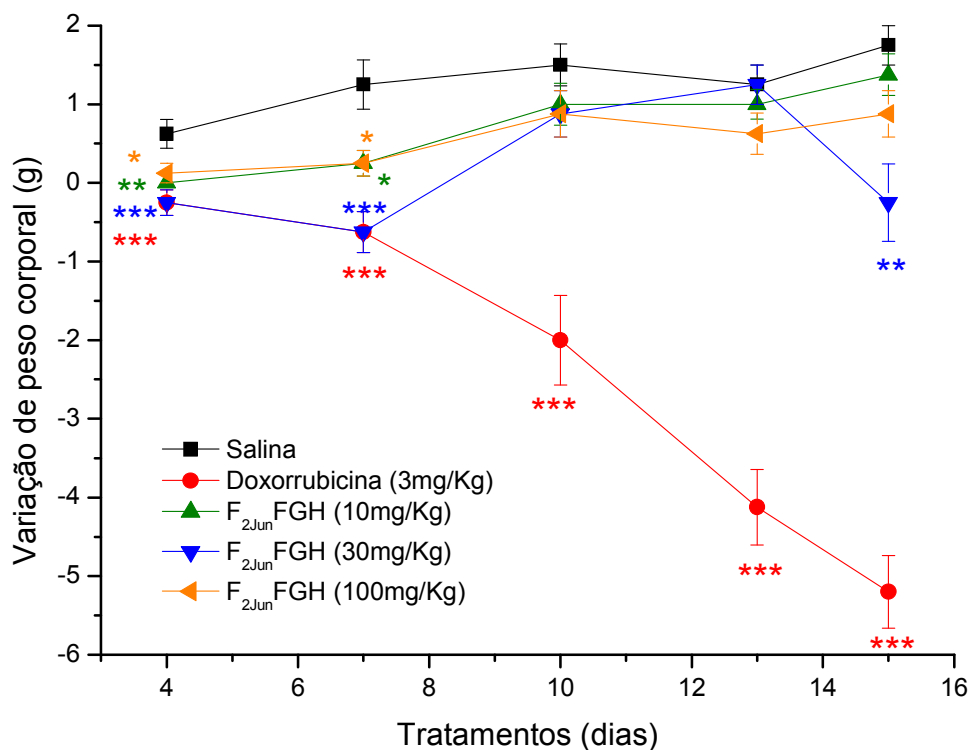


Figura 37. Variação do peso corporal durante o tratamento dos diversos grupos experimentais de camundongos com tumor de pata induzido por células de Ehrlich. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

Avaliação Macroscópica dos órgãos

O exame dos órgãos dos animais tratados com as diferentes doses da fração ativa F_{2Jun}FGH de *P. regnellii* não apresentou alterações macroscópicas evidentes. Neste experimento, além dos órgãos avaliados anteriormente com o extrato bruto diclorometânico (fígado, coração, pulmão, rins e baço) também foi obtido o peso úmido dos órgãos do sistema reprodutor masculino, como próstata, vesícula seminal e testículos. A avaliação do peso úmido do sistema reprodutor foi motivada pela seletividade apresentada por essa fração na linhagem PC-3 (próstata).

Nenhum dos grupos tratados com a fração apresentou diferenças nos pesos dos órgãos em questão, ao passo que no grupo doxorrubicina os órgãos fígado e baço sofreram alterações no peso (Figura 38).

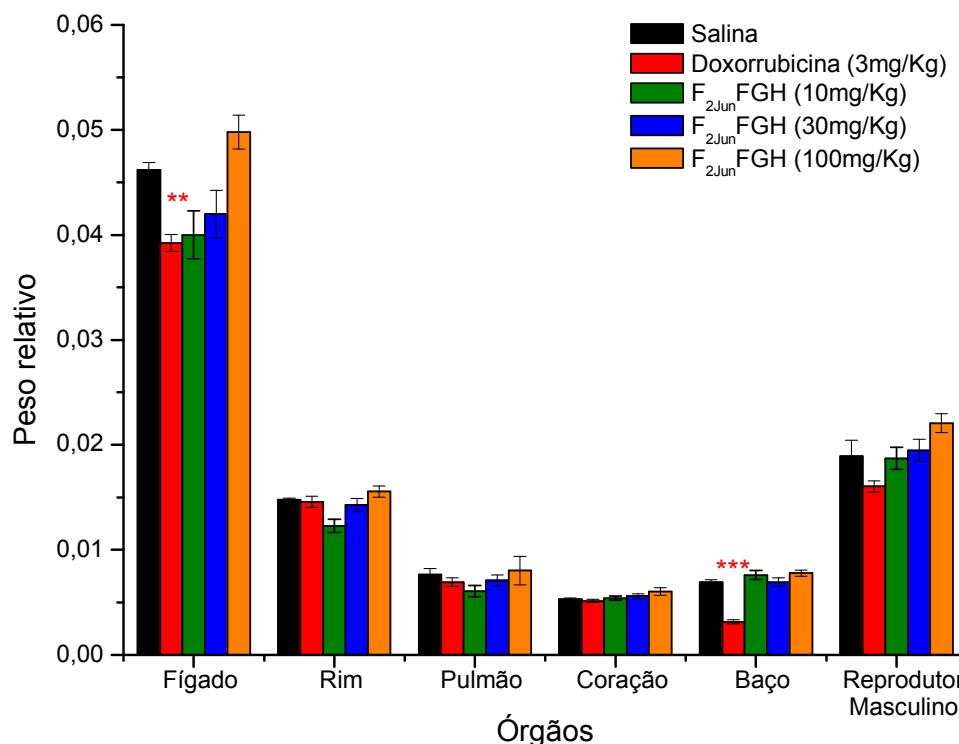


Figura 38. Gráfico do peso úmido dos órgãos dos grupos experimentais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

4.3.2.3 Atividade anticâncer do composto eupomatenóide-5

Avaliação do Volume tumoral

De acordo com a Figura 39, o composto isolado eupomatenóide-5 apresentou atividade antiproliferativa, reduzindo o tumor em 30,4% em relação ao grupo controle salina (Tabela 16). Sua atividade anticâncer foi observada a partir do sétimo dia e mantida até o final do experimento. Da mesma forma, o quimioterápico 5-Fluoracil reduziu o

volume tumoral a partir do sétimo dia e manteve sua atividade antiproliferativa até o encerramento do experimento, reduzindo o tumor em 58,6%.

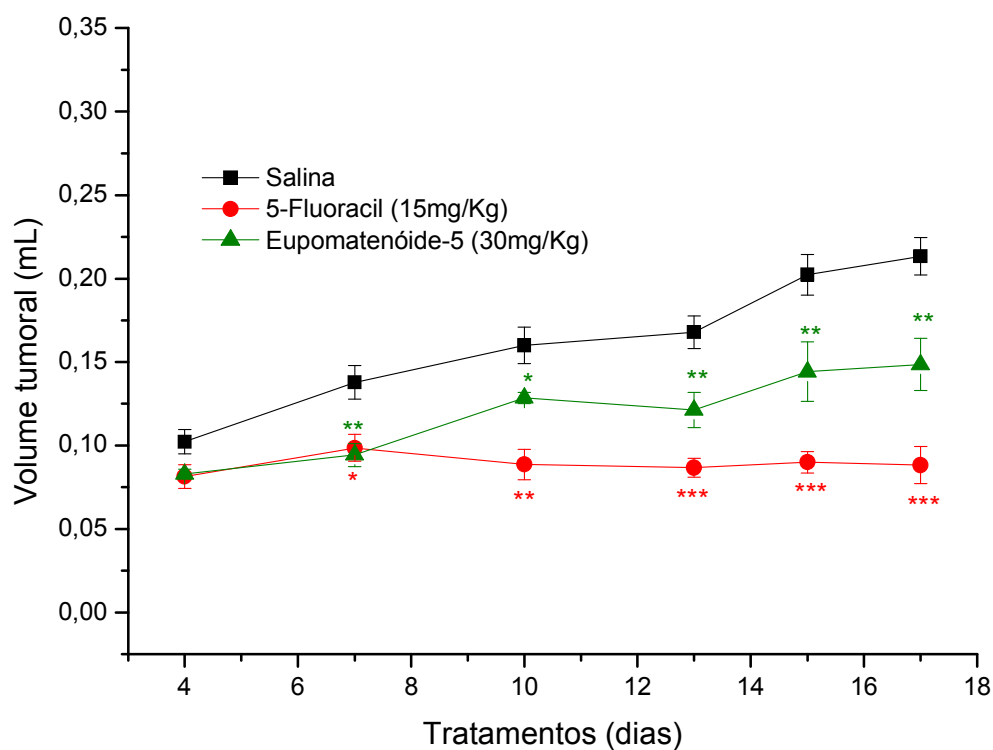


Figura 39. Variação do volume do tumor de pata de camundongo induzido por células de Ehrlich durante o tratamento, via i.p., dos grupos 5-Fluoracil e eupomatenóide-5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,01$ (ANOVA).

Tabela 16. Volume do tumor (μL) de pata de camundongo após dezessete dias de tratamento.

Grupos	Volume tumoral (μL) $\pm$ EPM	Redução do tumor (%)
Salina	213,3 $\pm$ 11,2	
5-Fluoracil (15mg/kg)	88,3 $\pm$ 11,1 ***	58,6%
Eupomatenóide-5 (30mg/kg)	148,6 $\pm$ 15,6 **	30,4%

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

Avaliação da Toxicidade e Peso corporal

Os animais do grupo controle positivo 5-Fluoracil não apresentaram sinais de toxicidade visíveis, como piloereção, evacuação, porém apresentaram perda de peso ao longo de todo o experimento (Figura 40). Após a primeira administração, os animais tratados com o composto eupomatenóide-5 não só recuperaram o peso inicial, como ganharam peso (1,25 g).

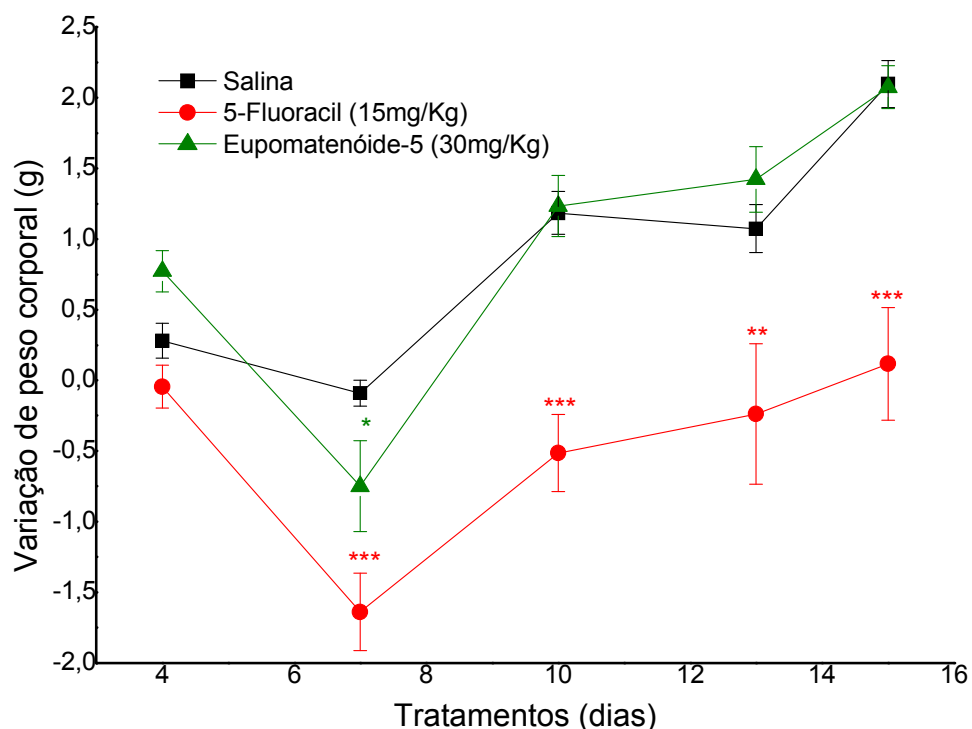


Figura 40. Variação do peso corporal nos diferentes grupos de camundongos com tumor de pata induzido pela injeção de células de Ehrlich *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Teste de Duncan, p<0,001 (ANOVA).

Avaliação Macroscópica dos órgãos

Os órgãos dos animais tratados com o composto eupomatenóide-5 não apresentaram alterações macroscópicas notáveis e nem mesmo diferenças nos pesos dos órgãos em questão, ao passo que no grupo 5-Fluoracil os órgãos fígado, pulmão e

baço sofreram alterações no peso (Figura 41). Neste experimento também foi avaliado o peso úmido dos órgãos do sistema reprodutor masculino, como próstata, vesícula seminal e testículos.

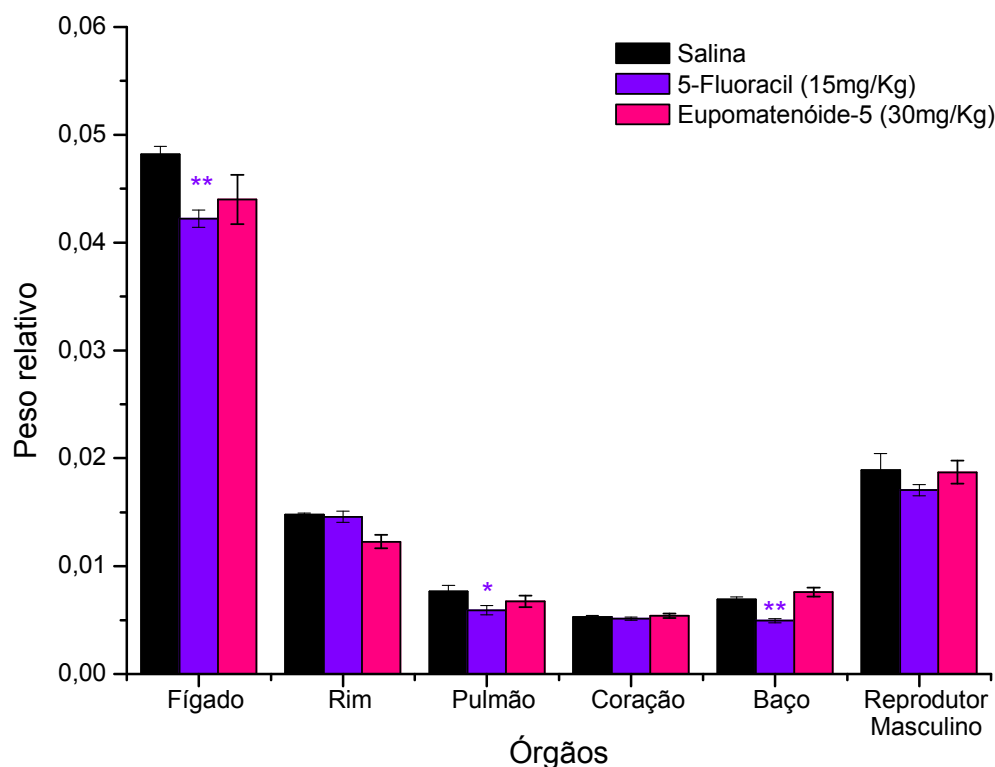


Figura 41. Gráfico representando as variações de peso úmido dos órgãos dos grupos 5-Fluoracil e eupomatenóide-5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

4.3.3 Atividade antiedematogênica do EBD_{Jun}

Edema de Pata induzido pela injeção de carragenina

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através da % de redução do volume do edema no 1º pico de inflamação (6h). Segundo os resultados obtidos, o grupo controle positivo piroxicam (20 mg/kg) e os grupos tratados com o EBD_{Jun} nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., foram eficazes na retenção do primeiro pico, reduzindo o volume do edema

em 54,7%; 30% e 30,7%, respectivamente. O grupo tratado com 30 mg/kg não foi estatisticamente diferente do grupo veículo, reduzindo o volume do edema em apenas 8,7% (Figura 42 e Tabela 17).

No segundo pico de inflamação, que ocorreu 72 horas após o início do experimento, o piroxicam e o EBD não reduziram o edema provocado nesta etapa do processo.

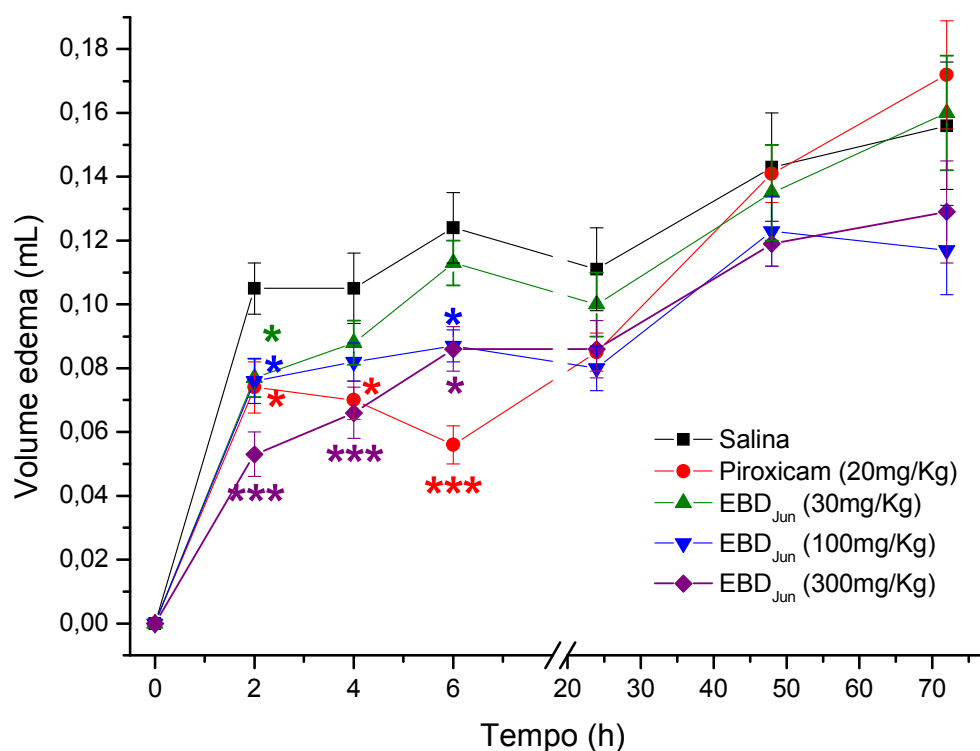


Figura 42. Gráfico apresentando a variação do volume das patas de camundongos em modelo de inflamação induzido por carragenina. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Teste de LSD, $p < 0,001$ (ANOVA).

Tabela 17. Volume do edema de pata (μL) induzido por carragenina após seis horas de tratamento (v.o.) durante o primeiro pico de inflamação.

Grupos	Volume edema (μL) $\pm$ EPM	% de redução do edema
Salina	123,7 $\pm$ 11,4	
Piroxicam (20mg/kg)	56,0 $\pm$ 5,6 ***	54,7%
EBD _{Jun} (30mg/kg)	113,0 $\pm$ 7,3	8,7%
EBD _{Jun} (100mg/kg)	86,6 $\pm$ 5,5 *	30,0%
EBD _{Jun} (300mg/kg)	85,7 $\pm$ 7,0 *	30,7%

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Teste de LSD, $p < 0,001$ (ANOVA).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetou de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recaiu principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. Para o ano de 2010, são esperados no Brasil 489.270 novos casos de câncer (INCA, 2009).

Dentre os muitos desafios da medicina, nenhum teve um início tão controverso quanto o da cura para o câncer. Embora o processo neoplásico tenha sido reconhecido há séculos, os conhecimentos sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão tumoral eram escassos até o advento da medicina molecular em meados do século 20. Fármacos e terapias imunológicas se transformaram no foco dos esforços para a cura do câncer e, desde então, a pesquisa científica tornou-se multidisciplinar e tem trabalhado em conjunto na busca por medicamentos mais efetivos para o tratamento de tumores (CHABNER e ROBERTS JR, 2005).

O controle e o tratamento do câncer, a segunda maior causa de morte por doenças em todo o mundo, têm apontado para a busca de novas diretrizes voltadas para o aprimoramento e a melhoria de terapias não convencionais. A descoberta de novos fármacos derivados de plantas medicinais possui um papel importante no tratamento do câncer, sendo que de todos os fármacos antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40% foi originado de produtos naturais ou semi-sintéticos (BUTLER, 2004).

Um dos exemplos de fármacos obtidos de espécies vegetais mais significantes é a vincristina, um alcalóide extraído da Vinca (*Catharanthus roseus*). A introdução da vincristina foi responsável por um aumento nas taxas de cura para a doença de Hodgkin e algumas formas de leucemia. Outro exemplo de agente ativo derivado de plantas é a

lignana etoposídeo, derivada da epipodofilotoxina, encontrada em *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*. Este composto apresenta grande eficácia na cura do câncer de testículo, quando utilizado em combinação com bleomicina (também derivada de produto natural) e cisplatina. Seu efeito citotóxico está relacionado com a inibição da divisão celular na metáfase, bloqueando a duplicação dos cromossomos e restando a divisão celular no estado mitótico do ciclo celular, além de ser inibidor da topoisomerase II, enzima nuclear essencial para o funcionamento do DNA e sobrevivência da célula, sendo, portanto, ferramenta importante na quimioterapia do câncer (WINK *et al.*, 2005; NITISS, 2009).

Os taxanos paclitaxel e docetaxel, derivados de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* apresentam expressiva atividade antitumoral contra cânceres de mama, ovário e outros tipos de tumores malignos. Os derivados da comptotecina (irinotecano e topotecano) têm demonstrado atividade antitumoral contra câncer colorretal e de ovário, respectivamente. Novas moléculas de origem vegetal oferecem uma grande oportunidade para avaliar não somente novas classes químicas de agentes tumorais, mas também novos e potencialmente relevantes mecanismos de ação (ROCHA *et al.*, 2001; ITOKAWA *et al.*, 2008).

É importante salientar que extratos e frações obtidos das folhas de *Pothomorphe umbellata*, outra Piperácea estudada no CPQBA, produziram atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas e em tumor ascítico de Ehrlich (SACOMAN *et al.*, 2008), incentivando-nos a estudar uma outra espécie desta família, cuja atividade antiproliferativa era inédita.

O presente projeto teve como objetivo principal avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa de extratos e frações ativas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* em cultura de células tumorais humanas e *in vivo*, em modelo de tumor sólido de Ehrlich.

No que se refere aos resultados obtidos através de ensaio *in vitro* de atividade antiproliferativa, os dados apontam para uma melhora na atividade do extrato bruto diclorometânico (EBD) quando este é previamente extraído com hexano (Tabela 5), embora ocorra uma queda no rendimento do extrato (9% versus 3,3%, Tabelas 4 e 6).

O EBD da planta coletada em junho sem extração prévia com hexano apresentou TGI baixo para as linhagens de melanoma (26,01 µg/mL) e mama (39,80 µg/mL). O EBD obtido após extração com hexano, além de manter a atividade para as linhagens de melanoma (TGI = 26,45 µg/mL) e mama (TGI = 39,58 µg/mL), ainda apresentou TGI baixo para as linhagens de pulmão e rim (20,39 e 21,93 µg/mL, respectivamente) e maior seletividade para as linhagens de próstata (10,97 µg/mL) e ovário (12,05 µg/mL).

Diferentemente do EBD_{Jun}, os EBD_{Out} e EBD_{Fev} não apresentaram propriedades antiproliferativas promissoras (Tabela 5). Semelhante ao EBD_{Jun}, a fração de média polaridade, obtida através da F_{1JunB}, além da seletividade para as linhagens de próstata, pulmão, rim, melanoma e mama (TGI = 5,44; 6,09; 8,33; 10,18 e 10,77 µg/mL, respectivamente), aumentou a atividade específica, comprovando a eficácia do processo de fracionamento utilizado.

A mesma fração de média polaridade (F_{OutB}) não apresentou atividade antiproliferativa significativa. A fração de maior polaridade F_{1JunC} foi seletiva para pulmão (TGI = 3,94 µg/mL), assim como as frações F_{OutA} e F_{OutC} (TGI = 3,38 e 0,44 µg/mL, respectivamente).

Quando comparados por análise em CCD, foi observado que os EBD_{Jun} e EBD_{Out} apresentavam diferentes compostos (Figura 14). Foi possível avaliar a presença de três neolignanas, de massas moleculares m/z = 294, 292 e 266, respectivamente (Figura 15), comparadas com os compostos descritos por PESSINI *et al.* (2005).

As neolignanas 1 a 3 estão presentes na F_{1JunB}, ao passo que na F_{OutB} não estão presentes. Uma vez que a fração de outubro apresentou uma queda na atividade

antiproliferativa em comparação à $F_{1Jun}B$, os resultados obtidos sugeriram que os compostos 1, 2 e 3 são importantes para a atividade anticâncer e posteriormente os espectros de CG-EM e de RMN possibilitaram a identificação da neolignana eupomatenóide-5 como sendo o composto 1 (Figuras 16, 22, 23 e Tabela 11).

Assim como o EBD_{Out} , o EBD_{Fev} não apresentou atividade anticâncer promissora. Um fracionamento por meio de coluna filtrante foi realizado, na tentativa de purificar a amostra e obter frações mais ativas, porém os resultados (Figura 31) indicaram apenas uma atividade citotóxica na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$).

Diferenças entre extratos vegetais coletados em épocas do ano distintas são esperadas, uma vez que fatores ambientais como luz, disponibilidade de nutrientes, estação do ano, período do dia e ciclo da planta interferem na produção e variabilidade de compostos e princípios ativos de espécies vegetais, principalmente a produção e teor de óleos essenciais voláteis (POTZERNHEIM *et al.*, 2006). Os resultados obtidos sugerem que diferentes épocas do ano influenciam na composição e na atividade antiproliferativa de *P. regnellii*, sendo o inverno o melhor período para a sua coleta.

O fracionamento realizado através de cromatografia em coluna filtrante foi eficiente para a separação dos compostos presentes no EBD_{Jun} . Uma das frações de média polaridade obtida através deste fracionamento foi a fração $F_{2Jun}F$ (Figura 18F), que apresentou seletividade para as linhagens de melanoma, próstata, rim, pulmão e cólon (TGI = 2,22; 3,17; 4,02; 5,46 e 7,19 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e para as linhagens hormônio-dependentes de mama (TGI = 3,63 $\mu\text{g/mL}$) e ovário (TGI = 9,52 $\mu\text{g/mL}$).

As linhagens de mama (MCF7) e ovário (OVCAR-3) são linhagens hormônio-dependentes, sugerindo estudos que avaliem a interação dessas substâncias em células com receptores hormonais. As frações $F_{2Jun}G$ e $F_{2Jun}H$ (Figuras 18G e 18H) também se mostraram potentes e seletivas para as linhagens de próstata (TGI = 5,03 $\mu\text{g/mL}$ e 6,63 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e ovário (TGI = 8,14 e 6,91 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Além

destes valores, semelhante à $F_{2Jun}F$, a $F_{2Jun}G$ foi ainda seletiva para linhagem de rim (TGI = 7,69 $\mu\text{g/mL}$) e a $F_{2Jun}H$ para a linhagem de melanoma (TGI = 2,52 $\mu\text{g/mL}$). Com base nos perfis cromatográficos e de atividade antiproliferativa (Tabela 9), estas frações foram agrupadas, originando a $F_{2Jun}FGH$. Esses valores de TGI demonstraram aumento da atividade específica das frações e a eficácia do processo de fracionamento utilizado.

Da fração ativa $F_{2Jun}FGH$ foi obtido um precipitado que, por meio de comparação de seus dados de ponto de fusão, massas, RMN^1H e RMN^{13}C com os da literatura (PESSINI *et al.*, 2005), foi identificado como sendo a neolignana denominada eupomatenóide-5 (composto-1), conforme já descrito.

Na tentativa de elucidar as diferenças entre as atividades dos EBD de junho, outubro e fevereiro, estes extratos foram comparados por análise em CG-EM (HP 6890/HP5975), avaliando o teor relativo do composto-1 (m/z 294). Observou-se que o EBD_{Jun} apresentou 6,03%, enquanto os EBD_{Out} e o EBD_{Fev} apresentaram, respectivamente, 0,21 e 0,22% do composto-1, corroborando com os resultados de redução da potência e seletividade sobre células tumorais de próstata, pulmão, rim, melanoma e mama nestes períodos (Tabela 5). Estes dados, juntamente com os dados de atividade antiproliferativa do EBD_{Jun} e de suas frações ativas permitem afirmar que a neolignana eupomatenóide-5 é um dos compostos responsáveis pela atividade antiproliferativa e anticâncer, sendo encontrado em maior quantidade, nesta planta, no inverno.

Dados da literatura relatam que a neolignana eupomatenóide-5, bem como outras três neolignanas (eupomatenóide-3, eupomatenóide-6 e conocarpano), apresentam atividades tripanocida (LUIZE *et al.*, 2006) e antifúngica (PESSINI *et al.*, 2005), mas nada era descrito quanto à sua atividade antiproliferativa.

Quando avaliado *in vitro* em painel de células tumorais humanas, este composto apresentou valores baixos de TGI (Tabela 10), indicando potência para as linhagens de

próstata (TGI = 6,47 µg/mL) e para as linhagens hormônio-dependentes de ovário e mama (TGI = 5,50 e 6,27 µg/mL, respectivamente), além de seletividade para a linhagem de rim (TGI = 1,93 µg/mL). Além das linhagens tumorais, o composto foi citotóxico para a linhagem VERO (células não tumorais), com TGI = 5,77 µg/mL. O quimioterápico doxorrubicina também apresentou atividade (TGI = 2,06 µg/mL) sobre as células VERO, sendo quase 3 vezes mais citotóxico que o eupomatenóide-5 (composto 1). As células VERO são de uma linhagem obtida a partir de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). São bastante utilizadas devido às suas características de crescimento e comportamento, sendo recomendadas para estudos de citotoxicidade e transformação celular (CARVALHO *et al.*, 1999). Como as células VERO apresentam características de crescimento em cultura bastante definidas, pequenas alterações em função de tratamentos por carcinógenos químicos podem ser facilmente observadas através de modificações nas suas propriedades de crescimento e características morfológicas.

Sabe-se que, se o tecido normal e o tumoral exibirem sensibilidade similar ao medicamento, não haverá janela terapêutica e, na concentração em que o tumor responder, a célula normal responderá também e o tecido será danificado (HOFMANN, 2008).

Entretanto, somente um estudo *in vitro* não é suficiente para determinar a atividade da amostra a ser estudada, ainda mais quando se trata de câncer. A maioria dos quimioterápicos produz efeitos adversos em tecidos de crescimento rápido. Sendo fibroblastos, é esperado que as células VERO sejam afetadas pela maioria dos quimioterápicos. Portanto, para maiores informações sobre a toxicidade, faz-se necessária a avaliação toxicológica *in vivo*.

A atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Muitas substâncias

apresentam excelente atividade em cultura de células, porém, quando administradas em animal, perdem sua atividade por metabolização ou problemas de biodisponibilidade. O modelo *in vivo* permite a obtenção de informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica do novo composto. Portanto, um estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão apropriada a respeito do potencial anticâncer de uma nova substância (SMITH *et al.*, 2005).

Neste contexto, a metodologia utilizada para o teste *in vivo* foi o experimento de tumor sólido de Ehrlich. O modelo de tumor sólido de Ehrlich é interessante, pois permite avaliar a ação sistêmica da amostra, já que o tumor é inoculado no coxim plantar do animal e os tratamentos são realizados pela via i.p.. A avaliação periódica do volume do tumor com o uso do pletismômetro permite um melhor acompanhamento dos efeitos e até, se necessário, o ajuste de doses. Já o acompanhamento do peso corporal permite avaliar a toxicidade do composto permitindo também o ajuste de doses, no caso de perda excessiva. O EBD_{Jun}, a fração F_{2Jun}FGH e o composto eupomatenóide-5 foram avaliados neste modelo de tumor sólido de Ehrlich.

A análise dos dados apresentados na Figura 33 permite inferir que nas doses de 300 e 1000 mg/kg o EBD reduziu, de forma significativa, o desenvolvimento tumoral a partir do quarto dia de experimento (33,3 e 41,9%, respectivamente).

O volume tumoral do grupo de 100 mg/kg ao longo dos 13 dias de experimento não foi estatisticamente diferente do volume do grupo controle salina, porém, este grupo não apresentou efeitos tóxicos, diferente dos grupos de maiores doses (300 e 1000 mg/kg). Embora não tenham sido observados sinais de toxicidade durante todo o período de observação (15 dias) do teste de toxicidade aguda, quando a amostra foi administrada em doses repetidas, alguns destes sinais apareceram, bem como letalidade.

De acordo com MARIZ *et al.* (2006), alguns dos parâmetros que evidenciam sinais de toxicidade são: piloereção, prostração, contorção abdominal, paralisia do trem

posterior, ptose palpebral, dispnéia, aumento da evacuação e perda de peso. Os animais dos grupos de maior dose apresentaram perda de peso, evacuação e, após a terceira dose administrada, 50% dos animais de ambos os grupos morreram, justificando o encerramento do experimento. Os animais tratados com as maiores doses, principalmente os do grupo de 1000mg/kg que morreram durante o experimento, apresentaram os intestinos colabados como sinal de toxicidade da amostra em doses elevadas.

Quando analisados os resultados dos pesos úmidos relativos dos órgãos, foi possível verificar uma redução no peso úmido do coração dos animais do grupo de 100 mg/kg. Além disso, houve uma redução do peso do baço nos animais do grupo de 1000 mg/kg (Figura 35), corroborando com os dados de toxicidade.

O estudo *in vivo* da fração ativa mostrou que as doses de 30 e 100 mg/kg reduziram o volume tumoral em 26,6 e 30,9%, respectivamente (Figura 36). A dose de 100 mg/kg apresentou redução do tumor a partir do quarto dia de experimento, e manteve esta atividade até o término do experimento, no 15º dia. Pode-se concluir que a fração ativa aumentou em dez vezes a atividade específica neste modelo experimental, assim como foi observado nos estudos em cultura de células tumorais. Neste experimento, o controle positivo doxorrubicina foi utilizado.

A doxorrubicina é, na atualidade, uma das mais potentes drogas antineoplásicas, podendo ser prescrita isoladamente ou em associação com outros fármacos. Suas aplicações são diversas, como neoplasias ginecológicas (mama, endométrio e ovário); uro-genitais (bexiga e testículo); endócrinas (tireóide e pâncreas); gastrointestinais e pulmonares (MORENO *et al.*, 2006). No entanto, seu uso está frequentemente associado à ocorrência de cardiotoxicidade (MACHADO *et al.*, 2008). A doxorrubicina é um derivado de antraciclina, cuja ação se dá na indução de danos ao DNA (BAGULEY, 2001).

Neste experimento, a doxorubicina apresentou atividade antiproliferativa a partir do sétimo dia, inibindo 60,6% do crescimento tumoral e mantendo também o controle de seu desenvolvimento até o encerramento do experimento.

Embora a resposta antiproliferativa do grupo de 30 mg/kg não tenha sido estatisticamente diferente do grupo controle salina no décimo terceiro dia de experimento, através da análise do gráfico podemos inferir que há uma tendência da amostra, na dose em questão, em inibir ou controlar o crescimento tumoral. No 15º dia de experimento as curvas das doses de 30 e 100 mg/kg tendem a se igualar, sendo ambas estatisticamente diferentes do grupo salina.

Os resultados observados na Figura 37 mostram que houve perda de peso durante as primeiras administrações das amostras nos animais. Embora os animais do grupo de 30 mg/kg tenham apresentado diferença estatística em relação ao grupo salina no último dia de experimento (15º dia), os animais aparentemente não estavam debilitados e não apresentavam sinais de toxicidade como piloereção, movimentos descoordenados ou outros distúrbios, diferente dos animais do grupo doxorubicina, que apresentaram piloereção e perda acentuada do peso, chegando até a 5 g de perda no final do experimento.

Com relação ao peso relativo dos órgãos, pode-se dizer que nenhum dos grupos tratados com a fração apresentou diferenças nos pesos dos órgãos em questão, ao passo que no grupo doxorubicina os órgãos fígado e baço sofreram alterações no peso (Figura 38).

Considerando que os experimentos com o extrato bruto e a fração ativa apresentaram atividade anticâncer de maneira dose-dependente, as doses efetivas de cada amostra foram calculadas (100 a 250 mg/kg para o EBD_{Jun} e 30 a 100 mg/kg da F_{2Jun}FGH) e a partir deste resultado foi determinada a dose do composto eupomatenóide-5 a ser administrada, sendo esta de 30 mg/kg.

De acordo com o gráfico da Figura 39, o composto isolado eupomatenóide-5 apresentou atividade antiproliferativa, reduzindo o tumor em 30,4% em relação ao grupo controle salina (Tabela 16). Sua atividade foi observada a partir do sétimo dia e mantida até o décimo sétimo dia de experimento. Assim como o composto, o quimioterápico 5-Fluoracil reduziu o volume tumoral a partir do sétimo dia e manteve sua atividade antiproliferativa até o encerramento do experimento, reduzindo o tumor em 58.6%.

O 5-Fluoracil também provocou uma redução no peso corporal dos animais, embora a doxorrubicina tenha sido mais tóxica e, portanto, mais agressiva com relação à perda de peso. O composto eupomatenóide-5 reduziu o peso corporal dos animais dois dias após a primeira administração da amostra (Figura 40), entretanto, ao longo do experimento os animais recuperaram esta perda de peso.

Além disso, os dados do peso relativo dos órgãos indicam que o quimioterápico 5-Fluoracil apresentou toxicidade, sendo os órgãos fígado, pulmões e baço os órgãos mais afetados por esta toxicidade (Figura 41). Estes dados corroboram com o estudo de caso clínico que reportou toxicidade pulmonar em pacientes em tratamento quimioterápico com essa substância (RUIZ-CASADO *et al.*, 2006).

Os dados de toxicidade de uma amostra são muito importantes e relevantes, uma vez que as neoplasias são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e muitos dos tratamentos utilizados nessas neoplasias, como os radioterápicos e quimioterápicos, têm efeitos colaterais indesejáveis (MACHADO *et al.*, 2008). Portanto, há uma incessante busca de fármacos eficientes, que tenham baixa toxicidade e, conseqüentemente, causem o mínimo de efeitos colaterais (VERÇOSA JR *et al.*, 2007). O composto eupomatenóide-5 apresentou atividade anticâncer, sem apresentar sinais de toxicidade nos animais. Os dados dos testes *in vitro* associados aos dados dos testes *in vivo* corroboram com dados descritos na literatura para a atividade antiproliferativa de lignanas e neolignanas (THOMPSON, 1998; ITOKAWA *et al.*, 2008).

A compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a proliferação celular permite a identificação de alvos que poderiam ser utilizados para a pesquisa de novas drogas (SWANTON, 2004). Frente ao exposto, e tendo conhecimento de que muitos tipos de câncer se desenvolvem a partir de sítios de inflamação, foi investigada a atividade antiedematogênica do extrato bruto diclorometânico (EBD_{Jun}) de *P. regnellii* em modelo de edema de pata induzido por carragenina.

De acordo com trabalhos anteriores (NUNES *et al.*, 2007), dois picos de inflamação induzida pela carragenina em camundongos são esperados ao longo do experimento: um na fase inicial (6 horas) e outro na fase tardia (72 horas). O grupo controle positivo piroxicam e os grupos tratados com o EBD_{Jun} nas doses de 100 e 300 mg/kg (v.o.) foram eficazes na retenção do primeiro pico, reduzindo o volume do edema em 54,7%, 30% e 30,7%, respectivamente. O grupo de 30 mg/kg não foi estatisticamente diferente do grupo salina, reduzindo o volume do edema em apenas 8,7% (Figura 42 e Tabela 17).

O segundo pico de inflamação ocorreu 72 horas após o início do experimento. Nem o piroxicam e nem o EBD_{Jun} reduziram o edema provocado pelo segundo pico, após 72 horas. Entretanto cabe lembrar que as administrações das amostras foram efetuadas 1h antes da injeção de carragenina nas patas. A fim de verificar a atividade antiedematogênica no segundo pico de inflamação, seria necessária pelo menos uma segunda administração entre 24 e 48 horas após injeção da carragenina.

Muitos tipos de câncer se desenvolvem a partir de sítios de inflamação, sendo esta muitas vezes responsável pela tumorigênese, transformação celular, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (COUSSENS e WERB, 2002; AGGARWAL *et al.*, 2006; MANTOVANI, 2007).

De fato, alguns mediadores envolvidos em processos de inflamação crônica têm sido relacionados às várias etapas envolvidas na tumorigênese (AGGARWAL *et al.*, 2006; KARIN E GRETEN, 2005). Vários relatos na literatura demonstram que a expressão

elevada da COX-2 em diferentes células tumorais pode estar relacionada com proliferação celular aumentada, prevenção de apoptose, aumento do potencial metastático, produção de fatores angiogênicos e inibição da vigilância imunológica (PEREIRA, 2009). Uma vez que a atividade antiinflamatória e antiproliferativa estão associadas principalmente em tumores que expressam COX (COUSSENS e WERB, 2002), a determinação do mecanismo de ação poderá estabelecer a possível correlação entre as duas atividades farmacológicas apresentadas pelo EBD.

Uma vez que não há registros da atividade anticâncer de *Piper regnellii*, os dados obtidos incentivam a descoberta de outros compostos que, em sinergismo com o composto eupomatenóide-5, intensificam sua atividade anticâncer; além de estudos para a determinação dos mecanismos de ação envolvidos nesta atividade. Sendo assim, os resultados sugerem que *Piper regnellii*, popularmente conhecida como caapeba, pode ser considerada fonte potencial de substâncias farmacologicamente ativas, que auxiliariam na terapêutica do combate ao câncer.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos em cultura de células tumorais humanas e em modelos *in vivo* permitem concluir que:

- ❖ A extração prévia com hexano auxilia na remoção de graxas e melhora a atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometânico de *P. regnellii*;
- ❖ Os extratos brutos hexânico e etanólico de *P. regnellii* não apresentam atividade antiproliferativa promissora;
- ❖ A melhor época para a coleta das folhas de *P. regnellii* foi durante o inverno, quando os princípios com potencial anticâncer estavam em maior quantidade;
- ❖ O extrato bruto diclorometânico da coleta de junho e suas frações ativas apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* com boa correlação entre concentração e efeito, seletividade para as linhagens hormônio-dependentes de ovário e mama, bem como para as linhagens de melanoma, rim e próstata;
- ❖ O EBD_{Jun} e a F_{2Jun}FGH reduziram significativamente o volume tumoral, inibindo seu crescimento, comprovando a atividade antiproliferativa observada em células tumorais humanas;
- ❖ Além da atividade antiproliferativa, o extrato bruto diclorometânico apresentou atividade antiedematogênica em modelo de inflamação de pata induzida por carragenina, sendo que estes efeitos podem estar relacionados às lignanas presentes nesta espécie;
- ❖ O composto eupomatenóide apresentou atividade citotóxica (*in vitro*), sendo seletivo para a linhagem de rim (786-0); e anticâncer (*in vivo*), sem apresentar sinais de toxicidade nos animais que possam produzir letalidade;

- ❖ Os resultados obtidos são inéditos e sugerem a continuidade deste trabalho, visando a determinação dos mecanismos de ação dos compostos ativos de *P. regnellii*.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Walter P. Biologia Molecular da célula. 5^o ed. New York: Garland Science, 1396p., 2008.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: How hot is the link? Biochemical Pharmacology, 72: 1605-1621, 2006.
- Atjanasuppat K, Wongkham W, Meepowpan P, Kittakoo P, Sobbon P, Barlett A, Whitfield. In vitro screening for anthelmintic and antitumor activity of ethnomedicinal plants from Thailand. Journal of Ethnopharmacology, 123: 475-482, 2009
- Baguley BC. A brief history of cancer chemotherapy. In: Baguley BC e Kerr D. Anticancer drug development. Academic press. 2001
- Balachandran P, Govindarajan R. Cancer – an ayurvedic perspective. Pharmacological Research, 51: 19-30, 2005.
- Balick MJ, Cox PA. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. New York: Scientific American Library, 228p., 1996.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug Discovery from Medicinal Plants. Life Sciences, 78: 431-441, 2005.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet, 357: 539-545, 2001.
- Baron JA e Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. Annual Reviews of Medicine, 51: 511-523, 2000.
- Benevides PJC, Sartorellii P, Kato MJ. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. Phytochemistry, 52: 339-343, 1999.
- Bertram JS. The molecular biology of cancer. Molecular aspects of Medicine, 21: 167-223, 2001.

- Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Alencar NMN, Mesquita RO, Lima MW, Pessoa ODL, Chaves JH, Silveira ER, Costa-Lotufo LV. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. *Journal of Applied Toxicology*, 28: 599-607, 2008.
- Broker LE, Krzyt FAE, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*, 11(9): 3155-3162, 2005.
- Brown JM, Attardi LD. The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Nature Reviews Cancer*, 5(3): 231-237, 2005.
- Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67(12): 2141-2153, 2004.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Filho VC, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews*, 18: 225-258, 1998.
- Carvalho CE, Santos Jr AR, Wada MLF. Dexamethasone-induced chromosome number alterations in cell culture. *Medical Science Research*, 27: 219-221, 1999.
- Céline V, Adriana P, Eric D, Joaquina AC, Yannick E, Augusto LF, Rosário R, Dionicia G, Michel S. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 413-422, 2009.
- Chabner BA, Roberts Jr TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5: 65, 2005.
- Chauret DC, Bernard CB, Arnason JT, Durst T, Krishnamurty HG, Sanchezvindas P, Moreno N, Sanroman L, Poveda L. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *Journal of Natural Products*, 59:152-155, 1996.

- Chen Z, Liu G, Chen M, Xu B, Peng Y, Chen M, Wu M. Screen anticancer drug in vitro using resonance light scattering technique. *Talanta*, 77: 1365-1369, 2009.
- Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p. 2006.
- Constantin, MB, Sartorellii P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJP, Ohara MT, Emerenciano VP, Kato MJ. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. *Planta Medica*, 67: 771-773, 2001.
- Corrêa MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, 687p., 1984.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867, 2002.
- Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*, 8: 313-331, 2009.
- David JP, Silva EF, Moura DL, Guedes MLS, Assunção RJ, David JM. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. *Química Nova*, 26(6): 730-733, 2001.
- Dayan FE, Kuhajek JM, Canel C, Watson SB, Moraes RM. *Podophyllum peltatum* possesses a B-glucosidase with high substrate specificity of the aryltetralin lignan podophyllotoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1646: 157-163, 2003.
- Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castaneda-Corral G, Angeles-Lopez G. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 334-342, 2007.
- Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oil from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 197-201, 2007.

- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. *Cancer Letters*, 233: 181, 2005.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. *The New England Journal of Medicine*, 315: 1650-1659, 1986.
- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. *Journal of Internal Medicine*, 258: 479-517, 2005.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, 14, 125–131, 1990.
- Felipe DF, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DAG. Evaluation of the antimicrobial activity of *Piper regnellii* (Miq). C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(4): 618-620, 2008.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Boyle CP. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*, 18:581-592, 2007.
- Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 12: 89-96, 2002.
- Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology*, 12: 88–93, 2001.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
- Hofmann J. Resistance to chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 99: 1368, 2008.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, RJ, 97(7): 1027-1031, 2002.
- Instituto Nacional do Cancer (INCA), 2009. <http://www.inca.gov.br>

- Itokawa H, Morris-Natschke SL, Akiyama T, Lee KH. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *Journal of Natural Medicines*, 62: 263-280, 2008.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer Statistics, 2009. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 59: 225-249, 2009.
- Kamb A, Wee S, Lengauer C. Why is cancer drug discovery so difficult? *Nature Reviews in Drug Discovery*, 6: 115-120, 2007.
- Karin M, Greten FR. NfκB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5: 749-759, 2005.
- Kim M-J, Kim Y-J, Park H-J, Chung J-H, Leem K-H and Kim H-K. Apoptotic Effect of Red Wine Polyphenols on Human Colon Cancer SNU-C4. *Cells, Food and Chemical Toxicology*, 44(6): 898-902, 2006.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews in Drug Discovery*, 4(3): 206-20, 2005.
- Koroish AM, Foss SR, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Filho BPD. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 270-277, 2008.
- Lago JHG, Chen A, Young MCM, Guimarães EF, Oliveira A, Kato MJ. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 2: 96-98, 2009.
- Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 284-291, 2005.

- Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MAS, Lima TCM. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5ª. Ed – Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2008.
- Lampe JW. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. American Journal of Clinical Nutrition, 78: 579 - 583, 2003.
- Lee KH. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. Journal of Biomedical Science, 6: 236-250, 1999.
- Luize PS, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Cortez DAG, Nakamura CV. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29(10): 2126-2130, 2006.
- Machado V, Cabral A, Monteiro P, Gonçalves L, Providência LA. O carvediol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas (doxorubicina). Revista Portuguesa de Cardiologia, 27(10): 1277-1296, 2008.
- Malhotra S, Singh AP. A review of pharmacology of phytochemicals from Indian Medicinal Plants. The internet Journal of Alternative Medicine, 5(1): 1540-2584, 2009.
- Mantovani A. Inflammation and cancer: the macrophage connection. International Symposium – New directions in cancer management – Academia Nacional de Medicina. Medicina, 67: 32-34, 2007.
- Mariz SR, Cerqueira GS, Araujo WC, Duarte JC, Melo AFM, Santos HB, Oliveira K, Diniz MFFM, Medeiros IA. Estudo toxicológico agudo do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(3): 372-278, 2006.

- Mazzocca A, Coppari R, De Franco R, Cho J, Liebermann TA, Pinzani M, Toker A. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Research*, 65: 4728-4738, 2005.
- Monks A, Scudiero D, Skehan 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: 757-766, 1991.
- Moreno AJM, Oliveira PJ, Palmeira CM. Carvedilol, an hypertensive drug, protects heart mitochondria from oxidative damage. *Mitochondrial Pharmacology and Toxicology*, 2: 23-46, 2006.
- Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro ESB, Guerra RNM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*, 78: 2650-2653, 2006.
- Nittis JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5): 338-350, 2009.
- Nunes FPB, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa e Silva MCC. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, 49: 1090-1098, 2007.
- Oppenheimer, SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta histochemica*, 108: 327-344, 2006.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OM, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46: 597-673, 1997.

- Pereira R. Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors Used for Preventing or Regressing Cancer. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 4(2): 157-163, 2009.
- Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Ferreira AG, Cortez DAG. Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 15(3): 199-204, 2005.
- Potzernheim MCL, Bizzo HR, Vieira RF. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com os óleos procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(2): 246-251, 2006.
- Prasad K. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. Molecular and Cellular Biochemistry, 168: 117-123, 1997.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharmacology and Therapeutics, 99(1): 1-13, 2003.
- Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. Current Opinion in Pharmacology, 1: 364-369, 2001.
- Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. Journal of National Cancer Institute, 82: 1113-1118, 1990.
- Ruiz-Casado A, Garcia MD, Racionero MA. Pulmonary toxicity of 5-fluoracil and oxiplatin. Clinical and Translational Oncology, 8(8): 624, 2006.
- Ruzza P, Quintieri L. Hot Topic: Enzymes as Useful Tools and Potential Targets in Cancer Chemotherapy, 9(7): 716, 2009.

- Sacoman J, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 41: 411-415, 2008.
- Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quinteiro-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli MLZ, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. Translocator protein (18kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich solid tumor cells in vivo. European Journal of Pharmacology. Article in press. 2009
- Saklani A, Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. Drug Discovery Today, 13(3/4): 161-171, 2008.
- Schimidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EMM, Bittencourt CF, Zanetti GD, Heinzman BM, Laufer S, Merfort I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. J Ethn, 122: 523-532, 2009.
- Selvendiran K, Singh JPV, Sakthisekaran, D. In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 19: 107-111, 2006.
- Setchell K. Discovery and potential clinical importance of mammalian lignans. In Cunnane S & Thompson L (eds). Flaxseed in Human Nutrition. Champaign, IL: AOCS, p. 82-98, 1995.
- Silva EMJ, Machado SR. Structure and development of the secretory trichomes in leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). Revista Brasileira de Botânica, 22: 117 - 124, 1999.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

- Singh M, Shakya S, Soni VK, Dangi A, Kumar N, Bhattacharya S-M. The n-hexane and chloroform fractions of *Piper betle* L. trigger different arms of immune responses in BALB/c mice and exhibit antifilarial activity against human lymphatic filarid *Brugia malayi*. International Immunopharmacology, 9: 716-728, 2009.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of National Cancer Institute, 82: 1107-1118, 1990.
- Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. Gynecology Oncology, 98: 141, 2005.
- Stuelten CH, Barbul A, Busch JI, Sutton E, Katz R, Sato M, Wakefield LM, Roberts AB, Niederhuber JE. Acute wounds accelerate tumorigenesis by a T Cell-dependent mechanism. Cancer Research, 68(18): 7278-7282, 2008.
- Subhashini J, Mahipal SVK, Reddanna P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia *in vitro*. Cancer Letters, 224: 31-43, 2005.
- Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. The Lancet Oncology, 5:27-36, 2004.
- Takachi R, Inoue M, Ishihara J, Kurahashi N, Iwasaka I, Sazasuki S, Iso H, Tsubono Y, Tsugane S. Fruit and vegetable intake and risk of total cancer and cardiovascular disease. American Journal of Epidemiology, 167(1): 59-70, 2008.
- Tsai IL, Lee FP, Wu CC, Duh CY, Ishikawa T, Chen JJ, Chen YC, SEKI, R. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. Planta Medica, 71: 535 - 542, 2005.
- Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR, Coelho J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias

- mamárias em cadelas. Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science, 44(2): 96-102, 2007.
- Thompson LU. Experimental studies on lignans and cancer. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 12(4): 691-705, 1998.
 - Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. Journal of National Cancer Institute, 94(4): 252-266, 2002.
 - Thun MJ, Henley SJ, Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. In: Chadwick DJ & Goode JA. Cancer and inflammation, Ontario, Novartis Foundation, 280p., 2004.
 - Verçosa Jr D, Melo MM, Cassali GD, Dantas-Barros AM, Silva Jr PGP. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59(1): 150-154, 2007.
 - Weinberg RA. A biologia do câncer. Porto Alegre. Artmed, 864p., 2008.
 - Wilson S, Greer B, Hooper J, Zijlstra A, Walker B, Quigley J, et al. The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. Biochemical Journal, 388: 967-972, 2005.
 - Wink M, Alfermann AW, Franke R, Wetterauer B, Distl M, Windhovel J, Krohn O, Fuss E, Garden H, Mohagheghzadeh A, Wildi E, Ripplinger P. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. Plant Genetic Resources 3(2): 90-100, 2005.
 - Who. Bulletin Of The World Health Organization (WHO). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, 1-43, 1998.
 - World Health Organization (WHO), 2010. www.who.int

ANEXO

Autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal

DECLARAÇÃO

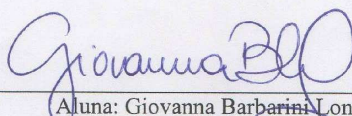
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada **Atividade anticâncer de extratos e frações ativas obtidos de *Piper regnellii* C. DC. var *regnellii***:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolos nºs 1963-1, 1964-1, 1965-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



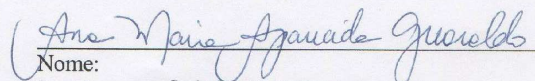
Aluna: Giovanna Barbarini Longato



Orientador: João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP