



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

VINICIUS ANDRADE ARCE PAIS

**“AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* E
IN VIVO DE PLANTAS MEDICINAIS PROVENIENTES DA
SERRA DA MANTIQUEIRA PAULISTA”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Vinicius Andrade</u> <u>Arce Pais</u> e aprovada pela Comissão Julgadora <u>[Assinatura]</u>
--

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, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P166a

Pais, Vinicius Andrade Arce
Avaliação de atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* de plantas medicinais provenientes da Serra da Mantiqueira Paulista / Vinicius Andrade Arce Pais. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: João Ernesto de Carvalho, Mary Ann Foglio.

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

1. Plantas medicinais. 2. Agentes antineoplásicos. 3. *In vivo*. 4. *In vitro*. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of anticancer activity *in vivo* and *in vitro* of medicinal plants from "Serra da Mantiqueira Paulista".

Palavras-chave em inglês: Medicinal plants; Antineoplastic agents; *In vivo*; *In vitro*.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho, Maria José Queiroz de Freitas Alves, Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Data da defesa: 25/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 25 de Fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)

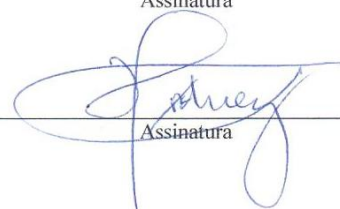


Assinatura

Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves

Assinatura

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues



Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder



Assinatura

Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes

Assinatura

“Onde não falta vontade, existe sempre um caminho”
J.R.R.Tolkien

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao programa de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado. Gostaria de agradecer também à Capes/Proex e CNPQ pelo suporte financeiro.

Agradeço aos integrantes da divisão de Farmacologia e toxicologia do CPQBA, local onde realizei o meu mestrado, pelo apoio e auxílio nos experimentos. Agradeço em especial a Aninha, pela paciência, puxões de orelha e tempo dispensado com as seguidas dúvidas.

Agradeço aos integrantes da Divisão de Fitoquímica por me auxiliarem nos experimentos e por ensinarem as metodologias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pela oportunidade e atenção. Agradeço também a Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pela atenção.

Agradeço a Profa. Dra. Rosely B. Torres pelo auxílio na coleta das plantas.

Agradeço ao meu amigo Rodrigo pelas palavras de apoio, amizade e pelo futebol de quinta feira à noite.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, suporte nos tempos difíceis e principalmente por estarem presentes durante as dúvidas e incertezas da vida, me ajudando a encontrar soluções e novos caminhos.

Agradeço a minha namorada e meu amor, por estar sempre presente nos momentos bons e ruins, mesmo distante espacialmente.

Agradeço a Deus, por conseguir ultrapassar mais essa etapa da minha vida, ciente de que novos desafios irão surgir, porém sei que terei o apoio necessário para seguir em frente.

RESUMO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças diferentes que afligem a população mundial e caracteriza-se pela perda de função celular e ausência de diferenciação, além da proliferação descontrolada. Somente no Brasil, estima-se que foram registrados 489.270 novos casos de câncer em 2010. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, representando uma das mais ricas fontes de materiais farmacologicamente ativos. Os extratos de plantas medicinais e seus compostos derivados são conhecidos por serem efetivos agentes contra vários tipos de cânceres. Estima-se que 60% das drogas antitumorais sejam de origem vegetal. A partir da coleta aleatória realizada no projeto BIOPROSPECTA-FAPESP (04/15410-0), foram selecionadas 10 espécies que apresentaram efeitos antiproliferativos. Dessas espécies, 5 foram novamente coletadas, sendo elas: *Miconia latecrenata* (DC.)Naudin, *Mollinedia schottiana* (Spreng.)Perkins, *Boehmeria caudata* Sw., *Boehmeria cylindrica* Sw. e *Acnistus arborescens*. Foram preparados extratos diclorometânicos (EBD) e etanólicos (EBE) das folhas destas espécies os quais foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa *in vitro*, em linhagens de células tumorais humanas. Todos os extratos apresentaram pelo menos efeito citostático no teste *in vitro* à exceção daqueles obtidos de *Mollinedia schottiana*. A partir desses resultados e da disponibilidade de material vegetal, foram selecionados para dar continuidade ao estudo *Boehmeria caudata* e a *B. cylindrica*. Assim, por existir dados referentes a alcalóides com efeitos citostáticos descritos na literatura, realizou-se extração ácido-base dos dois espécimes, onde se isolou alcalóides de polaridades diferentes. Os alcalóides isolados, e suas frações neutras, das duas plantas, EBAEN e EBCA, para *Boehmeria cylindrica* e FALCBC e FAENBC para *Boehmeria caudata*, foram encaminhados a testes *in vitro*, onde apenas os alcalóides da espécie *B. caudata*, retornou resultados positivos. O EBD de *Boehmeria cylindrica* e os extratos EBE e EBD de *Boehmeria caudata*, juntamente com a fração FALCBC foram submetidos a testes *in vivo*, utilizando o modelo do Tumor Sólido de Ehrlich. O EBD de *Boehmeria cylindrica* e de *Boehmeria caudata* apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$) diminuindo a progressão tumoral. Os EBDs de *B. cylindrica* e de *B. caudata* apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na progressão tumoral. Por outro lado, o EBE de *B. caudata* e a fração FALCBC não apresentaram atividade no teste *in vivo*, sugerindo que em função da

maior polaridade dos compostos presentes nessas amostras, essas substâncias que apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* foram metabolizadas e excretadas antes de atingirem seus sítios de ação no modelo *in vivo*. Concluindo, as espécies estudadas apresentaram significativa atividade antitumoral, corroborando com os relatos existentes de estudos de atividade antitumoral para outras espécies do gênero *Boehmeria*, e indicando o potencial do gênero para o desenvolvimento de uma droga anticâncer.

ABSTRACT

Cancer is a group of 100 different diseases that afflict the world's population and is characterized by loss of cell function, due to absence of differentiation, in addition to uncontrolled proliferation. In Brazil alone, an estimated 489,270 new cancer cases were reported in 2010. Brazil is the country with the greatest plant genetic diversity of the world, representing one of the richest sources of pharmacologically active materials.

Extracts of medicinal plants and their derived compounds are known to be effective agents against several types of cancers. It is estimated that 60% of anticancer drugs are of plant origin. Based on the random collection performed in the project BIOprospecTA-FAPESP (04/15410-0), 10 species that had significant anti-proliferative effects, were selected. From these, five were collected again, as follows: *Miconia latecrenata* (DC.)Naudin, *Mollinedia schottiana* (Spreng.)Perkins, *Boehmeria caudata* Sw., *Boehmeria cylindrica* Sw. and *Acnistus arborescens*.

These species were submitted for extraction process, resulting in dichloromethane and ethanolic extracts, subsequently which was evaluated with *in vitro* tests of human tumor cell lines. All of them showed cytocidal or cytostatic effects with *in vitro* assays, except for *Mollinedia schottiana* that produced no positive results. The available specimens with positive results were selected to continue the study; they are *Boehmeria caudata* and *Boehmeria cylindrica*.

Thus, since data of alkaloids with cytostatic effects have been described in the literature, an acid-base extraction was made of the two specimens, where alkaloids of different polarities were isolated. Isolated alkaloids, and the respective neutral fractions of the two plants, EBAEN and EBCA for *Boehmeria cylindrica*, FALCBC and FAENBC for *Boehmeria caudata*, were used in *in vitro* assays, where only the alkaloids from *B. caudata*, gave positive results. The DBE of *Boehmeria cylindrica* and the extracts, EBE and DBE of *Boehmeria caudata*, along with the FALCBC fraction were tested *in vivo* using the solid Ehrlich's tumor model. The DBE of *Boehmeria cylindrica* and of *Boehmeria caudata* showed significant results ($p < 0.05$), decreasing tumor progression. The brute ethanol extract of *Boehmeria caudata*, along with its fraction, FALCBC, showed no anti-proliferative activity.

The genus *Boehmeria* was subject to several studies for different species, indicating a potential of the genus for the discovery of a new anticancer drug. The species studied showed significant antitumor activity. The negative results of the alkaloidal fraction and the EBE of *Boehmeria caudata* in *in vivo* tests, do not invalidate its potential because these samples were possibly metabolized and excreted before reaching their action sites, probably due to the polarity of these substances.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xix
ABREVIATURA E SIGLAS.....	xxi
INTRODUÇÃO	24
I. O CÂNCER.....	25
II. HISTÓRIA DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	27
III. A BUSCA POR NOVOS QUIMIOTERÁPICOS: PLANTAS COMO FONTES DE RECURSOS TERAPÊUTICOS.....	28
IV. USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL E PELO MUNDO.....	30
V. CARACTERIZAÇÃO DA SERRA DA MANTIQUEIRA E SUA RIQUEZA.....	31
VI. PROJETO BIOTA-FAPESP.....	32
OBJETIVOS	33
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
I. DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS.....	36
II. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	37
III. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	38
EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO	
CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)	
PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE DRAGENDORF	
EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE	
IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES DA <i>BOEHMERIA CAUDATA</i> –	
ESPECTROMETRIA DE MASSA	
IV. TESTES <i>IN VITRO</i>	43
LINHAGENS CELULARES	
TESTE DE ATIVIDADE ANTICÂNCER EM CULTURA DE CÉLULAS	
TUMORAIS HUMANAS	
ANÁLISE DOS RESULTADOS	
V. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	48
ANIMAIS	
TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER EM MODELO MURINO	

RESULTADOS.....	51
I. EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL DA PRIMEIRA COLETA EM MAIO/2009.....	52
II. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	54
III. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES DA <i>BOEHMERIA CYLINDRICA</i>	62
IV. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM AS FRAÇÕES EBCA E EBAEN.....	64
V. ENSAIO <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO DE <i>BOEHMERIA CYLINDRICA</i>	65
VI. AVALIAÇÃO DOPS EXTRATOS OBTIDOS NA SEGUNDA COLETA, EM ABRIL/2010.....	67
VII. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES DO EBE DE <i>BOEHMERIA CAUDATA</i>	68
VIII. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	70
IX. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES.....	78
X. RESULTADOS <i>IN VIVO</i> DO EBD DE <i>BOEHMERIA CAUDATA</i> (BCAUD).....	81
XI. RESULTADOS <i>IN VIVO</i> DO EBE DE <i>BOEHMERIA CAUDATA</i> (BCAUET).....	82
XII. RESULTADOS <i>IN VIVO</i> DOS ALCALÓIDES EXTRAÍDOS DO EBE DE <i>BOEHMERIA CAUDATA</i> (FALCBC).....	83
DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXOS.....	106
I. ACEITE DA CEEA/UNICAMP Nº1812-1.....	107
II. ACEITE DA CEEA/UNICAMP Nº1813-1.....	108
III. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO PARA O EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY.....	109
IV. MANUSCRITO DO ARTIGO SUBMETIDO AO EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY.....	110
V. DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Foto da espécie Boehmeria cylindrica (L.) Sw. _____	37
Figura 2 - Prancha de identificação e foto da espécie Boehmeria caudata Sw. _____	37
Figura 3 - Esquema do protocolo de extração dos extratos brutos Diclorometânicos e Etanólicos a partir do material vegetal seco e triturado. _____	39
Figura 4 – Esquema do protocolo de Extração Ácido-base realizada com a espécie Boehmeria cylindrica e Boehmeria caudata _____	42
Figura 5 – Placa T0, onde as linhagens celulares são inoculadas para crescerem sem interferência de substâncias nocivas. _____	46
Figura 6 - Placa experimental, onde são testadas quatro drogas diferentes em quatro concentrações _____	46
Figura 7 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, dos extratos Diclorometânicos de Miconia latecrenata , Miconia sp. , Mollinedia schottiana , Acnistus arborescens , Boehmeria cylindrica . Fase móvel: Diclorometano/Metanol 1%. Revelador: Anisaldeído. _____	53
Figura 8 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, dos extratos Etanólicos de Miconia latecrenata , Miconia sp. , Mollinedia schottiana , Acnistus arborescens , Boehmeria cylindrica . Fase móvel: BAW (Butanol: Ácido acético: água). Revelador: Anisaldeído. _____	53
Figura 9 – Atividade citotóxica do quimioterápico Doxorubicina, utilizado como controle, relacionando sua concentração com porcentagem de crescimento celular _____	55
Figura 10 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de Boehmeria cylindrica , relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	56
Figura 11 - Atividade do extrato bruto Etanólico de Boehmeria cylindrica , relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	56
Figura 12 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de Miconia latecrenata , relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	57
Figura 13 - Atividade do extrato bruto Etanólico de Miconia latecrenata , relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	58
Figura 14 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de Mollinedia schottiana , relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	58
Figura 15 - Atividade do extrato bruto Etanólico de Mollinedia schottiana , relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	59
Figura 16 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de Acnistus arborescens (Manianeira), relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato _____	60
Figura 17 - Atividade do extrato bruto Etanólico de Acnistus arborescens (Manianeira), relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato. _____	60

Figura 18 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, dos extratos Diclorometânicos de <i>Miconia latecrenata</i> , <i>Miconia SP.</i> , <i>Mollinedia schottiana</i> , <i>Acnistus arborescens</i> , <i>Boehmeria cylindrica</i> . Em destaque a indicação da presença de alcalóides no extrato de <i>Boehmeria cylindrica</i> . Fase móvel: Diclometano/Metanol 1%. Revelador: Dragendorff.	62
Figura 19 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, utilizando BAW (Butanol, Ácido Acético e Água) como fase móvel e revelada com Dragendorff. Em destaque, dois alcalóides em polaridades distintas.	63
Figura 20 - Atividade da fração EBAEN do EBD de <i>Boehmeria cylindrica</i> , relacionando porcentagem de crescimento com a concentração.	64
Figura 21 - Atividade da fração EBCA do EBD de <i>Boehmeria cylindrica</i> , relacionando porcentagem de crescimento com a concentração.	65
Figura 22 – - Atividade anticâncer do extrato diclorometânico das folhas de <i>Boehmeria cylindrica</i> em tumor de pata de camundongo induzido pela injeção de células de Ehrlich. Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (BCYL 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg) e controles, onde a dose de 200 mg/Kg apresentou efeitos significativos ($=p<0,01$) e impediu o aumento do volume tumoral.	67
Figura 23 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, utilizando Dicloro/Metanol 5% como fase móvel e revelada com Dragendorff. Em destaque, alcalóides no extrato etanólico de <i>Boehmeria caudata</i> , corados em laranja.	68
Figura 24 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, utilizando Dicloro/Metanol 10% como fase móvel e revelada com Dragendorff, demonstrando a presença de alcalóides na fração FALCBC.	69
Figura 25 - Atividade do Extrato Bruto Diclorometânico de <i>Boehmeria caudata Sw.</i> , relacionando porcentagem de crescimento com a concentração	70
Figura 26 - Atividade do Extrato Bruto Etanólico de <i>Boehmeria caudata Sw.</i> , relacionando porcentagem de crescimento com a concentração	71
Figura 27 - Atividade do Extrato Bruto Diclorometânico de <i>Boehmeria cylindrica (L.) Sw.</i> , extraído do material vegetal obtido na segunda coleta, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração	72
Figura 28 - Atividade do Extrato Bruto Etanólico de <i>Boehmeria cylindrica (L.) Sw.</i> , extraído do material vegetal obtido na segunda coleta, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração	73
Figura 29 – Atividade citotóxica do Paclitaxel, utilizado como controle Positivo e de origem vegetal.	74

- Figura 30 - Atividade da Fração FAENBC, obtida a partir de extração Ácido-Base, do EBE de **Boehmeria caudata** Sw., relacionando porcentagem de crescimento com a concentração* _____ 75
- Figura 31 - Atividade da Fração FALCBC, obtida a partir de extração Ácido-Base, do EBE de **Boehmeria caudata** Sw., relacionando porcentagem de crescimento com a concentração* _____ 76
- Figura 32 – A) Full scan por espectrometria de massas da fração alcaloídica de **Boehmeria caudata** Sw. B) Maior aumento, demonstrando as fórmulas moleculares dos principais compostos identificados.* _____ 80
- Figura 33 - Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (BCAUD 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg) e controles, onde a dose de 50mg/Kg teve significativa retenção do crescimento tumoral após o 13º dia (* = $p < 0,05$), a dose de 100 mg/Kg, impediu a evolução do tumor significativamente após o 10º dia($p < 0,05$) e a dose de 200 mg/Kg apresentou efeitos significativos desde o 7º dia (*= $p < 0,01$) e impediu o aumento do volume tumoral.* _____ 82
- Figura 34 - Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (BCAUET 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg) e controles, onde nenhum dos grupos tratados, com exceção do controle positivo foram capazes de impedir o aumento do volume tumoral após o 10º dia.* _____ 83
- Figura 35 - Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (Alc 5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg) e controles, onde nenhum dos grupos tratados, com exceção do controle positivo foram capazes de impedir o aumento do volume tumoral após o 10º dia.* _____ 84

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Linhagens celulares, com as respectivas densidades de inoculação, oriundas de tumores humanos, cedidas ao CPQBA pelo National Cancer Institute (NCI – USA).</i>	44
<i>Tabela 2 - Extrações de diferentes plantas em Diclorometano e Etanol, com massa extraída e respectivos rendimentos.</i>	52
<i>Tabela 3 - GI 50 (Inibição de 50% do crescimento) dos extratos brutos de Boehmeria cylindrica e Doxorubicina, em µg/ml, realizado em 11 linhagens tumorais humanas</i>	61
<i>Tabela 4 - TGI, ou Inibição do crescimento total, dos Extratos Brutos de Boehmeria cylindrica e Doxorubicina, em µg/ml, de tratamentos realizados em 11 linhagens tumorais humanas.</i>	61
<i>Tabela 5 - Massa e rendimento das frações EBCA (Fração contendo compostos de caráter básico) e EBAEN (Fração contendo compósitos de caráter ácido) do extrato diclorometânico de Boehmeria caudata.</i>	63
<i>Tabela 6 - GI 50 (Inibição de 50% do crescimento) das frações EBCA e EBAEN, originadas do EBD de Boehmeria cylindrica, em µg/ml, realizado em 10 linhagens tumorais humanas</i>	65
<i>Tabela 7 – Massa Extraída e Rendimentos dos extratos obtidos na segunda coleta.</i>	68
<i>Tabela 8 – Massa Extraída e rendimento da Extração Ácido-Base</i>	69
<i>Tabela 9 - TGI, ou inibição do crescimento total, dos extratos brutos obtidos do material vegetal provenientes da 2ª coleta e frações FALCBC e FAENBC, em µg/ml, de tratamentos realizados em 10 linhagens tumorais humanas</i>	77
<i>Tabela 10 - GI 50 (Inibição de 50% do crescimento) dos extratos de Boehmeria cylindrica (L.) Sw., em µg/ml, realizado em 10 linhagens tumorais humanas</i>	77
<i>Tabela 11 - Dados de HRESI(+)-MS sumarizados de 8 substâncias identificadas na fração que demonstrou atividade antiproliferativa in vitro em células tumorais humanas</i>	78

ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA – Instituto Nacional do Câncer
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
OMS – Organização Mundial da Saúde
NCI – National Cancer Institute
CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
APA – Área de Proteção Ambiental
EBD – Extrato Bruto Diclorometânico
EBE – Extrato Bruto Etanólico
CCD – Cromatografia de Camada Delgada
EBCA – Fração Alcaloídica do EBD de *Boehmeria cylindrica*
EBAEN - Fração Neutra do EBD de *Boehmeria cylindrica*
FALCBC - Fração Alcaloídica do EBD de *Boehmeria caudata*
FAENBC - Fração Neutra do EBD de *Boehmeria caudata*
ESI-MS – Espectrometria de Massas – Eletrospray
RPMI – Meio de cultura
TGI – Inibição do crescimento tumoral total, *in vitro*
GI50 – Inibição de 50 % do crescimento tumoral, *in vitro*
5-FU – 5-Fluoracil, quimioterápico utilizado clinicamente
BCYLD – Extrato Diclorometânico de *Boehmeria cylindrica*
BCYLET - Extrato Etanólico de *Boehmeria cylindrica*
BCAUD - Extrato Diclorometânico de *Boehmeria caudata*
BCAUET - Extrato Etanólico de *Boehmeria caudata*

INTRODUÇÃO

I. O CÂNCER

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças diferentes que afligem a população mundial e caracteriza-se pela perda da função celular em consequência da ausência de diferenciação, proliferação descontrolada (maligna), invasividade dos tecidos adjacentes, podendo espalhar-se (metástase) para outras partes do corpo (INCA,2005). O surgimento da célula cancerígena pode acontecer por inativação dos genes supressores de tumor, ou por ativação de oncogenes, além da inativação de genes responsáveis pela apoptose, desregulando o ciclo celular e consequentemente levando a proliferação descontrolada da célula (insensibilidade a fatores anti-crescimento e auto-suficiência em fatores de crescimento). Ainda, podem ocorrer mutações produzidas por agentes externos, sejam eles químicos, físicos ou biológicos (Alberts Et al., 2008; Brown & Attardi, 2005; Simpson et al., 1998; Fadeel & Orrenius, 2005;Luo, J., et al., 2009).

As características acima são biomarcadores, características-chave (*Hallmarks*) que permitem a identificação de células cancerosas. Além das mutações atípicas no DNA (que podem levar a aneuploidias) somam-se a isso a invasividade dos tecidos, a metástase, a evasão da apoptose, não apenas pela inativação dos genes (células imortais), mas por estímulo à angiogênese, inibição do sistema imune e dos estresses metabólicos (proteotóxico, mitótico, oxidativo) e estresse dos danos ao DNA.(Luo, J., et al., 2009)

As células atingem os fenótipos de células cancerosas por reativar ou modificar programas intracelulares. Essas alterações podem ser incorporadas, levando ao surgimento do câncer ou a morte celular. A prevalência da célula mutada, ou sua morte, segue os preceitos da seleção natural, base da teoria Darwiniana, onde mutações randômicas nos genótipos de algumas células podem se estabelecer dando origem a um fenótipo, nesse caso o câncer, ou levar à morte celular, devido ao estabelecimento de uma mutação incompatível a vida. (Luo, J., et al., 2009; Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000).

Apesar de a Seleção Natural Darwiniana ser aceita como a força motriz que leva a formação de tumores, pela seleção de mutações específicas, muitos pesquisadores acreditam que o câncer é, na sua essência, uma doença genética e a malignidade é o

resultado de um acúmulo de ciclos de mutações múltiplas. No entanto, o câncer comprovadamente resulta da acumulação de mutações específicas, sendo que cada célula pode conter mais de 11.000 variações genéticas, dentre elas, substituições de aminoácidos, duplicações de genes, dentre outras (Ma, X., Wang, Z., 2009)

As mutações que geram o câncer ocorrem, em sua maioria, nos oncogenes, levando à expressão genética inapropriada, iniciando ou inibindo processos celulares e consequente formação de tumores. A geração de um oncone representa um ganho de função, onde um proto-oncogene está ativado inapropriadamente. Em contraste, mutações em genes supressores de tumor representam uma perda de função e do controle da progressão do ciclo celular. A liberação do ciclo celular sem seus limitadores também é tumorigênico. (Ma, X., Wang, Z., 2009)

Os mecanismos do surgimento e as características que levam ao estabelecimento dessa doença podem ocorrer de maneira diferenciada em cada indivíduo, por isso alguns cânceres são resistentes a tratamentos típicos para aquela categoria. Entendendo molecularmente a constituição do câncer e seus biomarcadores, é possível criar um tratamento eficaz e direcionado a um tipo específico, aumentando as chances de cura. Nessa mesma linha de raciocínio, a busca por quimioterápicos com toxicidade seletiva para as células malignas tem aumentado significativamente e consequentemente a busca por um arsenal de drogas com mecanismos de ação diferenciados (Jachak, M, Saklani, A., 2007; Ullah, M.F., Aatif, M., 2009).

Outros fatores contribuem para o aumento da incidência de câncer, além dos processos naturais, como a expansão da expectativa de vida da população e os hábitos da sociedade contemporânea. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010, estimaram-se 7,6 milhões de óbitos no mundo devido ao câncer, e 12,7 milhões de novos casos (INCA 2010).

A OMS divulgou dados obtidos com a incidência de Câncer do ano de 2008, através do GLOBOCAN (www.iarc.fr). A base de dados mencionada contém informações de 20 regiões do globo, baseadas nos dados divulgados por todos os países, dividindo-os em regiões mais ou menos desenvolvidas. A maioria dos casos de câncer ocorre em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, já que suas populações vivem mais e possuem

estilos de vida danosos, como o consumo excessivo de tabaco e álcool, hábitos nutricionais incorretos, dentre outros. Porém, se essas mesmas populações realizarem mudanças em seus estilos de vida, o fardo da alta incidência do Câncer poderá ser transferido para outras regiões do globo (Ferlay, J. et al, 2010).

No Brasil, estima-se que foram registrados 489.270 novos casos de câncer em 2010, sendo os maiores contribuintes para esse aumento os cânceres de pele não melanoma, próstata e mama. Existe uma distribuição diferencial dos casos de câncer pelo país sendo as regiões sudeste e sul apresentando as maiores taxas (INCA 2010).

Esses dados alarmantes contribuem para a busca de novas alternativas de tratamento, sejam outros métodos ou quimioterápicos. Nesse contexto se encaixa a pesquisa com plantas medicinais como fontes de substâncias ativas contra o câncer

II. HISTÓRIA DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais acompanha a história da civilização, pois os produtos naturais, por muito tempo, consistiram nas únicas fontes de medicamentos existentes. Os índios, conhecedores da flora nativa do Brasil, utilizavam muitas plantas para seus rituais sagrados e também como medicamentos. Os imigrantes trouxeram consigo além de sua cultura, algumas plantas medicinais e, na interação com os nativos, aprenderam e fundiram as tradições. Assim a riqueza do conhecimento sobre a utilização de plantas medicinais acumulou-se e possui grande heterogeneidade (Lorenzi, H., 2008).

As antigas civilizações descreveram os tumores a sua maneira, indicando diversos tipos de tratamento para os “inchaços” ou cânceres que afligiam suas populações. Apesar de existirem algumas intervenções cirúrgicas rudimentares, muitas espécies vegetais eram utilizadas para o tratamento, dentre elas, plantas do gênero *Catharanthus*, que deram origem a vincristina e vinblastina, atualmente (David, A.R., Zimmerman, M.R., 2010).

Muitos dos registros que contém os tratamentos e descrição das doenças são amplamente conhecidos, como os papiros de Edwin-Smith e Ebers, feitos pelos curandeiros egípcios. Hipócrates, pai da medicina, deixou seu relato sobre o câncer, indicando que o

mesmo era causado por um excesso de “Bile Preta”, além de descrever vários tipos de tumores. Outra grande contribuição é do tratado conhecido como “O Concílio de medicina” ou “A Lei da Medicina”, escrito pelo Persa Avicenna, onde registrou o crescimento em tamanho dos tumores e a invasividade dos mesmos, com várias seções dedicadas a plantas como fontes de tratamento. Este tratado foi utilizado como fonte de informação e tratamento por muitos dos séculos que se seguiram. (David, A.R., Zimmerman, M.R., 2010; Morrison, W.B., 2010)

Dessa forma, fica clara a relação entre o homem e a natureza, em especial, com as plantas medicinais. Apesar disso seu uso como fonte de remédios caiu em descrédito devido ao difícil controle de qualidade e efeitos toxicológicos desconhecidos (Ferro, D., 2006). Mas com a limitação dos métodos de síntese orgânica, já que se gastavam muitos recursos para conseguir pequenas quantidades de novas substâncias, o desenvolvimento dos métodos modernos de triagem (inclui-se nesses métodos, os testes feitos em culturas de células, permitindo o teste simultâneo de muitas substâncias) e de elucidação estrutural (Schenkel et al., 2007), as plantas medicinais como fontes de princípios ativos, voltaram a ser foco em pesquisas.

Espécies vegetais possuem substâncias com estruturas químicas e mecanismos de ação diferenciados que dificilmente seriam produzidos em laboratório, representando uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (Jachak, M.S., Saklani, A., 2007). Essas substâncias também podem servir como precursores em reações de semi-síntese, tendo como exemplo, os processos que deram origem ao paclitaxel, facilitando a obtenção de princípios ativos disponíveis em pequena quantidade na natureza, disponibilizando-os para a terapêutica. (Ferro, D., 2006; Schenkel et al., 2007).

III. A BUSCA POR NOVOS QUIMIOTERÁPICOS: PLANTAS COMO FONTES DE RECURSOS TERAPÊUTICOS

Baseando-se na tendência de uso crescente de plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos, verificada há muitos anos e também utilizando os preceitos da

medicina tradicional, em 1960, o National Cancer Institute (NCI), promoveu um programa de *screening* em larga escala, na busca de quimioterápicos. Entre 1960 e 1982, foram testadas 35.000 plantas, dando origem a várias drogas, entre elas os taxanos e camptotecinas (Mann, J., 2002; Cragg & Newman, 2009).

Estima-se que 62,8% das drogas antitumorais que estão no mercado, ou em testes clínicos, são de origem vegetal, derivadas ou inspiradas, demonstrando a contínua e valiosa contribuição da natureza no combate a doenças, em especial o câncer. A maioria desses compostos não podem ser sintetizados, devido ao alto custo, sendo obtidos de plantas cultivadas (Cragg & Newman, 2005; Cragg, G.M. *et al*, 2009).

Os extratos de plantas medicinais e seus compostos derivados são conhecidos por serem efetivos e versáteis agentes contra vários tipos de cânceres (Prasana et al., 2009). Dentre os quimioterápicos provenientes de plantas, podemos citar a Vincristina e a Vinblastina, ambos os alcalóides da *Catharanthus roseus* G. Don. (Vinca); Taxanos e seus derivados, provenientes da *Taxus brevifolia* Nutt. (Teixo do Pacífico); Camptotecinas e derivados, oriundos da *Camptotheca acuminata* Decne, dentre outros (Cragg & Newman, 2005; Chabner & Roberts Jr, 2005; Cragg & Newman, 2009).

A variedade de compostos provenientes do reino vegetal auxilia no tratamento do câncer, pois a todo o momento surgem linhagens celulares resistentes aos tratamentos tradicionais, por exposição prévia a determinada substância ou por uma resistência intrínseca determinada por mutações genéticas. Essas células podem apresentar resistência cruzada a um amplo espectro de quimioterápicos, mesmo que não tenha sido exposta a ele (Cragg & Newman, 2005).

Os agentes hoje conhecidos com ação sobre o câncer podem ser classificados em dois grupos: o primeiro é constituído por drogas que inibem o início 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, membros do segundo grupo, 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). No entanto muitos agentes supressores provocam dano ao DNA levando a mutações que podem ocasionar o aparecimento de tumores secundários.

O mecanismo anticâncer mais procurado hoje é o de indução seletiva de apoptose, levando apenas células malignas à morte (Subhashini *et al*, 2005), assim como os alcalóides da *Vinca*, que tem como alvo a mitose, já que as células cancerosas estão constantemente em divisão celular (Johansson, M., Persson, J.L., 2008).

É importante ressaltar que além do tratamento eficaz com a doença estabelecida, é necessário um diagnóstico precoce, aumentando significativamente a chance de sobrevivência, principalmente em cânceres de alto risco, como o câncer de próstata e mama, e para isso estudos devem ser realizados visando à identificação de biomarcadores dessas doenças. Alguns desses biomarcadores podem ser: a presença de proteases, antígenos e anticorpos contra os tumores (Ullah, M.F., Aatif, M., 2009).

IV. USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL E PELO MUNDO

É importante ressaltar que 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal, reafirmando o posto de grandes fontes de substâncias farmacologicamente ativas que as espécies vegetais ocupam (Rates, S.M.K., 2001; Carvalho, J.E., 2006). Somando-se a isso, os preços dos medicamentos alopáticos são elevados e aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento confiam na medicina tradicional, para obtenção dos cuidados primários à saúde (Brandão *et al*., 2008).

No Brasil, essa relação entre as plantas e a sociedade fica evidente, já que o comércio de medicamentos alopáticos atende a apenas 30% da população. O restante busca meios alternativos para o tratamento de suas doenças. Neste contexto se inserem as plantas medicinais cuja utilização pode ser por herança cultural ou por falta de recursos para a aquisição de medicamentos alopáticos (Lapa *et al*., 2007).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de uma estimativa de 350.000 a 550.000 (Guerra, M.P. & Nodari, R.O., 2007), correspondendo, então, a 22% do total mundial sendo uma das mais ricas fontes de materiais farmacologicamente ativos, advindos principalmente do metabolismo secundário das plantas. Princípios ativos são substâncias que efetivamente promovem o efeito terapêutico do preparado da planta, dita então medicinal (Silva et al., 1995).

V. CARACTERIZAÇÃO DA SERRA DA MANTIQUEIRA E SUA RIQUEZA

O Brasil possui diversos domínios fitogeográficos, com climas e vegetação típicos. Dessa maneira, em cada ponto do país existem espécies vegetais distintas, com características únicas. Alguns dos domínios existentes são: a Floresta Amazônica, Cerrado, Campos/Pampas, Mata de Araucárias, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e as faixas de transição.

A serra da Mantiqueira Paulista constitui-se em um ambiente heterogêneo com faixas de mata atlântica e cerrado. Alguns estudos (Myers, *et al.* 2000) indicam que é uma área com uma concentração de espécies endêmicas *-Hotspot-* sendo um ecossistema rico e que precisa ser preservado. O conhecimento sobre a fauna e flora é imprescindível para a preservação e proteção do patrimônio genético brasileiro. Muitas das plantas existentes nessas regiões podem conter princípios ativos únicos, com mecanismos de ação diferenciados que, se conhecidos, contribuirão para o tratamento de doenças, e muitas vezes, no desenvolvimento da região.

VI. PROJETO BIOTA – FAPESP

Durante os anos de 2004 a 2008, a divisão de Farmacologia do CPQBA, sob responsabilidade do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, constituiu uma equipe multidisciplinar de pesquisadores de várias instituições e participou do projeto BIOPROSPECTA - FAPESP (04/15410-0), com os objetivos de: Através de estudos etnobotânicos, coletar e identificar as plantas medicinais utilizadas pela população da APA da Serra da Mantiqueira Paulista, para controle do colesterol, hipertensão arterial e diurese; Coletar randomicamente e identificar espécies vegetais para avaliação de atividade anticâncer; Obtenção dos extratos e realização dos ensaios farmacológicos; Avaliar o perfil fitoquímico das espécies promissoras, através de fracionamento, isolamento e identificação dos principais compostos secundários.

A partir da coleta randômica, foram obtidas 50 espécies na APA da Serra da Mantiqueira Paulista e encaminhadas aos testes pré-clínicos. Das 50 plantas, 10 apresentaram resultados significativos, sendo elas: *Leandra carassana* (DC.)Cogn. (Melastomataceae), *Miconia latecrenata* (DC.)Naudin (Melastomataceae), *Miconia pusilliflora* (DC.)Naudin (Melastomataceae), *Lippia* sp. (Verbenaceae), *Gaultheria eryophylla* (Pers.) Sleumer ex Burt (Ericaceae), *Mollinedia schottiana* (Spreng.)Perkins (Monimiaceae), *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceae), *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw. (Urticaceae), *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. (Solanaceae), *Asclepias curassavica* L. (Asclepiadaceae).

As plantas descritas acima apresentaram inibição do crescimento das células utilizadas nos testes *in vitro*, tornando-se necessária a continuidade desse estudo. Dentre elas, foram selecionadas as espécies que não possuíam estudos sobre efeito anticâncer, publicados e disponibilidade de material vegetal.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo:

- Coleta e identificação das espécies vegetais selecionadas;
- Verificar a disponibilidade de material vegetal e facilidade de coleta;
- Obter extratos brutos diclorometânicos e etanólicos das espécies selecionadas;
- Realizar ensaios e cultura de células tumorais humanas com todas as amostras obtidas;
- Ensaios em modelo animal com as amostras que apresentarem os melhores efeitos;
- Isolar as substâncias ativas dos extratos que apresentaram os melhores efeitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS

Doxorrubicina (Eurofarma), sulforrodamina B (SBR), meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido tricloroacético (TCA), trizma Base (Sigma[®]), Tween 80R (Labsynth- Brasil), ácido acético glacial (Chemco- Brasil), diclorometano, acetato de etila (Chemco), solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído [50:1:0,5]), Ácido Clorídrico 10%, Solução de Dragendorff, Amoníaco, Solução Salina 0,9% . Todos os reagentes utilizados foram grau P.A.

II. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Espécies selecionadas em projetos anteriores foram coletadas na Fazenda Esperança, nas proximidades de Guaratinguetá, em Área de Proteção Ambiental da Serra da Mantiqueira, em Maio de 2009 (1ª Coleta) e Abril/2010 (2ª Coleta). As coletas contaram com a orientação da Profa. Rosely Torres do Instituto Agronômico de Campinas, que também foi responsável pela identificação das mesmas. Seguem espécies coletadas:

- *Miconia latecrenata* (DC.)Naudin (Melastomataceae),
- *Mollinedia schottiana* (Spreng.)Perkins (Monimiaceae)
- *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceae)
- *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw. (Urticaceae)
- *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. (Solanaceae)

Após coleta, as plantas foram identificadas e encaminhadas para o início da extração. O material vegetal (folhas) foi seco à temperatura de 40°, em estufa ventilada e, triturado em moinho de facas.

As espécies selecionadas para dar prosseguimento aos estudos foram a *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw. (Figura 1) e outra espécie do mesmo gênero, *Boehmeria caudata* Sw. (Figura 2), ambas pertencentes à família Urticaceae.



Figura 1 Foto da espécie *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw.



Figura 2 - Prancha de identificação e foto da espécie *Boehmeria caudata* Sw.

III. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

A obtenção dos extratos, purificação e o isolamento dos princípios ativos realizaram-se na Divisão de Fitoquímica do CPQBA, sob orientação da Dra. Mary Ann Foglio.

Cinquenta gramas de material vegetal foram submetidos a um processo de maceração dinâmica com 500 ml de diclorometano durante 1 hora e meia. Esse procedimento foi repetido por três vezes, sendo que ao final de 4,5 horas os volumes resultantes foram reunidos e filtrados. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo, em temperatura de aproximadamente 40°C, em rotaevaporador fornecendo então o extrato bruto diclorometânico (EBD). O resíduo vegetal deste processo foi retomado em 500 ml de etanol a 95% e extraído novamente por três vezes. O solvente orgânico foi evaporado, na temperatura de 55°C, até a eliminação do etanol e a seguir o resíduo foi liofilizado, fornecendo o extrato bruto etanólico (EBE). Esses extratos foram encaminhados para avaliação de sua eventual atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. O protocolo de extração está esquematizado na Figura 3.

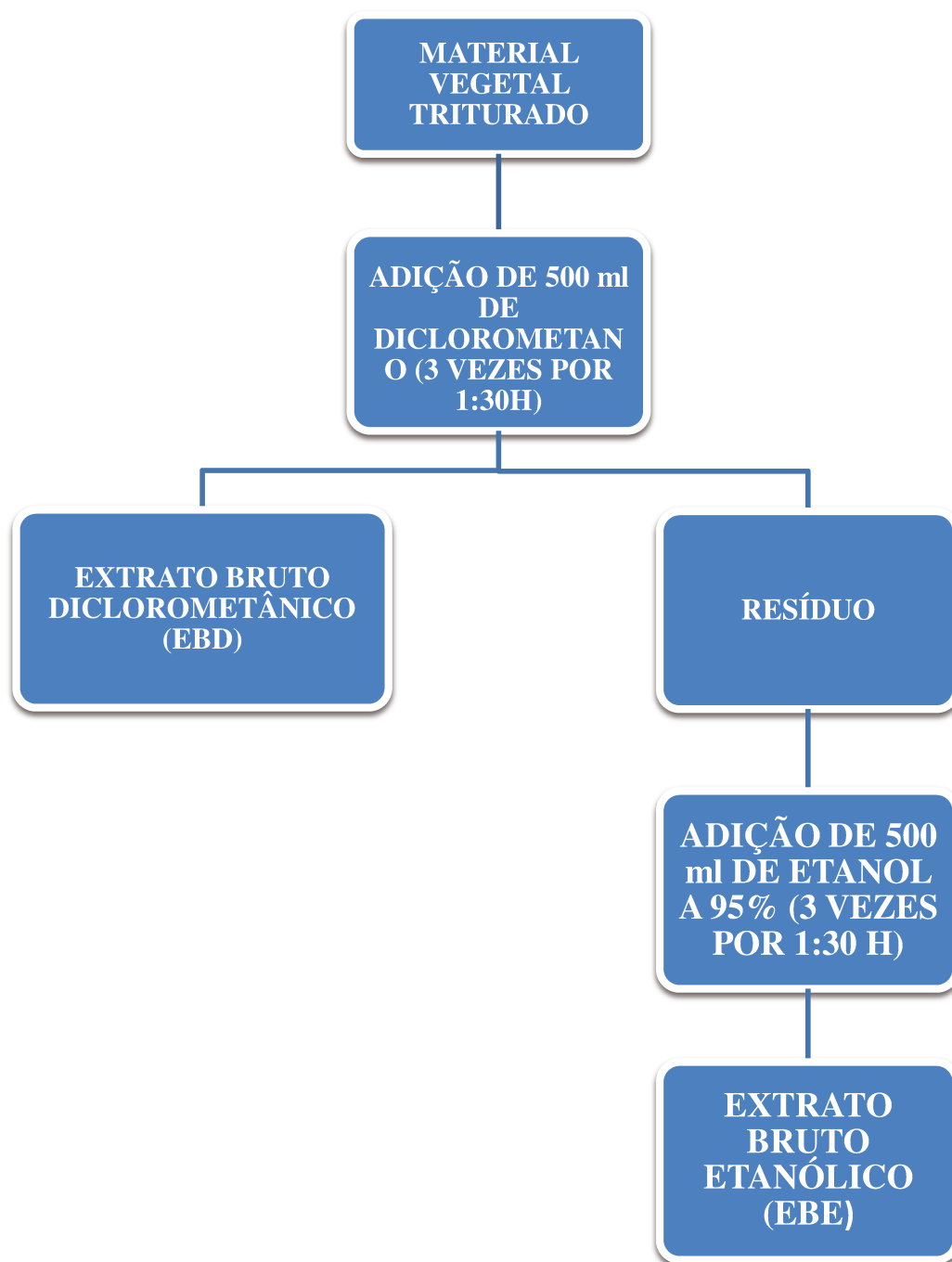


Figura 3 - Esquema do protocolo de extração dos extratos brutos Diclorometânicos e Etanólicos a partir do material vegetal seco e triturado.

CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromatofolhas de alumínio com silicagel (Merck[®] artigo 5554). Os eluentes utilizados foram uma mistura de Diclorometano e Metanol, nas concentrações de 1%, 5%, 10%. A detecção visual dos compostos foi obtida após pulverização da placa com uma solução contendo uma mistura de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5), seguida de aquecimento em estufa a 100°C durante 1 minuto e pela solução de Dragendorff para detecção de alcalóides.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE DRAGENDORFF

A solução de Dragendorff foi preparada em duas etapas. Inicialmente, foi dissolvido 5g de Carbonato de Bismuto (BiI_4) em 12 ml de Ácido clorídrico concentrado, formando a solução A.

Após a preparação da solução A, foi dissolvido 25 g do Iodeto de Potássio em um pequeno volume de água destilada, formando a solução B.

Com o preparo das soluções A e B, a solução B foi misturada, pouco a pouco, com a solução A, completando o volume para 100 ml. Posteriormente, a solução final foi filtrada e guardada em local abrigado da luz.

EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

A primeira extração foi realizada utilizando 1g de extrato bruto diclorometânico de *Boehmeria cylindrica*. A massa do extrato foi solubilizada em 100 ml de Acetato de Etila, em um funil de separação de 250ml. Juntamente com a solução acetato-extrato, adicionou-se 60ml de Ácido Clorídrico a 10% (HCl 10%) agitando vigorosamente. Após a agitação, o HCl e o Acetato separam-se por diferença de densidade, sendo a solução de HCl recolhida. Esse processo foi repetido por três vezes. A solução final de HCl mais os componentes

básicos extraídos foram neutralizados com amoníaco. A fração de Acetato de etila contém outros componentes de caráter ácido.

Essa mesma solução, após ser neutralizada, sofre nova extração com diclorometano, sendo três extrações com 60 ml cada, em funil de separação. A separação das duas frações ocorre por diferença de densidade, já que o diclorometano é mais denso que a fração de HCl, agora chamada de Neutro. A fração recolhida contém diclorometano e possivelmente alcalóides, o restante foi descartado. Ao final, a fração Básica – EBCA - (que veio da extração com HCl) e a fração de Acetato de Etila – EBAEN - foram encaminhadas para avaliação da atividade anticâncer *in vitro*.

Em um segundo momento, nova extração ácido base foi realizada, utilizando 2,5 g de extrato bruto etanólico de *Boehmeria caudata*, que apresentou sinais de possuir maior quantidade de alcalóides. A massa do extrato foi solubilizada em 300 ml de Acetato de Etila, em um funil de separação de 1000 ml. Juntamente com a solução acetato-extrato, adicionou-se 150 ml de Ácido Clorídrico a 10% (HCl 10%) agitando vigorosamente. Após a agitação, o HCl e o Acetato separam-se por diferença de densidade, sendo a solução de HCl recolhida. Esse processo foi repetido por três vezes. A solução final de HCl mais os componentes básicos extraídos foram neutralizados com amoníaco. A fração de Acetato de etila contém outros componentes de caráter ácido.

Essa mesma solução, após ser neutralizada, sofre nova extração com acetato de etila, sendo três extrações com 300 ml cada, em funil de separação. A separação das duas frações ocorre por diferença de densidade, já que o acetato de etila é menos denso que a fração de HCl, agora chamada de Neutro. A fração recolhida contém acetato de etila e possivelmente alcalóides, o restante foi descartado. Ao final, a fração Básica – FALCBC- (Originada da extração com HCl) e a fração de Acetato de Etila – FAENBC - também foram encaminhadas para avaliação de atividade anticâncer *in vitro*. A extração foi realizada de acordo com o protocolo apresentado na Figura 4.

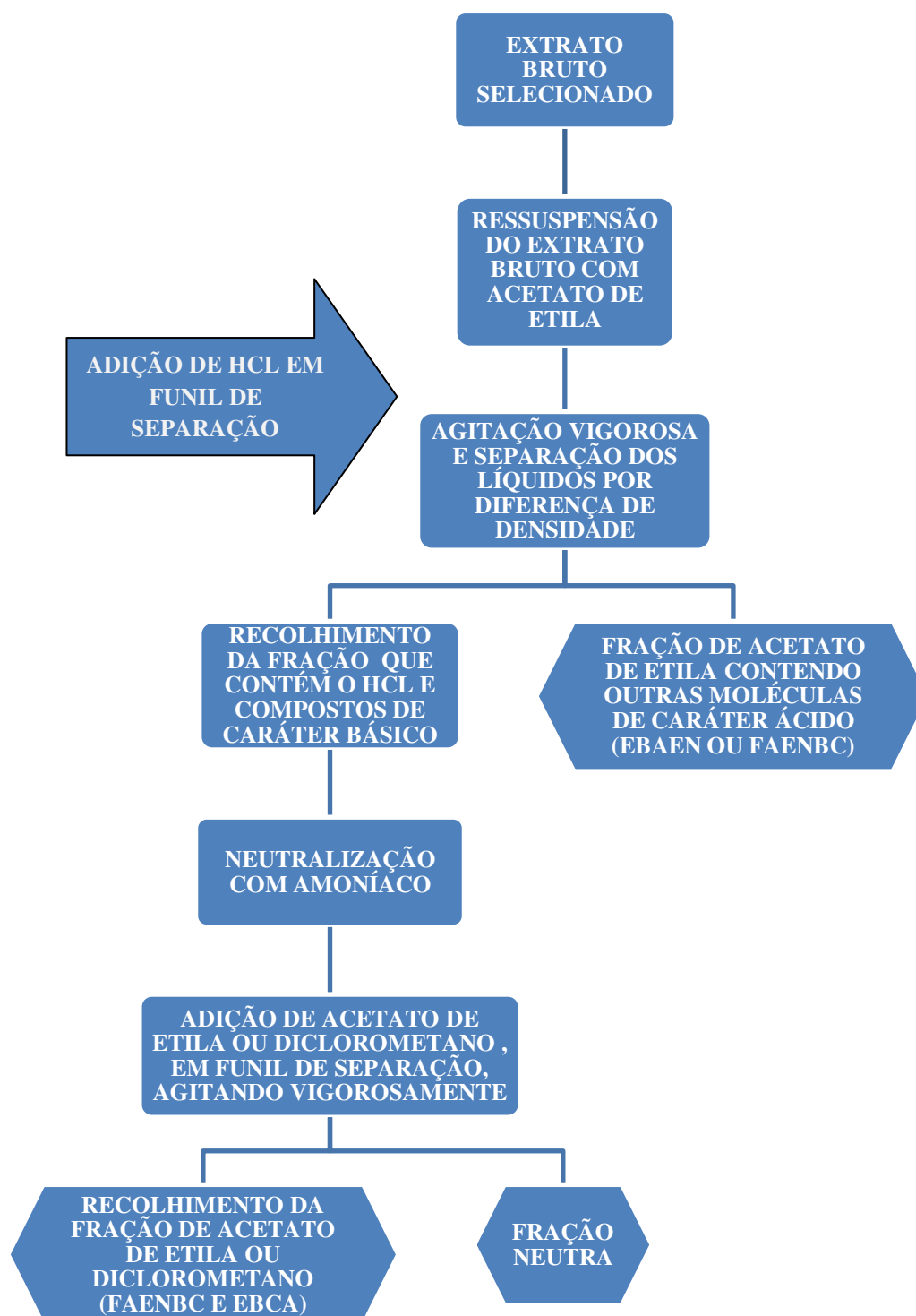


Figura 4 – Esquema do protocolo de Extração Ácido-base realizada com a espécie *Boehmeria cylindrica* e *Boehmeria caudata*

IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES DA *BOEHMERIA CAUDATA* – ESPECTROMETRIA DE MASSA

A alíquota de 8,2mg dos alcalóides extraídos do Extrato Etanólico de *Boehmeria Caudata*, foi diluída em 1 mL de MeOH.

A amostra foi injetada por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS foram extraídos no modo positivo de ionização em um espectrômetro de massas LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific - Alemanha) de configuração de ESI-FT-ICR. As condições de operação do equipamento para as análises foram: 2.5 kV voltagem do capilar, 100 °C temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação de 100 °C, e voltagem do cone de 20V. As amostras foram injetadas via Nanomate (Adivion) com um fluxo contínuo de 200 nL min⁻¹. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 50 a 1000.

IV. TESTES *IN VITRO*

LINHAGENS CELULARES

As linhagens tumorais humanas utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI), localizado nos Estados Unidos da América e encontram-se indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens celulares, com as respectivas densidades de inoculação, oriundas de tumores humanos, cedidas ao CPQBA pelo National Cancer Institute (NCI – USA).

Tipo Celular	Linhagens	Densidade de Inoculação (x 10⁴ células/mL)
Pulmão	NCI -H460	4
Mama	MCF-7	6
Ovário resistente	NCI-ADR/RES	5
Cólon	HT29	5
Próstata	PC-3	4,5
Melanoma	UACC-62	4
Ovário	OVCAR-03	7
Renal	786-0	5
Glioma	U251	4
Rim normal	VERO	4
Leucemia	K562	6

Tais linhagens foram cultivadas em RPMI com 5% de soro fetal bovino inativado, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e em ambiente úmido. Como diversas linhagens celulares apresentam sensibilidade diferente frente a compostos citotóxicos, o uso de mais de uma linhagem celular é necessário para a detecção de substâncias com atividade seletiva (Skehan *et al.*, 1990).

TESTE DE ATIVIDADE ANTICÂNCER EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Para a realização do teste *in vitro*, as substâncias foram diluídas inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/ml. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI suplementado com 5% de

SFB e gentamicina, evitando a atividade tóxica de concentrações elevadas do DMSO. Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µl de suspensão celular em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Depois desse período de adaptação uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de proteínas (células) no momento da adição das drogas.

Nas demais placas as drogas foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ml e incubadas por 48 horas. A disposição das linhagens celulares bem como o tratamento com as quatro doses ocorrem em apenas uma placa, conforme demonstrado na Figura 4. Após este período, as placas 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 a seguir submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa para em seguida serem coradas pela adição de 50µl do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %. Após incubação 4 °C por 30 minutos as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (Skehan et al., 1990; Rubinstein et al., 1990; Monks et al., 1991).

A placa T0, representa o controle do experimento, onde em cada coluna foi inoculada uma linhagem celular com sua respectiva concentração, para medição do crescimento celular sem a interferência da droga-teste (Figura 5).

A Figura 6 demonstra o esquema das placas experimentais, onde em cada placa é inoculada uma linhagem celular e são testadas quatro concentrações, 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ml da droga teste.

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

Figura 5 – Placa T0, onde as linhagens celulares são inoculadas para crescerem sem interferência de substâncias nocivas.

	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	2.5	0.25
F		Célula	250	25	2.5	0.25	250	25	2.5	0.25	2.5	0.25
G		Célula	250	25	2.5	0.25	250	25	2.5	0.25	2.5	0.25
H			250	25	2.5	0.25	250	25	2.5	0.25	2.5	0.25

- Amostra 1; - Branco da Amostra 1.
 - Amostra 2; - Branco da Amostra 2.
 - Amostra 3; - Branco da Amostra 3.
 - Amostra 4; - Branco da Amostra 4.
 - Amostra 5; - Branco da Amostra 5.

Figura 6 - Placa experimental, onde são testadas quatro drogas diferentes em quatro concentrações

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Com os dados de absorbância foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração de extrato ou fração, ou seja, concentração da amostra e seu efeito.

As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma concentração-dependente, preferencialmente apresentando seletividade celular.

Através da regressão sigmóide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento, são calculados os valores TGI (total growth inhibition), ou seja, concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular e GI 50, concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular. Esses valores são utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade, à partir das concentrações necessárias para inibir (citostático) ou diminuir o crescimento celular (citocida).

V. ENSAIOS *IN VIVO*

ANIMAIS

Foram utilizados animais machos e fêmeas das linhagens Swiss e Balb-C, com 25-35g de peso corporal, mantidos em temperaturas controladas de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com 12h de ciclos claro-escuro, mantidos em laboratório em gaiolas com no máximo 10 animais, com água e comida *ad libitum*, ao menos sete dias antes do experimento. A via intraperitoneal foi utilizada para todos os experimentos. Os estudos se realizaram em concordância com as diretrizes atuais de cuidados com animais de laboratório (VOIPIO et al, 2008), com a permissão e vigilância do Comitê de Ética para experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (1812-1 e 1813-1, presentes no Anexo 1).

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Os camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes dos extratos e/ou frações e após a administração foram mantidos em observação por um período mínimo de 14 dias. O número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado e a DL50 calculada pelo método de Litchfield e Wilcoxon (1949).

Com esses dados foi possível estabelecer as doses que foram utilizadas para avaliação da atividade nos modelos de câncer murino.

AValiação da Atividade Anticâncer em Modelo Murino

RESSUSPENSÃO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE

As substâncias testes foram ressuspensas em um veículo composto por solução salina (NaCl 0,9%) e Tween80 0,5%. As células utilizadas para inoculação foram suspendidas em tampão-fosfato (PBS – pH 7,0).

ENSAIO ANTICÂNCER *IN VIVO*: TUMOR SÓLIDO DE EHRlich LOCALIZADO NA PATA DE CAMUNDONGOS.

O tumor Ascítico de Ehrlich, derivado de um adenocarcinoma mamário, espontâneo, de camundongos foi mantido na forma ascítica através de passagens sequenciais em camundongos da linhagem Swiss, por transplantes intraperitoneais semanais de 5×10^5 células tumorais, de maneira a preparar as células para os testes subsequentes.

O fluido ascítico foi removido, após abertura do abdômen do animal, e coletado cuidadosamente com auxílio de uma seringa de 3ml estéril. A contagem das células tumorais ascíticas foram realizadas em um hemocítômetro de Neubauer e o número total foi determinado pelo método de exclusão de Trypan azul, com viabilidade celular sempre

maior que 90%. As células foram então diluídas em tampão-fosfato a 0,9% (PBS) para uma densidade final de inoculação de $2,5 \times 10^6$ cell/mL.

Para a implantação da forma sólida do tumor, $2,5 \times 10^6$ cell/mL de células viáveis, em um volume de 60 μ L foram injetados no coxim sub-plantar da pata direita de camundongos Balb-C (KLEEB et al, 1997). Após a inoculação do tumor, o volume da pata era medido a cada três dias, utilizando um aparelho de Pletismômetro (Panlab, Espanha), durante 15 dias. Após esse período os animais foram sacrificados e o volume tumoral medido de acordo com a seguinte fórmula:

$\text{Volume medido} - \text{Volume Basal} = \text{Volume do Tumor}$

DOSAGEM E CRONOLOGIA DOS TRATAMENTOS

A cronologia dos tratamentos e as doses utilizadas foram determinadas durante a padronização e validação dos modelos em nosso laboratório. Dessa maneira, cinco agentes quimioterápicos foram usados dentre eles taxol, doxorrubicina, 5-fluoruracil, ciproterona e vincristina, para determinar o melhor para ser usado nos experimentos subseqüentes, sendo o 5-Fluoracil (5-FU) selecionado como controle positivo considerando a efetividade desde o início o crescimento tumoral, até o final do experimento.

A fim de investigar o potencial antitumoral *in vivo* dos extratos brutos diclorometânico de *Boehmeria cylindrica* (BCYLD), diclorometânico e etanólico de *Boehmeria caudata* (BCAUD e BCAUET) e dos alcalóides extraídos do extrato etanólico de *Boehmeria caudata* (FALCBC), todos comparados com a ação do 5-FU, no mesmo teste, foram administrados em animais em diferentes doses, determinadas pelos testes de toxicidade aguda, conforme segue:

1. BCYLD: doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via i.p., iniciando um dia após a inoculação do tumor (dia 1) e posteriormente a cada 3 dias

2. BCAUD: doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via i.p., iniciando um dia após a inoculação do tumor (dia 1) e posteriormente a cada 3 dias
3. BCAUET: doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via i.p iniciando um dia após a inoculação do tumor (dia 1) e posteriormente a cada 3 dias
4. FALCBC: doses de 5, 25 e 50 mg/Kg, via i.p., iniciando um dia após a inoculação do tumor (dia 1) e posteriormente a cada 3 dias

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, “one way (ANOVA)”, considerando como nível crítico $p \leq 0.05$, para avaliar a diferença significativa entre o controle e os grupos tratados, seguido pelo Teste de Duncan, utilizando StatSoft[®] software. Gráficos foram construídos através do software Origin[®].

RESULTADOS

I. EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL DA PRIMEIRA COLETA EM MAIO/2009

A coleta de material vegetal realizada em Maio/2009 proporcionou a obtenção de quatro espécies, sendo elas:

- *Miconia latecrenata* (DC.)Naudin (Melastomataceae),
- *Mollinedia schottiana* (Spreng.)Perkins (Monimiaceae)
- *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw. (Urticaceae)
- *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. (Solanaceae)

Após a coleta do material vegetal, foram realizadas extrações com diclorometano e etanol. A Tabela 2 representa as duas extrações em cada planta, com os respectivos rendimentos.

Tabela 2 - Extrações de diferentes plantas em Diclorometano e Etanol, com massa extraída e respectivos rendimentos.

ESPÉCIE	PESO AMOSTRA (g)	EXTRATO	MASSA EXTRAÍDA (g)	RENDIMENTO
<i>Boehmeria cylindrica</i>	20,04	Dicloro	0,8183	4,08%
		Etanol	2,6385	13,17%
<i>Acnistus arborescens</i>	20,02	Dicloro	1,3175	6,58%
		Etanol	3,1989	15,98%
<i>Miconia latecrenata</i>	20,00	Dicloro	0,6983	3,49%
		Etanol	2,8841	14,42%
<i>Mollinedia schottiana</i>	20,03	Dicloro	0,8942	4,46%
		Etanol	1,5141	7,56%

Após a extração, realizou-se Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e as cromatoplasas (Figuras 7 e 8) estão ilustradas:

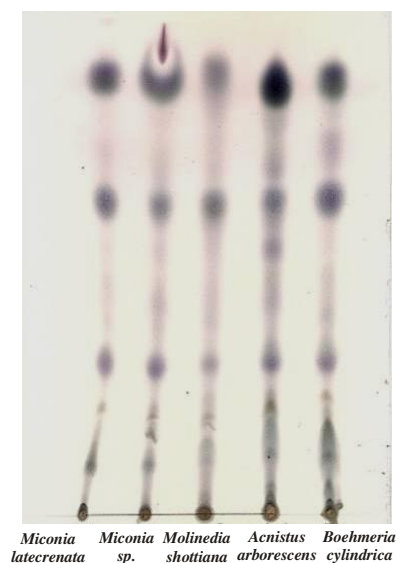


Figura 7 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, dos extratos Diclorometânicos de *Miconia latecrenata*, *Miconia sp.*, *Mollinedia schottiana*, *Acnistus arborescens*, *Boehmeria cylindrica*. Fase móvel: Diclorometano/Metanol 1%. Revelador: Anisaldeído.

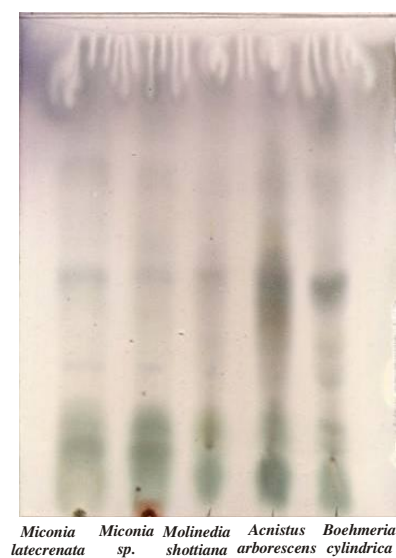


Figura 8 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, dos extratos Etanólicos de *Miconia latecrenata*, *Miconia sp.*, *Mollinedia schottiana*, *Acnistus arborescens*, *Boehmeria cylindrica*. Fase móvel: BAW (Butanol: Ácido acético: água). Revelador: Anisaldeído.

A cromatoplaça apresentada na figura 7 contém o perfil fitoquímico do extrato diclorometânico das plantas selecionadas, onde é possível observar a presença de muitas substâncias, principalmente no início indicando uma grande quantidade de substâncias com maior polaridade. As espécies *Boehmeria cylindrica* e *Acnistus arborescens* possuem a maior parte das substâncias presentes nas regiões com maior polaridade.

A figura 8 apresenta a cromatoplaça contendo o perfil fitoquímico do extrato etanólico das plantas selecionadas. É possível observar a existência de uma quantidade maior de compostos nas espécies *Acnistus arborescens* e *Boehmeria cylindrica*.

II. ENSAIOS *IN VITRO*

Com a média dos valores de absorbância foram calculados os percentuais de inibição de crescimento que, por sua vez, foram utilizados para a elaboração dos gráficos de atividade. Nesses gráficos relacionando essa porcentagem de crescimento com a concentração dos extratos, os valores abaixo de 50% e acima da linha zero são relativos à inibição de crescimento. A linha zero representa os valores de proteína encontrados na placa fixada após 24hs de incubação, imediatamente antes da adição dos extratos. Portanto os valores abaixo da linha zero indicam que além da inibição de crescimento houve morte celular, pois o conteúdo de proteína está abaixo do encontrado no momento da adição do extrato. Para análise da atividade são considerados os seguintes parâmetros: boa correlação entre concentração e efeito, seletividade e potência.

Cada um dos extratos brutos diclorometânicos e etanólicos foram submetidos aos testes *In vitro*, para a verificação de sua atividade antitumoral (Figuras 9 a 17). O controle utilizado foi a Doxorubicina (Figura 9), quimioterápico conhecido e eficaz para o tratamento de câncer.

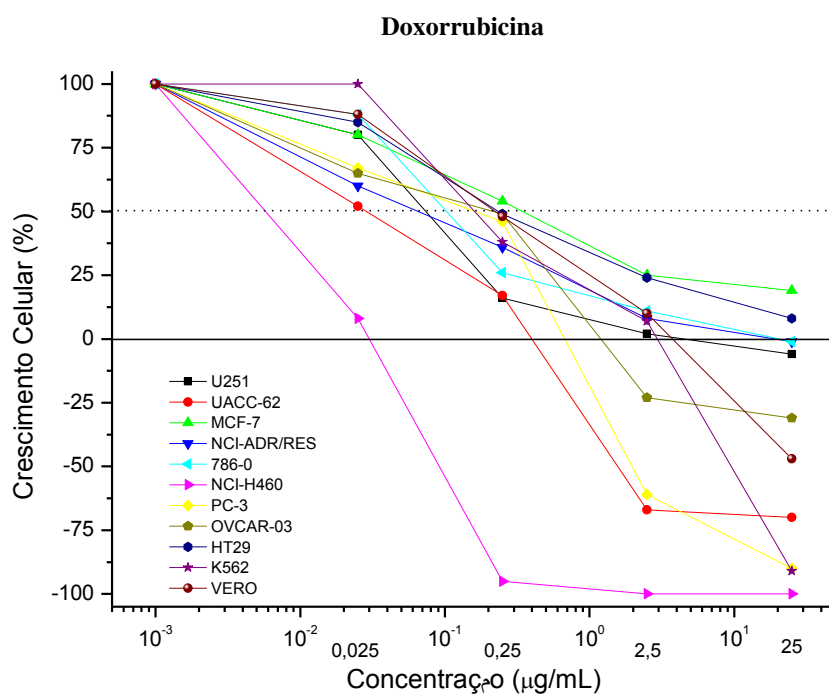


Figura 9 – Atividade citotóxica do quimioterápico Doxorrubicina, utilizado como controle, relacionando sua concentração com porcentagem de crescimento celular

O extrato diclorometânico da *B. cylindrica* apresentou atividade citostática a partir da concentração de 2,5 ug/mL, sem atividade citotóxica significativa (Figura 10). O extrato etanólico não apresentou atividade citostática ou citotóxica (Figura 11).

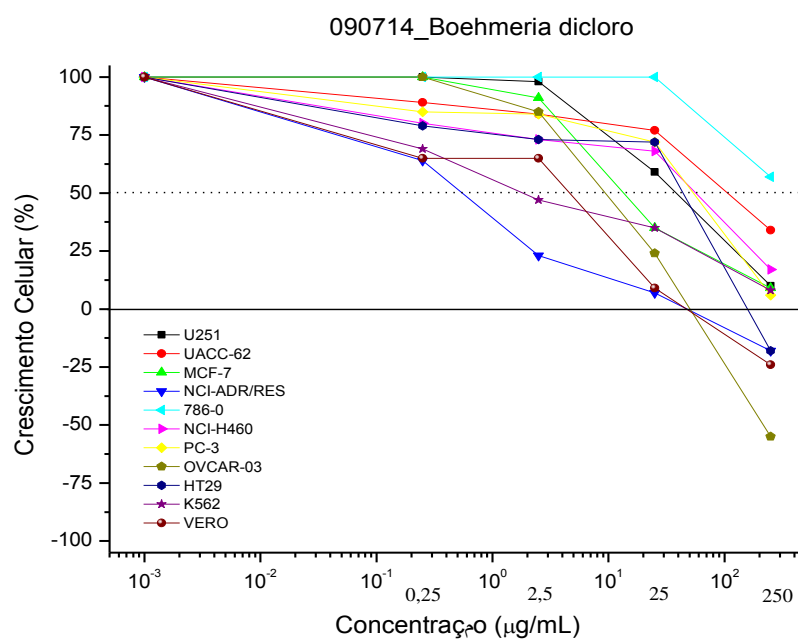


Figura 10 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de *Boehmeria cylindrica*, relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

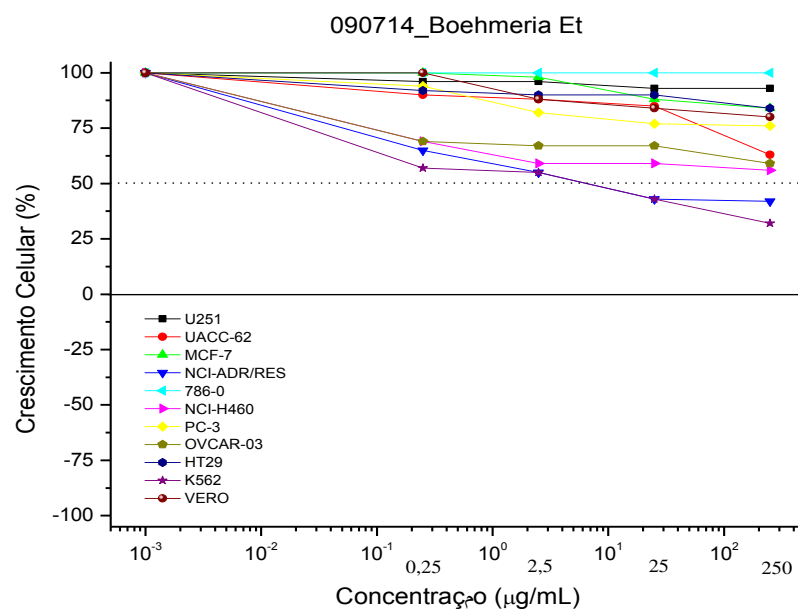


Figura 11 - Atividade do extrato bruto Etanólico de *Boehmeria cylindrica*, relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

Os dois extratos brutos de *Miconia latecrenata* foram citotóxicos, sendo o etanólico com maior potência e seletividade. O extrato bruto diclorometânico produziu morte celular apenas na maior concentração, já o extrato bruto etanólico com 2,5 ug/ml produziu citotoxicidade para algumas linhagens (Figuras 12 e 13). Apesar de demonstrar efeitos significativos e não possuir estudos, não houve disponibilidade de material vegetal para dar continuidade ao estudo.

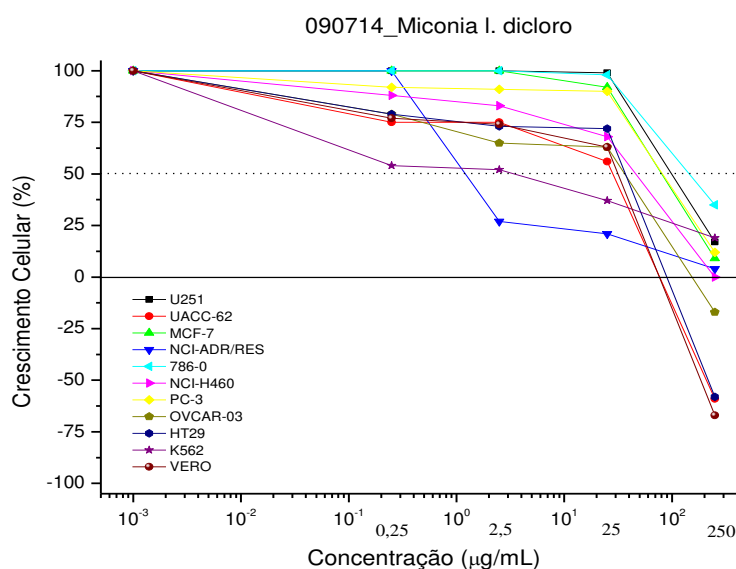


Figura 12 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de *Miconia latecrenata*, relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

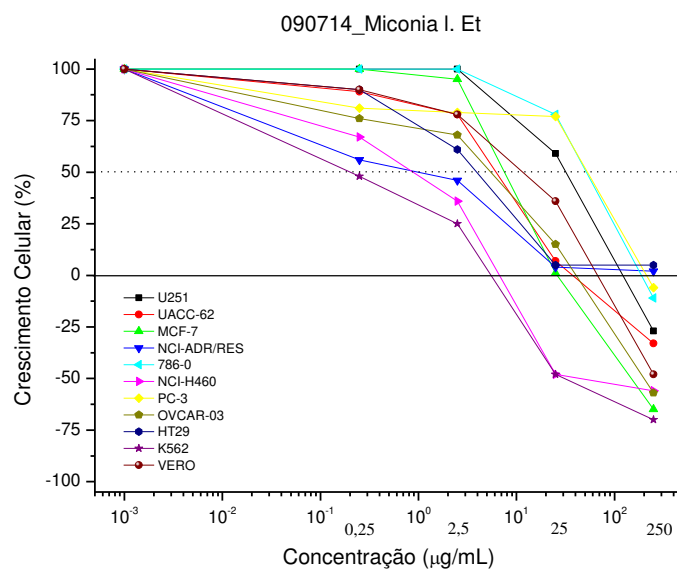


Figura 13 - Atividade do extrato bruto Etanólico de *Miconia latecrenata*, relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

Os extratos de *Mollinedia schottiana* não apresentaram atividades significativas (Figuras 14 e 15).

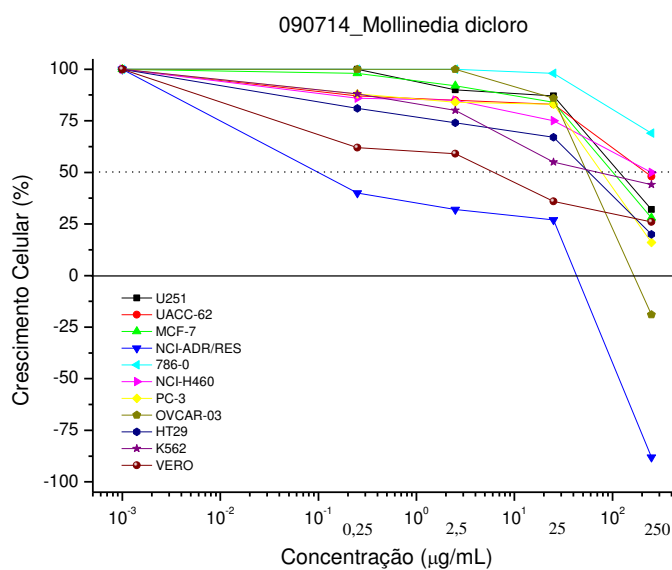


Figura 14 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de *Mollinedia schottiana*, relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

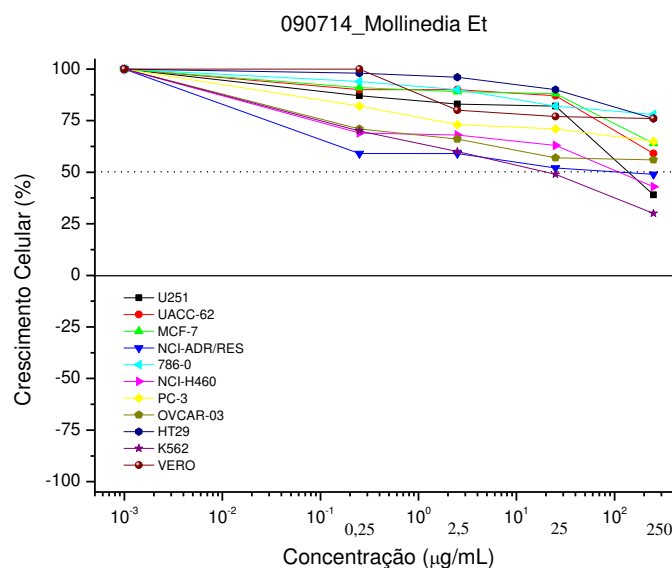


Figura 15 - Atividade do extrato bruto Etanólico de *Mollinedia schottiana*, relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

Os dois extratos obtidos da *Acnistus arborescens*, conhecida popularmente como Manianeira, apresentaram atividade citotóxica dependente da concentração e seletividade (Figuras 16 e 17). Apesar desse excelente perfil de atividade, os estudos não tiveram prosseguimento, pois existem trabalhos na literatura relatando a atividade anticâncer de extratos e substâncias isoladas dessa espécie (CORDERO, C.P. et al., 2009; VERAS, M.L. et al., 2004; ROCHA, D.D. et al., 2006)

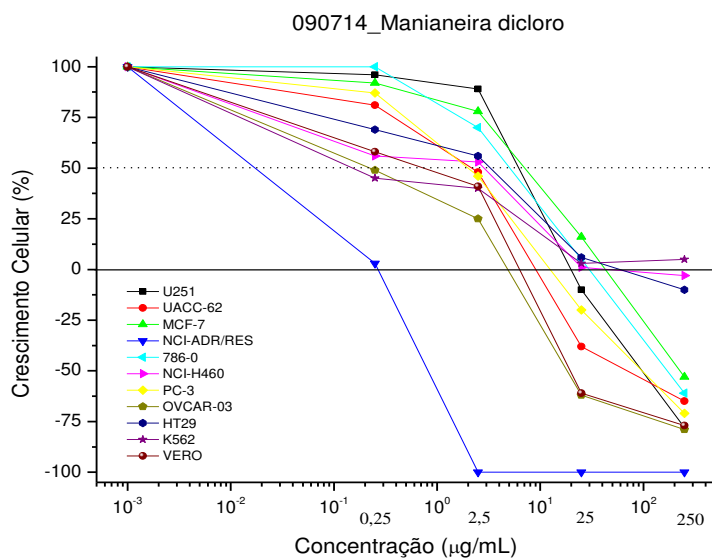


Figura 16 - Atividade do extrato bruto Diclorometânico de *Acnistus arborescens* (Manianeira), relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato

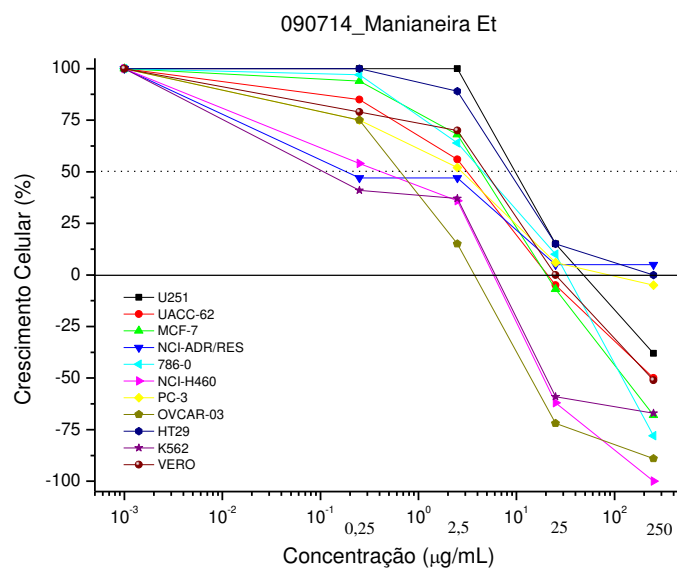


Figura 17 - Atividade do extrato bruto Etanólico de *Acnistus arborescens* (Manianeira), relacionando porcentagem de crescimento com concentração do extrato.

A espécie selecionada em um primeiro momento foi a *Boehmeria cylindrica*, pois não foram encontrados estudos sobre atividade anticâncer da mesma, apesar de publicações com outras espécies do mesmo gênero. Soma-se a esse fator a facilidade de obtenção de

material vegetal, já que são espécies abundantes na região de coleta. A *Boehmeria cylindrica* é facilmente encontrada nas margens dos rios, possuindo caráter arbustivo.

A Tabela 3 apresenta os valores de GI 50, ou seja, a concentração de amostra necessária, em µg/ml, para inibição de 50% da proliferação celular. Esse dado é importante para a comparação da potência entre os extratos brutos testados e quimioterápicos já estabelecidos.

Tabela 3 - GI 50 (Inibição de 50% do crescimento) dos extratos brutos de *Boehmeria cylindrica* e Doxorrubicina, em µg/ml, realizado em 11 linhagens tumorais humanas

	U251	UACC 6	MCF- 7	PC3	K562	NCI- H460	HT 29	NCIA DR/R ES	VERO	OVCA R03	786-0
Boehmeria cylindrica DICLORO	34,92	105,05	15,54	45,97	2,334	32,28	28,12	0,527	2,260	9,718	>250
Boehmeria cylindrica ETANOL	>250	>250	>250	>250	5,565	225,76	>250	12,74	>250	>250	>250
Doxorrubicina	0,072	0,029	0,391	0,09	0,196	0,0172	0,305	0,069	0,222	0,993	0,1145

Os valores de TGI, ou seja, as concentrações necessárias para a total inibição da proliferação celular estão expressas na Tabela 4. Somente as linhagens HT29, NCIADR/RES, VERO e OVCA-03 tiveram seu crescimento totalmente inibido (TGI abaixo de 250 µg/mL).

Tabela 4 - TGI, ou Inibição do crescimento total, dos Extratos Brutos de *Boehmeria cylindrica* e Doxorrubicina, em µg/ml, de tratamentos realizados em 11 linhagens tumorais humanas.

	U251	UACC 6	MCF- 7	PC3	K562	NCI- H460	HT29	NCIA DR/R ES	VERO	OVCA R03	7860
BCYL DICLORO	>250	>250	>250	>250	>250	>250	171,22	41,13	59,62	49,25	>250
BCYL ETANOL	>250	>250	>250	>250	>250	>250	> 250	>250	>250	>250	>250
Doxorrubicina	5,317	0,312	52,96	0,596	1,703	0,028	25,22	9,821	3,222	2,076	9,608

III. OBTENÇÃO DE FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES DA *BOEHMERIA CYLINDRICA*

Outras espécies do mesmo gênero possuem alcalóides em sua composição que são ativos contra o câncer (LUO, Y. et al., 2003; YAN, J. et al., 2006), porém nos extratos etanólicos. Os alcalóides foram encontrados no extrato diclorometânico, e devido a relatos na literatura de alcalóides ativos, foram extraídos. Em placa de CCD (Figura 18), revelada com dragendorff, existem traços de alcalóides.

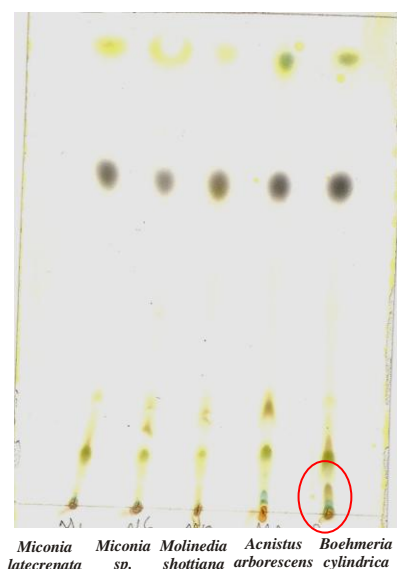


Figura 18 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, dos extratos Diclorometânicos de *Miconia latecrenata*, *Miconia SP.*, *Mollinedia schottiana*, *Acnistus arborescens*, *Boehmeria cylindrica*. Em destaque a indicação da presença de alcalóides no extrato de *Boehmeria cylindrica*. Fase móvel: Diclorometano/Metanol 1%. Revelador: Dragendorff.

Com a confirmação da presença dessas substâncias, realizou-se extração ácido-base, com o objetivo de isolá-los.

Os rendimentos dessa extração seguem na Tabela 5.

Tabela 5 - Massa e rendimento das frações EBCA (Fração contendo compostos de caráter básico) e EBAEN (Fração contendo compostos de caráter ácido) do extrato diclorometânico de *Boehmeria caudata*.

FRAÇÃO	MASSA (g)	RENDIMENTO(%)
EBCA	0,0157	1,57
EBAEN	0,688	68,8

A fração EBCA possui os compostos de caráter básico, ou seja, os alcalóides. A fração EBAEN conta com os compostos de caráter ácido. Em cromatoplaça, revelada com dragendorff, que é um corante inespecífico para alcalóides, observa-se a presença de dois pontos alaranjados, correspondendo a grupos de alcalóides com polaridades distintas, para a fração EBCA (Figura 19).

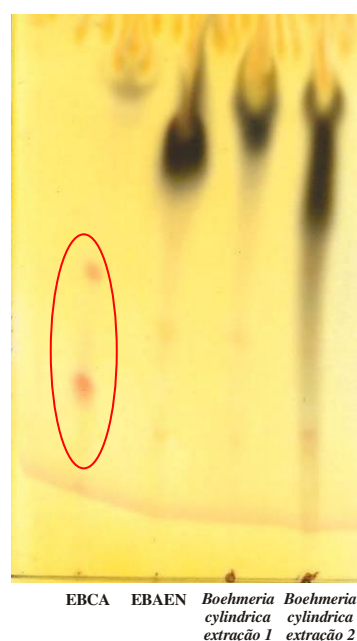


Figura 19 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, utilizando BAW (Butanol, Ácido Acético e Água) como fase móvel e revelada com Dragendorff. Em destaque, dois alcalóides em polaridades distintas.

As frações (EBCA e EBAEN) foram avaliadas em cultura de células tumorais humanas, para verificar se são as frações responsáveis pelos efeitos observados no extrato bruto.

IV. ENSAIOS *IN VITRO* COM AS FRAÇÕES EBCA E EBAEN

Tanto a fração EBAEN como a fração EBCA apresentaram efeitos citostáticos apenas para as linhagens U251 (GI50 = 136,42 e 102,64 $\mu\text{g/mL}$), OVCAR-03 (GI50=0,710 e 0,238 $\mu\text{g/mL}$), UACC-62 (GI50 = 216,84 e 211,11 $\mu\text{g/mL}$) e PC-3 (GI50=180,55) e K562 (GI50 = 133.35), apenas para EBAEN, semelhantes ao apresentado pelo extrato bruto diclorometânico (Figuras 20 e 21).

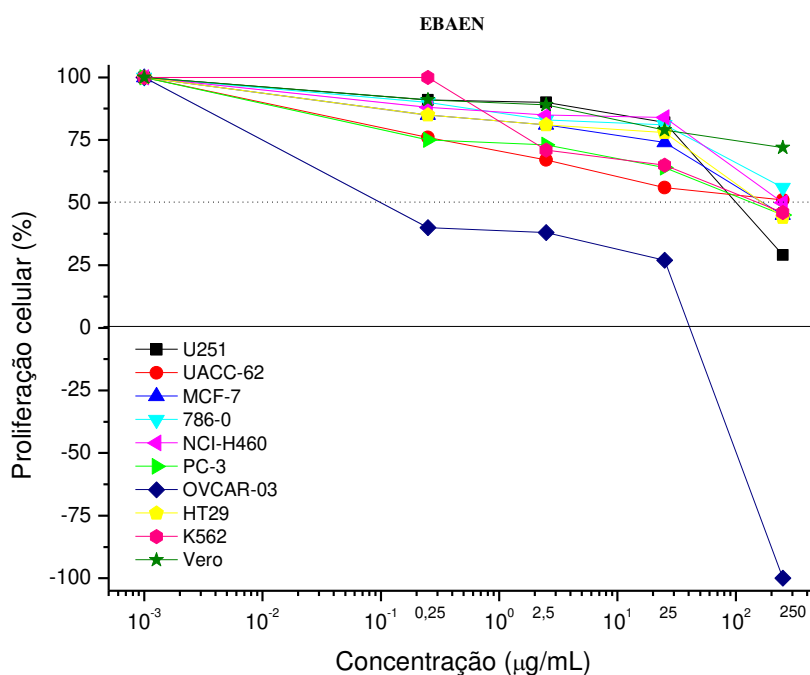


Figura 20 - Atividade da fração EBAEN do EBD de *Boehmeria cylindrica*, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração.

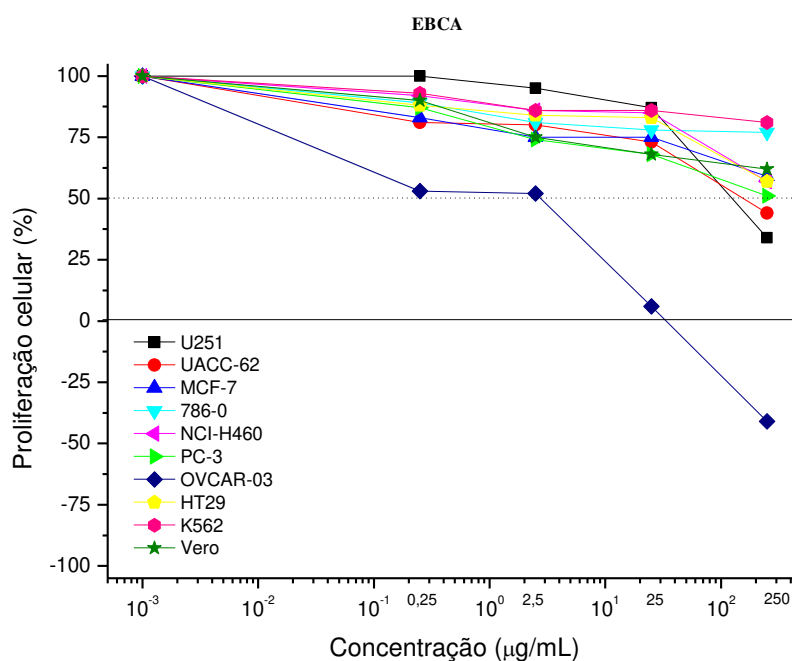


Figura 21 - Atividade da fração EBCA do EBD de *Boehmeria cylindrica*, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração.

Segue Tabela 6 com os valores de GI50 das duas frações obtidas.

Tabela 6 - GI 50 (Inibição de 50% do crescimento) das frações EBCA e EBAEN, originadas do EBD de *Boehmeria cylindrica*, em µg/ml, realizado em 10 linhagens tumorais humanas

	U251	UACC-62	MCF-7	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-03	HT29	K562	VERO
EBCA	136,4 ₂	216,84	>250	>250	>250	>250	0,710	>250	>250	>250
EBAEN	102,6 ₄	211,119	219,88	>250	>250	180,5 ₅	0,238	226,9 ₉	133,3 ₅	>250

V. ENSAIO IN VIVO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO DE *BOEHMERIA CYLINDRICA*

O experimento in vivo foi realizado com o extrato bruto diclorometânico, que apresentou resultados significativos nos ensaios *in vitro*. A máxima dose efetiva, com a menor quantidade de efeitos adversos foi determinada através do teste de toxicidade aguda.

O ensaio contou com 3 doses, sendo elas 50 mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg /Kg, além dos controles negativo (Salina) e positivo (5-fluoracil) com o objetivo de determinar uma curva de dose-resposta, bem como a dose mais efetiva do citado extrato. O tumor sólido de Ehrlich foi inoculado na pata traseira direita do animal, e o volume foi avaliado a cada três dias, coincidindo com os tratamentos. Os resultados apurados estão expressos na Figura 22.

A dose de 50 mg/kg de BCYL não impediu o desenvolvimento do tumor (curva Vermelha) e o crescimento do mesmo foi superior ao grupo salina (controle negativo). De forma semelhante, a dose de 100 mg/kg de BCYL (curva verde) também não impediu a progressão do tumor com crescimento semelhante ao grupo salina. O 5-FU (controle positivo – curva azul) impediu o crescimento agressivo do tumor sólido de Ehrlich no início do período experimental e a partir do 10º dia, houve pouca ou nenhuma progressão. Já a dose de 200 mg/kg do BCYL (curva rosa) reteve a progressão tumoral desde o 4º dia de experimento, principalmente após o 10º dia, época em que o tumor torna-se mais agressivo. É importante ressaltar que há diferença estatística em relação ao controle salina (crescimento normal do tumor sem interferência de qualquer quimioterápico), com $p < 0,01$, obtido através do Teste de Duncan, em todos os pontos do gráfico.

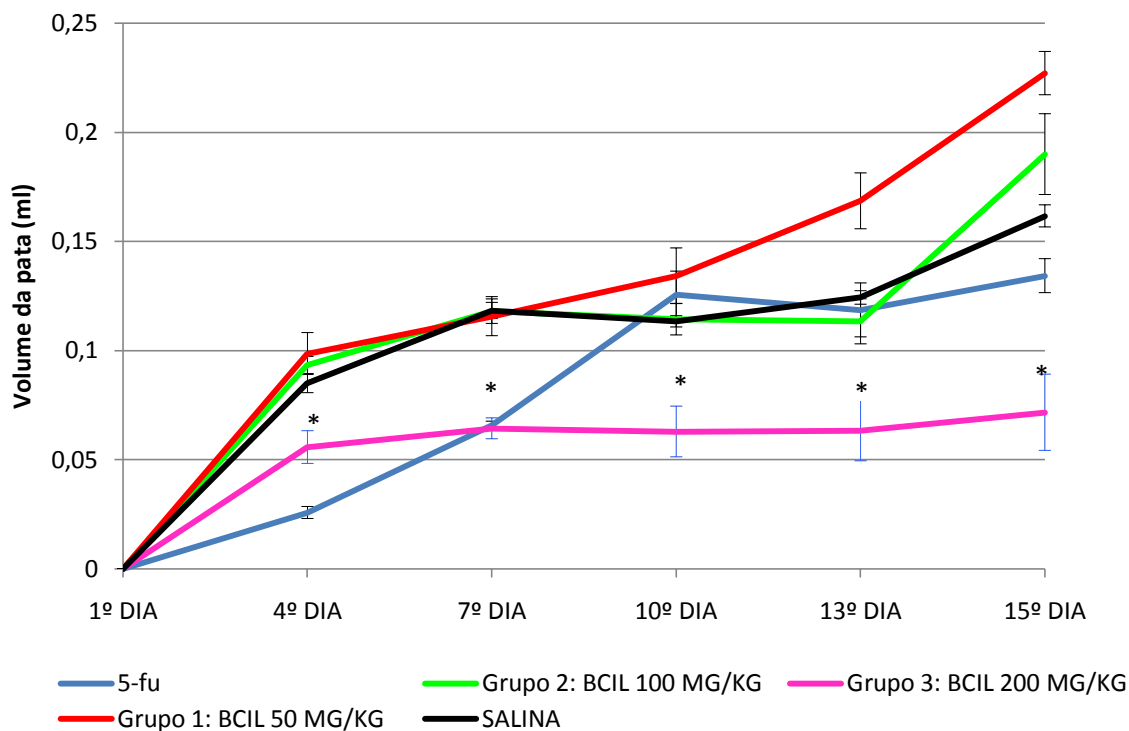


Figura 22 – - Atividade anticâncer do extrato diclorometânico das folhas de *Boehmeria cylindrica* em tumor de pata de camundongo induzido pela injeção de células de Ehrlich. Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (BCYL 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg) e controles, onde a dose de 200 mg/Kg apresentou efeitos significativos (*= $p < 0,01$) e impediu o aumento do volume tumoral.

VI. AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS NA SEGUNDA COLETA, EM ABRIL/2010.

A segunda coleta, realizada em Abril/2010, teve por objetivo a obtenção de material vegetal das espécies *Boehmeria caudata* e *Boehmeria cylindrica*. A primeira espécie não foi encontrada na primeira coleta, porém foi encontrada em abundância na segunda, em Abril/2010.

Após a coleta e identificação dessas espécies, o material vegetal foi triturado em moinho de facas, e submetido à extração com diclorometano e etanol, conforme descrito no item III do Materiais e Métodos. Na Tabela 7 encontram-se as quantidades obtidas e os respectivos rendimentos

Tabela 7 – Massa Extraída e Rendimentos dos extratos obtidos na segunda coleta.

	MASSA INICIAL - EXTRATO SECO (g)	MASSA EXTRAÍDA (g)	RENDIMENTO (%)
BCAU D	146,56	5,7811	3,94%
BCAU ET	146,56	6,8777	4,69%
BCYL D	145,45	7,7075	5,30%
BCYL ET	145,45	9,4632	6,51%

VII. OBTENÇÃO DE FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES DO EBE DE *BOEHMERIA CAUDATA*

Outras espécies do mesmo gênero possuem alcalóides, obtidos do extrato etanólico, com atividade anticâncer em cultura de células tumorais (LUO, Y. et al., 2003; YAN, J. et al., 2006). Em placa de CCD (Figura 23), revelada com dragendorff, existem traços de alcalóides nos dois, extratos etanólico e diclorometânico, porém em maior quantidade no extrato etanólico.



Figura 23 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, utilizando Dicloro/Metanol 5% como fase móvel e revelada com Dragendorff. Em destaque, alcalóides no extrato etanólico de *Boehmeria caudata*, corados em laranja.

Após extração Ácido-Base realizada com o extrato bruto etanólico de *Boehmeria caudata* foram obtidas duas frações, FAENBC (Fração Neutra) e FALCBC (Fração que contém os alcalóides). O rendimento da extração está representado na Tabela 8, abaixo, bem com a massa extraída.

Tabela 8 – Massa Extraída e rendimento da Extração Ácido-Base

MASSA INICIAL - BCAUET (g)	MASSA EXTRAÍDA (g)	RENDIMENTO (%)
2,5546	0,2614	10,23%

Segue CCD (Figura 24) demonstrando que existem alcalóides somente na fração FALCBC, na mesma polaridade dos alcalóides existentes no extrato bruto etanólico.

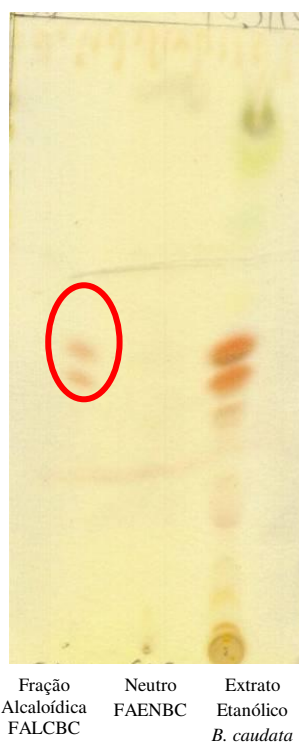


Figura 24 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de sílica gel, utilizando Dicloro/Metanol 10% como fase móvel e revelada com Dragendorff, demonstrando a presença de alcalóides na fração FALCBC.

VIII. ENSAIOS *IN VITRO*

Os extratos brutos diclorometânicos e etanólicos, bem como as frações FAENBC e FALCBC, obtidos nos processos de extração, foram encaminhados para os testes em cultura de células a fim de avaliar a atividade anticâncer. O controle utilizado foi a doxorubicina (Figura 9), quimioterápico conhecido e eficaz para o tratamento de câncer.

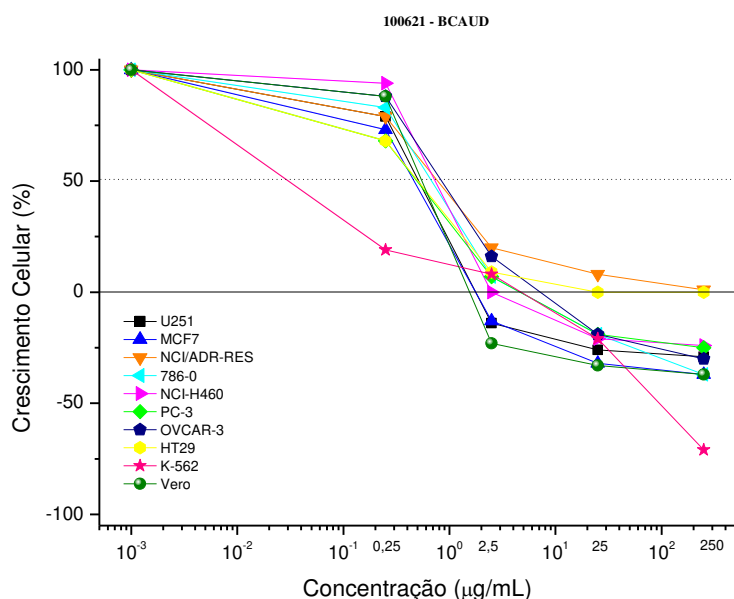


Figura 25 - Atividade do Extrato Bruto Diclorometânico de *Boehmeria caudata* Sw., relacionando porcentagem de crescimento com a concentração

O extrato bruto diclorometânico da espécie *Boehmeria caudata* (BCAUD) apresentou atividade citotóxica para a maioria das linhagens tumorais humanas componentes do ensaio *in vitro*, (Figura 25), sendo notável o efeito nas concentrações acima de 2,5 µg/mL.

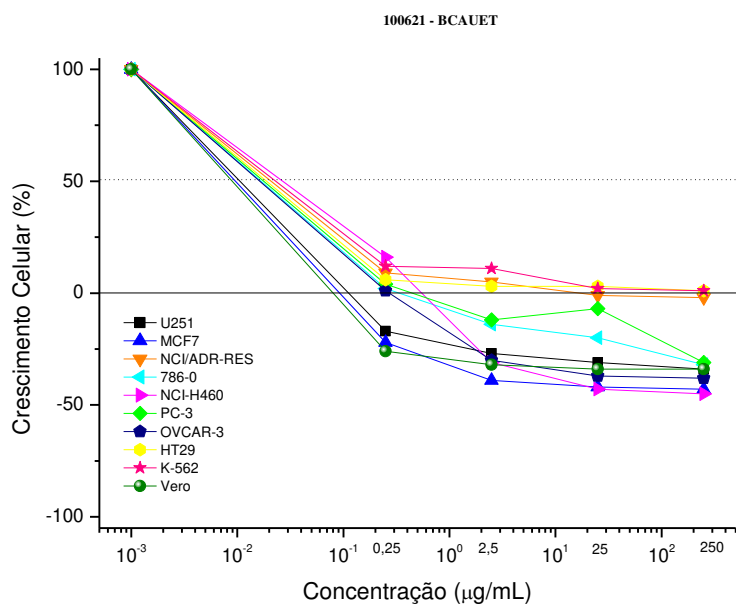


Figura 26 - Atividade do Extrato Bruto Etanólico de *Boehmeria caudata* Sw., relacionando porcentagem de crescimento com a concentração

O extrato bruto etanólico da espécie *Boehmeria caudata* (BCAUET) apresentou um perfil de ação diferente do extrato diclorometânico (BCAUD), além de contar com uma potencia superior, apresentando os efeitos citotóxicos em concentrações do extrato na ordem de 0,25 µg/mL (Figura 26).

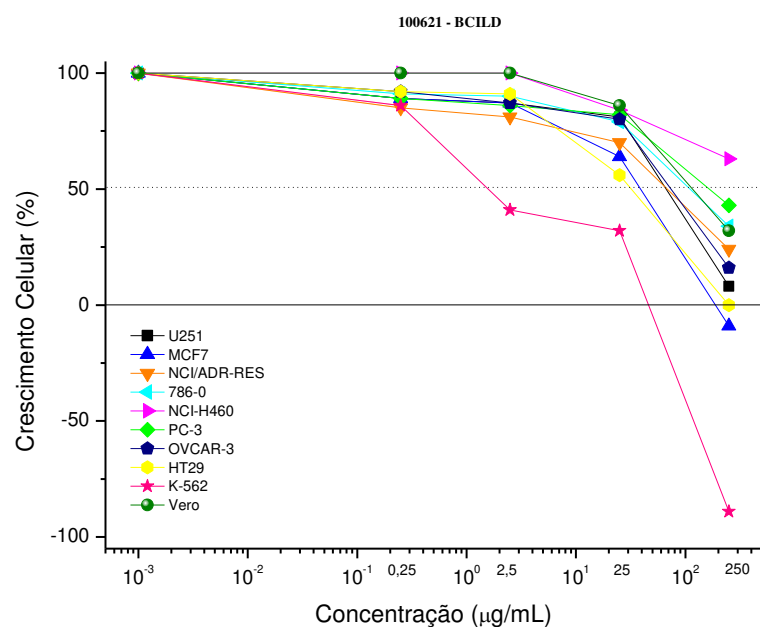


Figura 27 - Atividade do Extrato Bruto Diclorometânico de *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw., extraído do material vegetal obtido na segunda coleta, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração

A espécie *Boehmeria cylindrica* foi novamente coletada em Abril/2010, como citado anteriormente. Assim como na primeira coleta, o extrato diclorometânico apresentou perfil citostático (Figura 27), semelhante aos efeitos observados nos testes com as frações EBAEN e EBCA, bem como do extrato bruto (Figuras 10, 20, 21). O extrato etanólico obtido com o material vegetal da segunda coleta, não apresentou efeitos significativos (Figura 28).

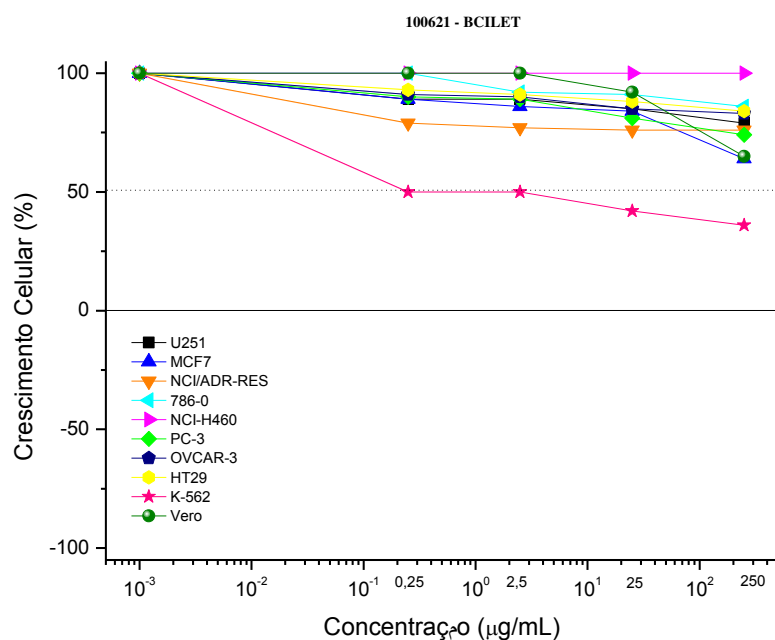


Figura 28 - Atividade do Extrato Bruto Etanólico de *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw., extraído do material vegetal obtido na segunda coleta, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração

O Paclitaxel é um quimioterápico utilizado na clínica que possui origem vegetal (Figura 29) e possui perfil de ação diverso ao da Doxorubicina e pode ser usado para a comparação com os resultados obtidos.

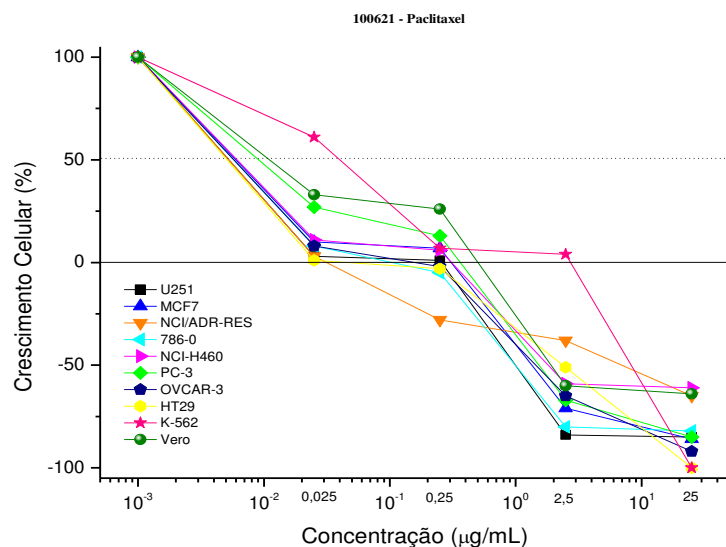


Figura 29 – Atividade citotóxica do Paclitaxel, utilizado como controle Positivo e de origem vegetal.

A fração neutra do extrato bruto etanólico (FAENBC) da *B. caudata* obtida por extração ácido-base, teve ação citotóxica principalmente após a concentração de 2,5 ug/mL, indicando que não apenas os alcalóides são responsáveis pela ação citotóxica obtida nos ensaios com o extrato bruto. Outro fator importante a ser destacado é que o perfil de ação da fração FAENBC (Figura 30) é semelhante ao perfil do extrato bruto diclorometânico da *Boehmeria caudata*. (Figura 25)

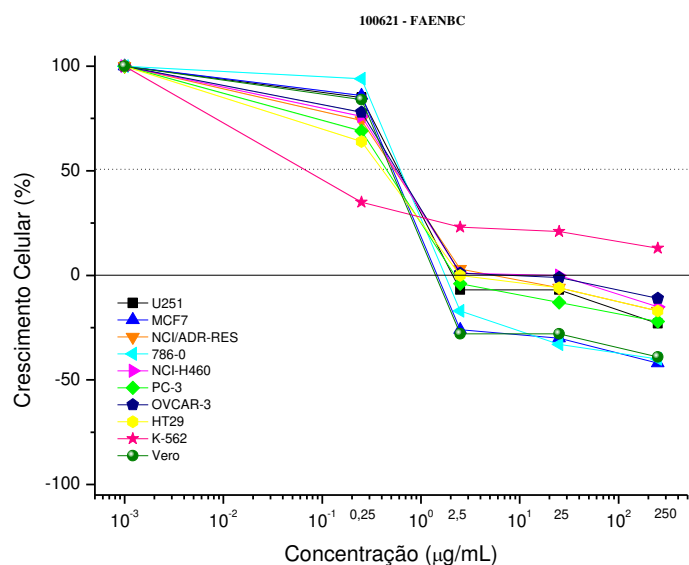


Figura 30 - Atividade da Fração FAENBC, obtida a partir de extração Ácido-Base, do EBE de *Boehmeria caudata* Sw., relacionando porcentagem de crescimento com a concentração

A fração FALCBC contém os alcalóides extraídos do extrato bruto etanólico de *Boehmeria caudata*, obtidos por extração Ácido-Base. Os alcalóides dessa fração, de forma semelhante ao extrato etanólico, já apresentaram inibição de crescimento ou morte celular na menor concentração (Figura 26). Da mesma forma que observado com a fração neutra (FAENBC), o perfil de ação dos compostos alcaloídicos é semelhante ao perfil do extrato bruto etanólico, indicando serem eles os promotores de tal efeito.

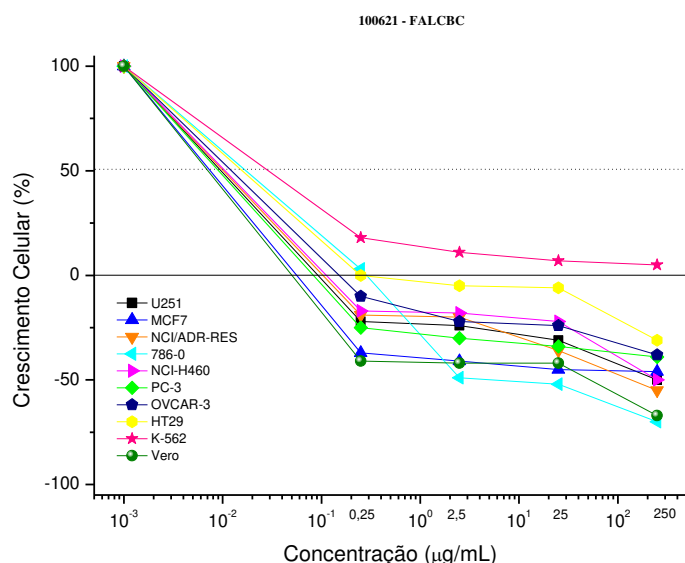


Figura 31 - Atividade da Fração FALCBC, obtida a partir de extração Ácido-Base, do EBE de *Boehmeria caudata* Sw., relacionando porcentagem de crescimento com a concentração

Segue tabela de TGI (Tabela 9), demonstrando a concentração necessária para que ocorra inibição de 100% do crescimento celular, para as duas espécies do gênero *Boehmeria* e alcalóides isolados. O extrato BCAUD foi citotóxico para todas as linhagens celulares estudadas, apresentando TGI abaixo de 25 µg/mL, com exceção das linhagens NCI/ADR-RES e HT29. O extrato BCAUET foi citotóxico para todas as linhagens celulares com TGI <0,25 µg/mL para as linhagens U251, MCF-7, OVCAR-03 e VERO, e as linhagens NCI/ADR-RES com TGI=40,1 µg/mL, 786-0 com TGI=0,271 µg/mL, NCI-H460 com TGI = 0,437 µg/mL, PC-3 com TGI= 0,557 µg/mL e HT29 e K562, com TGI = 250 µg/mL, porém graficamente apresentam crescimento inibido. A fração FALCBC, que contém os alcalóides, possui TGI <0,25 µg/mL para todas as linhagens, com exceção da HT29, com TGI =0,598 µg/mL e K562, com TGI = 250 µg/mL. Já a fração neutra, FAENBC possui TGI inferior a 25 µg/mL para a maioria das linhagens estudadas, com exceção da NCI-H460 (TGI=29,124 µg/mL), OVCAR-03 (TGI=33,379 µg/mL) e K562 (TGI=250 µg/mL).

Tabela 9 - TGI, ou inibição do crescimento total, dos extratos brutos obtidos do material vegetal provenientes da 2ª coleta e frações FALCBC e FAENBC, em µg/ml, de tratamentos realizados em 10 linhagens tumorais humanas

	U251	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-03	HT29	K562	VERO
BCAUD	7,774	5,556	104,967	11,824	14,594	13,213	16,424	65,712	2,267	5,428
BCAUET	<0,25	<0,25	40,1	0,271	0,437	0,557	<0,25	250	250	<0,25
BCYLD	>250	199,123	>250	>250	>250	>250	>250	246,28	26,282	>250
BCYLET	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
FAENBC	17,354	4,934	23,284	6,113	29,124	13,579	33,379	19,886	250	5,058
FALCBC	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,598	250	<0,25
Doxorrubicina	0,943	0,5714	10,522	2,763	0,294	3,567	2,654	8,431	0,337	14,354
Paclitaxel	0,059	0,091	0,029	0,063	0,100	0,169	0,074	0,062	0,461	0,292

Segue Tabela 10 com os valores de IG50 dos extratos de *Boehmeria cylindrica*, com efeitos citostáticos para todas as linhagens estudadas, com exceção da linhagem NCI-H460, que foi maior que 250 µg/mL.

Tabela 10 - GI 50 (Inibição de 50% do crescimento) dos extratos de *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw., em µg/ml, realizado em 10 linhagens tumorais humanas

	U251	MCF-7	NCI/A DR- RES	786-0	NCI- H460	PC-3	OVCAR -03	HT29	K562	VERO
BCYL D	59,22	26,992	54,701	112,64	>250	190,37	69,63	28,383	1,932	127,63
BCYLE T	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	0,629	>250

IX. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES.

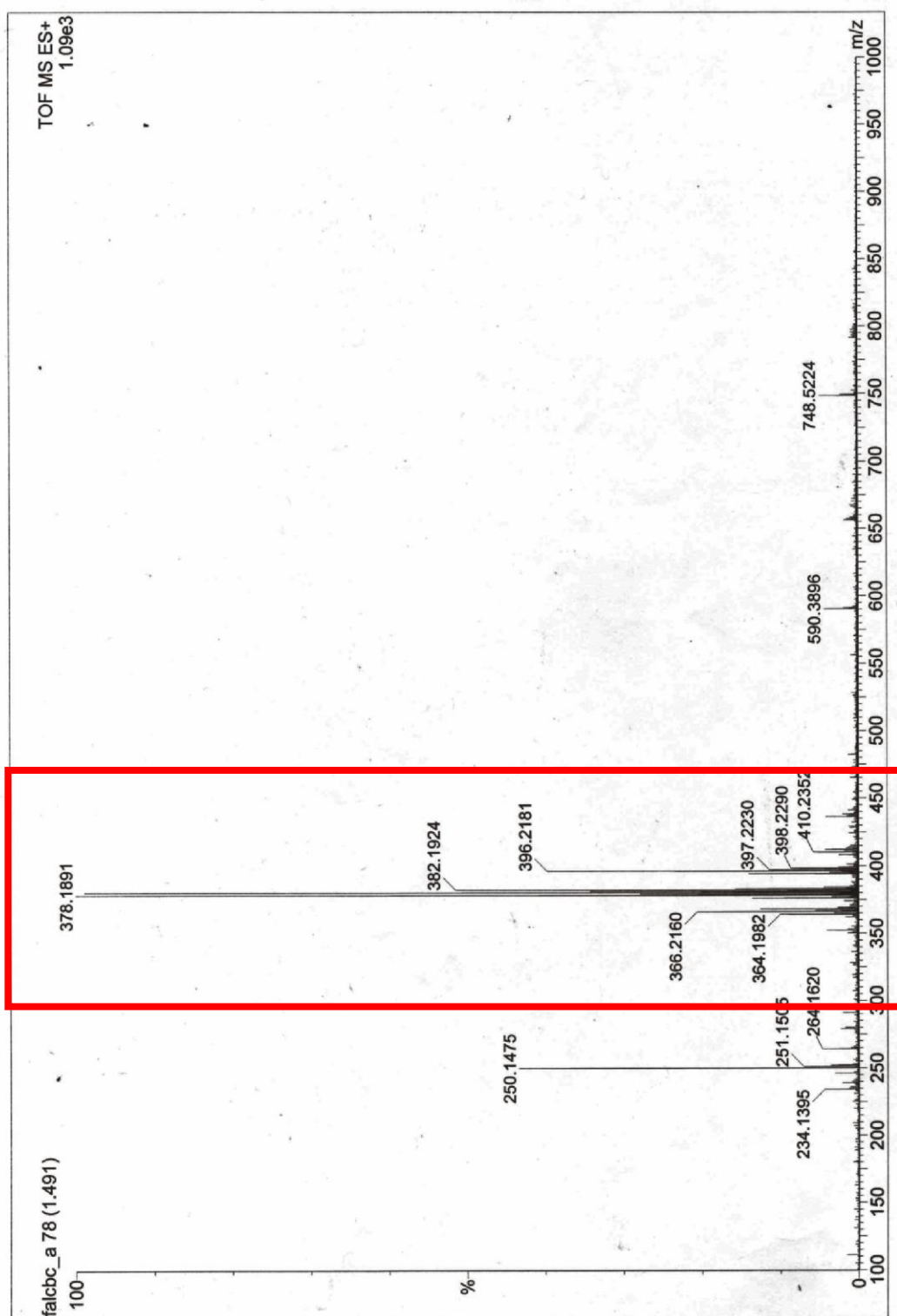
O gênero *Boehmeria* conta alguns estudos, onde alcalóides foram isolados e identificados (Cui, M., Wang Q., 2009; Luo et al, 2003). Portanto, a partir de dados previamente descritos na literatura, foi monitorada a presença dos alcalóides. Segue Tabela 11 com as massas encontradas e os compostos alcaloídicos identificados por ESI-MS

Tabela 11 - Dados de HRESI(+)-MS sumarizados de 8 substâncias identificadas na fração que demonstrou atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais humanas

Composto	Fórmula Molecular	[M+H] (<i>m/z</i>) calculado	[M+H] (<i>m/z</i>) experimental	E (ppm)
1	C ₂₃ H ₂₀ NO ₄	374,1392	***	***
2	C ₂₉ H ₂₄ NO ₄	450,1705	**	***
3	C ₂₃ H ₂₈ NO ₄	382,2018	382,1924	24,59
4	C ₂₉ H ₃₂ NO ₄	458,2331	***	***
5	C ₂₄ H ₂₈ NO ₄	394,2018	394,2122	26,38
6	C ₂₃ H ₂₈ NO ₃	366,2069	366,2160	24,84
7	C ₂₂ H ₂₀ NO ₃	346,1443	***	***
8	C ₂₉ H ₂₆ NO ₃	436,1913	436,2026	25,90
9	C ₂₂ H ₂₀ NO ₄	362,1392	362,1635	67,10
10	C ₂₄ H ₂₈ NO ₃	378,2069	378,2119	13,22
11	C ₂₃ H ₂₆ NO ₃	364,1913	364,1982	18,94
12	C ₂₄ H ₃₀ NO ₃	380,2226	380,2224	0,53

Alguns dos compostos possuem fórmula estrutural definida e já foram identificados, são eles: 5-Criptoleuridina, 10-Boehmeriasina A, 11- Boehmeriasina B e 12 – Hidroxicriptoleurina. A Figura 32 apresenta o *Full scan* por espectrometria de massas da fração FALCBC, com os alcalóides identificados e outras substâncias que são precursores das substâncias em destaque.

A



X. RESULTADOS IN VIVO DO EBD DE *BOEHMERIA CAUDATA*

Em virtude dos resultados obtidos em cultura de células tumorais humanas, o extrato bruto diclorometânico das folhas de *Boehmeria caudata* (BCAUD) foi avaliado em modelo de câncer experimental induzido pela inoculação de células de Ehrlich na pata de camundongos

O ensaio *in vivo* realizado com o extrato BCAUD contou com 3 doses, 50 mg/Kg (BCAUD50), 100 mg/Kg (BCAUD100) e 200 mg/Kg (BCAUD200), utilizando o 5-Fluoracil (20mg/Kg) como controle positivo e salina como controle negativo (veículo). O grupo tratado com 5-FU apresentou crescimento tumoral similar ao grupo salina, estabilizando o desenvolvimento do mesmo após o 10º dia. Apesar disso, não houve diferença significativa entre os crescimentos dos grupos salina e controle positivo ($p > 0,05$) (Figura 33).

O grupo BCAUD50 apresentou discreto efeito antitumoral, diminuindo o ritmo de crescimento do tumor nos primeiros dias. No entanto, o tumor voltou a aumentar o ritmo de crescimento atingindo os mesmo valores que o grupo controle no 15º dia. Houve diferença estatística somente no 10º dia ($p < 0,05$), indicando o potencial efeito, porém não foi capaz de reter o desenvolvimento tumoral (Figura 33).

O grupo BCAUD100, quando comparado ao grupo salina, apresentou efeitos significativos após o 10º dia de tratamento ($P < 0,05$), mantendo seus efeitos no 13º e 15º dias de tratamento ($p < 0,01$). Essa mesma dose, quando comparado ao grupo 5-FU, foi mais efetiva ($p < 0,05$), nos mesmos períodos considerados.

Já a dose de 200 mg/kg, como seria esperado, foi a que produziu maior inibição de crescimento com diferença significativa em relação ao grupo controle negativo no 7º dia de experimento ($p < 0,05$), que se manteve por todo o período experimental. Nos dias 10º, 13º e 15º, manteve o crescimento tumoral inferior ao produzido pelas outras doses e aos controles positivo ($p < 0,01$) e negativo ($p < 0,01$) (Figura 33).

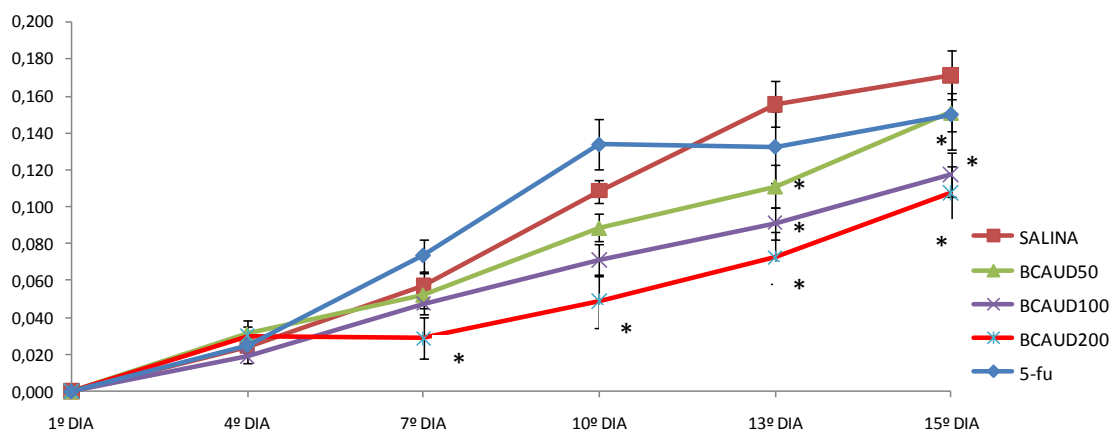


Figura 33 - Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (BCAUD 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg) e controles, onde a dose de 50mg/Kg teve significativa retenção do crescimento tumoral após o 13º dia (* = $p < 0,05$), a dose de 100 mg/Kg, impediu a evolução do tumor significativamente após o 10º dia ($p < 0,05$) e a dose de 200 mg/Kg apresentou efeitos significativos desde o 7º dia (*= $p < 0,01$) e impediu o aumento do volume tumoral.

XI. RESULTADOS IN VIVO DO EBE DE *BOEHMERIA CAUDATA* (BCAUET)

O ensaio *in vivo* realizado com o extrato BCAUET contou com 3 doses, 50 mg/Kg (BCAUET50), 100 mg/Kg (BCAUET100) e 200 mg/Kg (BCAUET200), utilizando o 5-Fluoracil como controle positivo e solução Salina 0,9% como controle negativo (veículo).

O extrato etanólico de *Boehmeria caudata* não apresentou efeitos significativos nos experimentos realizados (Figura 34), já que não foi capaz de reter o crescimento tumoral, acompanhando o desenvolvimento do grupo salina. Apenas a dose de 100 mg/Kg teve efeito até o 10º dia do tratamento ($p < 0,05$) e após essa fase, o efeito antitumoral não mais se manifestou.

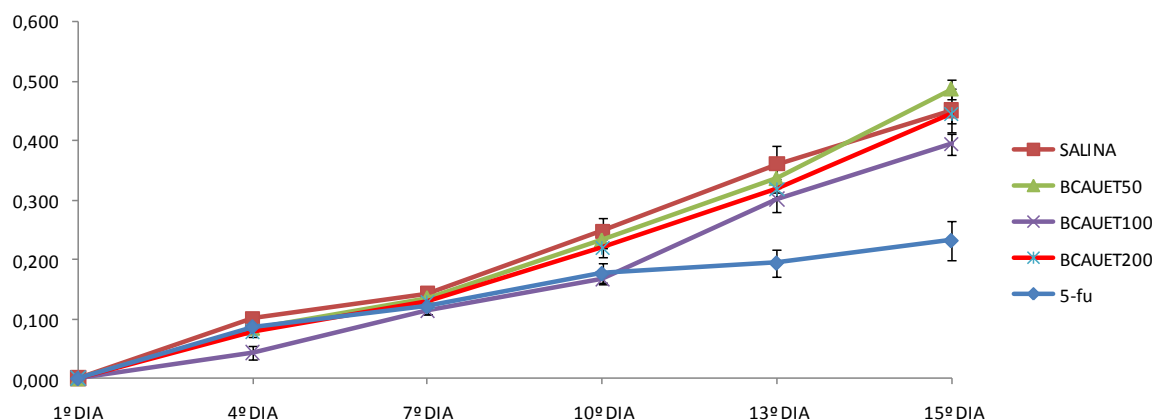


Figura 34 - Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (BCAUET 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg) e controles, onde nenhum dos grupos tratados, com exceção do controle positivo foram capazes de impedir o aumento do volume tumoral após o 10º dia.

XII. RESULTADOS IN VIVO DOS ALCALÓIDES EXTRAÍDOS DO EBE DE *BOEHMERIA CAUDATA* (FALCBC)

O ensaio *in vivo* realizado com o extrato alcaloídico (FALCBC), obtido por extração ácido-base, do extrato etanólico de *Boehmeria caudata*, contou com 3 doses, 5 mg/Kg (ALC5), 25 mg/Kg (ALC25) e 50 mg/Kg (ALC50), utilizando o 5-Fluoracil como controle positivo e solução Salina 0,9% como controle negativo (veículo).

A fração alcaloídica, FALCBC, não apresentou efeitos significativos nos experimentos realizados, já que não foi capaz de reter o crescimento tumoral, acompanhando o desenvolvimento do grupo salina. Apenas as doses de 25 e 50 mg/Kg tiveram efeitos no início do experimento ($p < 0,05$), até o 10º dia, e após essa fase, o efeito antitumoral não mais se manifestou.

O Controle positivo, 5-Fluoracil, foi efetivo na retenção do crescimento tumoral, mantendo-o em patamares inferiores ao grupo salina ($p < 0,05$ após o 7º dia de experimento).

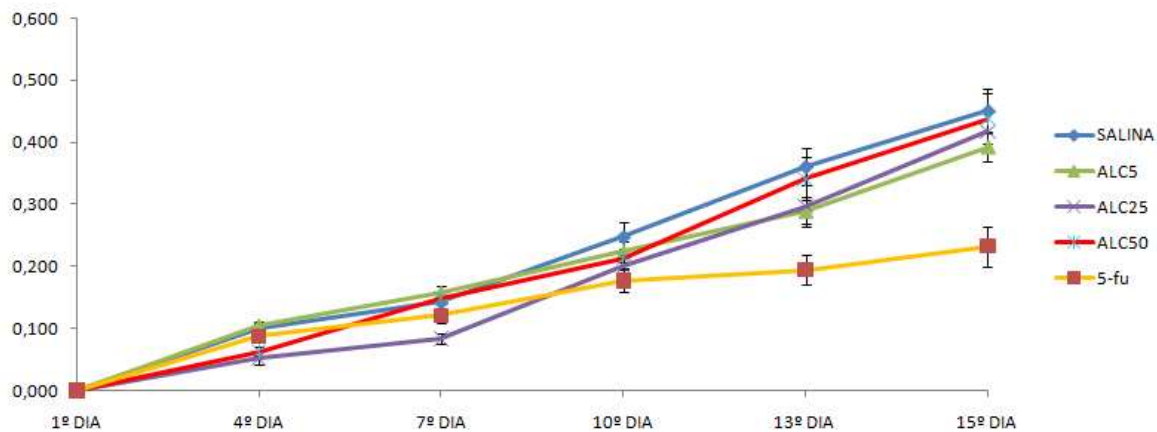


Figura 35 - Crescimento tumoral (Volume) durante o período experimental de 15 dias para 3 grupos tratados (Alc 5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg) e controles, onde nenhum dos grupos tratados, com exceção do controle positivo foram capazes de impedir o aumento do volume tumoral após o 10º dia.

DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que figura no ranking das maiores causas de morte no mundo e, por isso, muitas pesquisas são realizadas para a descoberta de novas drogas e formas de tratamento desta enfermidade. Estudos das últimas décadas revelaram que as espécies vegetais são fontes potenciais de novas drogas anticâncer, assim como fornecedoras de precursores de novos quimioterápicos (CRAGG & NEWMAN, 2009)

As espécies vegetais são importantes nesse contexto, pois contribuem com uma infinidade de substâncias, que podem ser ativas contra o câncer ou culminar no desenvolvimento de drogas sintéticas, baseadas em produtos naturais.

A Serra da Mantiqueira Paulista é considerada um “*hotspot*”, por conter uma grande variedade de espécies endêmicas. A população da região utiliza largamente as plantas medicinais como tratamento primário para diversos problemas de saúde, possuindo vasto conhecimento da flora da região. Mesmo assim, muitas plantas ainda são desconhecidas em seus efeitos terapêuticos, sendo essa a vantagem da modalidade de coleta randômica. O Projeto que deu base a esse trabalho utilizou essa metodologia (BIOPROSPECTA - FAPESP 04/15410-0), coletando uma série de plantas para o teste antiproliferativo em cultura de células tumorais humanas.

Foram selecionadas 10 plantas que apresentaram bons resultados nos testes preliminares. Dentre essas plantas, foram encontradas e coletadas cinco:

- *Miconia latecrenata* (DC.)Naudin (Melastomataceae),
- *Mollinedia schottiana* (Spreng.)Perkins (Monimiaceae)
- *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceae)
- *Boehmeria cylindrica* (Urticaceae)
- *Acnistus arborescens* (Solanaceae)

Todas essas plantas foram submetidas novamente aos testes *in vitro*, a fim de verificar se os resultados obtidos anteriormente se confirmavam. A repetição do teste se apresenta importante, pois muitas plantas sofrem interferências sazonais na produção dos seus metabólitos secundários, como acontece com a maioria das espécies reconhecidamente medicinais (Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007).

A triagem inicial da atividade anticâncer foi realizada com os extratos brutos diclorometânico e etanólico obtidos sequencialmente das folhas secas, através de testes de citotoxicidade *in vitro*, em cultura de células tumorais humanas. Os extratos diclorometânicos têm a capacidade de extrair substâncias de baixa a média polaridade, enquanto os etanólicos extraem substâncias de média e alta polaridade. Alguns compostos provenientes desses extratos possuem efeitos citotóxicos, ou seja, substâncias que possuem toxicidade em relação às células, levando-as a morte celular. Outras são citostáticas, pois impedem a proliferação das células cancerosas, diminuindo as taxas de crescimento

Das cinco plantas testadas, quatro apresentaram resultados satisfatórios, sendo elas *Acnistus arborescens*, *Boehmeria caudata*, *Boehmeria cylindrica* e *Miconia latecrenata*.

A espécie *Miconia latecrenata*, faz parte de um gênero com mais de 1000 exemplares e não possui estudos para atividade anti-câncer. Existem outros efeitos já documentados para espécimes do mesmo gênero, como analgésico, anti-tumoral, anti-microbiana, dentre outros, tornando-a uma espécie promissora (Serpeloni, J.M., et al., 2008). No entanto essa espécie não pôde ser selecionada devido à falta de material vegetal suficiente para os estudos subsequentes.

A espécie *Acnistus arborescens*, é conhecida na região de coleta como Manianeira e é abundante. Existem estudos, e alguns realizados por grupos brasileiros, que tratam da atividade anticâncer dessa espécie vegetal. Ainda, existem outros efeitos comprovados contra o *Trypanossoma cruzi*, parasita responsável pela doença de Chagas (Vieira, et al., 2008). Estudos recentes (Cordero, C.P. et al., 2009; Veras, M.L. et al., 2004) apresentam vários compostos isolados dessa espécie com efeitos citotóxicos, e atividade semelhante à obtida no presente estudo. Muitas dessas substâncias são lactonas esteroidais, que possuem diferentes atividades, dentre elas a seletividade para células de leucemia (Rocha, D.D. et al., 2006).

O extrato diclorometânico das folhas da *Boehmeria cylindrica*, produziu inibição da proliferação celular dependente da concentração e seletividade. Como a pesquisa bibliográfica nas bases de dados ISI, SCOPUS ou SCIELO, não retornou resultados, essa espécie foi uma das selecionadas para dar prosseguimento ao estudo

O extrato diclorometânico apresentou atividade citostática em cultura de células tumorais humanas (Figura 4 e Tabela 4) e supõe-se que os compostos responsáveis por essa atividade são os de baixa polaridade. Compostos apolares geralmente estão envolvidos em diversas atividades biológicas devido ao seu caráter lipossolúvel, capaz de atravessar a membrana plasmática celular.

Os valores de GI 50 (Tabela 4) demonstram que, em todas as linhagens que foram submetidas ao teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais, concentrações de até 34 µg/ml, inibiram em 50% o crescimento das células tumorais, exceto a linhagem 786-0. Esse extrato além da inibição de crescimento produziu morte celular para as linhagens de cólon (HT29) ovário resistente (NCIADR/RES), fibroblasto (VERO) e ovário (OVCAR-03).

Os resultados obtidos nos testes em cultura de células motivaram a seqüência do trabalho com o objetivo de verificar se esses resultados são reproduzidos em modelo experimental utilizando animais de laboratório. O teste *in vivo* é fundamental, pois muitos compostos com excelente atividade *in vitro* perdem seu efeito, por metabolização ou baixa biodisponibilidade.

Os testes de toxicidade aguda foram realizados a fim de determinar a dose máxima efetiva, com toxicidade aceitável, para o tratamento crônico. Esse experimento determinou que a dose máxima efetiva para uso no modelo experimental de câncer é de 200mg/Kg. Além dessa dose foram utilizados grupos experimentais tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg do BCYLD. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina 0,9% e o positivo com 5-Fluoracila a 20 mg/Kg. O modelo utilizado para o ensaio antitumoral *in vivo*, foi o tumor sólido de Ehrlich em patas de camundongos onde se mede o volume tumoral pela diferença entre a medida basal e as medidas realizadas a cada 3 dias.

O tumor de Ehrlich é um tipo de câncer de crescimento rápido e comportamento agressivo. Esse tumor é capaz de crescer em praticamente todas as linhagens de camundongos, sugerindo que o reconhecimento e as respostas imunes desse tumor são independentes do Complexo de Histocompatibilidade (Segura et al, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que a resposta inflamatória neutrofílica é essencial para controlar o tumor de Ehrlich. No entanto, o grande influxo dessas células promove o

desenvolvimento tumoral (Bergami-Santos et al, 2004). Esse efeito é provavelmente relacionado com a angiogênese e fatores de crescimento induzidos pela inflamação, que são necessários para o desenvolvimento tumoral. A implantação do tumor de Ehrlich por si só induz uma inflamação local, com permeabilidade vascular aumentada, resultando em intensa formação de edema, migração celular e formação de fluído ascítico, essencial para o crescimento tumoral, já que constitui a fonte nutricional direta para as células tumorais (Fecchio et al, 1990; Gupta et al, 2004). Drogas com ação antiinflamatória também inibem o crescimento desse tumor (Vendramini-Costa, D.B. et al, 2010).

Na Figura 22 é possível observar claramente relação dose-resposta na inibição do crescimento do tumor de pata de camundongo induzido pelas células de Ehrlich do extrato bruto diclorometânico, administrado pela via intraperitoneal. O grupo BCYL 200mg/Kg apresentou crescimento muito inferior aos outros grupos, incluindo os controles positivos e negativos. Nota-se que o crescimento fica estabilizado desde os primeiros dias do tratamento, até o ultimo dia, apresentando diferença estatística entre o crescimento do grupo tratado e do grupo Salina ($p < 0,01$).

Esses resultados sugerem um grande potencial para o extrato bruto diclorometânico de *Boehmeria cylindrica*, já o mesmo foi capaz de diminuir a proliferação celular de um tipo de tumor agressivo, aumentando a biblioteca de possíveis novos quimioterápicos provenientes de plantas.

Os extratos brutos diclorometânico (BCAUD) e etanólico (BCAUET) de outra espécie de *Boehmeria*, a *B. caudata*, apresentaram resultados significativos tanto nos testes *in vitro* como nos testes *in vivo*. É possível observar que os dois extratos apresentaram atividade antitumoral nos ensaios em cultura de células, porém com perfis de ação diferentes. O BCAUD possui ação anti-proliferativa para todas as linhagens testadas, e a concentração necessária para a inibição de 100% do crescimento – TGI – varia entre 2,26 µg/ml a 16,424 µg/ml, com apenas duas linhagens onde o TGI é mais alto, sendo elas NCI/ADR-RES (Ovário Resistente), contando com 104,967 µg/ml e HT29, com 65,72 µg/ml.). Esse experimento demonstra a potência do extrato diclorometânico obtido com essa espécie quando comparado ao extrato diclorometânico da *B. cylindrica*. Já o extrato etanólico (BCAUET) possui ação anti-proliferativa, em cultura de células, para todas as

linhagens testadas. Os TGIs estão, em sua maioria, inferiores a 1 µg/ml, com exceção das linhagens HT29 (Cólon) e K562 (Leucemia), onde o TGI atinge 250 µg/ml, porém graficamente a proliferação celular foi inibida nas menores doses, mantendo uma taxa de crescimento ou inibição constante. Comparando os dados com os quimioterápicos utilizados como controle, paclitaxel e doxorubicina, observa-se que os valores de TGI estão próximos aos da doxorubicina em parte dos casos, demonstrando o potencial quimioterápico dessa amostra, pois em um extrato bruto estão presentes centenas de substâncias além das ativas. Portanto, o isolamento dos princípios ativos pode levar à identificação de moléculas de elevada potência.

A indicação da presença de alcalóides nos extratos etanólicos de *Boehmeria caudata* é de extrema importância, pois essa categoria de substâncias possui uma variedade de efeitos descritos, desde para o tratamento de diabete, até efeitos contra células cancerígenas, como a camptotecina, substância inibidora de topoisomerase I, responsável pelo relaxamento da superespiralização do DNA devido aos processos de transcrição e replicação (Bredholt, T. et al, 2009; Pommier, Y., 2006). Outros exemplos já utilizados clinicamente no tratamento do câncer são os alcalóides provenientes da *Vinca*, vincristina e vimblastina (Ishikawa, H. et al, 2009).

Alcalóides de caráter citotóxico em cultura de células cancerosas foram isolados de uma espécie de mesmo gênero, denominada *Boehmeria siamensis*, originária da China. Nessa espécie foram identificados alcalóides do grupo fenatroquinolizidinicos, denominados de Boehmeriasinas A e B (Luo, Y. et al., 2003). O mesmo grupo que isolou essas substâncias, realizou testes em células de câncer de mama, linhagem MDA-MB-231, determinando que essa droga atua na fase G1 do ciclo celular, inibindo a proliferação das células (Yan, J. et al., 2006).

A extração ácido-base deu origem a duas frações: uma delas contém os alcalóides (EBCA) e a outra aos compostos neutros (EBAEN). A fração EBCA apresentou seletividade para duas linhagens celulares, sendo elas U251(Glioma) e UACC-62 (Melanoma) e os valores de GI50 para essas duas linhagens são de 136,4242 µg/ml e 216,8397 µg/ml respectivamente. Apesar de outros gêneros da mesma espécie possuírem alcalóides citotóxicos, os obtidos da *B. cylindrica*, não produziram aumento da atividade

específica observada com o extrato bruto diclorometânico, podendo ser descartados como os principais responsáveis pela atividade anticâncer (Figura 20 e 21).

A fração EBAEN, contendo os compostos neutros apresentou resultados mais significativos que a fração alcaloídica, já que foi seletiva para as linhagens U251 (Glioma), UACC-62 (Melanoma), PC-3 (Próstata), HT-29 (Cólon) e K562 (Leucemia), com os valores de IG50 de 102,63 $\mu\text{g/ml}$, 211,11 $\mu\text{g/ml}$, 180,55 $\mu\text{g/ml}$, 227,0 $\mu\text{g/ml}$ e 133,35 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. O Espectro maior de seletividade da fração neutra pode indicar que existem outros componentes, que não os alcalóides, responsáveis pela ação citostática do EBD de *Boehmeria cylindrica*.

Outro fator importante é que no extrato etanólico de *Boehmeria caudata* existem alcalóides. Luo, Y. et al, 2003, indicam que na espécie *Boehmeria siamensis*, em seu extrato etanólico, existem diversos compostos do tipo alcalóides com efeitos citotóxicos em cultura de células, assim, levou a prospecção desses compostos em planta do mesmo gênero no presente estudo. Esse extrato, de forma inversa aos alcalóides extraídos da *B. cylindrica*, foi o que apresentou maior potência em cultura de células tumorais. A extração ácido-base foi realizada a fim de obter a fração alcaloídica, presente nesse extrato. A fração FALCBC (Figura 31), que contém os alcalóides, foi mais potente que o extrato bruto diclorometânico e que a fração neutra, já que a morte celular foi observada em concentrações inferiores a 0,25 $\mu\text{g/ml}$, porém foi similar ao efeito obtido pelo EBE de *Boehmeria caudata* (Figura 26). O valor de TGI da fração FALCBC é, em sua maioria, inferior a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ para todas as linhagens celulares testadas, com exceção de HT29 (Cólon) e K562 (Leucemia). Nesse caso é possível afirmar que os alcalóides são os principais responsáveis pela atividade anticâncer dos extratos etanólicos da *B. caudata*, pois a fração rica nessas substâncias aumentou em a atividade específica.

A fração neutra FAENBC (Figura 30) possui perfil de ação similar ao extrato bruto diclorometânico (Figura 25), indicando a presença de princípios ativos semelhantes, atuando em todas as linhagens celulares que foram testadas. Os valores de TGI dos dois extratos são similares, exceto para a linhagem de leucemia (K562). Esses resultados indicam também a presença de outros compostos com atividade antiproliferativa.

A Fração alcaloídica foi submetida à espectrometria de massas, permitindo a identificação, através de sua massa molecular, das substâncias que compunham a mistura da fração selecionada. Assim, foram identificadas 8 substâncias de 12 selecionadas com base em informações de estudos prévios (Cui, M & Wang Q., 2009; Luo, Y. et al, 2003). Das 8 substâncias identificadas, 4 são descritas e foram isoladas e/ou sintetizadas (Cui, M & Wang Q., 2009; Dumoulin, D. et al, 2010; YAN, J., et al, 2006). Os alcalóides identificados foram Boehmeriasina-A, Boehmeriasina-B, Criptoleurina e Hidroxicriptoleurina e classificam-se como alcalóides fenantroquinolizidínicos, existentes em pequena quantidade, nas famílias Asclepiadacea, Lauracea, Vitacea e Urticacea, e receberam pouca atenção na pesquisa de prospecção por novas substâncias. No entanto, a Boehmerisina-A foi testada em cultura celular (Yan, J., et al, 2006; Luo, Y. et al, 2003) provando possuir atividade antiproliferativa *in vitro*, inibindo o crescimento de células cancerígenas de pulmão, cólon, mama, próstata, rim e leucemia.

Os alcalóides mencionados foram extraídos e identificados em experimentos com a planta *Boehmeria siamensis*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa (Dumoulin, D. et al, 2010; Yan, J., et al., 2006.; Luo, Y. et al, 2003.). Outra planta do mesmo gênero, *Boehmeria pannosa* (Cai, X.F. et al, 2006) possui alguns alcalóides da mesma classe, com potente ação antitumoral. No entanto, os mesmos alcalóides foram isolados de outra espécie, do mesmo gênero, a *Boehmeria caudata*, no presente estudo, coletada em território brasileiro. Assim, possivelmente a produção desses metabólitos não esteja relacionada ao regionalismo, sendo intrínseco ao gênero.

O EBD de *Boehmeria caudata* foi avaliado em animais inoculados com células do tumor de Ehrlich no coxim plantar da pata direita de camundongos. A resposta do tumor a droga se fez de maneira dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose menor o crescimento tumoral. A dose de 50 mg/Kg (BCAUD50) igualou-se ao controle positivo no 15º do experimento. A Dose de 100 mg/Kg (BCAUD100), apresentou efeito antiproliferativo após o 10º dia do tratamento. A dose de 200 mg/Kg, possui atividade antitumoral significativa após o 7º ($P < 0,05$), mantendo a patamares inferiores aos controles tanto positivo quanto negativo até o 15º dia ($p < 0,01$). A eficácia do tratamento *in vivo* do

EBD de *Boehmeria caudata*, condiz com os resultados dos testes *in vitro* e sugere que os princípios ativos têm biodisponibilidade suficiente para atingir o tumor.

Apesar dos testes *in vitro* se mostrarem promissores e estarem corroborados por resultados existentes na literatura (Yan, J., et al, 2006.; Luo, Y. et al, 2003), o extrato bruto etanólico da *B. caudata* (BCAUET) que originou os alcalóides e a fração alcaloídica (FALCBC), obtida desse extrato não reproduziram *in vivo* os efeitos observados em cultura de células tumorais (Figuras 34 e 35). Já o extrato bruto diclorometânico dessa espécie produziu inibição do crescimento relacionada à dose de maneira similar ao efeito observado pelo extrato diclorometânico da *B. cylindrica*. Esses dados sugerem que os alcalóides podem estar tendo dificuldades para atingir o tumor ou então sendo eliminados rapidamente do organismo.

No entanto, existe um componente antiinflamatório integrante do tumor de Ehrlich e devido a sua inoculação, existe resposta inflamatória significativa até o 10º dia do experimento (Fecchio et al. 1990; Gupta et al., 2004). Após esse período as células tumorais têm crescimento exponencial, e de acordo com os experimentos expostos em Figuras 34 e 35 da fração alcaloídica (FALCBC) e do extrato EBE de *Boehmeria caudata* (BCAUET), houve diferença significativa entre o desenvolvimento dos controles positivo e negativo e a maior dose dos tratamentos principalmente no 10º dia, após esse dia não houve diminuição do crescimento tumoral. Portanto, existe potencial anti-inflamatório das drogas vegetais testadas, e estudos nesse sentido precisam ser realizados.

Em um regime terapêutico ideal, a droga deve atingir o local de ação e não ser degradada e/ou excretada rapidamente, ou o fator terapêutico vai ser transiente ou com muitas limitações (Ebadi, M. 2007).

As drogas inoculadas via intraperitoneal são absorvidas diretamente pela corrente sanguínea, sem precisar passar pelo aparelho digestivo, principalmente o estômago que possui pH ácido, e enfrentar pHs que podem inativar a mesma. O mesmo ocorre com a inoculação subcutânea, porém a substância inoculada é absorvida lentamente. Já na via oral, a droga passa pelo trato gastrointestinal e pode ser degradada. Baseando-se nessa premissa, seria natural supor que a droga teria efeito total ao ser absorvida pelo peritônio, porém, existem outras barreiras que podem degradar as drogas e que precisam ser

consideradas, são elas os Rins, responsáveis pela excreção, a Barreira Hemato-encefálica que impede a passagem de substâncias nocivas ao cérebro, e o fígado, responsável pela desintoxicação do organismo e degradação de droga (Ebadi, M. 2007; Rang, H.P. et al., 2007).

As drogas são distribuídas de maneira não uniforme no organismo, e essa distribuição é dependente de suas características físico-químicas, como se são lipofílicas ou não, peso molecular, e da afinidade da droga com determinados receptores. Ainda, a distribuição da mesma depende de caracteres fisiológicos, como a irrigação sanguínea dos tecidos, composição química dos órgãos e tecidos. Biodisponibilidade é um termo farmacológico, definido pela velocidade e extensão, com que uma substância é absorvida em sua forma farmacologicamente ativa, a partir de um fármaco, e se torna disponível no local de ação. A biodisponibilidade também é dependente de características físico-químicas da substância em questão, e das características fisiológicas. Vale ressaltar que a injeção pela via intraperitoneal leva a uma biodisponibilidade teórica de 100%.

Outro fator importante, diz respeito à capacidade da droga se ligar ao receptor por períodos mais longos. O complexo fármaco-receptor está em equilíbrio com concentrações de fármacos livres, nos sítios de efeito, (Vauquelin, G., Charlton, S. J., 2010), assim, permitindo que a ação esperada da droga-teste se estenda.

A biotransformação de drogas é outro processo importante que através de ações enzimáticas produzem alterações da molécula que têm como objetivo final facilitar a excreção droga do organismo. Os flavonóides do Chá verde e Ácidos Clorogênicos do café, passam por extenso metabolismo, após ingestão oral, promovendo a produção de ácidos fenólicos no cólon, pela microbiota, que serão absorvidos (Crozier, A. et al, 2010), demonstrando que o metabolismo de substâncias pode levar a produção de substâncias benéficas. Muitas drogas em virtude de polaridade elevada e hidrossolubilidade são eliminadas sem alterações quando da passagem pelo processo de filtração renal. A conversão de substâncias que não são excretadas facilmente ocorre predominantemente de duas maneiras, Hepática e não-Hepática (Leucuta, S.E., Vlase, L,2006).

O metabolismo de drogas que ocorre no fígado corresponde à maior parte da biotransformação ocorrida no organismo, sendo realizada na sua primeira etapa pela família de enzimas e isoenzimas do citocromo P-450, responsáveis pela oxidação de diversas drogas. A via não-hepática pode ocorrer no plasma e pulmão. As drogas, na maioria dos casos, são convertidas em substâncias hidrossolúveis e excretadas pelos rins. As drogas quando metabolizadas podem perder afinidade com o receptor por alterações em sua carga, forma tridimensional e composição química (Leucuta, S.E.; Vlase, L, 2006; Rang, H.P. et al, 2007).

Os tumores sólidos, assim como o tumor de Ehrlich aplicado nas patas dos camundongos, apresentam diversas barreiras que dificultam o acesso da droga às células, e consequentemente dificultam o tratamento. A droga deve deixar os vasos sanguíneos que irrigam o tumor e atingir todas as células tumorais, e o pH do microambiente do tumor pode influenciar a citotoxicidade de drogas anticâncer, já que as moléculas difundem mais eficientemente na forma não carregada. Devido ao baixo pH extracelular e o pH neutro, intracelular, drogas básicas, como a doxorubicina, vincristina e vinblastina, estão protonadas e demonstram efeitos celulares diminuídos (Tredan, O. et al, 2007). Assim como a vincristina e vinblastina, as substâncias isoladas (Figura 32) são alcalóides de caráter básico e sua ação pode ter sido prejudicada pela acidez extracelular tumoral, já que nos testes *in vitro*, a droga apresentou potencial citotóxico, com os TGIs <0,25 na maioria dos casos (Figura 31 e Tabela 9).

Os alcalóides provenientes do extrato etanólico de *Boehmeria caudata* tem caráter básico e, por originarem-se do extrato etanólico, é possível concluir que são polares, levando em consideração que o extrato etanólico tem por característica a extração de substâncias polares (Falkenberg, M.B., et al, 2007). Substâncias polares são normalmente mais hidrossolúveis. Os radicais hidroxila e Metoxila, presentes em sua estrutura molecular (Figura 31) corroboram a suposição de polaridade dessas substâncias, e dessa maneira é possível supor que essas substâncias, ao serem inoculadas em animais, foram excretadas facilmente, diminuindo sua concentração plasmática, antes de apresentarem seu potencial citotóxico, devido a sua hidrossolubilidade (Leucuta, S.E., Vlase, L, 2006; Rang, H.P. et al, 2007).

Entendendo os processos de biodisponibilidade e biotransformação podemos inferir o motivo pelo qual os alcalóides da fração FALCBC e o Extrato Bruto Etanólico de *Boehmeria caudata* não apresentaram efeitos significativos nos ensaios *in vivo*, enquanto os ensaios *in vitro* foram muito promissores. Ainda, a concentração utilizada para os testes pode ter sido inferior à concentração efetiva, mesmo que os testes de Toxicidade aguda tenham sugerido as concentrações utilizadas.

Outro fator a considerar, é que as drogas não atingiram o sítio ativo, pois havia a necessidade de interagir com outras substâncias, facilitando o transporte da droga, ou, caso tenha atingido o sítio, a presença de adjuvantes ou ligantes para a efetiva interação do princípio ativo e seu receptor. Uma alternativa para aperfeiçoar a biodisponibilidade da droga é a sua complexação com outros fármacos, denominando-se co-droga - do inglês *codrug* - levando a uma melhor absorção e/ou efeito. Essa técnica foi aplicada em tratamentos para artrite reumatóide, onde o Benorilato, um produto da esterificação do paracetamol e o Ácido Acetilsalicílico foram conjugados (Das, S. et al, 2010).

CONCLUSÃO

Inicialmente foram selecionadas 10 espécies vegetais com efeitos promissores. Dessas, 2 espécies foram escolhidas para dar prosseguimento ao estudo, *Boehmeria cylindrica* e *Boehmeria caudata*.

Observou-se que o EBD de *Boehmeria cylindrica* apresentou inibição do crescimento celular em cultura de células e nos testes *in vivo*, a inoculação do extrato impediu a evolução tumoral principalmente na maior dose, de 200 mg/Kg.

Os Extratos EBE e EBD de *Boehmeria caudata*, foram citotóxicos em cultura de células, levando à diminuição da proliferação celular. Já nos ensaios *in vivo* apenas o EBD apresentou resultados significativos. A concentração utilizada para os testes pode ter sido inferior à concentração efetiva, mesmo que os testes de toxicidade aguda tenham sugerido as concentrações utilizadas.

Mais estudos são necessários para definir o princípio ativo dos extratos EBD de *Boehmeria caudata* e *Boehmeria cylindrica*. Estudos objetivando novos meios de tratamento (via Subcutânea e Oral) se fazem necessários, com a fração FALCBC e EBE de *Boehmeria cylindrica*, além de estudos de síntese de análogos mais resistentes a biotransformação e dessa maneira possibilitar a seqüência deste trabalho, além de adequar o modelo experimental a fim de atingir os objetivos propostos. Ainda, estudos são necessários a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade nos EBD de *Boehmeria caudata* e *Boehmeria cylindrica*.

REFERÊNCIAS

1. ALBERTS, B. *et al* Biologia Molecular da célula. 5º ed. Porto Alegre: Artmed. 2008.
2. BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci.* v. 75, p.245– 255. 2004.
3. BRANDÃO, M.G.L. et al.. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.141-148, 2008.
4. BREDHOLT, T.; DIMBA, E.A.O.; HAGLAND, H.R.; WERGELAND, L.; SKAVLAND, J.; FOSSAN, K.O.; TRONSTAD, K.J.; JOHANNESSEN, A.C.; VINTERMYR, O.K.; GJERTSEN, B.J. Camptothecin and khat (*Catha edulis* Forsk.) induced distinct cell death phenotypes involving modulation of c-FLIP_L, Mcl-1, procaspase-8 and mitochondrial function in acute myeloid leukemia cell lines. *Molecular Cancer*. v. 8, n. 101. 2009.
5. BROWN, J.M. E ATTARDI, L.D., The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Nat. Rev. Cancer*, v.5, n.3, p.231-237, 2005.
6. CAI, X. F.; JIN, X.; LEE, D.; YANG, Y.T.; LEE, K.; HONG, Y.S.; LEE, J.H., LEE, J.J. Phenanthroquinolizidine Alkaloids from roots of *Boehmeria pinnosa* potentially inhibit Hypoxia-Inducible Factor-1 in AGS Human Gastric Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* v.69, p.1095-1097, 2006.
7. CARVALHO, J.E., Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Revista Multiciência*. v.7, 2006.
8. CHABNER, B. A. E ROBERTS JR., T. G., Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v.5, p.65- 71, 2005.
9. COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* v.326, p.1-10, 1997.
10. CORDERO, C.P.; MORANTES, S.J.; PAEZ, A.; RINCÓN, J.; ARISTIZÁBAL, F.A. Cytotoxicity of withanolides isolated from *Acnistus arborescens*. *Fitoterapia*. v.80, p.364-368, 2009.
11. CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J., Impact of natural products on developing new Anti-cancer agents. *Chemistry Reviews*. v.109, p. 3012-3043, 2009.
12. CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*. v. 8, p. 313-331, 2009.
13. CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J., Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. v.100, p.72-79, 2005.
14. CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular aspects of medicine*. v. 31, p.446-467, 2010.

15. CUI, M.; WANG, Q. Total Synthesis of Phenanthro-quinolizidine Alkaloids: (±)-Cryptopleurine, (±)-Boehmeriasin A, (±)-Boehmeriasin B and (±)-Hydroxycryptopleurine. *Eur. J. Org. Chem.* p.5445-5451. 2009.
16. DAS, S.; DHANAWAT, M.; DASH, B.; NAGARWAL, R.C.; SHRIVASTAVA, S.K. Codrug: an efficient approach for drug optimization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* v. 41, p.571-588. 2010.
17. DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between?. *Nature*, v.10, p.728-733, 2010.
18. DUMOULIN, D.; LEBRUN, S.; COUTURE, A.; DENLAU, E.; GRANDCLAUDON, P. First Asymmetric Synthesis of Boehmeriasin A. *Eur. J. Org. Chem.*, p.1943-1950, 2010.
19. DUVOIX, A. et al. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. *Cancer Lett.*, v.223, p.181-188, 2005.
20. EBADI, M. The Pharmacokinetic Basis of Therapeutics *in* Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton - USA. Chapter 1, p. 1-23, 2007.
21. FADEEL, B.; ORRENIUS, S., Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. *J. Intern. Med.* v.258, p. 479-488, 2005.
22. FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª Ed. Porto Alegre-RS: Editora da UFRGS, 2007. p.229-245.
23. FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflam.* v. 14, p.125-131. 1990.
24. FERLAY, J.; HAI-RIM, S.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*, v.127, p.2893-2917. 2010.
25. FERRO, D. *Fitoterapia: Conceitos Clínicos*, 1ª Ed., Ribeirão Preto - SP, Ed. Atheneu, 2006.
26. GERAN, R. I.; GREENBERG, N. H.; MACDONALD, M. M.; SCHUMACHER, A. M.; ABBOTT, B. J. *Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems*, 3º ed. Bethesda, Maryland, 1972.
27. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova.* v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.
28. GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª Ed. Porto Alegre-RS: Editora da UFRGS, 2007. p.13-28.

29. GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M.L.M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *J. Pharmacol. Sci.* v.94, p. 177–184. 2004.
30. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A., The Hallmarks of cancer. *CELL*, v. 100, p. 57-70, 2000.
31. HENRY, R. J. *Clinical Chemistry Principles and techniques*, 2º ed. Ed. Hargeston: Harper & How, 1974.
32. HOLBECK, S. L. “Update on NCI in vitro drug screen utilities”. *Eur. J. Cancer*, v.40, p.785-793 ,2004.
33. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), 2005. Site: <http://www.inca.gov.br>.
34. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), 2010. Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasi. Site: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>
35. ISHIKAWA, H.; COLBY, D.A.; SETO, S.; VA, P.; TAM, A.;KAKEI, H.; RAYL, T.J.; HWANG, I.; BOGER, D.L. Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. *J. Am. Chem. Soc.* v.131, p.4904-4916, 2009.
36. JACHAK, S.M.; SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Cur. Sci.*, v.92, n.9, p. 1251-1257, 2007.
37. JOHANSSON, M.; PERSSON, J.L., Cancer therapy: Targeting cell cycle regulators. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*.v.8, p.723-731, 2008
38. KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; FRUSSA-FILHO, R., DAGLI,M.L.Z. Effect of haloperidol on the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sci.* v.60, p.69– 74. 1997.
39. LAMBERT, J.D. et al. “Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations”. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 81, p. 284-292, 2005.
40. LAPA, A.J. et al., *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. In: SIMÕES, C.M.O. et al.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª Ed. Porto Alegre-RS: Editora da UFRGS, 2007. p.247-262.
41. LEUCUTA, S.E.; VLASE, L. Pharmacokinetics and metabolic drug interactions. *Current Clinical Pharmacology*. v. 1, p.5-20, 2006
42. LITCHFIELD JR., J.T. & WILCOXON, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.96, p.99-110, 1949.
43. LORENZI, H., *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. 2ª Ed. Nova Odessa, SP:Instituto Plantarum, 2008.
44. LUO, J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J., Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *CELL*, v. 136, p.823-833, 2009.

45. LUO, Y.; LIU, Y.; LUO, D.; GAO, X.; LI, B.; ZHANG, G. Citotoxic alkaloids from *Boehmeria siamensis*. *Planta Medica*. v. 69, p.842-845, 2003
46. MA, X.; WANG, Z. Anticancer Drug Discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*. v.14, n. 23/24, p.1136-1142, 2009.
47. MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat. Rev. Cancer*, v.2, n.2, p.143-148, 2002.
48. MONKS A. et al., Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*. v.83, p. 757-766, 1991.
49. MORRISON, W.B. Cancer Chemotherapy: An Annotated History. *J. Vet. Intern. Med*. v. 24, p. 1249-1262, 2010.
50. MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, 2000.
51. NICHOLSON, D.W. et al., Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, v.376, p.37-43,1995.
52. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2005, <http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=126>. Acesso em: 11/03/09
53. POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*. v. 6, p. 789-802, 2006.
54. PRASANNA, R. et al., Anti-cancer effect of *Cassia auriculata* leaf extract *in vitro* through cell cycle arrest and induction of apoptosis in human breast and larynx cancer cell lines. *Cell Biology International*. v.33, p.127-134, 2009.
55. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Pharmacology*. 6th Edition Churchill Livingstone., 2007. 844p.
56. RATES, S.M.K., Plants as source of drugs. *Toxicon*. v.39, p.603-613, 2001.
57. ROCHA, D.D.; MILITÃO, G.C.G.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; ALVES, A.P.N.N.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Selective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. *Life Sciences*. v. 79, p. 1692-1701, 2006.
58. RUBINSTEIN L.V., et al., 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*. v.82, p.1113-118, 1990.
59. SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., PETROVICK, P.R., Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamento In: SIMÕES, C.M.O. et al.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6^a Ed. Porto Alegre-RS: Editora da UFRGS, 2007. p.371-400.

60. SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MARQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immun. Lett*, v.74, p.111– 115 . 2000.
61. SERPELONI, J.M.; REIS, M.B.; RODRIGES, J.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; DOKKEDAL, A.L.; CÓLUS, I.M.S. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of *Miconia* species using the comet assay and micronucleous test. *Mutagenesis*. v.23, n.6, p.501-507, 2008.
62. SILVA J.R. et al., Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais. Cascavel: Assoeste, 1995, 203p.
63. SIMPSON A.J.G.– Bases da Oncologia. 1ª ed., São Paulo, Livraria e Editora Marina, p. 53-70, 1998.
64. SKEHAN, P. et al., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*. v.82, p.1107-1118, 1990.
65. SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO D. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *Journal of National Cancer Institute*, v.82 (13), p. 1107-1118, 1990.
66. SUBHASHINI, J., MAHIPAL, S.V.K. & REDDANNA, P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia in vitro. *Cancer Lett*. v.224, p.31-43, 2005.
67. THORNBERRY, N.A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J. Biol. Chem*. V.272, p.179-197, 1997.
68. TRÉDAN, O.; GALMARINI, C.M.; PATEL, K.; TANNOCK, I.F. Drug Resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl Cancer Inst*. v.99, p.1441-1454. 2007
69. ULLAH, M. F., AATIF, M., The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Cancer treatment Reviews*. v. 35, p. 193-200, 2009
70. VAUQUELIN, G.; CHARLTON, S. J. Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action. *British Journal of Pharmacology*. v. 161, p. 488-508. 2010.
71. VENDRAMINI-COSTA, D.B.; CASTRO, I. B. D.; RUIZ, A.L.T.G.; MARQUISSOLO, C.; PILLI, R.A.; CARVALHO, J.E. Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorganic & medicinal Chemistry*. v.18, p.6742-6747, 2010.
72. VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.B.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.L.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Citotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. *Planta Médica*. v.70, p.551-555, 2004.
73. VIEIRA, N.C.; ESPÍNDOLA, L.S.; SANTANA, J.M.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.L.; PINHEIRO, S.M.; ARAÚJO, R.M.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from northeastern Brazil flora. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v.16, p.1676-1682, 2008.

74. VOIPIO, H.M.; BANEUX P. ;GOMEZ DE SEGURA, I.A.; HAU, J.; WOLFENSOHN, S. Joint Working Group on Veterinary Care. Lab. Animals. V.42(1), p.1-11, 2008.
75. YAN, J.; LUO, D.; LUO, Y.; GAO, X.; ZHANG, G. Induction of G1 arrest and differentiation in MDA-MB-231 breast cancer cell by boehmeriasin A, a novel compound from plant. International Journal of Gynecol Cancer. v.16, p.165–170,2006.



CEEAA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp**

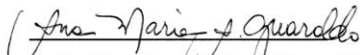
CERTIFICADO

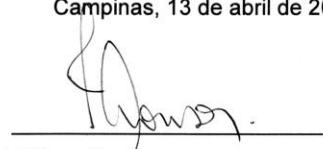
Certificamos que o Protocolo nº **1812-1**, sobre "**Avaliação da atividade anticâncer in vivo e in vitro de plantas medicinais provenientes da Serra da Mantiqueira Paulista - tumor sólido de Ehrlich**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vinicius Andrade Arce Pais**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em **13 de abril de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1812-1**, entitled "**Evaluation of anticancer activity in vivo and in vitro of medicinal plants from Serra da Mantiqueira Paulista - solid ehrlich tumor**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 13, 2009**.

Campinas, 13 de abril de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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



CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**

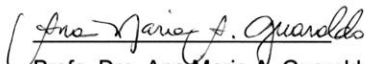
CERTIFICADO

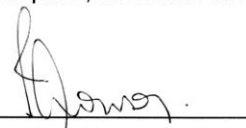
Certificamos que o Protocolo nº **1813-1**, sobre "**Avaliação da atividade anticâncer in vivo e in vitro de plantas medicinais provenientes da Serra da Mantiqueira Paulista - Teste de toxicidade aguda**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Vinicius Andrade Arce Pais**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em **06 de abril de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1813-1**, entitled "**Evaluation of anticancer activity in vivo and in vitro of medicinal plants from Serra da Mantiqueira Paulista – acute toxicity assay**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 6, 2009**.

Campinas, 06 de abril de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ON LINE PARA O EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY

De: ees.ejp.0.edbc2.4787b2db@eesmail.elsevier.com em nome de The European Journal of Pharmacology [ejp-office@pharm.uu.nl]

Enviado em: domingo, 30 de janeiro de 2011 17:08

Para: vinnyapa@terra.com.br

Assunto: Submission Confirmation for Anticancer activity evaluation in vitro and in vivo of medicinal plants from Serra da Mantiqueira Paulista

Sinalizador de acompanhamento:

Acompanhar

Status do sinalizador: Sinalizada

Categorias: Categoria Vermelha

Dear Mr Vinicius Andrade Arce Pais,

Your submission entitled "Anticancer activity evaluation in vitro and in vivo of medicinal plants from Serra da Mantiqueira Paulista" has been received by journal European Journal of Pharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

European Journal of Pharmacology

.....

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com Global telephone support is available 24/7:

For The Americas: +1 888 834 7287 (toll-free for US & Canadian customers) For Asia & Pacific: +81 3 5561 5032 For Europe & rest of the world: +353 61 709190

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**MANUSCRITO DO ARTIGO SUBMETIDO AO
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**

Evaluation of anticancer activity in vitro and in vivo of medicinal plants from Serra da Mantiqueira Paulista

Vinicius Andrade Arce Pais ^{Campinas State University – UNICAMP – vinnypa@terra.com.br}
 CPQBA/UNICAMP PO. 6171 Postal Code - 13081-970 - Campinas – SP
Corresponding Autor

Mary Ann Foglio ^{CPQBA – Multidisciplinary Center for Biological and Agricultural Chemical Research, Unicamp – foglioma@gmail.com}
 CPQBA/UNICAMP PO. Box 6171 Postal Code - 13081-970 - Campinas – SP

Rosely B. Torres ^{Agronomic Institute of Campinas. IAC - rbtorres@iac.sp.gov.br}
 PO. Box 28 – Postal Code 13012-970 - Campinas, SP

João Ernesto de Carvalho ^{CPQBA – Multidisciplinary Center for Biological and Agricultural Chemical Research, Unicamp – carvalho_je@yahoo.com.br}
 CPQBA/UNICAMP PO. 6171 Postal Code - 13081-970 - Campinas – SP

Abstract

Cancer is a group of more than a 100 different diseases that afflict the world's population and is characterized by loss of cell function, in addition to uncontrolled proliferation. In Brazil alone, an estimated 489,270 new cancer cases were reported in 2010. Brazil is the country with the greatest plant genetic diversity of the world, representing one of the richest sources of pharmacologically active materials. It's estimated that 60% of anticancer drugs are of plant origin. Based on the random collect performed in the project BIOPROSPECTA-FAPESP (04/15410-0) two species were collected again: *Boehmeria caudata* Sw. and *Boehmeria cylindrica* Sw. These species were submitted to an extraction process, resulting in dichloromethane and ethanolic extracts, subsequently sent to *in vitro* tests on human tumor cell lines. All of them showed cytocidal or cytostatic effects in *in vitro* assays. Thus, based on data for alkaloids with cytostatic effects described in the literature, an acid-base extraction of *Boehmeria caudata* Sw. was carried out, where alkaloids of different polarities were extracted. Isolated alkaloids, and their respective neutral fraction, FALCBC and FAENBC for *Boehmeria caudata*, were sent to *in vitro* assays, where only the alkaloids from *B. caudata*, gave positive results. The DBE of *Boehmeria cylindrica* and the extracts and DBE, of *Boehmeria caudata*, were tested in vivo using the solid Ehrlich's tumor model. The two extracts showed significant results ($p < 0.05$), decreasing tumor progression, indicating a potential of the genus for the discovery of a new anti-cancer drug. The species studied showed significant antitumor activity.

Keywords: *Boehmeria*, *caudata*, *cylindrica*, cancer, extract, ehrlich

1. Introduction

Cancer is a group of more than 100 diseases that afflict the world's population (INCA, 2005). The Emergence of the cancer cell could be due to inactivation of tumor suppressing genes, or the activation of oncogenes, and deregulation of the cell cycle leading to uncontrolled cell proliferation (insensitivity to anti-growth factors and self-sufficiency in growth factors). Still, there may be mutations produced by external agents, whether chemical, physical or biological (Alberts Et al., 2008; Brown & Attardi, 2005; Simpson et al., 1998; Fadeel & Orrenius, 2005; Luo, J., et al., 2009).

The mechanisms that lead to the establishment of this disease occur differently in each individual, therefore some cancers have a resistant phenotype. Understanding the molecular constitution of cancer and its biomarkers, it is possible to create an effective treatment, increasing the chances of cure. Thus, the search continues for chemotherapeutic agents with selective toxicity for malignant cells has increased significantly and consequently the search for drugs with alternative action mechanisms (Jachak, Ms; Saklani, A., 2007; Ullah, M.F., Aatif, M., 2009).

According to the World Health Organization (WHO) in 2010 7.6 million deaths worldwide due to cancer and 12.7 million new cases (INCA 2010) were estimated. In Brazil, an estimated 489,270 new cases were registered in 2010.

Approximately 62.8% of commercial antitumor drugs which are on market or in clinical trials, are of plant origin, derived from or inspired by plants, demonstrating the valuable contribution of nature to fight diseases, especially cancer. Most of these compounds cannot be synthesized, and could be obtained only from plants grown (Cragg & Newman, 2005; Cragg, G.M. *et al*, 2009).

The Serra da Mantiqueira Paulista, is a heterogeneous environment with tracks of Atlantic Forest and Cerrado. Some studies (Myers, et al. 2000) indicate that it is an area with a concentration of endemic species-*Hotspot*- meaning it is a rich ecosystem that needs to be preserved. The plants in those regions may contain active compounds with unique, differentiated action mechanisms that will contribute to the treatment of diseases.

The present study had the objective of obtaining the ethanol and dichloromethane extracts of the species, *Boehmeria caudata* Sw (Urticaceae) and *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw (Urticaceae), selected in previous studies in our laboratory, and evaluating them *in vitro* and *in vivo*.

2. Material and Methods

2.1 Drugs and Reagents

Doxorubicin (Eurofarma) sulforrodamin B (SBR), RPMI 1640 (Gibco ®) with 5% bovine fetal serum (FCS) (Gibco ®), dimethyl sulfoxide (DMSO), trichloroacetic acid (TCA), Trizma Base (Sigma ®) Tween 80R (Labsynth-Brazil), glacial acetic acid (Chemco, Brazil), dichloromethane, ethyl acetate (Chemco) anisaldehyde solution (acetic

acid: sulfuric acid: anisaldehyde [50:1:0,5]), Hydrochloric Acid 10%, solution of Dragendorff, ammonia, 0.9% saline. All reagents used were P.A. grade.

2.2 plant material

Species previous selected were collected at Fazenda Esperança in Guaratinguetá, the APA of Serra da Mantiqueira in May 2009 and April/2010. The specimens are stored at the IAC Herbarium, registered under number 48833 and 48834. The specimens were identified by Dra Rosely Torres at Instituto Agrônômico de Campinas. The following species were collected:

- *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceae)
- *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw. (Urticaceae)

2.3 Extraction and isolation

The extracts obtaining, purification and isolation of active principles were made in the CPQBA Phytochemistry Division, under the guidance of Dr. Mary Ann Foglio.

Fifty grams of plant material, grounded in a knife mill, were subjected to the process of dynamic maceration with 500 ml of dichloromethane at 1:30 hours, repeated three times, and the end of 4:30 hours the resulting volumes were collected and filtered. The organic solvent was eliminated under vacuum at 40 ° C in a rotary evaporator then providing the crude dichloromethane extract (CDE). The plant residue from this process was resumed in 500 ml of 98% ethanol and extracted three times again. The organic solvent was evaporated at 55 ° C until the elimination of ethanol and the residue was lyophilized, obtaining the crude ethanol extract (CEE).

2.4 Thin Layer Chromatography

Thin layer chromatography (tlc) was performed in aluminum silica-gel (merck ® article 5554). Eluent used: dichloromethane and methanol at 1%, 5% and 10%. Detection compounds were obtained after spraying with a solution of anisaldehyde, followed by heating at 100 ° C for 1 minute, and Dragendorff solution for detection of alkaloids.

2.5 Acid- Base Extraction

The extraction was performed using 2.5 g of CEE from *Boehmeria caudata*. The extraction mass was dissolved in 300 ml of ethyl acetate in a separatory funnel of 1000 ml. Along with the solution-acetate extract 150 ml of 10% HCl was added, stirring vigorously. The HCl solution was collected and acetate was discarded. This process was repeated three times. The final solution of HCl was neutralized with ammonia. The neutralized solution, undergoes further extraction, this time, with 300 ml of ethyl acetate for 3 repetitions. The separation of the two fractions by density difference occurs because the acetate is more dense than the fraction of HCl, now called Neutral. The fraction collected contains alkaloids, the rest was discarded. Finally, the basic fraction - FALCBC and the fraction of

ethyl acetate - FAENBC originating from *Boehmeria caudata* were referred for evaluation of anticancer activity.

2.6 Alkaloids identification of *Boehmeria caudata* – mass spectrometry

The aliquot of 8.2 mg of alkaloids drawn from *Boehmeria caudata*'s ethanol extract was diluted in 1 mL of MeOH.

The sample was injected by direct insertion in a mass spectrometer via NanoMat (Adivion) with a continuous flow of 200 nL min⁻¹. The total time for acquisition of each spectrum was set at 1 minute. ESI-MS spectra were obtained on a positive mode ionization mass spectrometer LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific - Germany) configuration ESI-FT-ICR. The operating conditions of the equipment were: capillary voltage 2.5 kV, 100 ° C source temperature, desolvation temperature of 100 ° C, and cone voltage of 20V. The full scan spectra were acquired in the range of m / z 50 to 1000.

2.7 In vitro antiproliferative assay

Human tumor cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-460 (lung, non-small cells), OVCAR-03 (ovarian), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-0 (renal), U251 (glioma) and NCI-ADR/ RES (ovarian expressing phenotype multiple drugs resistance), VERO (Normal Kidney) and K562 (Leukemia) were obtained from National Cancer Institute at Frederick, MA, USA.

Stock cultures were grown in medium containing 5 mL RPMI 1640 (GIBCO BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, GIBCO) at 37 °C with 5% CO₂. Penicillin:streptomycin (1000 Iu/L: 1000 U/L, 1 mL/L) was added to the experimental cultures.

Cells in 96-well plates (100 IL cells well⁻¹) were exposed to BCYLD, BCYLET, EBAEN, EBCA, BCAUD, BCAUET, FALCBC and FAENBC concentrations in DMSO (Merck)/RPM (0.25, 2.5, 25, and 250 Iu mL⁻¹) at 37°C, 5% of CO₂ in air for 48 h. Final DMSO concentration did not affect cell viability. Afterwards cells were fixed with 50% trichloroacetic acid (Merck) and cell proliferation determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content using sulforhodamine Bassay. (Monks, et al, 1991)

Using the concentration–response curve for each cell line, the TGI (concentration that produces total growth inhibition or cytostatic effect) and GI50 (concentration that produces 50% of growth inhibition, or citostatic effect) were determined through non-linear regression analysis (using software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).(Shoemaker, 2006)

2.8 IN VIVO ASSAYS

2.8.1 ANIMALS

Male and female Swiss and Balb-C strains were used, with 25-35g body weight, maintained at controlled temperatures of $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ with 12h light-dark cycle in cages containing up to 10 animals, with food and water ad libitum. The studies were conducted in accordance with current guidelines of care of laboratory animals (Voipio et al, 2008), and permission of the Ethics Committee for Animal experimentation of the Institute of Biology, Unicamp (Protocols 1812-1 and 1813-1).

2.8.2 Acute toxicity test

Mice were treated intraperitoneally with increasing doses of the extracts and / or fractions and after administration were kept under observation for 14 days. The LD50 was calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon (1949), with the number of dead animals.

With these data it was possible to establish the doses for evaluation of activity in the in vivo models.

2.8.3. Cells maintenance and preparation.

Ehrlich tumor cells were maintained in the ascites form by peritoneal passages in mice by weekly transplantation of 5×10^5 tumor cells. For testing, cells were prepared at a density of 2.5×10^6 cells/60 μL / animal.

2.8.4. Experimental procedure.

Experiments were designed according to Kleeb et al. (1999), with several modifications. Balb/C mice (n = 8-10/group) right hind paw basal volume was measured using a plethysmometer (Panlab, Spain) and then were inoculated with 60 μL (2.5×10^6 cells) into the right hind footpad. Tumor volume was determined by the difference between volume measured and basal volume, and evaluated every third day, until 15 days after cell inoculation, when animals were sacrificed. The animals were treated intraperitoneally every three days after the third day past cell inoculation, as follows: Negative control (vehicle-saline 0.9%), positive controls (5-FU- 20 mg/kg) and experimental groups BCYLD (50, 100 e 200 mg/Kg), BCAUD (50, 100 e 200 mg/Kg).

2.8.5 Statistical analysis

Results were expressed as % inhibition $\pm$ standard deviation. All results were submitted to one way analysis of variance (ANOVA), considering as critical level $p < 0,05$ to evaluate significant difference between the control and treated groups, followed by Duncan's Test, using StatSoft- software. Graphs were designed using the Origin - software.

3.Results

3.1 *Boehmeria cylindrica* Extraction

Table 1 represents an extraction and its yield.

Table 1 - *Boehmeria cylindrica* extractions in ethanol and dichloromethane, extraction mass and income.

SPECIE	SAMPLE WEIGHT (G)	EXTRACT	EXTRACTED MASS(G)	YIELD
<i>Boehmeria cylindrica</i>	20,04	Dicloro	0,8183	4,08%
		Etanol	2,6385	13,17%

After extraction, was carried out a Thin Layer Chromatography (TLC) and chromatographies (Figure 1a e 1b) are shown below:

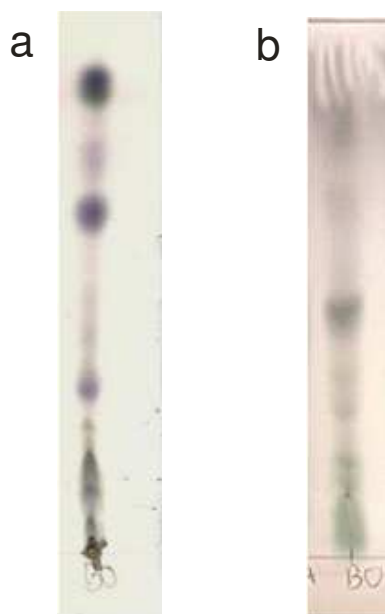


Figura 1 - a) TLC in silica-gel, of Dicloromethane extract of *Boehmeria cylindrica* (BO). Mobile Phase: Dicloromethane/Metanol 1%. Revealer: Anisaldehyde. b) TLC in silica-gel, of Ethanolic extract of *Boehmeria cylindrica* (BO). Mobile Phase: BAW. Revealer: Anisaldehyde.

3.2 *Boehmeria caudata* extraction

Following table 2 with the incomes of the crude extracts obtained, and TLC (Figure 2) containing both extracts, *Boehmeria caudata* and *Boehmeria cylindrica*.

Table 2 - Extracted mass and income

	Initial Weight (g)	Extracted Mass (g)	Yield (%)
BCAU D	146,56	5,7811	3,94%
BCAU ET	146,56	6,8777	4,69%

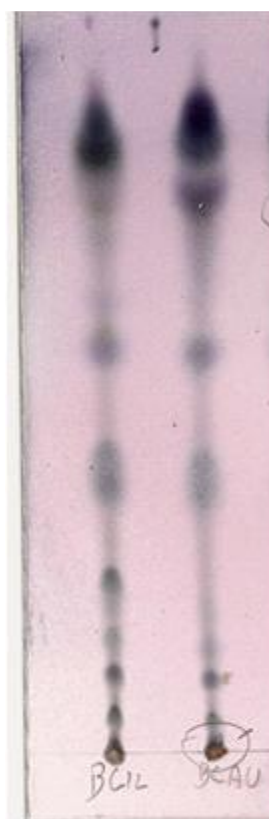


Figure 2 - TLC in silica-ge, comparing both extracts, Mobile phase: Dicloro/Metanol 10%. Developer: Anisaldehyde

3.2.1 Obtaining a rich fraction of alkaloids from ebe boehmeria caudata

Other species of this genus possess alkaloids, obtained with the ethanol extract exhibiting anticancer activity in cell culture (Luo, Y. et al. 2003; Yan, J. et al., 2006). In

TLC's plate (Figure 3), developed with dragendorff, there are traces of alkaloids in the ethanolic and dichloromethane extracts.



Figura 3 - TLC in silica-gel. Mobile Phase: Dicloro/Metanol 5%.Developer:Draguendorf. Showing alkaloids in *Boehmeria caudata*'s Ethanolic extract.

After Acid-Base extraction, performed with EBE from *Boehmeria caudata*, were obtained two fractions, FAENBC FALCBC. The extraction yield is shown in Table 3 together with extracted mass.

Table 3 – Extracted mass and income of Acid-base extraction

Initial Mass (g)	Extracted Mass (g)	Yield (%)
2,5546	0,2614	10,23%

Follows CCD (Figure 4) showing that are alkaloids in fraction FALCBC, in the same polarity of the alkaloids of crude ethanol extract.



Figure 4 - TLC in silica-gel, Mobile Phase: Dicloro/Metanol 10%. Developer: Draguedorff, showing the presence of alkaloids in fraction FALC.

3.3 *In vitro* assays

The crude dichloromethane and ethanolic extract were tested *in vitro*, to verify their antitumor activity. The control used was doxorubicin (Figure 5).

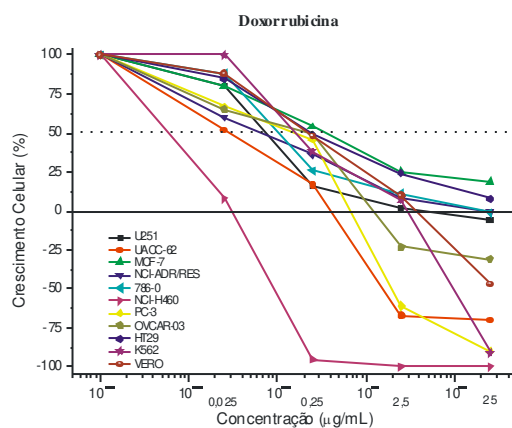


Figure 5 – Cytotoxic activity of Doxorubicin, used as control, comparing chemotherapeutic concentration and cell growth

The dichloromethane extract of *B. cylindrica* showed cytostatic activity at concentrations of 2.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ without significant cytotoxicity (Figure 6). The ethanol extract showed no cytotoxic or cytostatic activity (Figure 7).

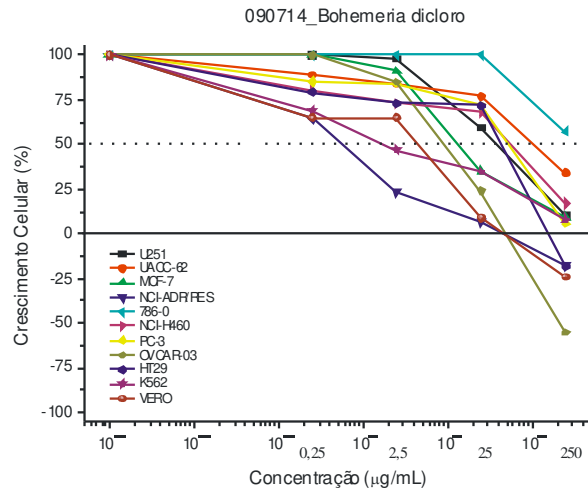


Figure 6 - Dicloromethane crude extract of *Boehmeria cylindrica* comparing cell growth and extract concentration.

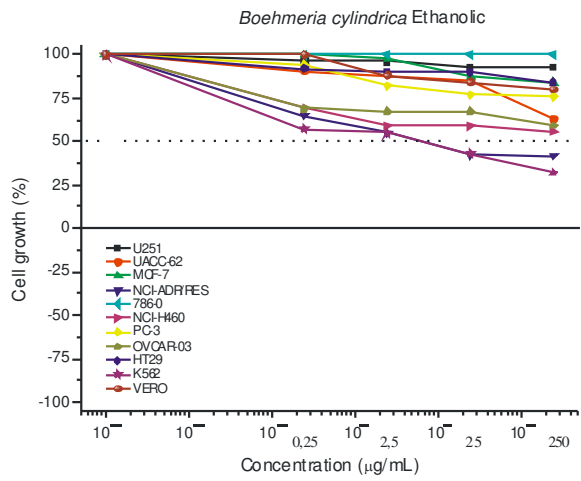


Figure 7 - Ethanolic crude extract of *Boehmeria cylindrica*, comparing cell growth and extract concentration.

Table 4 presents the values of GI 50.

Table 4- IG 50 of crude extracts of *Boehmeria cylindrica* and Doxorubicin, (µg/ml), performed in 11 human tumor lineages.

	U251	UACC6	MCF-7	PC3	K562	NCI-H460	HT29	NCIADR/RES	VERO	OVCAR03	786-0
Boehmeria cylindrica DICLORO	34,92	105,05	15,54	45,97	2,334	32,28	28,12	0,527	2,260	9,718	>250
Boehmeria cylindrica ETANOL	>250	>250	>250	>250	5,565	225,76	>250	12,74	>250	>250	>250
Doxorubicin	0,072	0,029	0,391	0,09	0,196	0,0172	0,305	0,069	0,222	0,993	0,1145

TGI values are shown in Table 5. Only the HT29, NCIADR / RES, VERO and OVCA-03 lineages have had its growth completely inhibited (TGI below 250 µg/mL).

Table 5 – TGI of crude extracts of *Boehmeria cylindrica* and Doxorubicin (µg/ml), performed in 11 human tumor lineages

	U251	UACC6	MCF-7	PC3	K562	NCI-H460	HT29	NCIADR/RES	VERO	OVCA R03	7860
BCYL DICLORO	>250	>250	>250	>250	>250	>250	171,22	41,13	59,62	49,25	>250
BCYL ETANOL	>250	>250	>250	>250	>250	>250	> 250	>250	>250	>250	>250
Doxorubicin	5,317	0,312	52,96	0,596	1,703	0,028	25,22	9,821	3,222	2,076	9,608

The crude dichloromethane and ethanolic extract from *Boehmeria caudata*, and the fractions FAENBC FALCBC were sent for testing in cell culture. The control used was doxorubicin (Figure 5).

The crude dichloromethane extract of *Boehmeria caudata* (BCAUD) showed cytotoxic activity for most of human tumor cell lines in vitro (Figure 8), the effect at concentrations above 2.5 µg / ml is remarkable.

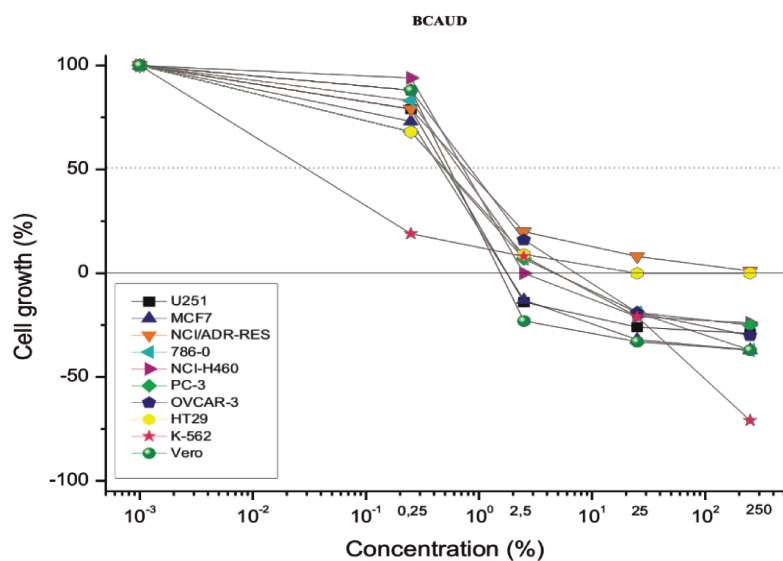


Figure 8 - Dichloromethane crude extract of *Boehmeria caudata*, relating cell growth and extract concentration.

The crude ethanol extract of *Boehmeria caudata* (BCAUET) presented a action profile different from the dichloromethane extract (BCAUD), besides having a higher potency, showing cytotoxic effects at extract concentrations in the order of $0.25 \mu\text{g} / \text{mL}$ (Figure 9).

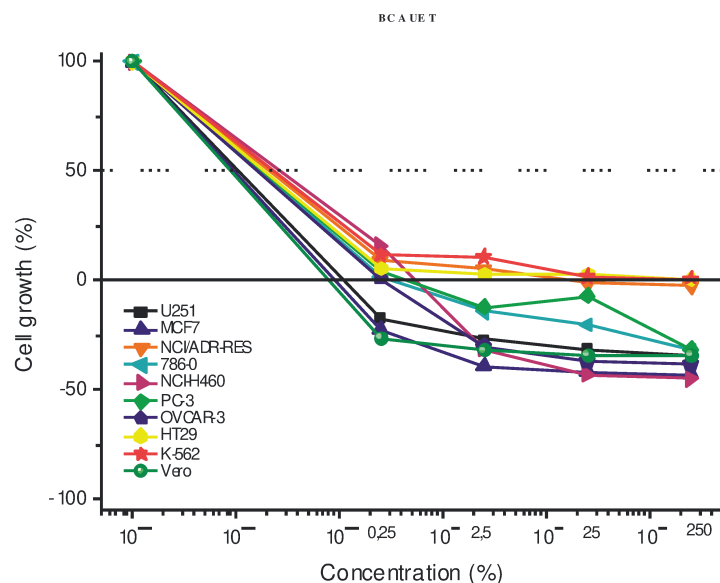


Figure 9 - Ethanolic crude extract of *Boehmeria caudata*, relating cell growth and extract concentration.

The above neutral fraction, FAENBC, of *B. caudata* showed cytotoxic activity especially after the concentration of $2.5 \mu\text{g} / \text{mL}$, indicating that not only the alkaloids are responsible for the cytotoxic activity as observed in assays with the crude extracts. Another important factor to note is that the FAENBC action profile (Figure 10) is similar to dichloromethane extract of *Boehmeria caudata*. (Figure 8)

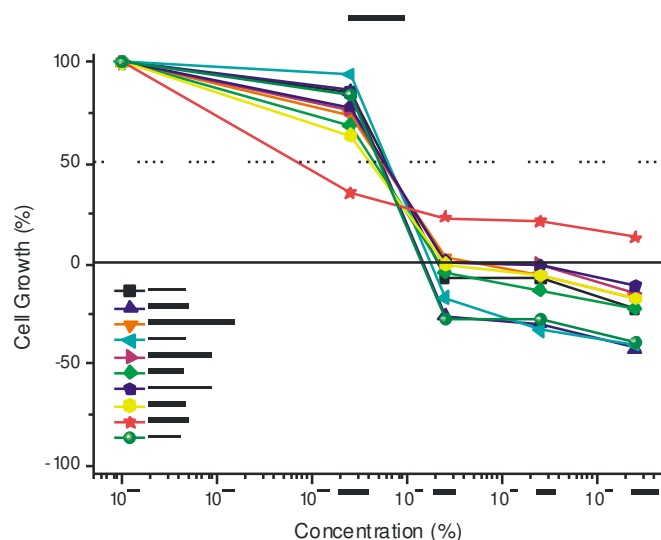


Figure 10 - FAENBC fraction activity, relating cell growth and extract concentration.

The fraction FALCBC contains alkaloids extracted from the ethanol extract of *Boehmeria caudata* obtained by Acid-Base extraction. The alkaloids of this fraction, similarly to the ethanol extract, already showed growth inhibition or cell death at lower concentrations (Figure 11). The profile of alkaloids action is similar to the profile of the ethanolic extract, indicating they are the promoters of such an effect.

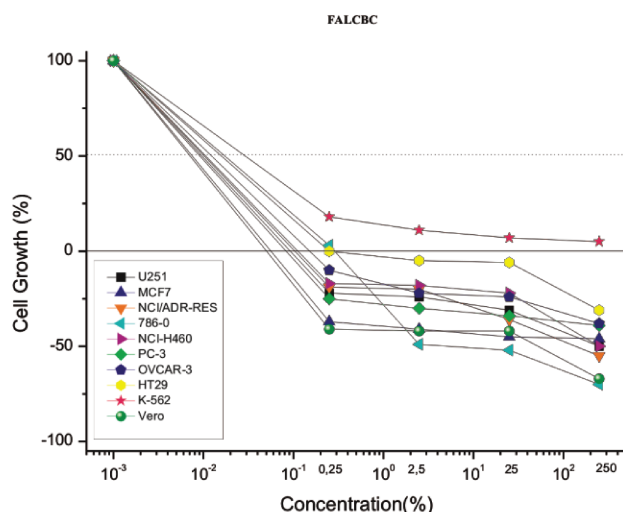


Figure 11- FALCBC fraction activity, relating cell growth and extract concentration.

Following table of TGI (Table 6), for *Boehmeria caudata* and isolated alkaloids.

Table 6 - TGI of crude extracts of *Boehmeria caudata*, FALCBC e FAENBC fractions and Doxorubicin ($\mu\text{g/ml}$), performed in 10 human tumor lineages

	U251	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-03	HT29	K562	VERO
BCAUD	7,774	5,556	104,967	11,824	14,594	13,213	16,424	65,712	2,267	5,428
BCAUET	<0,25	<0,25	40,1	0,271	0,437	0,557	<0,25	250	250	<0,25
FAENBC	17,354	4,934	23,284	6,113	29,124	13,579	33,379	19,886	250	5,058
FALCBC	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,598	250	<0,25
Doxorubicina	0,943	0,5714	10,522	2,763	0,294	3,567	2,654	8,431	0,337	14,354

3.4 Alkaloids identification.

The genus *boehmeria* own studies, where alkaloids were isolated and identified (Cui, M, Wang Q., 2009, lu et al, 2003). So, the presence of alkaloids was monitored. Following table 7 with the masses found and the alkaloids identified by ESI-MS.

Table 7 - HRESI(+)-MS data, of substances identified in the fraction that demonstrated antitumor activity *in vitro*, in human tumor cells.

Compound	Molecular Formula	[M+H] (m/z) calculated	[M+H] (m/z)	E (ppm)
----------	-------------------	-------------------------------	--------------------	---------

experimental				
1	C ₂₃ H ₂₀ NO ₄	374,1392	***	***
2	C ₂₉ H ₂₄ NO ₄	450,1705	**	***
3	C ₂₃ H ₂₈ NO ₄	382,2018	382,1924	24,59
4	C ₂₉ H ₃₂ NO ₄	458,2331	***	***
5	C ₂₄ H ₂₈ NO ₄	394,2018	394,2122	26,38
6	C ₂₃ H ₂₈ NO ₃	366,2069	366,2160	24,84
7	C ₂₂ H ₂₀ NO ₃	346,1443	***	***
8	C ₂₉ H ₂₆ NO ₃	436,1913	436,2026	25,90
9	C ₂₂ H ₂₀ NO ₄	362,1392	362,1635	67,10
10	C ₂₄ H ₂₈ NO ₃	378,2069	378,2119	13,22
11	C ₂₃ H ₂₆ NO ₃	364,1913	364,1982	18,94
12	C ₂₄ H ₃₀ NO ₃	380,2226	380,2224	0,53

Some of the compounds have structural formula defined and identified, they: 5-Criptoleuridin, 10-Boehmeriasin-A, and 11-Boehmeriasin-B and 12- Hidroxicriptoleurin. Figure 12 shows the full scan mass spectrometry of fraction FALCBC with the alkaloids identified.

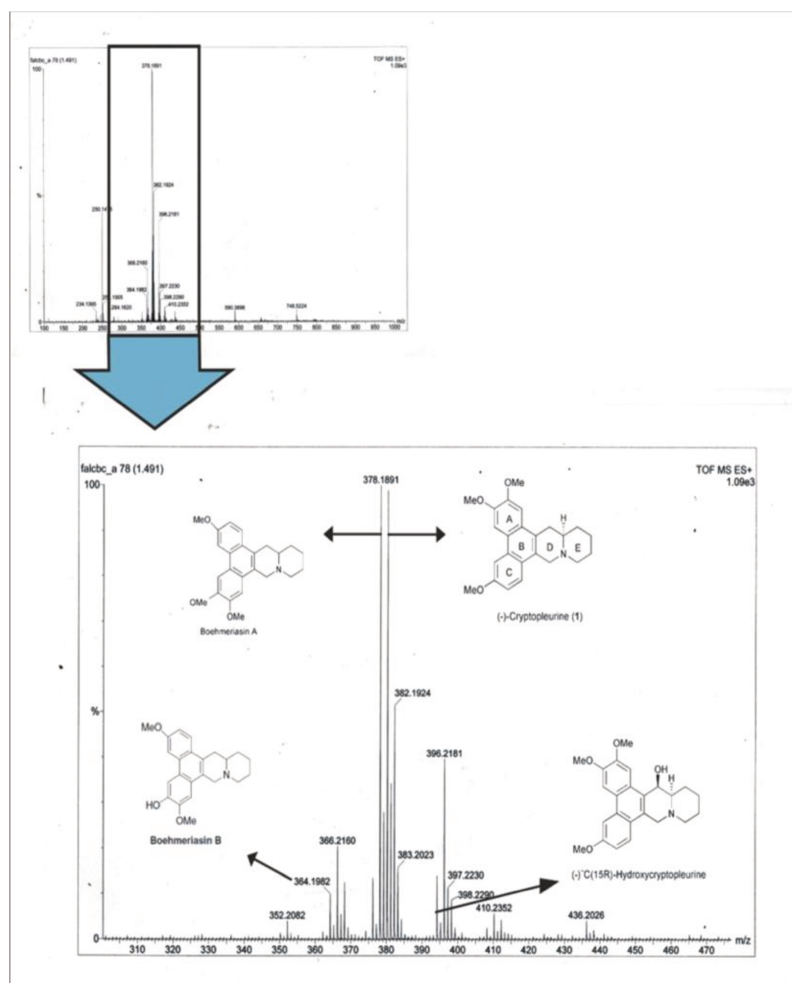


Figure 12 – Mass Spectrometry full scan of alcaloidal fraction of *Boehmeria caudata* Sw. showing the molecular formula of the main identified compounds

3.5 *In vivo* Results of Dichloromethane extract of *Boehmeria cylindrica*

The dose of 50 mg / kg BCYL did not prevent tumor development and growth that was superior to saline (negative control). Similarly, the dose of 100 mg / kg BCYL did not prevent tumor progression. The 5-FU (positive control) prevented the growth of Ehrlich solid tumor in the beginning of the trial but after the 10th day, there was little progress. The dose of 200 mg / kg BCYL retained tumor development as of the 4th day of the experiment, especially after the 10th day, at which time the tumor became more aggressive. There is a statistical difference compared to negative control, $p < 0.01$. (Figure 13)

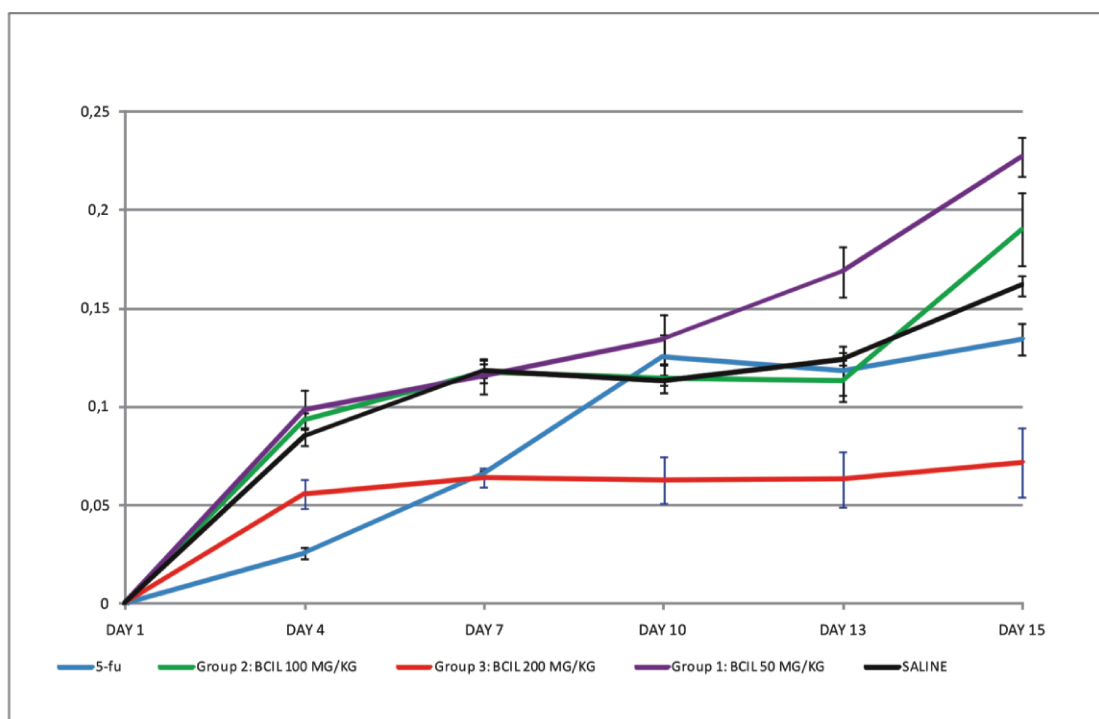


Figure 13 - - anticancer activity of dichloromethane extract from *Boehmeria cylindrica* leaves in induced Ehrlich's solid tumor. Tumor growth (volume) during the experimental period of 15 days to three treatment groups (BCYL 50mg/Kg, 100 mg / kg in 200 mg / kg) in controls, where the dose of 200 mg / kg showed significant effects ($p * = <0.05$) and prevented a increase in tumor

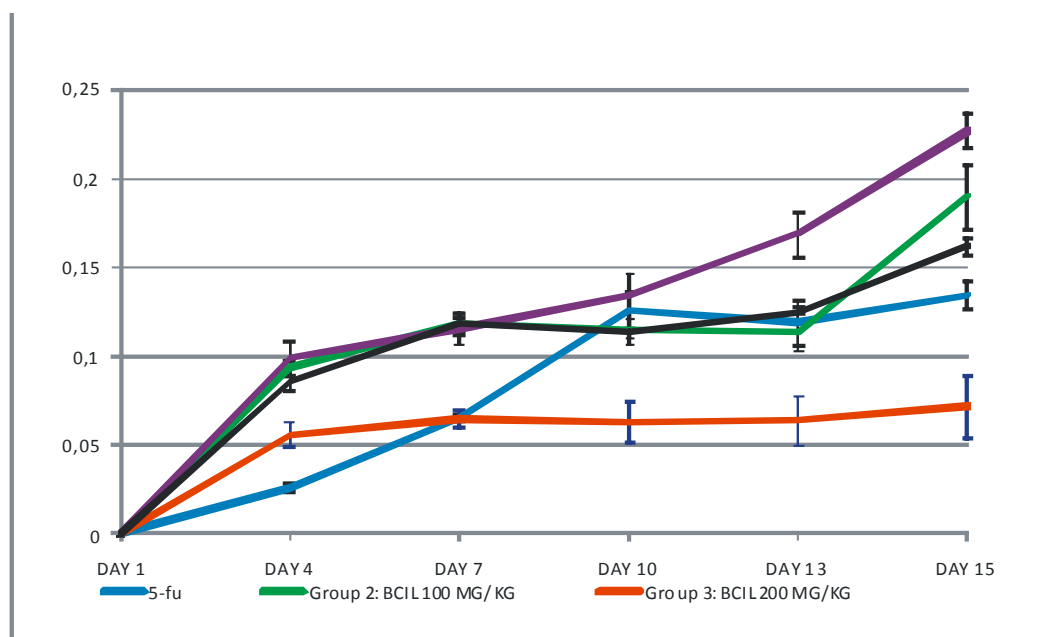


Figure 13 - - anticancer activity of dichloromethane extract from *Boehmeria cylindrica* leaves in induced Ehrlich's solid tumor. Tumor growth (volume) during the experimental period of 15 days to three treatment groups (BCYL 50mg/Kg, 100 mg / kg in 200 mg / kg) in controls, where the dose of 200 mg / kg showed significant effects ($p \leq 0.05$) and prevented a increase in tumor

3.6 In vivo Results of Dichloromethane extract of *Boehmeria caudata*

Given the results obtained in culture of human tumor cells, the crude dichloromethane extract from leaves of *Boehmeria caudata* (BCAUD) was evaluated in an experimental model of cancer induced by inoculation of Ehrlich cells in the paws of mice

The group treated with 5-FU (positive control) showed tumor growth similar to the saline group, stabilizing the development after the 10th day. Nevertheless, no significant difference was found between the growth of saline and positive control groups ($p > 0.05$) (Figure 14).

The group, BCAUD50, showed a slight antitumor effect, slowing tumor growth in the early days. However, the same values as control group were reached at day 15. (Figure 14).

The group BCAUD100 compared to the saline group, showed significant effects after the 10th day of treatment ($P < 0.05$), while maintaining its effect on the 13th and 15th days of treatment ($p < 0.01$). This same dose, when compared to 5-FU was more effective ($p < 0.05$).

Since the dose of 200 mg / kg produced greater growth inhibition with a significant difference compared to saline group on day 7 of treatment ($p < 0.05$). On days 10, 13 and

15, tumor growth remained below significantly that produced by other doses, the positive ($p < 0.01$) and negative controls (Figure 14).

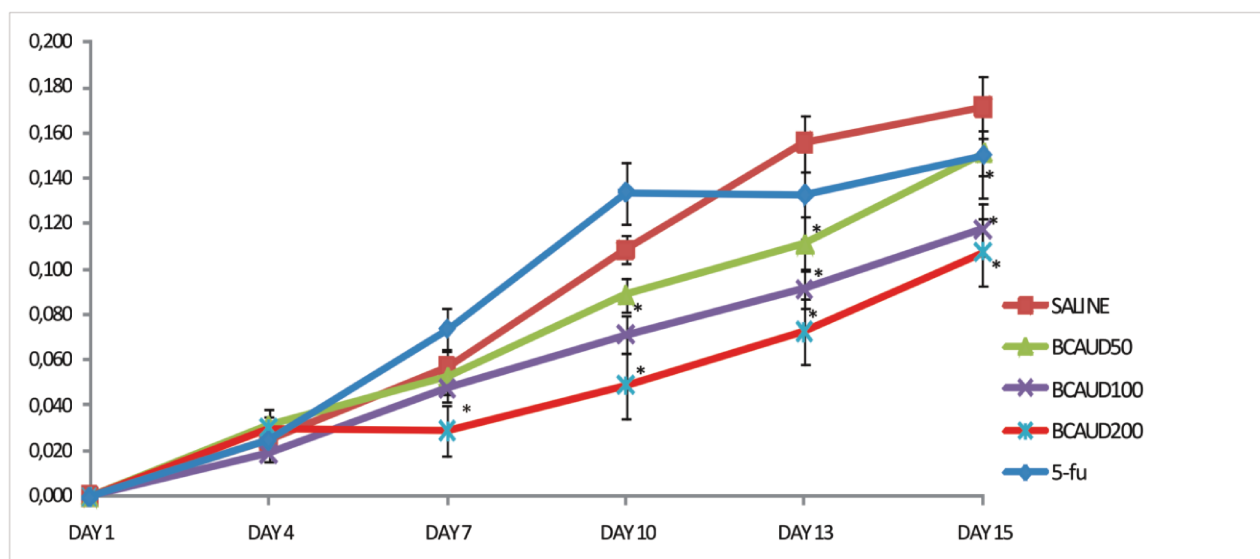


Figure 14 - tumor growth (volume) during the experimental period of 15 days for three treatment groups (BCAUD 50mg/Kg, 100 mg / kg and 200 mg / kg) and controls, where the dose of 50 mg/kg significantly showed significant retention of tumor growth after a 13 th (* = $p < 0.05$), the dose of 100 mg / kg, prevented tumor development after the 10th day ($p < 0.05$) and 200 mg / kg showed significant effects from the 7 th day (* = $p < 0.01$) and prevented a increase in tumor volume.

Cancer is a disease which appears in the ranks of the leading causes of death worldwide, and many surveys are conducted for new drug discoveries and treatments. Studies have shown that plant species are potential sources of new anticancer drugs, new chemotherapeutic agents as well as suppliers of precursors (Cragg & Newman, 2009)

The initial screening of anticancer activity was performed with dichloromethane and ethanolic extracts obtained sequentially from the dried leaves, using cytotoxicity tests in vitro, on cultures of human tumor cells. The dichloromethanic extracts have the ability to separate substances of low polarity, while ethanol extract substances of medium and high polarity.

The dichloromethane extract from the leaves of *Boehmeria cylindrica*, produced inhibition of cell proliferation dependent on concentration and selectivity. There are no reports of anticancer studies in the databases ISI, SCOPUS or SCIELO on this species.

The dichloromethane extract presented cytostatic effect in culture of human tumor cells (Figure 5 and Table 4) and it is assumed that the compounds responsible for this activity are those of low polarity. Apolar compounds are involved in biological activities and due to their soluble nature, they are capable of crossing the cell plasma membrane.

The values of GI 50 (Table 4) show that concentrations of up to 34 $\mu\text{g} / \text{ml}$, inhibited 50% growth of tumor cells, except for the line 786-0. This extract also produced

growth inhibition of cell growth to the strains of colon (HT29) resistant ovarian cancer (NCIADR / RES), fibroblast (VERO) and ovarian (OVCAR-03) cells.

The results obtained from cell culture motivated the verification of effect observed in the experimental model using laboratory animals.

The acute toxicity tests were conducted to determine the maximum effective dose for chronic treatment. The maximum dose calculated for the experimental model of cancer is 200 mg / kg (data not shown). In addition to this dose, experimental groups were treated with 50 and 100 mg / kg of BCYLD and the control groups that consisted in the positive (5-FU to 20mg/kg) and negative (0.9% Saline) controls.

The Ehrlich tumor is a fast growing and aggressive cancer, able to grow in virtually all strains of mice, suggesting that recognition and immune responses that are independent of tumor Histocompatibility Complex (Segura et al, 2000).

Studies have shown that the inflammatory response of neutrophils is essential for the Ehrlich tumor and the large influx of these cells promotes tumor development (Bergami-Santos et al, 2004). This effect is related to angiogenesis and growth factors induced by inflammation, necessary for tumor development. The implantation of the tumor only induces local inflammation, with increased vascular permeability, edema formation, cell migration and formation of ascites fluid, essential for tumor growth (Fecchio et al, 1990, Gupta et al, 2004). Anti-inflammatory drugs also inhibit the growth of this tumor (Vendramini-Costa, DB et al, 2010).

In figure 13 it is possible to observe the dose-dependent inhibition response of tumor growth in mouse footpads by the action of the crude dichloromethane extract administered intraperitoneally. The BCYL 200mg/Kg group grew less than the other groups and tumor growth was stabilized since the early treatment days showing a statistical difference compared with the saline group ($p < 0.01$).

These Results suggest great potential for crude dichloromethane extract of *Boehmeria cylindrica*, as it managed to reduce the proliferation of an aggressive type of tumor.

The dichloromethane (BCAUD) and ethanol extracts (BCAUET) of another species of the genus *Boehmeria*, *B. caudata* showed significant results in both in vitro and in vivo tests. The extracts showed antitumor activity assays in cell culture, but with different action profiles. The BCAUD has anti-proliferative action for all strains tested, and the value of the GI tract varies between 2.26 $\mu\text{g} / \text{ml}$ to 16.424 $\mu\text{g} / \text{ml}$, with only two lines where it is higher, and the NCI / ADR-RES (Resistant Ovary), with 104.967 $\mu\text{g} / \text{ml}$, and HT29, with 65.72 $\mu\text{g} / \text{ml}$. This experiment demonstrates the increased power of the dichloromethane extract obtained with this species when compared to the dichloromethane extract of *B. cylindrica*. Since the ethanol extract (BCAUET) has anti-proliferative action in cell culture for all strains tested. The TGIS are mostly below 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, except for lines HT29 (colon) and K562 (leukemia), where the GI reaches 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$, but graphically cell proliferation was inhibited at lower rates, showing a constant growth rate. It is observed that the values are close to the TGI of doxorubicin in most cases, demonstrating the chemotherapeutic potential of this sample, since in a crude extract there are hundreds of substances in addition to the active one. Therefore, isolation of active principles can lead to the identification of molecules of high potency.

The indication of the alkaloid presence in ethanolic extract of *Boehmeria caudata* is extremely important, because in this class of substances a variety of effects from the treatment of diabetes have been described, even effects against cancer cells, such as camptothecin, a topoisomerase I inhibitor substance (Bredholt, T. et al, 2009; Pommier, Y., 2006) Other examples already used clinically to treat cancer are the alkaloids from Vinca, vincristine and vinblastine (Ishikawa, H. et al, 2009).

Alkaloids of cytotoxic characteristics for in cultured cancer cells were isolated from a species of the same genus, named *Boehmeria siamensis*, from China. In this species phenantroquinolizidine group alkaloids, named Boehmeriasin A and B (LUO, Y. Et al., 2003) were identified. Tests done on breast cancer cells, line MDA-MB-231, determined that this drug acts in the G1 phase of the cell cycle, inhibiting cell proliferation (Yan, J. et al., 2006).

The ethanol extract of *Boehmeria caudata* contain alkaloids and this extract showed greater potential in cell culture. FALCBC fraction (Figure 11), which contains the alkaloids, was more potent than the crude dichloromethane extract and the neutral fraction, since cell death was observed at concentrations below 0.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, it was similar to the effect obtained by EBE from *Boehmeria caudata* (Figure 9). The value of TGI of FALCBC fraction is mostly below 0.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for all cell lines tested except HT29 (Colon) and K562 (leukemia). In this case we can say that the alkaloids are mainly responsible for the anticancer activity of ethanol extracts of *B. caudata*, because the fraction rich in these substances increased the specific activity.

The neutral fraction, FAENBC, (Figure 10) has action profile similar to BE dichloromethane (figure 8), indicating the presence of similar active ingredients, working in all cell lines that were tested. TGI values of the two extracts are similar, except for the lineage leukemia (K562). These results also indicate the presence of other compounds with antiproliferative activity.

The alkaloidal fraction was subjected to mass spectrometry, allowing the identification of substances that make up the mix fraction selected. Thus, we identified 8 of 12 substances selected based on information from previous studies (Cui, M and Q. Wang, 2009; Luo, Y. et al, 2003). Of the substances identified eight were four described and 4 were isolated and / or synthesized (Cui, M and Q. Wang, 2009; Dumoulin, D. et al, 2010; Yan, J., et al, 2006).

The alkaloids identified were Boehmeriasin-A, Boehmeriasin-B, and Criptoleurin Hidroxicriptoleurin and are classified as phenanthroquinolizidine alkaloids, existing in small numbers, in the families Asclepiadaceae, Lauraceae, Vitaceae and Urticaceae. The Boehmeriasin-A was tested in cell culture (Yan, J., et al, 2006; Luo, Y. et al, 2003) proving to have antiproliferative activity in vitro, inhibiting the growth of cancer cells from lung, colon, breast, prostate, kidney and leukemia.

Alkaloids mentioned were extracted and identified in experiments with the plant *Boehmeria siamensis*, a plant used in traditional Chinese medicine (Dumoulin, D. et al, 2010; Yan, J., et al, 2006., Luo, Y. et al, 2003.). Another plant of the same genus *Boehmeria pinnosa* (Cai, XF et al, 2006) has some Alkaloids of the same class that shows potent antitumor activity. However, the same alkaloids were isolated from another species

of the same genus, *Boehmeria caudata* in this study, collected in Brazil. Thus, possibly the production of these metabolites are not related to regionalism, being intrinsic to the genus.

The EBD of *Boehmeria caudata* was evaluated in *in vivo* tests. The tumor response to drugs was also dose-dependent, ie the higher the dose, reduced tumor growth. The dose of 50 mg / kg (BCAUD50) produced a slight effect, equaling the positive control in 15 days of the experiment. A dose of 100 mg / kg (BCAUD100) showed antiproliferative effect after the 10th day of treatment. The dose of 200 mg / kg was the most effective, possessing significant antitumor activity after 7 days ($P < 0.05$), keeping the levels lower than in the controls both positive and negative by the 15th day ($p < 0.01$). The efficiency of EBD in *in vivo* *Boehmeria caudata*, consistent with results from *in vitro* and suggests that the active ingredients have enough bioavailability to reach the tumor.

5. References

1. Alberts, B. *et al*, 2008. Molecular Biology of the Cell. Artmed, Porto Alegre.pp.1725
2. Bergami-Santos, P.C., Mariano, M., Barbuto, J.A.M.,2004. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci.* 75, 245– 255
3. Bredholt, T., Dimba, E.A.O., Hagland. H.R., Wergeland, L., Skavland, J., Fossan, K.O., Tronstad, K.J., Johannessen, A.C., Vintermyr, O.K., Gjertsen, B.J.,2009. Camptothecin and khat (*Catha edulis* Forsk.) induced distinct cell death phenotypes involving modulation of c-FLIP_L Mcl-1, procaspase-8 and mitochondrial function in acute myeloid leukemia cell lines. *Mol. Cancer.* 8, 101.
4. Brown, J.M., Attardi, L.D., 2005. The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Nat. Rev. Cancer* 5, 3, 231-237.
5. Cai, X. F., Jin, X., Lee, D., Yang, Y.T., Lee, K., Hong, Y.S., Lee, J.H., Lee, J.J.,2006. Phenanthroquinolizidine Alkaloids from roots of *Boehmeria pinnosa* potentially inhibit Hypoxia-Inducible Factor-1 in AGS Human Gastric Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* 69, 1095-1097.
6. Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. of Ethnopharm.*100, 72-79.
7. Cragg, G.M., Newman, D.J.,2009. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem. Rev.* 8, 313-331.
8. Cui, M., Wang, Q.,2009. Total Synthesis of Phenanthro-quinolizidine Alkaloids: (±)-Cryptopleurine, (±)-Boehmeriasin A, (±)-Boehmeriasin B and (±)-Hydroxycryptopleurine. *Eur. J. Org. Chem.* 5445-5451.
9. Dumoulin, D., Lebrun, S., Couture, A., Denlau, E., Grandclaudeon, P., 2010. First Asymmetric Synthesis of Boehmeriasin A. *Eur. J. Org. Chem.*,1943-1950.

10. Fadeel, B., Orrenius, S., 2005. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. *J. Intern. Med* 258, 479-488.
11. Fecchio, D., Sirois, P., Russo, M., Jancar, S., 1990. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflam.* 14, 125-131.
12. Gupta, M., Mazumder, U.K., Kumar, R.S., Sivakumar, T., Vamsi, M.L.M., 2004. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 177-184.
13. Instituto Nacional Do Cancer (INCA), 2010. [Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010). Site: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>
14. Ishikawa, H., Colby, D.A., Seto, S., Va, P., Tam, A., Kakei, H., Rayl, T.J., Hwang, I., Boger, D.L., 2009. Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 4904-4916.
15. Jachak, S.M., Saklani, A., 2007. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Cur. Sci.* 92, 9, 1251-1257.
16. Kleeb, S.R., Xavier, J.G., Frussa-Filho, R., Dagli, M.L.Z., 1997. Effect of haloperidol on the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sci.* 60, 69-74.
17. Luo, J., Solimini, N.L., Elledge, S.J., 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *CELL* 136, 823-833.
18. Luo, Y., Liu, Y., Luo, D., Gao, X., Li, B., Zhang, G., 2003. Citotoxic alkaloids from *Boehmeria siamensis*. *Planta Medica.* 69, 842-845.
19. 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. J. 1991. *Nat. Cancer Inst.*, 83, 757.
20. Pommier, Y., 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer.* 6, 789-802.
21. Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J., 2000. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immun. Lett.* 74, 111-115.
22. Shoemaker, R. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 813.
23. Simpson A.J.G., 1998. *Oncology Basis*, 1st ed., São Paulo, Livraria e Editora Marina, p. 53-70.
24. Ullah, M. F., Aatif, M., 2009. The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Canc. Treat. Rev.* 35, 193-200.
25. Vendramini-Costa, D.B., Castro, I. B. D., Ruiz, A.L.T.G., Marquissolo, C., Pilli, R.A., Carvalho, J.E., 2010. Effect of goniiothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 6742-6747.
26. Voipio, H.M., Baneux P., Gomez De Segura, I.A., Hau, J., Wolfensohn, S., 2008. Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab. Animals.* 42, 1, 1-11.
27. Yan, J., Luo, D., Luo, Y., Gao, X., Zhang, G., 2006. Induction of G1 arrest and differentiation in MDA-MB-231 breast cancer cell by boehmeriasin A, a novel compound from plant. *Intern. J. of Gynecol. Cancer* 16, 165-170.

6. Acknowledgements

We thank to Post-graduation program of Cellular and Structural Biology, CNPq and CAPES for funding and everyone who helped developing this work.

DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

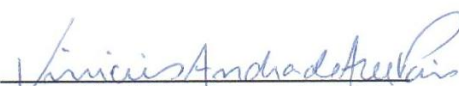
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada **"Avaliação de atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* de plantas medicinais provenientes da Serra da Mantiqueira Paulista"**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA – IB- UNICAMP, sob Protocolo(s) nº 1812-1 E 1813-1.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

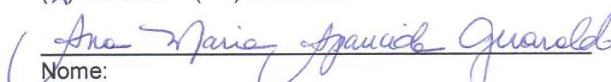

Aluno(a): Vinicius Andrade Arce Pais



Orientador(a): João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP