

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULA ARAUJO MONTEIRO

“ATIVIDADE ANTICÂNCER DE EXTRATOS E FRAÇÕES
OBTIDOS DE *Croton campestris* A.St.-Hil.”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Paula Araujo Monteiro

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Co-Orientadora: Prof. Dr. Mary Ann Foglio

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Monteiro, Paula Araujo, 1985-

M764a Atividade anticâncer de extratos e frações obtidos de *Croton campestris* A.St.-Hil. / Paula Araújo Monteiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.
Coorientadora: Mary Ann Foglio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. *Croton campestris*. 3. Células – Cultura e meios de cultura. 4. Agentes antineoplásicos. 5. Carcinoma de Ehrlich. 6. Proliferação celular. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Anticancer activity of extracts and fractions obtained from *Croton campestris* A.St.-Hil.

Palavras-chave em Inglês:

Cancer

Croton campestris

Cell culture

Antineoplastic agents

Ehrlich tumor carcinoma

Cell proliferation

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Carmen Silvia Passos Lima

Data da defesa: 17-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 17 de fevereiro de 2012

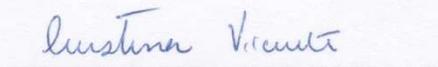
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)



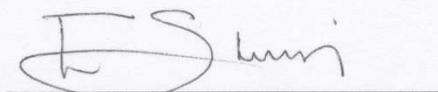
Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima



Assinatura

Profa. Dra. Karina Gottardello Zecchin

Assinatura

Profa. Dra. Vera Lucia Garcia Rehder

Assinatura

Dedico o fruto do meu trabalho aos meus pais que, com muito amor, abdicaram de muitos de seus sonhos em prol dos meus.

A eles que, incondicionalmente, incentivaram meus estudos e apoiaram minhas decisões acadêmicas e profissionais com muito amor e compreensão.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

“O pensamento lógico pode levar você de A a B, mas a imaginação te leva a qualquer parte do Universo.”

(Albert Einstein)

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

(1 Coríntios 13:2)

Agradecimentos

Agradeço e louvo a Deus pelo amor, paciência, sabedoria e instrução ao longo de mais esse caminho trilhado à sua luz.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pelo carinho, amizade e orientação.

Agradeço aos meus pais pelo infinito amor, apoio e compreensão nos dias difíceis. A minha irmã, Carol, pela força de sempre e pelos dias em que abdicou dos estudos de flauta em prol da minha concentração. Ao meu noivo Júlio, meu porto seguro, que infinitas vezes não me deixou desanimar e me dá forças para que eu seja capaz. Ao meu filhote Bart por ficar literalmente ao meu lado nos dias de estudo. A Vó Romilda que me ensinou a importância das plantas medicinais e fez nascer em mim o carinho por essa ciência.

À mais que amiga, Renata, pelo amor, carinho e orações que me fortalecem.

Aos meus primos queridos, os melhores amigos do mundo, que me fazem ter orgulho do meu sobrenome todos os dias.

A todos os meus familiares e amigos que sempre torceram por mim e por minhas conquistas.

Às colegas de graduação, em especial à Flavinha, Patrícia, Camila, Tati, Jéssica e Débora pelos momentos maravilhosos.

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio pela amizade e coorientação valiosas.

Às queridas Débora, Gi Longato, Gi Fiorito e Lari Rizzo pela amizade, apoio e os momentos deliciosos de brincadeiras e comilanças.

À Sica pelos ensinamentos, auxílio e amizade excepcionais.

Aos amigos Humberto, Lari Shiozawa, Michelle, Vanessa, Vivi, Gabi, Ricardo, Adriana, Thiago, Karin, Erika, Lucas, Sabrina e Rafael pelo companheirismo, auxílio, amizade e alegria de todos os dias.

À Ana Possenti por suas deliciosas e carinhosas cucas.

À Aninha por suas valiosas contribuições.

Aos colegas da Divisão de Fitoquímica, Rodney, Ilza, Núbia, Johnny, Leilane, Karina, Leila, Patrícia, Fabrício e Sidnei pelas dicas, orientações e companhia preciosíssimas.

À Elaine Cabral por sua excepcional contribuição nas análises de espectrometria de massas.

Ao Benício Pereira por seu auxílio nos dias de coleta.

À Divisão de Agrotecnologia e a Profa. Dra. Glyn Mara Figueira pelo suporte.

À querida secretária Liliam Panagio por sua eficiência e paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À FAPESP pela bolsa fornecida ao longo do período desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e torceram pelo meu sucesso.

Resumo

Fatores como o aumento na expectativa de vida, o tabagismo, alcoolismo e a má alimentação, vêm elevando a incidência de câncer já que o envelhecimento do organismo, assim como a ação de carcinógenos, favorece o seu aparecimento. Atualmente, essa doença é a segunda causa de morte na população mundial. As células tumorais caracterizam-se por ignorar os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, e tenderem a evitar os processos de apoptose e diferenciação, sendo consideradas muito invasivas. Grande parte dos quimioterápicos utilizados hoje no tratamento do câncer advém de pesquisas desenvolvidas a partir de fontes naturais como vegetais. Dentro do Projeto Fapesp-Bioprospecta (2004/07943-9) desenvolvido no CPQBA/UNICAMP, uma das espécies selecionadas, *Croton campestris*, mostrou interessante perfil antiproliferativo em cultura de células tumorais. No atual projeto, extratos, frações e princípios ativos obtidos de *Croton campestris* foram avaliados quanto a sua atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas e em modelo de tumor sólido de Ehrlich em pata de camundongo. Foram testadas diversas metodologias de extração a fim de verificar, com relação ao rendimento e à atividade, qual seria o extrato ideal para início do fracionamento. Dessa maneira, o melhor perfil de atividade no painel de linhagens tumorais utilizado foi observado para o extrato bruto por acetato de etila, tanto extraído a frio (CCEBA_{tot}), quanto o a quente (CCEBA_{totq}). As frações obtidas foram submetidas ao teste antiproliferativo e as melhores amostras oriundas de cada extrato foram novamente fracionadas. As frações mais ativas foram CFb96-98 e CFqb14. Ambas foram submetidas à avaliação de parâmetros de morte celular como avaliação de apoptose e necrose e do ciclo celular sendo que os resultados observados confirmam a diminuição da viabilidade celular, aumento de população celular em sub-G₁ e morte celular necrótica. A fração CFqb14, testada em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, apresentou resultados satisfatórios de inibição tumoral, bem como elevada potência visto que a dose mais baixa de 1mg/kg foi efetiva, comparada ao grupo controle. Testes fitoquímicos indicaram a presença de terpenóides nas frações ativas e através de espectrometria de massas, foi verificada a presença de duas substâncias já descritas na literatura, velamona e velamolona, que podem ser as responsáveis ou agir em sinergismo com outras moléculas, contribuindo para a atividade anticâncer. Portanto, esses resultados tornam a espécie brasileira *Croton campestris* uma importante candidata a fonte de novas moléculas a serem utilizadas no tratamento do câncer.

Abstract

Factors such as the rise in life expectancy, smoking, alcoholism and bad diet are increasing the incidence of cancer because the aging body and the action of carcinogens favor its appearance. This disease is the second leading cause of death worldwide. Tumor cells are characterized by ignoring the external and internal signals that regulate cell proliferation, and tend to avoid the processes of apoptosis and differentiation, being considered too invasive. Most chemotherapy drugs used in cancer treatment today comes from researches developed from natural sources like plants. Results were obtained from Fapesp-Bioprospecta Project (2004/07943-9) developed at CPQBA/UNICAMP. The anticancer activity of extracts and active fractions obtained from *Croton campestris* were evaluated in cultured human tumor cells and in Ehrlich solid tumor model in mouse paw. Several extraction methods were tested to verify which one would be better for the beginning of the fractionation, considering efficiency and activity. The extracts with a better activity profile in the tumor strains panel used were obtained by extraction with ethyl acetate, both cold (CCEBA_{tot}) and hot extraction (CCEBA_{totq}). Fractions obtained that presented the best results in the antiproliferative test were refractionated. The most active fractions of the respective fractionations were CFb96-98 and CFqb14. Both were submitted to the evaluation of cell death-related parameters and the results confirm a decrease in cell viability, increased cell population in sub-G₁ and necrotic cell death. Fraction CFqb14 tested in Ehrlich solid tumor, a murine adenocarcinoma, showed satisfactory results of tumor inhibition, as well as high potency because the lowest dose of 1mg/kg was effective, compared to the control group. Phytochemical tests indicated the presence of terpenoids in the active fractions and through mass spectrometry, it was possible to detect the presence of two substances described in the literature, velamone and velamolone, which may be responsible or act in synergy with other molecules, contributing to the anticancer activity. Therefore, these results make the Brazilian species *Croton campestris* an important source of new molecules used in cancer treatment.

Índice de abreviaturas

- 7-AAD – 7-amino-actinomicina
- 786-0 – linhagem celular de adenocarcinoma de rim
- C – controle das células
- CCD – cromatografia de camada delgada
- CCEBA – extrato bruto por acetato de etila
- CCEBAq – extrato bruto por acetato de etila a quente
- CCEBAtot – extrato bruto total por acetato de etila
- CCEBAtotq – extrato bruto total por acetato de etila a quente
- CCEBD – extrato bruto diclorometânico
- CCEBDf – extrato bruto diclorometânico de folhas frescas
- CCEBDq – extrato bruto diclorometânico a quente
- CCEBDs – extrato bruto diclorometânico de folhas secas
- CCEBE – extrato bruto etanólico
- CCEBEf – extrato bruto etanólico de folhas frescas
- CCEBEq – extrato bruto etanólico a quente
- CCEBEs – extrato bruto etanólico de folhas secas
- CCEBEtot – extrato bruto total etanólico
- CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
- CEUA – Comissão de Ética de Uso Animal
- CFa – frações do primeiro fracionamento a partir do CCEBAtot
- CFqaI – frações do primeiro fracionamento a partir do CCEBAtotq obtidas na primeira etapa
- CFqaII – frações do primeiro fracionamento a partir do CCEBAtotq obtidas na segunda etapa
- CFb – frações do segundo fracionamento a partir da CFa22-27
- CFqb – frações do segundo fracionamento a partir de CFqaI26-51 e CFqaII40-56
- CG/EM – cromatografia gasosa acoplada a detector de massas
- CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas

DI – densidade de inoculação

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético

ESI-MS – Espectrometria de massas por ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)

ESI - MS/MS – Espectrometria de massas por ionização por eletrospray em tandem (*Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*)

GI₅₀ – inibição do crescimento em 50% (*50% of growth inhibition*)

HaCat – linhagem celular de queratinócitos normais humanos

Hbg – hemoglobina

Hct – hematócrito

HRMS – Espectrometria de massas de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry*)

HT-29 – linhagem celular de adenocarcinoma colo retal

IARC – Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

IC – inibição de crescimento

INCA – Instituto Nacional do Câncer

K-562 – linhagem celular de leucemia mielóide crônica

kV – Kilo Volts

[M+H]⁺ - Molécula protonada

MCF-7 – linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MCH – hemoglobina corpuscular média

MCHC – concentração da hemoglobina corpuscular

MCV – volume corpuscular médio

MeOH – metanol

MS/MS – Espectrometria de massas em tandem (*Tandem Mass Spectrometry*)

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NCI – Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*)

NCI-ADR/RES – linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas

NCI-H460 – linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células

NIH:OVCAR-3 – linhagem celular de adenocarcinoma de ovário

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology*)

PARP – poli-ADP-ribose-polimerase

PBS – tampão fosfato salina

PC-3 - linhagem celular de adenocarcinoma de próstata

PI – Iodeto de propídio

Pt – plaquetas

QToF – Quadropolo por tempo de voo (*Quadruple Time of Flight*)

RBC – eritrócitos

RIP – proteína quinase de interação com receptor

RMN – ressonância magnética nuclear

RPMI – meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SFB – soro fetal bovino

SRB – sulforrodamina B

T – média das absorbâncias das células tratadas

T₀ – média das absorbâncias das células controle

TCA – ácido tricloroacético

TGI – inibição total do crescimento (*total growth inhibition*)

TNF – fator de necrose tumoral

U251 – linhagem celular de glioblastoma

UACC-62 – linhagem celular de melanoma

Vero – linhagem celular de fibroblasto normal de rim de macaco verde

WBC – leucócitos totais

Índice de figuras

Figura 1	Incidência e mortalidade no Brasil para os tipos de câncer em ambos os sexos. Número de casos estimados em 2008. Fonte: International Agency for Research on Cancer (IARC) França (http://www.globocan.iarc.fr).	p. 5
Figura 2	<i>Croton campestris</i> A.St.-Hil. da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA-UNICAMP.	p. 12
Figura 3	Furano-diterpenos obtidos das cascas de <i>C. campestris</i> : velamona (R=Me), velamolona (R=CH ₂ OH) e acetato de velamolona (R=CH ₂ OAc).	p. 13
Figura 4	Foto ilustrativa do Rotaevaporador marca Büchi, modelo R 200.	p. 19
Figura 5	Fluxograma do processamento de extração por maceração dinâmica usando três solventes.	p. 20
Figura 6	Fluxograma da extração total por acetato de etila.	p. 20
Figura 7	Foto ilustrativa do sistema para extração por sistema <i>Sohxlet</i> .	p. 21
Figura 8	Fluxograma da extração a quente por sistema <i>sohxlet</i> .	p. 22
Figura 9	Placa controle (T ₀) contendo as linhagens celulares testadas e o controle contendo apenas meio de cultura (branco).	p. 31
Figura 10	Placa de 96 poços usada nos testes antiproliferativos mostrando a disposição e concentrações das amostras, o branco das amostras, das células e do meio de cultura.	p. 32
Figura 11	Resumo dos processos extrativos e de fracionamento para as amostras mais ativas.	p. 43
Figura 12	Perfil observado por CCD dos extrato bruto por acetato de etila (CCEBA _{tot}) e etanólico total (CCEBE _{tot}) de <i>C. campestris</i> . Uso de diclorometano/ metanol (99/1) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.	p. 44
Figura 13	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração total por acetato de etila das folhas secas de <i>C. campestris</i> (CCEBA _{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.	p. 45
Figura 14	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração total por etanol 95% das folhas secas de <i>C. campestris</i> (CCEBE _{tot}) em cultura de células tumorais.	p. 46

- Figura 15** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração total com acetato de etila por sistema *Soxhlet* de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 47
- Figura 16** Perfil observado por cromatografia de camada delgada das frações unidas de acordo com o perfil cromatográfico. Uso de diclorometano/metanol (99/1) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador. p. 48
- Figura 17** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa1-8 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 49
- Figura 18** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa9-17 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 49
- Figura 19** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CF18-21 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 50
- Figura 20** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa22-27 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 51
- Figura 21** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa28-32 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 51
- Figura 22** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa33-40 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 52
- Figura 23** Perfil observado por cromatografia de camada delgada da fração CFa22-27 e suas frações obtidas por coluna filtrante unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado. Uso de diclorometano/metanol (99/1) como fase móvel e anisaldeído como revelador. p. 53
- Figura 24** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb25-33 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* em cultura de células tumorais e linhagem HaCat. p. 55

Figura 25	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb39-51 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de <i>C. campestris</i> em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.	p. 55
Figura 26	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb55-69 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de <i>C. campestris</i> em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.	p. 56
Figura 27	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb96-98 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de <i>C. campestris</i> em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.	p. 56
Figura 28	Perfil observado por cromatografia de camada delgada das frações unidas de acordo com o perfil cromatográfico para dois fracionamentos (CFqaI e CFqaII) a partir de CCEBAtotq. Uso de diclorometano/metanol (90/10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.	p. 58
Figura 29	Perfil observado por cromatografia de camada delgada das frações CFqa e unidas a partir de CCEBAtotq. Uso de diclorometano/metanol (90/10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.	p. 59
Figura 30	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFqaI26-42 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAtotq).	p. 60
Figura 31	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFqaI43-51 obtida do fracionamento do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAtotq).	p. 60
Figura 32	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFqaII 40-56 obtida do fracionamento do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAtotq).	p. 61
Figura 33	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com as frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56 obtida do fracionamento do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAtotq).	p. 61
Figura 34	Perfil observado por cromatografia de camada para as frações CFqb a partir de CCEBAtotq. Uso de diclorometano/metanol (90:10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.	p.63
Figura 35	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb12 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.	p. 64

Figura 36	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb13 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.	p. 65
Figura 37	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb14 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.	p. 65
Figura 38	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb15 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.	p. 66
Figura 39	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb16 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.	p. 67
Figura 40	Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb17 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.	p. 67
Figura 41	Cromatografia de camada delgada dos extratos e frações mais ativos revelados com diferentes reveladores: solução de anisaldeído, cloreto férrico, Dragendorff, Liebermann-Burchard e sulfato cérico. Manchas positivas para terpenóides destacadas. Uso de diclorometano/metanol (90/10) como fase móvel.	p. 70
Figura 42	Perfil de ESI(+)-MS dos extratos CCEBA _{tot} , CCEBE e CCEBE _{tot} com condições otimizadas para os íon de <i>m/z</i> .	p. 73
Figura 43	Perfil de ESI(-)-MS dos extratos CCEBA _{tot} , CCEBE e CCEBE _{tot} com condições otimizadas para os íons de <i>m/z</i> .	p. 74
Figura 44	Perfil de ESI(+)-MS dos extratos CCEBA _{totq} e CCEBA _{tot} com condições otimizadas para os íon de <i>m/z</i> .	p. 75
Figura 45	Perfil de ESI(+)-MS dos íons de <i>m/z</i> 301 (velamona) e 317 (velamolona) presentes nos extratos CCEBA _{totq} e CCEBA _{tot} .	p. 76
Figura 46	Porcentagem de células K562 viáveis após o tratamento de 24h com 5 e 10µg/mL das amostras CCEBA _{tot} , CFa22-27, CFb25-33 e CFb96-98.	p. 77
Figura 47	Porcentagem de células NCI-H460 viáveis após o tratamento de 24 e 48h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 78
Figura 48	Porcentagem de células K562 viáveis após o tratamento de 24 e 48h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 78
Figura 49	Porcentagem de células NCI-H460 positivas para anexina e 7-AAD após o tratamento de 24h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 79
Figura 50	Porcentagem de células K562 positivas para anexina e 7-AAD após o tratamento de 48h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 80

Figura 51	Porcentagem de células K562 positivas para anexina e 7-AAD após o tratamento de 3h com 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 80
Figura 52	Porcentagem das populações celulares (K562) presentes em cada fase do ciclo celular após tratamento de 24h com 5 e 10µg/mL das amostras CCEBA _{tot} , CFa22-27, CFb25-33 e CFb96-98.	p. 83
Figura 53	Porcentagem das populações celulares H460 presentes em cada fase do ciclo após o tratamento de 24h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 84
Figura 54	Porcentagem das populações celulares K562 presentes em cada fase do ciclo após o tratamento de 24h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.	p. 84
Figura 55	Varição do volume tumoral induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento com o extrato CCEBA _{tot} de <i>Croton campestris</i> ; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0,001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 87
Figura 56	Pata evidenciando a massa tumoral de animal não tratado (A), tratado com quimioterápicos doxorrubicina (B) e tamoxifeno (C) e tratado com 20mg/kg de CCEBA _{tot} (D).	p. 88
Figura 57	Peso relativo do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo após o tratamento com o extrato CCEBA _{tot} de <i>Croton campestris</i> ; *** p < 0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 89
Figura 58	Varição do peso corporal dos grupos durante o tratamento com o extrato CCEBA _{tot} de <i>Croton campestris</i> . * p<0,05, ** p < 0.01. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 90
Figura 59	Peso relativo dos órgãos após tratamento com o extrato CCEBA _{tot} de <i>Croton campestris</i> . * p<0,05, ** p < 0.01. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 91
Figura 60	Varição do volume tumoral induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento com os extratos CCEBA _{tot} e CCEBE _{tot} de <i>Croton campestris</i> ; * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0,001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 92
Figura 61	Peso relativo do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo após o tratamento com os extratos CCEBA _{tot} e CCEBE _{tot} de <i>Croton campestris</i> ; *p < 0.05 e ** p < 0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 93
Figura 62	Varição do peso corporal dos grupos durante o tratamento com os extratos CCEBA _{tot} e CCEBE _{tot} de <i>Croton campestris</i> . *p<0,001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).	p. 93

- Figura 63** Peso relativo dos órgãos após tratamento com os extratos CCEBA_{tot} e CCEBE_{tot} de *Croton campestris*. * p<0.05, ** p < 0.01 e p<0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 94
- Figura 64** Hemograma do sangue total dos animais após tratamento com os extratos CCEBA_t e CCEBE_t de *Croton campestris*: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito (Hct), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p<0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 96
- Figura 65** Variação do volume tumoral induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*; ** p < 0.01, ***p<0,001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 98
- Figura 66** Peso relativo do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo após o tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*; *p < 0.05, ** p < 0.01 e *** p < 0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 99
- Figura 67** Variação do peso corporal dos grupos durante o tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 100
- Figura 68** Peso relativo dos órgãos após tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*. * p<0.05 e ** p < 0.01. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 101
- Figura 69** Hemograma do sangue total dos animais após tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito (Hct), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p<0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA). p. 102
- Figura 70** Perfil observado por cromatografia de camada delgada dos extratos brutos diclorometânicos (CCEBD) e etanólicos (CCEBE) de folhas secas (S) e frescas (F) de *Croton campestris*. Uso de diclorometano/metanol 99:1 como fase móvel e anisaldeído como revelador. p. 117
- Figura 71** Perfil observado por cromatografia de camada delgada dos extratos brutos diclorometânicos (CCEBD), acetato de etila (CCEBA) e etanólicos (CCEBE) obtidos à frio e à quente (q) de *Croton campestris*. Uso de diclorometano/ metanol 99:1 como fase móvel e anisaldeído como revelador. p. 118

- Figura 72** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico das folhas frescas de *Croton campestris* (CCEBDf) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 119
- Figura 73** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico das folhas secas de *Croton campestris* (CCEBDs) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 120
- Figura 74** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico das folhas frescas de *Croton campestris* (CCEBEf) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 120
- Figura 75** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico das folhas secas de *Croton campestris* (CCEBEs) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 121
- Figura 76** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico das folhas secas de *C. campestris* (CCEBD) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 122
- Figura 77** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico obtido por extração a quente das folhas secas de *C. campestris* (CCEBDq) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 123
- Figura 78** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto por acetato de etila das folhas secas de *C. campestris* (CCEBA) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 123
- Figura 79** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração à quente por acetato de etila das folhas secas de *C. campestris* (CCEBAq) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 124
- Figura 80** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico das folhas secas de *C. campestris* (CCEBE) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 124
- Figura 81** Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico obtido por extração a quente das folhas secas de *C. campestris* (CCEBEq) em cultura de células tumorais e linhagem Vero. p. 125

Índice de tabelas

Tabela 1	Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> (adaptado de Marchetti, 2008).	p. 8
Tabela 2	Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o primeiro fracionamento do CCEBA _{tot} por coluna filtrante.	p. 23
Tabela 3	Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o fracionamento da fração CFa ₂₂₋₂₇ obtida por coluna filtrante a partir do CCEBA _{tot} .	p. 24
Tabela 4	Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o fracionamento do CCEBA _{totq} .	p. 25
Tabela 5	Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o fracionamento das frações unidas CFqaI 26-51 e CFqaII 40-56 a partir do CCEBA _{totq} .	p. 26
Tabela 6	Linhagens celulares tumorais humanas e normais (Vero e HaCat) utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas densidades de inoculação (DI).	p. 29
Tabela 7	Massa e rendimento das frações obtidas em fracionamento do extrato CCEBA _{tot} por coluna filtrante.	p. 48
Tabela 8	Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por coluna filtrante a partir do CCEBA _{tot} .	p. 52
Tabela 9	Massa e rendimento das frações obtidas em fracionamento da fração CFa ₂₂₋₂₇ por coluna filtrante.	p. 54
Tabela 10	Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante (CFb) a partir da fração CFa ₂₂₋₂₇ .	p. 57
Tabela 11	Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante (CFqa) a partir do CCEBA _{totq} .	p. 59
Tabela 12	Massa e rendimento das frações obtidas em fracionamento da fração CFqaI 26-51 e CFqaII40-56 unidas, coluna filtrante.	p. 64
Tabela 13	Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante (CFqb) a partir do CCEBA _{totq} .	p. 68
Tabela 14	Valores de GI ₅₀ (µg/mL) dos extratos diclorometânicos (CCEBD) e etanólicos (CCEBE) antes (f) e após secagem (s).	p. 121
Tabela 15	Valores de GI ₅₀ (concentração inibitória de 50% do crescimento) dos extratos diclorometânicos (CCEBD), por acetato de etila (CCEBA) e etanólicos (CCEBE) obtidos a quente (q) e a frio (f).	p. 126

Sumário

INTRODUÇÃO	3
1. Câncer	4
2. A pesquisa de novos fármacos anticâncer a partir de fontes naturais	6
3. <i>Croton campestris</i> A.St.-Hil. (Euphorbiaceae).....	10
OBJETIVOS	15
1. Objetivo geral	16
2. Objetivos específicos	16
METODOLOGIA	17
1. Processamento Fitoquímico	18
1.1. Coleta	18
1.2. Preparo do material vegetal	18
1.3. Obtenção dos extratos brutos	18
1.3.1. <i>Extração a frio por maceração dinâmica</i>	18
1.3.2. <i>Extração a quente por sistema Soxhlet</i>	21
1.4. Fracionamento dos CCEBA _{tot} por coluna cromatográfica filtrante	22
1.5. Fracionamento da fração ativa CFa ₂₂₋₂₇ obtida do CCEBA _{tot}	23
1.6. Fracionamento do CCEBA _{totq} por coluna cromatográfica filtrante.....	24
1.7. Fracionamento das frações ativas CFqa _{I26-51} e CFqa ₄₀₋₅₆ obtidas do CCEBA _{totq}	25
1.8. Triagem de frações por cromatografia de camada delgada.....	26
1.9. Análise de frações por CG/EM.....	27
1.10. Análise de extratos brutos e frações por espectrometria de massas	27
2. Ensaios <i>in vitro</i>	28
2.1. Células.....	28
2.2. Cultivo celular	28
2.2.1. <i>Descongelamento das células</i>	29
2.2.2. <i>Congelamento das células</i>	30
2.3. Atividade antiproliferativa de extratos e frações de <i>Croton campestris</i>	30
2.3.1. <i>Preparo das placas e inoculação das células</i>	30
2.3.2. <i>Preparo e aplicação das amostras</i>	31
2.3.3. <i>Análise dos dados</i>	33
2.4. Citometria de Fluxo	34
2.4.1. <i>Viabilidade celular</i>	34
2.4.2. <i>Avaliação de morte celular</i>	35
2.4.3. <i>Avaliação do ciclo celular</i>	36
3. Ensaios <i>in vivo</i>	37
3.1. Animais	37
3.2. Teste Hipocrático	37
3.3. Atividade anticâncer em modelo de tumor de pata	38
3.3.1. <i>Atividade anticâncer do CCEBA_{tot} em modelo de tumor de pata</i>	39

3.3.2. Atividade anticâncer do CCEBEtot em modelo de tumor de pata	39
3.3.3 Atividade anticâncer da fração CFqb14 obtida do CCEBAtotq em modelo de tumor de pata.....	40
3.4. Análise dos resultados	40
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	41
1. Processamento fitoquímico e atividade antiproliferativa dos extratos brutos	42
1.2. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> dos extratos brutos	45
2. Fracionamento do extrato CCEBAtot e atividade antiproliferativa.....	47
2.1. Fracionamento do CCEBAtot	47
2.2. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> das frações do extrato CCEBAtot	48
3. Fracionamento da fração ativa CFa22-27 e atividade antiproliferativa.....	53
3.1. Fracionamento da fração ativa CFa22-27.....	53
3.2. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> utilizando frações obtidas da fração CFa22-27...	54
4. Fracionamento do CCEBAtotq e atividade antiproliferativa.....	57
4.1. Fracionamento do CCEBAtotq	57
4.2. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> das frações do extrato CCEBAtotq	59
5. Fracionamento da fração ativa unida CFqaI26-51 e II40-56 e atividade antiproliferativa.....	62
5.1. Fracionamento da fração ativa unida CFqaI26-51 e CFqaII40-56	62
5.2. Atividade antiproliferativa das frações CFqb	64
6. Análise de frações por cromatografia de camada delgada	68
7. Análise de frações por CG/EM.....	71
8. Análise de extratos brutos e frações por espectrometria de massas.....	72
9. Parâmetros avaliados por citometria de fluxo	76
9.1. Viabilidade celular	76
9.2. Avaliação de morte celular	79
9.3. Avaliação do ciclo celular	82
10. Ensaios <i>in vivo</i>	85
10.1. Teste Hipocrático	85
10.2. Atividade anticâncer em modelo de tumor de pata	86
10.2.1. Atividade anticâncer do CCEBAtot em modelo de tumor de pata.....	86
10.2.2. Atividade anticâncer do CCEBEtot em modelo de tumor de pata	91
10.2.3. Atividade anticâncer da fração CFqb14 em modelo de tumor de pata ..	97
CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXOS.....	115
Anexo 1.....	116
Anexo 2	127

Introdução

Introdução

1. Câncer

O ciclo de vida celular envolve mecanismos extremamente complexos e cuidadosamente regulados em seus mínimos detalhes. Apenas um deslize pode ser o início de uma proliferação descontrolada que levará ao surgimento de nova população celular com características aberrantes, diferentes do tecido original e sem limites de crescimento, a neoplasia que, quando maligna, poderá protagonizar o câncer. As células cancerosas manifestam, em graus variados, cinco características que as distinguem das células normais: proliferação descontrolada, desdiferenciação, perda de função, invasividade e metástase (Rang & Dale, 2007). Os *hallmarks* do câncer compreendem diferentes características biológicas apresentadas ao longo do desenvolvimento tumoral como a manutenção da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, capacidade de replicação ilimitada, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase. São também componentes desse quadro a instabilidade genômica e mutações, que aceleram a aquisição dessa malignidade, a desregulação energética celular, o escape da destruição pelo sistema imunológico e a inflamação relacionada ao tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

Essas anomalias celulares vão levar à perda do controle sobre a morte celular e podem afetar cerca de 200 tipos celulares (Mesquita *et al.*, 2009). Esses fatores podem culminar em um conjunto de manifestações clínicas que caracterizam mais de 100 doenças nas quais as células apresentam um crescimento desordenado e podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011). Segundo o IARC (2011), a previsão de mortalidade por câncer no mundo é de mais de 9 milhões no ano de 2015 com quase 240 mil só no Brasil. A cada ano, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), surgem cerca de dez milhões de novos casos de câncer com cerca de seis milhões de mortes em todo o mundo. Essa malignidade é a segunda maior causa de morte no mundo superada apenas pelas mortes decorrentes de doenças cardiovasculares.

As causas do câncer podem ser adquiridas somaticamente a partir de fontes externas, relacionadas ao ambiente e aos hábitos de vida, ou internas o que, na maioria das vezes,

são pré-determinadas geneticamente. A interação desses fatores pode aumentar a probabilidade de transformações malignas nas células normais. Dentre as causas ambientais que mais contribuem para o desenvolvimento desta doença estão o tabagismo, a exposição excessiva ao sol, alcoolismo e o tipo de alimentação (INCA, 2011). Além disso, a extensão da expectativa de vida vem promovendo o aumento da incidência de câncer (Montesano & Hall, 2001), pois o envelhecimento do organismo favorece o aparecimento da doença já que as células das pessoas idosas foram expostas por mais tempo à ação de carcinógenos, o que aumenta a suscetibilidade à transformação maligna.

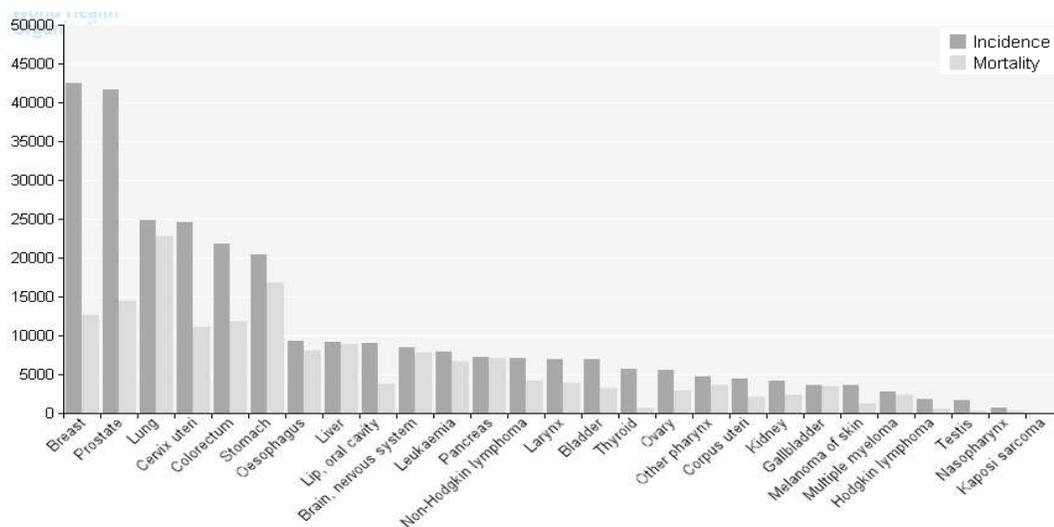


Figura 1. Incidência e mortalidade no Brasil para os tipos de câncer em ambos os sexos. Número de casos estimados em 2008. Fonte: International Agency for Research on Cancer (IARC) França (<http://www.globocan.iarc.fr>).

Entre os cânceres de maior incidência estão os de mama, próstata e pulmão (Fig. 1). O de pulmão é o que apresenta a maior taxa de mortalidade atingindo 85% dos casos de acordo com as estatísticas de 2008 (IARC, 2011).

Determinados tipos de cânceres podem ser curados mediante tratamentos locais como a cirurgia e radioterapia dependendo, obviamente, do tipo de tumor e do estágio de seu desenvolvimento. Outros tipos tumorais, principalmente no caso de disseminação

sistêmica, exigem tratamento combinado com diferentes terapias, incluindo o uso de diversos quimioterápicos (Grahame-Smith & Aronson, 2004). As classes de quimioterápicos incluem os agentes alquilantes (clorambucil, ciclofosfamida), antimetabólitos (5-fluorouracil, metotrexato), antibióticos carcinolíticos (bleomicina, dactinomicina, doxorubicina) e inibidores mitóticos (vincristina, vimblastina e paclitaxel) (Rang & Dale, 2007).

Os esforços e estudos para combater o câncer levaram a muitas descobertas fundamentais na biologia celular e molecular. A partir de anomalias observadas em células cancerígenas, muitas proteínas como a p53, foram descritas devido ao seu papel na proliferação descontrolada, no aumento das taxas de divisão celular e na diminuição de morte (Alberts *et al.*, 2010). Nesse sentido, os estudos do câncer têm progredido para buscar mecanismos cada vez mais específicos direcionando a pesquisa de novos quimioterápicos que possam atuar em alvos específicos minimizando os efeitos nocivos observados com os atuais medicamentos utilizados na clínica. No entanto, é preciso cuidado ao tratar o tema para que seleção de alvos específicos não induza as células tumorais a buscarem outros mecanismos de escape para progressão tumoral, o que pode ser favorecido com o uso de diferentes fármacos atuando em conjunto para a erradicação da neoplasia.

Tanto o foco molecular, pautado em receptores, proteínas e enzimas envolvidas na morte de células tumorais, quanto a abordagem que coloca em voga todo o potencial farmacológico escondido na imensa biodiversidade que possuímos, têm a sua contribuição no campo científico na busca por novos ativos anticâncer, visto que, a grande maioria dos medicamentos utilizados na clínica, no tratamento do câncer e em diversas outras doenças, são provenientes de estudos baseados em fontes naturais.

2. A pesquisa de novos fármacos anticâncer a partir de fontes naturais

Novas drogas obtidas a partir de fontes naturais que exibem perfil de atividade contra vários tipos de câncer estão entre os assuntos mais interessantes no campo da pesquisa em produtos naturais (Mesquita *et al.*, 2009). Compostos orgânicos de organismos terrestres e

marinhos têm sido extensivamente utilizados no tratamento de diversas doenças em sua forma natural e como plataforma para modificações sintéticas (Chin *et al.*, 2006).

Atualmente a biologia do câncer tem sido muito estudada e esse conhecimento tem sido aplicado no desenvolvimento de novos quimioterápicos, na tentativa de buscar alternativas para terapias contra o câncer bem como para a descoberta de novos mecanismos de ação.

Uma referência na área de busca de novos agentes anticâncer é o *National Cancer Institute* (NCI) que possui diversos programas para viabilizar a triagem de novas moléculas em grande quantidade. (Monga & Sausville, 2002). Com um painel de diversas linhagens celulares tumorais humanas derivadas de tumores sólidos, o NCI desenvolveu um método de triagem com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário e cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Esse método permitiu adaptar ao processamento de numerosos agentes químicos ou derivados de fontes naturais e tem minimizado o uso de animais além de exigir menor quantidade de material necessário para a triagem inicial (Monks *et al.*, 1991). Baseado nessa metodologia, o painel utilizado para o estudo na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/ UNICAMP, possui 10 linhagens com células de diferentes tecidos humanos (Tab. 1), cedidas pelo NCI. Nesse ensaio chave, a capacidade de proliferação desenfreada das células tumorais é avaliada na busca por compostos que reduzam a proliferação de células tumorais *in vitro* (Harvey & Cree, 2010).

Tabela 1. Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* (adaptado de Marchetti, 2008).

Sigla	Nome	Características
U251 ^a	Glioblastoma	Expressa GFAP e vimentina ¹ .
MCF-7 ^a	Adenocarcinoma de mama	Produz proteínas insulina like (liga fatores de crescimento) e superexpressa gene P2P-R; TNF- α inibe seu crescimento.
NCI-ADR/RES ^b	Adenocarcinoma de ovário resistente a multidroga	Perdeu o receptor de estrógeno; expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) traduzindo para glicoproteína-P que confere essa capacidade; proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas.
NIH: OVCAR-3 ^b	Adenocarcinoma de ovário	Possui receptores de estrógeno, andrógeno e progesterona e poucos cromossomos normais representados; adequada em estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal; alta produção da enzima 24-OHase e baixa de 1- α OHase.
PC-3 ^b	Adenocarcinoma de próstata	Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- α redutase; sem cromossomo Y normal detectado; é uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos.
786-O ^b	Adenocarcinoma de rim	Produz peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoideano; mutações no gene HVL e da prolina oxidase propiciam a formação do tumor.
K-562 ^c *	Leucemia mielóide crônica	Células altamente indiferenciadas (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica; há o gene fusionado Bcr-abl impedindo sua apoptose.
UACC-62 ^{**a}	Melanoma	Originária de melanócitos.
HT-29 ^d	Adenocarcinoma coloretal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2.
NCI-H460 ^d	Adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células	Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático; com características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas; é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico.

Tecido de Origem: ^aEctoderme; ^bMesoderme; ^cMesênquima; ^dEndoderme. Todas as células são aderidas, exceto a K-562*, que é em suspensão. Todas as linhagens apresentam morfologia epitelial, à exceção da K-562* (morfologia linfoblástica) e UACC-62** (morfologia fibroblástica). ¹Disponível online no site do CLS : http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e148/e3845/index_eng.html Consultado dia 25/10/2011.

Os resultados obtidos em cultura de células são livres de qualquer interferência metabólica, fisiológica ou ambiental. Dessa forma, por se tratar de um ambiente artificial, é preciso investigar também se as análises realizadas com sucesso *in vitro* também o seriam *in vivo*. Por isso, no estudo de novos agentes anticâncer, a etapa pré-clínica é fundamental para correlacionar os dados obtidos em cultura de células, corroborando ou não para a continuidade da investigação acerca do novo ativo (Carvalho, 2006).

Um dos modelos estabelecidos para a triagem pré-clínica de novos agentes anticâncer é o tumor sólido de Ehrlich. Descrito por Paul Ehrlich (1906) esse tumor é uma neoplasia de camundongo originária de adenocarcinoma de mama. Além de ser um modelo de fácil manutenção, uma de suas principais vantagens é o controle do número de células a serem inoculadas, de forma a padronizar os experimentos tanto da sua forma sólida quanto ascítica (Matsuzak, 2004). Portanto, através de modelos como esse, os animais tratados podem ter a evolução tumoral analisada ao longo do tratamento com a droga candidata, além de terem suas características clínicas observadas ao longo do ensaio, verificando a efetividade sistêmica da aplicação *in vivo*.

Por muitos séculos as plantas têm sido uma rica fonte de agentes terapêuticos e bases para diversas drogas sintéticas sendo que, ainda hoje, 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal (Sacoman *et al.*, 2008; Balunas & Kinghorn, 2005). Mais de 50% dos quimioterápicos utilizados foram obtidos a partir de fontes naturais, fazendo das plantas e seus derivados sintéticos importantes fontes de drogas antitumorais (Mesquita *et al.*, 2009; Mann, 2002). Nesse contexto, as pesquisas de diversos produtos naturais como fornecedores de compostos promissores têm sido apontadas como um caminho para a descoberta de novas drogas anticâncer (Figueiredo *et al.*, 2006; Siu, 2011; Cragg & Newman, 2009).

Nos últimos anos, com o advento da biologia molecular e o aprimoramento dos métodos de triagem de potenciais substâncias anticâncer, a busca por novos agentes de origem vegetal tem obtido sucesso sendo acompanhada de um significativo aumento nos investimentos nessa área. Entre os fatores que impulsionaram as pesquisas nessa área está à descoberta de drogas muito eficazes no tratamento do câncer (Carvalho, 2001; Rates, 2001; Newman *et al.*, 2003).

Atualmente, os agentes anticâncer mais utilizados na clínica pertencem a quatro classes principais, incluindo derivados sintéticos ou semi-sintéticos: alcaloides da *Vinca* (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don, epipodofilotoxinas de *Podophyllum peltatum* L., taxanos de *Taxus brevifolia* Nutt e camptotecinas de *Camptotheca acuminata* Decne (Balunas *et al.*, 2006).

Os agentes conhecidos hoje com ação sobre o câncer são classificados em dois grupos. Os agentes bloqueadores (quimiopreventivos) que inibem a iniciação do processo carcinogênico e estão presentes em diversos alimentos como o café e o alho e os agentes supressores, que inibem a proliferação de células malignas durante a fase de promoção da progressão tumoral (Marchetti, 2008). Por atuar após a instalação da doença, esses últimos são o foco na busca de novos fármacos (Duvoix *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2005).

Por isso, a busca de novos medicamentos tem nos produtos naturais uma importante fonte de novos candidatos, visto a pouco explorada diversidade química e biológica que pode ser encontrada nas diversas esferas naturais (Cragg & Newman, 2009; Diwanay *et al.*, 2004).

3. *Croton campestris* A.St.-Hil. (Euphorbiaceae)

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta cujas plantas têm sido, desde os tempos ancestrais, usadas para tratar uma ampla variedade de doenças incluindo câncer (Brandão *et al.*, 2008). Apesar dessa imensa biodiversidade, grande parte das plantas brasileiras possui pouco ou mesmo nenhum estudo químico ou biológico e podem ser uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, apesar de muitos agentes farmacologicamente ativos contra o câncer e outras doenças serem obtidos a partir de estudos randômicos, é importante dirigir a triagem de compostos naturais a partir de informações sobre compostos descritos em espécies precursoras (Ma & Wang, 2008). Dessa forma, o histórico de moléculas bioativas identificadas em espécies da família Euphorbiaceae e seu gênero *Croton*, viabilizam os estudos com a espécie selecionada, a *Croton campestris*.

A família Euphorbiaceae está presente principalmente em regiões tropicais e temperadas de todo o planeta e apresenta cerca de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. No Brasil, é uma das famílias mais ricas em número de espécies, cerca de 1.000, distribuídas em 80 gêneros, possuindo ampla distribuição com representantes em todos os diferentes tipos de vegetação do país (Sátiro & Roque, 2008). Os diversos usos das plantas contidas nessa família refletem a elevada diversidade química presente nesse grupo de plantas.

O gênero *Croton* apresenta cerca de 1300 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do planeta sendo que várias delas são descritas por apresentar um importante papel na medicina tradicional da África, Ásia e América do Sul. Entre os diversos usos medicinais está o tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia, diabetes, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade. O gênero é rico em constituintes com atividade biológica como diterpenóides e alcaloides (Salatino *et al.*, 2007).

Croton campestris A.St.-Hil., conhecida popularmente como velame-do-campo (Fig. 2), é um arbusto nativo, não endêmico presente nos domínios da Amazônia, caatinga, cerrado e Mata Atlântica. Está presente principalmente nas regiões sudeste e nordeste (Matias *et al.*, 2010) mas sua distribuição geográfica compreende as cinco regiões brasileiras: região Norte (Tocantins), Nordeste (PiauÍ, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) (Cordeiro *et al.*, 2010).

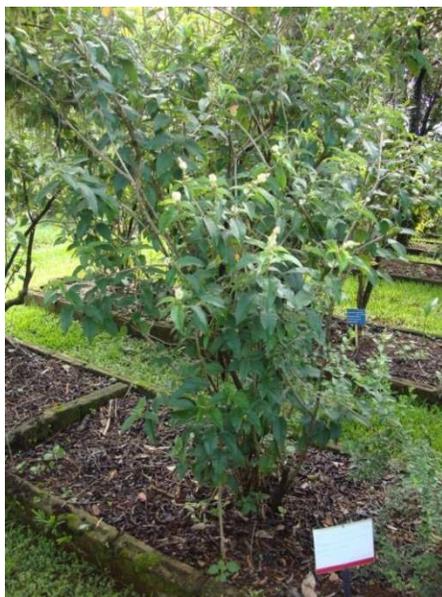


Figura 2. *Croton campestris* A.St.-Hil. da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA-UNICAMP.

Na medicina popular as folhas e raízes da *C. campestris*, sob a forma de chá, são utilizadas como poderoso depurativo, no combate à escrofulose, doenças venéreas, impinges, tumores, moléstias de pele, reumatismo, úlcera do útero, diarreia, artrismo, doenças inflamatórias e parasitárias, com atividade inseticida, antimicrobiana, anti-helmíntica, antimalárica e leishmanicida (Prata *et al.*, 1993; Babili *et al.*, 1998; Babili *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2005; Matias *et al.*, 2010). No entanto, até o momento nenhum estudo aplicado à atividade anticâncer dessa espécie foi realizado. E, de acordo com resultados promissores realizados previamente pelo grupo de pesquisa, essa espécie brasileira mostrou-se como uma excelente candidata aos estudos de seu potencial farmacológico anticâncer.

Algumas dos componentes presentes em diferentes partes da *C. campestris* já foram descritos e algumas de suas atividades biológicas foram comprovadas. Prata *et al.* (1993) isolaram três princípios do extrato etanólico obtido das folhas da planta, do quais a taspina provocou contração do músculo reto abdominal de sapo; a 1,2,10-trihidroxi-N-óxido-

crotosinolina produziu relaxamento em preparação de traqueia isolada de cobaio; e o tetracosanoato de butila que não apresentou atividade farmacológica.

Três diterpenos (Fig. 3) foram isolados do extrato diclorometânico obtido das cascas das raízes de *C. campestris* por Babili *et al.* (1998), a velamona (*ent*-15,16-epoxy-2-oxo-3,13(16),14-clerodatrien), a velamolona (*ent*-15,16-epoxy-20-hydroxy-2-oxo-3,13(16),14-clerodatrien) e o acetato de velamolona (*ent*-15,16-epoxy-20-acetoxy-2-oxo-3,13(16),14-clerodatrien). Tanto o extrato diclorometânico quanto os três componentes isolados apresentaram atividade moluscida contra *Bulinus truncatus* o hospedeiro intermediário do *Shistosoma haematobium* (Babili *et al.*, 2006).

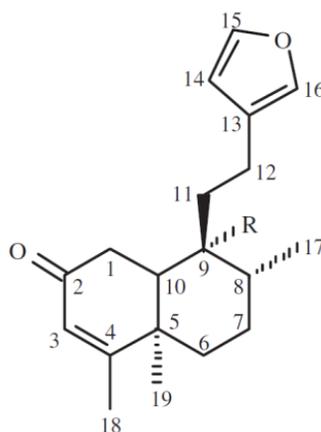


Figura 3. Furano-diterpenos obtidos das cascas de *C. campestris*: velamona (R=Me), velamolona (R=CH₂OH) e acetato de velamolona (R=CH₂OAc).

Santos *et al.* (2005) isolou do extrato butanólico das partes aéreas da planta, quatro flavonoides O-glicosilados: quercetina (3-O-β-D-Apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil quercetina), hiperina (3-O-β-D-Galactopiranosil quercetina), guajaverina (3-O-α-L-arabinopiranosil quercetina) e quercitrina (3-O-α-L-Ramnopiranosil quercetina). Mesmo não sendo substâncias inéditas, foi a primeira vez que a presença dessas substâncias foi relatada em *C. campestris*.

Objetivos

Objetivos

1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade anticâncer de extratos e frações obtidos das folhas da espécie brasileira *Croton campestris* A.St.-Hil.

2. Objetivos específicos

1. Obter extratos brutos com atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas;
2. Fracionar o extrato ativo por biomonitoramento a fim de isolar e identificar os componentes com atividade anticâncer;
3. Avaliar a atividade observada *in vitro*, em animais via tumor sólido de Ehrlich de pata;
4. Avaliar parâmetros celulares envolvidos na ação citotóxica dos extratos e frações de *Croton campestris* via citometria de fluxo;

Metodologia

Metodologia

1. Processamento Fitoquímico

1.1 Coleta

As folhas da espécie vegetal *Croton campestris* A.St.-Hil. foram coletadas na CPMA do CPQBA/UNICAMP em abril de 2010, julho de 2010, setembro de 2010 e março de 2011, com exsicata número CPQBA16, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Glyn Mara Figueira.

1.2 Preparo do material vegetal

O material vegetal coletado foi seco em estufa ventilada (Precision, Modelo 28) a 40°C por 60 horas, moído em moinho de facas com peneira de 40 mesh (MR-Manesco Raniere LTDA, tipo MM R-320) e armazenado em freezer até que fosse processada para a obtenção dos extratos.

1.3 Obtenção dos extratos brutos

A obtenção dos extratos e fracionamento foi realizada na Divisão de Fitoquímica do CPQBA, sob orientação da Dra. Mary Ann Foglio. Todos os processos de extração foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) e através testes antiproliferativos *in vitro*.

1.3.1 Extração a frio por maceração dinâmica

Folhas secas (99,95g) e frescas (9,13g) moídas foram submetidas a processo de maceração dinâmica com 500 e 100 mL de diclorometano (Synth[®]), respectivamente, durante 1,5 hora. Esse procedimento foi repetido por três vezes, sendo que ao final de 4,5 horas os volumes resultantes foram reunidos e filtrados em sistema a vácuo em funil de büchner. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo (Büchi, modelo R 200; Fig. 4) a 40°C, obtendo-se o extrato bruto diclorometânico das folhas frescas (CCEBDF) e o extrato bruto diclorometânico das folhas secas (CCEBDs).



Figura 4. Foto ilustrativa do Rotaevaporador marca Büchi, modelo R 200.

O resíduo vegetal deste processo foi retomado em 500 mL de etanol a 95% (Synth[®]) e extraído novamente por três vezes. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo a 40°C e a seguir liofilizado (liofilizador modelo BT. 8xL Virtis Sentry[™]), fornecendo os extratos brutos etanólico (CCEBEf e CCEBEs).

A extração com acetato de etila (Synth[®]) foi realizada usando a mesma metodologia descrita sendo executada logo após a primeira etapa da extração com diclorometano e, em seguida, prosseguiu-se com a etapa extrativa com etanol a 95%. Dessa maneira, foram obtidos o extrato bruto diclorometânico (CCEBD), o extrato bruto por acetato de etila (CCEBA) e o extrato bruto etanólico (CCEBE), todos obtidos a partir das folhas secas e moídas de *C. campestris* (Fig. 5).

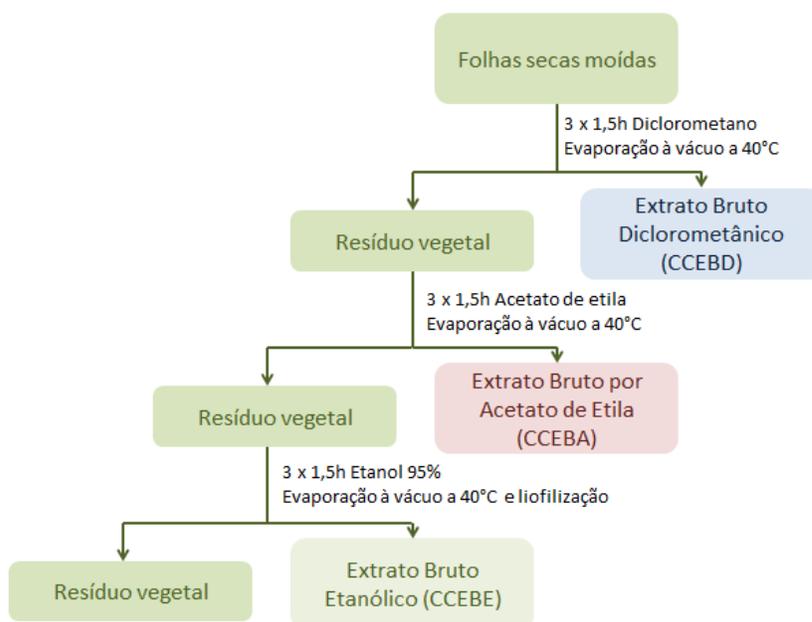


Figura 5. Fluxograma do processamento de extração por maceração dinâmica usando três solventes.

Por maceração dinâmica, foram feitas 6 extrações sequenciais das folhas secas e moídas (98,63g) com acetato de etila por 1,5h cada (Fig. 6) obtendo-se o extrato bruto total por acetato de etila (CCEBA_{tot}), o qual foi escolhido para continuar o processamento fitoquímico.

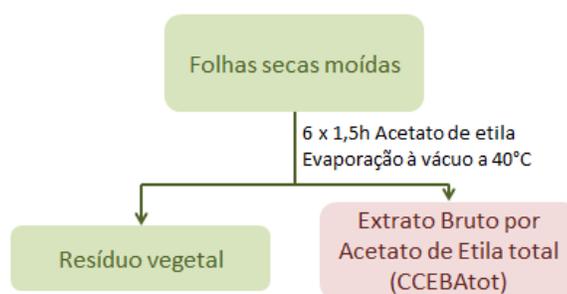


Figura 6. Fluxograma da extração total por acetato de etila.

A extração total com etanol 95% foi realizada por maceração dinâmica. Foram feitas 6 extrações sequenciais das folhas secas e moídas (10,96g) com 100mL por 1,5h cada, obtendo-se o extrato bruto total etanólico (CCEBE_{tot})

1.3.2 Extração a quente por sistema Soxhlet

Foi realizada extração por sistema *Soxhlet* (Fig. 7) na qual foi utilizado folhas secas e moídas (24,73g) e foram realizadas 3 extrações sequenciais de 48h cada, utilizando 100 mL dos solventes diclorometano, acetato de etila e etanol a 95%.



Figura 7. Foto ilustrativa do sistema para extração por sistema *Soxhlet*.

Os extratos foram filtrados e evaporados sob vácuo a 40°C, sendo o CCEBEq posteriormente liofilizado (Fig. 8). Foram obtidos o extrato bruto diclorometânico a quente (CCEBDq), o extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAq) e o extrato bruto etanólico a quente (CCEBEq). Os resultados dos ensaios de atividade antiproliferativa dos extratos obtidos podem ser apreciados no anexo 1.

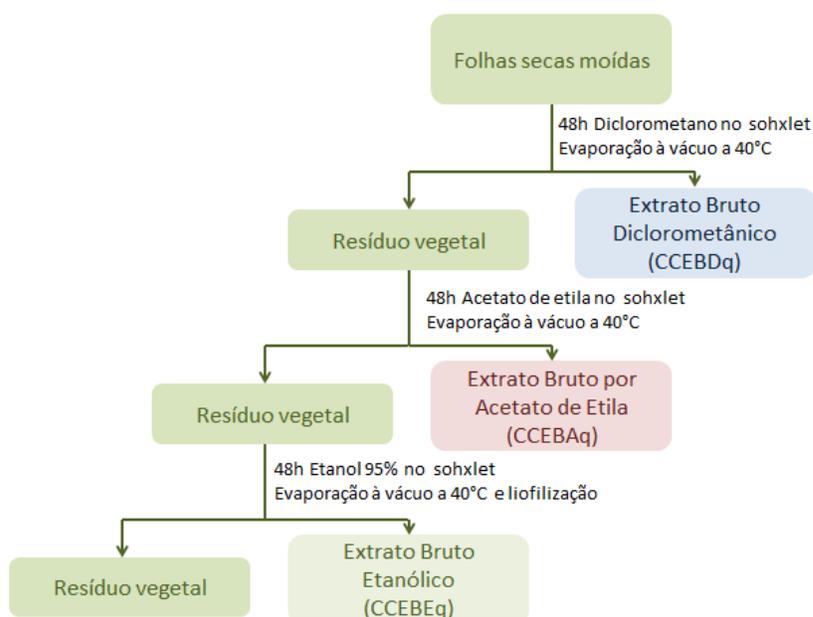


Figura 8. Fluxograma da extração a quente por sistema *sohxlet*.

Para a extração total por acetato de etila, folhas secas e moídas (200,25g) foram submetidas às 72h de extração, com 3 trocas de solvente e utilizando 750mL de solvente em cada troca. Foram feitos dois processos de extração, sendo que no segundo foram utilizados 276,99g de folhas secas e moídas, seguindo os mesmos procedimentos descritos. Os extratos foram filtrados e evaporados sob vácuo a 40°C obtendo-se os extratos brutos total por acetato de etila a quente (CCEBA_{totq}) os quais foram submetidos a fracionamento.

1.4 Fracionamento dos CCEBA_{tot} por coluna cromatográfica filtrante

A coluna cromatográfica filtrante foi montada utilizando funil de placa porosa como suporte da fase estacionária de sílica gel 60 (Merck®) que foi previamente empacotada a seco. O extrato CCEBA_{tot} (1,044g) foi incorporado em sílica gel e a amostra resultante foi aplicada à parte superior da coluna empacotada. Em seguida a coluna foi eluída com uma mistura de solventes de polaridade crescente de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o primeiro fracionamento do CCEBA_{tot} por coluna filtrante.

Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol	Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol
1	100	0	0	16	0	84	16
2	50	50	0	17	0	82	18
3	25	75	0	18	0	80	20
4	20	80	0	19	0	78	22
5	15	85	0	20	0	76	24
6	10	90	0	21	0	74	26
7	5	95	0	22	0	72	28
8	0	100	0	23	0	70	30
9	0	98	2	24	0	68	32
10	0	96	4	25	0	66	34
11	0	94	6	26	0	64	36
12	0	92	8	27	0	62	38
13	0	90	10	28	0	60	40
14	0	88	12	29	0	58	42
15	0	86	14	Lavagem	0	0	100

As frações foram monitoradas por CCD, unidas de acordo com o perfil apresentado e evaporadas sob vácuo a 40°C, obtendo-se as frações por coluna filtrante (CFa).

1.5 Fracionamento da fração ativa CFa22-27 obtida do CCEBA_{tot}

A coluna cromatográfica filtrante foi montada utilizando funil contendo algodão na base, como suporte da fase estacionária de sílica gel 60 (Merck®) empacotada a vácuo. A fração CFa22-27 (0,4026g) foi incorporada em 0,5g de sílica gel 60 e a amostra resultante foi aplicada à parte superior da coluna empacotada. Em seguida a coluna foi eluída com uma mistura de solventes de polaridade crescente de acordo com a tabela 3. À medida que a coluna foi eluída, as frações foram sendo recolhidas a cada 10mL, aproximadamente.

Tabela 3. Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o fracionamento da fração CFa22-27 obtida por coluna filtrante a partir do CCEBA_{tot}.

Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol	Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol
1	100	0	0	15	0	98,6	1,4
2	50	50	0	16	0	98,4	1,6
3	25	75	0	17	0	98,2	1,8
4	20	80	0	18	0	98,0	2,0
5	15	85	0	19	0	97,8	2,2
6	10	90	0	20	0	97,6	2,4
7	5	95	0	21	0	97,4	2,6
8	0	100	0	22	0	97,2	2,8
9	0	99,8	0,2	23	0	97,0	3,0
10	0	99,6	0,4	24	0	96,8	3,2
11	0	99,4	0,6	25	0	96,6	3,4
12	0	99,2	0,8	26	0	96,4	3,6
13	0	99,0	1,0	27	0	96,2	3,8
14	0	98,8	1,2	Lavagem	0	0	100

As frações foram monitoradas por CCD, unidas de acordo com o perfil apresentado e evaporadas sob vácuo a 40°C, obtendo-se as frações por coluna filtrante (CFb).

1.6 Fracionamento do CCEBA_{tot}q por coluna cromatográfica filtrante

A coluna cromatográfica filtrante foi montada utilizando funil de placa porosa como suporte da fase estacionária de sílica gel 60 (Merck®) foi previamente empacotada. O processo de fracionamento foi realizado em duas porções de CCEBA_{tot}q (16,34g e 19,81g) que foi inicialmente incorporado em sílica gel e a amostra resultante foi aplicada à parte superior da coluna empacotada. A coluna foi eluída com uma mistura de solventes de polaridade crescente de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 4. Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o fracionamento do CCEBA_{totq}.

Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol	Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol
1	100	0	0	20	0	98,2	1,8
2	90	10	0	21	0	98,0	2,0
3	80	20	0	22	0	97,8	2,2
4	70	30	0	23	0	97,6	2,4
5	60	40	0	24	0	97,4	2,6
6	50	50	0	25	0	97,2	2,8
7	40	95	0	26	0	97,0	3,0
8	30	70	0	27	0	96,8	3,2
9	20	80	0	28	0	96,6	3,4
10	10	90	0	29	0	96,4	3,6
11	0	100	0	30	0	96,2	3,8
12	0	99,8	0,2	31	0	96,0	4,0
13	0	99,6	0,4	32	0	95,8	4,2
14	0	99,4	0,6	33	0	95,6	4,4
15	0	99,2	0,8	34	0	95,4	4,6
16	0	99,0	1,0	35	0	95,2	4,8
17	0	98,8	1,2	36	0	95,0	5,0
18	0	98,6	1,4	Lavagem	0	0	100
19	0	98,4	1,6				

As frações foram monitoradas e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico apresentado obtendo-se as frações por coluna filtrante (CFqaI e CFqaII).

1.7 Fracionamento das frações ativas CFqaI26-51 e CFqaII40-56 obtidas do CCEBA_{totq}

A fim de otimizar o processo de fracionamento e obter maior massa de frações mais puras, as frações resultantes do primeiro fracionamento foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico e massas obtidas para a execução desse segundo fracionamento. Dessa forma, coluna cromatográfica filtrante foi montada utilizando funil de placa porosa contendo a fase estacionária de sílica gel 60 (Merck[®]) empacotada a vácuo. As frações CFqaI26-51 e CFqaII40-56 foram reunidas (1,7004g) e incorporadas em sílica gel 60 e a

amostra resultante foi aplicada à parte superior da coluna empacotada. Em seguida a coluna foi eluída com uma mistura de solventes de polaridade crescente, mistura essa que priorizou a separação dos compostos mais polares, visto a atividade antiproliferativa observado o sucesso para frações do mesmo tipo previamente testadas (Tab. 5).

Tabela 5. Porcentagens dos solventes utilizados em cada eluente usado para o fracionamento das frações unidas CFqal 26-51 e CFqalII 40-56 a partir do CCEBA totq.

Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol	Eluente	Hexano	Diclorometano	Metanol
1	50	50	0	9	0	94	6
2	25	75	0	10	0	93	7
3	0	100	0	11	0	92	8
4	0	99	1	12	0	91	9
5	0	98	2	13	0	90	10
6	0	97	3	14	0	50	50
7	0	96	4	Lavagem	0	0	100
8	0	95	5				

As frações resultantes foram monitoradas por CCD, evaporadas sob vácuo a 40°C obtendo-se as frações por coluna filtrante (CFqb).

1.8 Triagem de frações por cromatografia de camada delgada

A fim de avaliar a presença de alguns grupos químicos nos extratos e frações com maior atividade antiproliferativa, as amostras foram aplicadas em diferentes cromatoplasmas de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck®) na concentração 30mg/mL e eluídas com diclorometano/metanol da proporção 1/10, dada a polaridade das frações ativas. Em seguida, cada placa foi revelada com os seguintes reveladores:

- Solução de anisaldeído (C₈H₈O₂) que revela compostos orgânicos em manchas escurecidas.
- Reagente de Dragendorff (K(BiI₄)) para alcaloides revelados em amarelo;
- Cloreto férrico (FeCl₃) para taninos, onde os grupos fenólicos são revelados em azul escuro;
- Sulfato cérico (Ce(SO₄)₂.5H₂O) para terpenóides e flavonoides, revelados em roxo

e amarelo respectivamente;

- Solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) para cumarinas, reveladas em UV;
- Reagente de Liebermann-Burchard (anidrido acético $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ em ácido sulfúrico (H_2SO_4)) para triterpenóides e esteroides, revelados em azul violáceo;

1.9 Análise de frações por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM)

As frações obtidas por cromatografia de camada delgada que se apresentaram com perfil diferenciado ou com bandas isoladas, foram submetidas à análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

As frações foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 6890, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250°C; temperatura do detector: 300°C; programa de temperatura: 40(2min)-240°C, 5°C/min, 240-300°C, 10°C/min; com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min.

Os fragmentogramas foram analisados no programa Enhanced Data Analysis através de análise comparativa com a biblioteca NIST.

1.10 Análise de extratos brutos e frações por espectrometria de massas (ESI e MS/MS)

As análises foram realizadas no Laboratório Thomson do IQ-UNICAMP com auxílio da pesquisadora Elaine Cabral, sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Eberlin.

Os extratos e frações de *Croton campestris* foram diluídos em MeOH/H₂O +7% de ácido fórmico sob agitação em Vortex por 1 min. As amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram extraídos no modo

negativo e/ou positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester - Reino Unido) de configuração de ESI-QToF. As condições de operação do equipamento para das 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.

2. Ensaio *in vitro*

2.1 Células

As linhagens tumorais humanas do CPQBA indicadas na tabela 6 foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (Bethesda, MD, EUA). Os procedimentos de experimentação foram realizados em condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], classe IIB2).

2.2 Cultivo celular

As células (Tab. 6) mantidas em frascos de cultivo de 25cm³ com 5mL de meio RPMI contendo 5% de SFB e foram repicadas uma vez por semana, quando a monocamada de células atingia aproximadamente 80% de confluência, ou seja, quando cobriam 80% da superfície disponível para crescimento na superfície do frasco.

Para a K562, que cresce em suspensão, o repique foi realizado com a transferência de volume previamente determinado do frasco de manutenção antigo para o novo frasco que posteriormente teve o seu volume completado para 5 ou 10mL para garrafas de 25cm² ou 75cm², respectivamente.

No caso das linhagens que crescem aderidas, foi necessária a tripsinização, ou seja, o desprendimento das células do frasco de ação enzimática. Após a aspiração do meio de cultura, foram adicionados 500µL de tampão de Hank's (Sigma[®]) banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Após a aspiração do tampão, foram adicionados 500µL de tripsina-EDTA 2,5g/L (Vitrocell[®]) a 37°C e o frasco foi incubado

por tempo determinado de acordo com a característica de cada tipo celular, já que algumas linhagens se desprendem mais facilmente que outras. Após a completa soltura das células, a ação da tripsina foi bloqueada pelo banho com RPMI contendo 5% de SFB. Finalmente, prosseguiu-se com as mesmas etapas realizadas para a linhagem leucêmica.

O volume de células a ser cultivado, ou seja, a diluição utilizada foi dependente das características de cada linhagem celular (Tab. 6) e dos objetivos dos experimentos realizados. Os frascos foram mantidos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

Tabela 6. Linhagens celulares tumorais humanas e normais (Vero e HaCat) utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (DI).

Linhagem Celular	Nome	DI (x10 ⁴ células/mL)
Glia	U251	4,0
Melanoma	UACC-62	4,0
Mama	MCF-7	6,0
Ovário com Fenótipo Resistência Multidroga	NCI-ADR/ RES	5,0
Renal	786-O	5,0
Pulmão	NCI-H460	4,0
Próstata	PC-3	4,5
Ovário	OVCAR-3	7,0
Cólon	HT-29	5,0
Leucemia	K-562	6,0
Rim de macaco	Vero	4,0
Queratinócito humano	HaCat	4,0

2.2.1 Descongelamento das células

A fim de expandir as células em passagens e quantidade adequada para os experimentos, as células tiveram seus criotubos descongelados a temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15mL e, para lavagem do glicerol

utilizado no congelamento, teve o seu volume completado para 10mL com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®). O tubo foi centrifugado a 2000rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado de células foi ressuscitado cuidadosamente em 5mL do meio de cultura descrito. As células em meio de cultura foram transferidas para frascos de manutenção de 25cm² (T₂₅) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

2.2.2 Congelamento das células

As células foram cultivadas em frascos de 75 cm², para obtenção de uma quantidade elevada para que o volume final da solução celular a ser congelado fosse de 1x 10⁶cel/ml. Para células aderidas, após tripsinização com tripsina/EDTA (Sigma®), as células foram ressuscitadas em 10mL de meio suplementado com 30% de SFB, procedido pela contagem do número de células em câmara de Neubauer. A solução celular foi centrifugada a 2000rpm, por 4 minutos à 4°C, o sobrenadante foi aspirado e, a seguir, foi adicionado meio RPMI com 30% de SFB e 20% de glicerol em volume calculado para obtenção de uma concentração final de 1x 10⁶cel/mL. Cada criotubo contendo 1mL da solução celular foi colocado na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 horas, para depois serem imersos na fase líquida.

2.3 Atividade antiproliferativa de extratos e frações de Croton campestris

Para a triagem de atividade antiproliferativa *in vitro* foram selecionadas 10 linhagens celulares, oriundas de tumores humanos, assim designadas: linhagens K562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), 786-0 (rim) e U251 (glioma); e 1 linhagem celular normal: VERO (rim de macaco) posteriormente substituída pela HaCat (queratinócito humano).

2.3.1 Preparo das placas e inoculação das células

No início do teste 100µL de suspensão celular foram plaqueados em placas de 96 compartimentos, de acordo com as respectivas densidades de inoculação descritas na tabela

7, utilizando meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L). Cada placa continha apenas uma linhagem celular, sendo possível a avaliação de cinco amostras distintas em triplicata em cada placa além de uma placa controle celular (T_0) (Fig. 9) contendo as linhagens celulares utilizadas no experimento. Anteriormente a adição das amostras, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido.

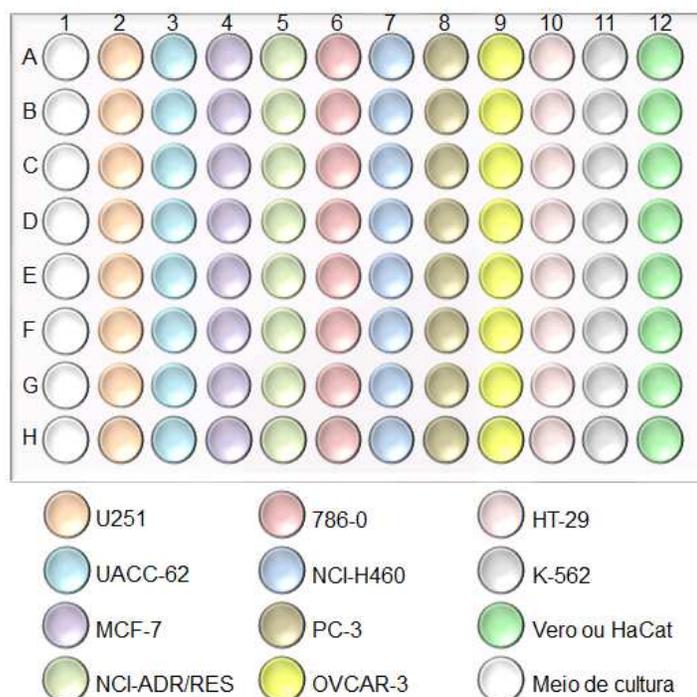


Figura 9. Placa controle (T_0) contendo as linhagens celulares testadas e o controle contendo apenas meio de cultura (branco).

2.3.2 Preparo e aplicação das amostras

Todos os extratos e algumas das frações obtidas foram submetidos ao teste antiproliferativo a fim de que fossem selecionados para a continuidade do fracionamento e testes *in vivo* apenas extratos e frações que se mostrassem ativas.

As amostras foram diluídas em soluções estoque em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1g/mL. Para adição à cultura de células o DMSO foi diluído em pelo menos 400 vezes em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L) para não produzir toxicidade. Após a diluição, 100µL de meio contendo extrato ou

fração a ser testada foram adicionados à placa de 96 compartimentos, exceto na T₀ (placa controle), nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL em triplicata (Fig. 10). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido.

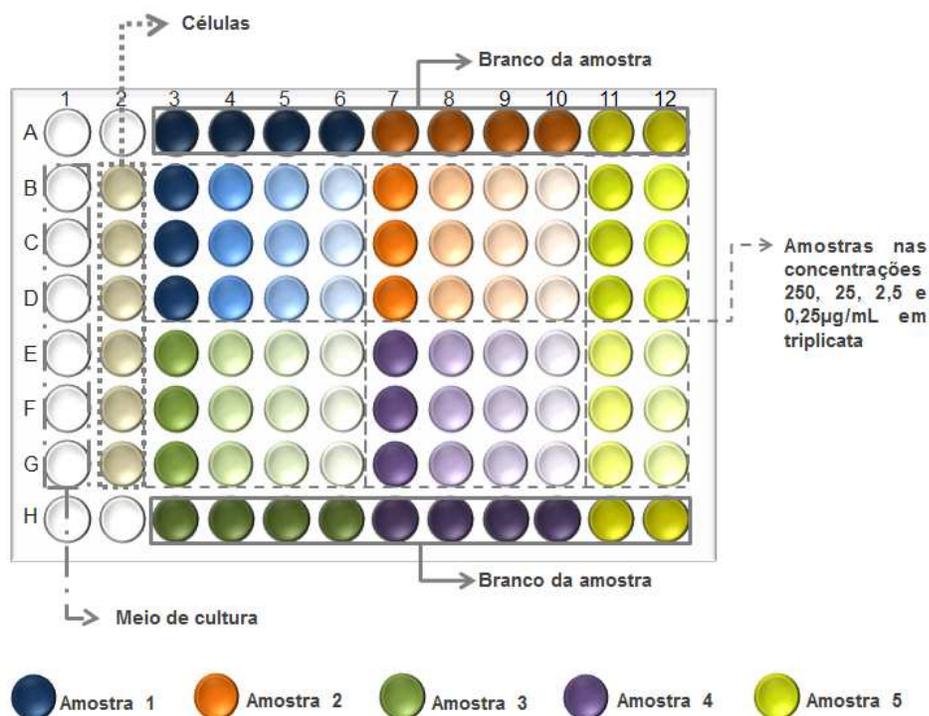


Figura 10. Placa de 96 poços usada nos testes antiproliferativos mostrando a disposição e concentrações das amostras, o branco das amostras, das células e do meio de cultura.

Ao término das aplicações das amostras e início do tratamento de 48h, a placa T₀ foi fixada com a adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (Sigma[®]) determinando assim a real quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas.

Ao final do tratamento de 48h, as células foram fixadas pela adição de 50 µL de TCA a 50%, e incubação por 1 hora a 4°C. Em seguida as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a completa secagem das placas, foram adicionados a cada compartimento 50µL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma[®]) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% para a completa remoção dos resíduos de SRB. Após a completa secagem das placas a temperatura ambiente, o corante ligado as proteínas foi solubilizado pela adição de 150 µL de Trizma Base na concentração 10µM e pH 10,5 (Sigma[®]). Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica da absorbância em leitor de microplacas a 540nm (Molecular Devices[®], modelo VersaMax). A sulforrodamina B liga-se aos aminoácidos básicos das proteínas das células viáveis no momento da fixação e então, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (Skehan *et al.*, 1990; Rubistein *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991).

2.3.3 Análise dos dados

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e através das fórmulas a seguir, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresentou IC.

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

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

Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C o controle de célula e T_0 o controle das células no dia da adição das drogas, o resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração de extrato ou fração. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma concentração dependente, preferencialmente apresentando seletividade para os tipos celulares.

Através do *software* Origin[®], foi feita regressão sigmoide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento, e foram calculados os valores TGI (*total growth inhibition*) que são os valores da concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular. Esses foram utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade. Por conta das características citostáticas dos extratos e frações testadas, foram calculados os valores de GI₅₀ (*50% of growth inhibition*) que são os valores da concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%. O GI₅₀ representa de uma forma melhor os resultados antiproliferativos de amostras com essas características.

2.4 Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo Guava EasyCiteTMMiniSystem Millipore[®] (FAPESP 09/51602-5) viabilizou o início das análises de parâmetros celulares envolvidos na atuação dos extratos e frações de *C. campestris* estudados. As concentrações usadas no controle com doxorubicina (Doxorubicin hydrochloride) (Eurofarma[®]) foram 2,5 e 5µg/mL para o primeiro grupo de experimentos. Para o segundo grupo de experimentos foram usados o tratamento controle com doxorubicina 0,5µg/mL e 5-Fluorouracil 1 e 2µg/mL para a linhagem H460, e doxorubicina 10µg/mL e 5-Fluorouracil 150 e 300µg/m para K562. Como o veículo usado para as amostras foi o DMSO, os controles negativos receberam esse diluente no volume máximo correspondente ao usado para as células tratadas, ou seja, cerca de 0,1% de DMSO.

2.4.1 Viabilidade celular

Esse ensaio é capaz de distinguir células viáveis de células não viáveis baseado na perda de seletividade de membrana das células lesionadas. Isso permite a entrada de uma combinação de corantes presentes no reagente *Guava*[®]*ViaCount* capaz de se ligar ao DNA, marcando as células inviáveis.

As células K562 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de 6×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com

5 e 10 μ g/mL de CCEBA_{tot}, CFa₂₂₋₂₇, CFb₂₅₋₃₃ e CFb₉₆₋₉₈ em duplicata, por 24h. Em seguida, 1x10⁴ células por amostra em 20 μ L foram diluídas em 380 μ L de reagente e analisadas por citometria de fluxo (2000 eventos).

Na sequência do trabalho, a fração CFqb₁₄, mais purificada e muito ativa nos testes antiproliferativos, foi testada em triplicata (0,25; 2,5 e 25 μ g/mL) por 24 e 48h nas linhagens K562 com a densidade de inoculação de 6x10⁴ e 5x10⁴cel/mL. A mesma fração também foi aplicada na linhagem para a qual demonstrou maior seletividade, a NCI-H460, a qual foi inoculada numa densidade de 5 e 4x10⁴cel/mL para os tratamentos de 24 e 48h respectivamente. Após o tratamento, as células foram recolhidas, incubadas por 5 minutos com o reagente *Guava*[®]*ViaCount* e lidas em citômetro de fluxo.

2.4.2 Avaliação de morte celular

Este teste utiliza marcação dupla por anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD). A anexina V é uma proteína ligante de fosfolípido com elevada afinidade por fosfatidilserina que se localiza na face interna da membrana plasmática de células viáveis. Na fase inicial da apoptose, as moléculas de fosfatidilserina são translocadas para a face externa e ficam disponíveis para a ligação com anexina V, marcando, portanto as células em apoptose. O 7-AAD liga-se ao DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana já que não é capaz de marcar células viáveis e em apoptose inicial.

Células NCI-H460 foram plaqueadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 5x10⁴cel/mL para o tratamento de 24h e 4 x10⁴cel/mL para o tratamento de 48h em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L) mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com a fração ativa CFqb₁₄ em triplicata (0,25; 2,5 e 25 μ g/mL) por 24h e 48h. O mesmo teste foi realizado para a linhagem K562 que foi plaqueada na densidade 5 x10⁴cel/mL com tratamento de 48h. A fim de verificar em qual momento os eventos de morte celular se iniciam, esse teste também foi realizado para um tempo de tratamento de 3 horas com 25 μ g/mL.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e, a uma solução celular de 1x10⁵ células em 100 μ L foram adicionados 100 μ L do reagente *Guava*[®]*Nexin*. As amostras

foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz, e foram analisadas por citometria de fluxo (2000 eventos).

2.4.3 Avaliação do ciclo celular

Esse ensaio de ciclo celular baseia-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA. As células na fase G_0/G_1 contêm duas cópias dos cromossomos, ou seja, apresentam ploidia típica ($2n=2c$) de células que ainda não entraram em mitose. Já as células que entraram em processo de divisão celular e iniciaram a síntese de material genético na fase S, apresentam uma maior quantidade de DNA ($>2c$) e, conseqüentemente uma maior intensidade de marcação. As células que já tiveram seu material genético duplicado ($4c$) e estão prestes a sofrer citocinese (fase G_2/M), apresentam o dobro de fluorescência comparado a população G_0/G_1 .

Células K562 foram plaqueadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 6×10^4 cel/mL em meio RPMI sem SFB para o carenciamento, ou seja, a sincronização das células para o início do ciclo celular. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido e após 24h de sincronização, receberam suplemento de SFB novamente e foram tratadas com 5 e $10\mu\text{g/mL}$ de CCEBA_{tot}, CFa22-27, CFb25-33 e CFb96-98 em duplicata. Foi usado como controle positivo 5 e $10\mu\text{g/mL}$ de doxorrubicina, que causa parada do ciclo em G_2/M .

Após de 24h de tratamento, 2×10^5 células foram centrifugadas a 2500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, o pellet foi ressuspensionado em $500\mu\text{L}$ de PBS e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi aspirado de forma a deixar $100\mu\text{L}$ de PBS o qual foi utilizado para ressuspender o precipitado de células. Aos poucos essa solução celular foi adicionada a outro microtubo contendo $500\mu\text{L}$ de etanol 70% gelado. O microtubo foi homogeneizado e mantido a 4°C por no mínimo 12h antes do procedimento de marcação. As amostras já fixadas podem ser mantidas por semanas a 4°C ou a -20°C de 2 a 3 meses. Procedeu-se então com a centrifugação das amostras a 2500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em $500\mu\text{L}$ de PBS, a fim de retirar todo o etanol. As amostras foram centrifugadas novamente e o precipitado

celular foi ressuspendido em 200µL do reagente *Guava*[®] *Cell cycle*, as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz e a seguir analisadas por citometria de fluxo (5000 eventos).

Além disso, nesse teste, a fração CFqb14 foi testada em triplicata (0,25; 2,5 e 25µg/mL) nas linhagens K562 por 24 e 48h, e também na linhagem para a qual demonstrou maior seletividade ao longo de todo o estudo, a NCI-H460 por 24h na densidade 5×10^4 cel/mL e 4×10^4 cel/mL, respectivamente. As células K562 foram tratadas por 24h e 48h e as células NCI-H460 foram tratadas por 24h e, em seguida, os procedimentos do kit descritos acima foram executados.

3. Ensaio *in vivo*

3.1 Animais

A atividade antiproliferativa sobre células cancerosas obtidas *in vitro* pode não ocorrer *in vivo*. Dessa forma, o ensaio *in vivo* permite a obtenção de informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da amostra em estudo. Por isso, um estudo combinado desses dois modelos é indicado para uma conclusão sólida a respeito do potencial anticâncer de uma nova substância (Smith *et al.*, 2005).

Nos diferentes experimentos realizados foram utilizados camundongos fêmeas e machos da linhagem Swiss para os testes de toxicidade e Balb C para a avaliação de atividade anticâncer, animais estes, obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP), cujos grupos experimentais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do CPQBA e com ração e água fornecidos *ad libitum*, quando o jejum não foi necessário. Os protocolos de número 2280-1 e 2281-1 foram previamente aprovados pela Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (IB-UNICAMP) (Anexo 1).

3.2 Teste Hipocrático

Camundongos Swiss machos em grupos de até 5 animais foram tratados pela via

intraperitoneal com 30, 60, 125, 250 e 500mg/kg de CCEBD, 125, 250 e 500mg/kg de CCEBE, 15, 30, 50, 75, 150 e 300mg/kg de CCEBA_{tot}, 30, 40, 50, 100 mg/kg de CCEBA_{totq} e 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100mg/kg de CFqb14 e após a administração foram observados por 4h e mantidos em observação por um período mínimo de 14 dias. O número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado, foi feita necropsia dos mesmos e então foi possível estabelecer as doses que foram utilizadas para avaliação da atividade nos modelos de câncer murino.

3.3 Atividade anticâncer em modelo de tumor de pata

A fim de avaliar o potencial anticâncer *in vivo* dos extratos de *Croton campestris* foi aplicado o modelo de tumor de pata murino (Vendramini-Costa *et al.*, 2010; Longato *et al.*, 2011).

As células de tumor ascítico de Ehrlich foram descongeladas, ressuspendidas em tampão fosfato salina (PBS) e centrifugadas por 5 minutos a 2500rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para que cada animal recebesse $1,0 \times 10^4$ células numa proporção em 0,5mL (via intraperitoneal). Dois animais swiss machos receberam essas células e foram considerados doadores, e após sete dias foram eutanasiados por deslocamento cervical, seu líquido ascítico foi coletado e diluído em PBS para contagem. A solução de células foi diluída em PBS de forma que cada animal recebesse 60µL contendo $2,5 \times 10^6$. Ao final do ensaio foram avaliados os parâmetros:

- a) Variação do volume da pata traseira direita, tendo como controle o volume basal antes da indução do tumor;
- b) Peso relativo do tumor, descontando-se o peso da pata sadia e dividindo-se pelo peso corporal;
- c) Variação do peso corporal dos animais;
- d) Avaliação do peso de órgãos como: rins, pulmão, baço, coração e fígado;
- e) Hemograma do sangue total dos animais (Sysmex[®], modelo pocH-100iV), avaliando: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito

(Hct), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração da hemoglobina corpuscular (MCHC), e plaquetas (Pt).

3.3.1 Atividade anticâncer do CCEBA_{tot} em modelo de tumor de pata

Camundongos Balb C fêmeas foram pesados e o volume basal de suas patas traseiras direitas foi medido em aparelho de hidropletismômetro (Panlab[®], modelo LE7500). No dia 0 (D₀), as células de Ehrlich foram inoculadas no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos, na densidade de $2,5 \times 10^6/60 \mu\text{L}/\text{animal}$. No dia 3 (D₃) os animais foram divididos nos seguintes grupos com 8 animais: solução salina 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorrubicina (3mg/kg) e tamoxifeno (20mg/kg) como controles positivos e CCEBA_{tot} de *C. campestris* nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. Portanto, o tratamento via intraperitoneal foi iniciado no terceiro dia após a inoculação do tumor e se manteve a cada três dias, bem como a avaliação da variação do volume das patas traseiras direitas e o peso corporal dos animais.

No 14º dia de teste, mesmo antes do previsto por conta da agressividade do tumor, até 8 animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e suas patas traseiras foram retiradas, pesadas e armazenadas adequadamente para posteriores análises histológicas. Também foram pesados órgãos como rins, pulmão, baço, coração e fígado, e os dados obtidos foram analisados. Nesse experimento os parâmetros hematológicos não foram avaliados.

3.3.2 Atividade anticâncer do CCEBE_{tot} em modelo de tumor de pata

Camundongos Balb C machos foram pesados e o volume basal de suas patas traseiras direitas foi medido em aparelho de hidropletismômetro. Como na metodologia já descrita, no dia 0 (D₀), as células de Ehrlich foram inoculadas no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos, na densidade de $2,5 \times 10^6/60 \mu\text{L}/\text{animal}$. No dia 3 (D₃) os animais foram divididos nos seguintes grupos com 8 animais em cada: solução salina 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorrubicina (3 mg/kg) como controle positivo, CCEBE_{tot} de *C. campestris* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, e, a fim de confirmar a atividade também em machos e obter parâmetros hematológicos, a dose de 10 mg/Kg de

CCEBA_{tot} também foi avaliada. Como já descrito, o tratamento via intraperitoneal foi iniciado no terceiro dia após a inoculação do tumor e continuou a cada três dias, bem como a avaliação da variação do volume das patas traseiras direitas e o peso corporal dos animais.

Esse ensaio foi encerrado no 17º dia de teste, sendo que até 8 animais por grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e suas patas traseiras foram retiradas e pesadas a fim de verificar o valor da massa tumoral. Também foram pesados órgãos como rins, pulmão, baço, coração e fígado. Parâmetros hematológicos também puderam ser mensurados e todo o conjunto de resultados foi analisado estatisticamente.

3.3.3 Atividade anticâncer da fração CFqb14 obtida do CCEBA_{tot} em modelo de tumor de pata

Camundongos Balb C fêmeas foram pesadas e o volume basal de suas patas traseiras direitas foi medido em hidropletismômetro. Como na metodologia já descrita, no dia 0 (D₀), as células de Ehrlich foram inoculadas no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos, na densidade de $2,5 \times 10^6 / 60 \mu\text{L} / \text{animal}$. No dia 3 (D₃) os animais foram divididos nos seguintes grupos com 8 animais em cada: solução salina 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorrubicina (3 mg/kg) como controle positivo, CFqb14 nas doses de 1, 2 e 4mg/kg. Após os terceiro dia de inoculação do tumor o tratamento foi iniciado e continuou a cada três dias, assim como a medição do volume das patas traseiras direitas e do peso corporal dos animais.

No 16º dia de teste, até 8 animais por grupos foram eutanasiados deslocamento cervical e suas patas traseiras foram retiradas e pesadas a fim de verificar o valor da massa tumoral. Outros parâmetros como peso de órgãos e hemograma já descritos também foram avaliados e os dados foram submetidos às análises estatísticas.

3.4 Análise dos resultados

A variação de peso do tumor, animais, órgãos e de parâmetros hematológicos foram estatisticamente analisadas através do Teste de Duncan ($p < 0,05$) com o programa estatístico Statistica⁷®.

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

1. Processamento fitoquímico e atividade antiproliferativa dos extratos brutos

Através da análise dos resultados obtidos por um projeto inicial desenvolvido pelo grupo de pesquisa que avaliou a atividade antiparasitária de espécies vegetais (FAPESP 2004/07943-9) algumas espécies mostraram-se candidatas para identificação de princípios ativos, determinação de mecanismos de ação e estudos *in vivo*. Assim, de acordo com a potência e seletividade dos extratos, juntamente com os relatos de seu uso popular contra tumores (Babili *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2005; Matias *et al.*, 2010), foi selecionada a espécie *C. campestris* cujos extratos produziram efeitos promissores em cultura de células tumorais humanas. Portanto, pelo seu perfil de atividade e também pela sua disponibilidade na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPMA-CPQBA) essa espécie foi selecionada para os estudos de isolamento de componentes bioativos. Sua exsicata encontra-se depositada no herbário do CPQBA sob o código CPQBA16.

Foi feito um estudo para verificar qual seria a metodologia adequada para a extração de componentes bioativos da espécie *C. campestris*. Esse estudo incluiu avaliação dos extratos obtidos a partir do material fresco e seco, o uso de solventes com diferentes polaridades e métodos brandos e não brandos como a extração a frio por maceração dinâmica e extração por sistema *Soxhlet*. O acompanhamento do perfil cromatográfico dos extratos processados, os rendimentos obtidos e os resultados antiproliferativos observados nessa fase inicial do estudo, puderam definir o método de extração adequado para dar sequência ao processamento fitoquímico. Os resultados dos processos prévios de extração realizados e a avaliação da atividade antiproliferativa obtidos nessa etapa inicial do estudo, encontram-se no anexo 1.

Analisando-se todas as metodologias empregadas para a obtenção do extrato com melhor perfil de atividade antiproliferativa e rendimento, a investigação do melhor método desenvolvida ao longo do trabalho está resumida na figura 11, que mostra a evolução dos extratos selecionados de acordo com os perfis cromatográficos e antiproliferativos (anexo1) e as frações mais ativas obtidas:

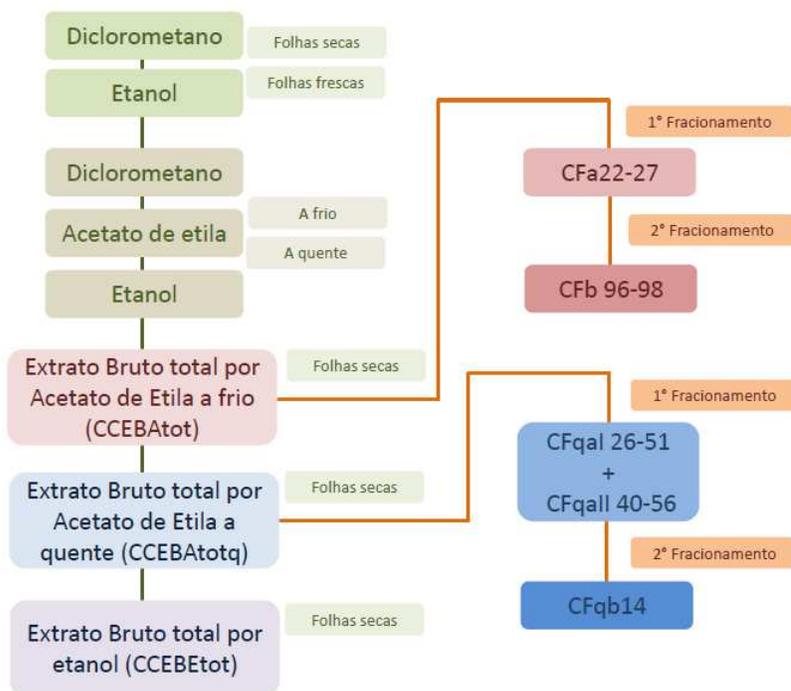


Figura 11. Resumo dos processos extrativos e de fracionamento para as amostras mais ativas.

Devido ao perfil antiproliferativo semelhante entre os quatro extratos produzidos (anexo1) e a viabilidade do processo, optou-se por utilizar a planta seca e também pela adição de uma etapa no processo de extração, usando um terceiro solvente de polaridade intermediária (acetato de etila). Para tal, a extração com acetato de etila (Synth[®]) foi realizada usando a mesma metodologia descrita sendo executada logo após a primeira etapa da extração com diclorometano e, em seguida, prosseguiu-se com a etapa extrativa com etanol a 95%. Dessa maneira, foram obtidos o extrato bruto diclorometânico (CCEBD), o extrato bruto por acetato de etila (CCEBA) e o extrato bruto etanólico (CCEBE), todos obtidos a partir das folhas secas e moídas de *C. campestris*. Essa sequência de solventes também foi utilizada na extração por sistema *Soxhlet* e gerou o extrato bruto diclorometânico a quente (CCEBDq), o extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAq) e o extrato bruto etanólico a quente (CCEBEq). O processo de extração

por sistema *Soxhlet*, no qual o extrato é submetido a altas temperaturas, não alterou significativamente o perfil antiproliferativo dos extratos (anexo 1).

Sendo o perfil antiproliferativo do CCEBD semelhante ao perfil do CCEBA e, ambos, com melhor atividade que o CCEBE (anexo1) optou-se pela extração total com o solvente acetato de etila.

Além da extração total por acetato de etila de folhas secas moídas (98,63g), foi realizada também a extração total de folhas secas moídas (10,96g) com etanol 95% a fim de comparar seu perfil cromatográfico (Fig. 12), atividade *in vitro* e *in vivo*.



Figura 12. Perfil observado por CCD dos extratos brutos por acetato de etila (CCEBA tot) e etanólico total (CCEBE tot) de *C. campestris*. Uso de diclorometano/ metanol (99/1) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.

Após os resultados antiproliferativos observados para o CCEBA tot, optou-se pela realização da extração total por acetato de etila por sistema *Soxhlet* para otimizar e melhorar o rendimento do processo de extração.

1.2 Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos

Os gráficos abaixo relacionam a porcentagem de crescimento e a concentração das amostras testadas, evidenciando a ação dos extratos de *C. campestris* sobre a cultura de células tumorais humanas. Os valores entre 100% e 0 representam inibição de crescimento enquanto os valores negativos representam morte celular, pois a quantidade de células (dosagem de proteínas coradas por absorbância, inferindo sobre a quantidade de células ao final do experimento) nesse caso, é menor do que aquela que iniciou o experimento, ou seja, a quantidade de células analisadas na placa T₀.

Essa metodologia de triagem *in vitro*, permitiu a avaliação dos extratos e frações em diferentes linhagens celulares tumorais, possibilitando a avaliação da atividade antiproliferativa com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade (Monks *et al.* 1991).

A figura 13 mostra os resultados da atividade antiproliferativa de CCEBA_{tot} que foi selecionado para a etapa de fracionamento. Nesse teste as linhagens mais sensíveis ao extrato foram NCI/ADR-R, NCI-H460 e K562 com GI₅₀ de 3.46, <0.25 e <0.25 μg/mL respectivamente.

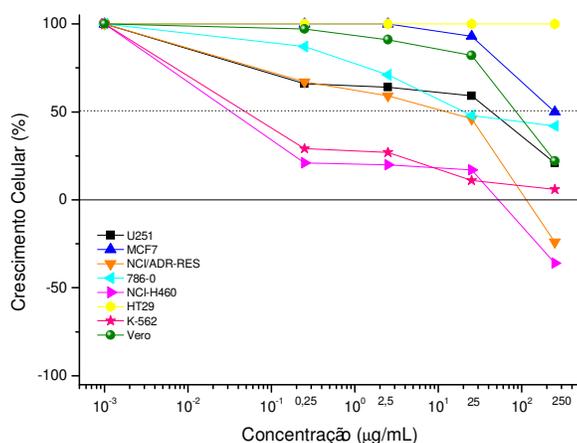


Figura 13. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração total por acetato de etila das folhas secas de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

A título de comparação, foi realizada extração por etanol 95% para verificar a atividade antiproliferativa dos componentes totais extraídos das folhas secas e moídas de *C. campestris*. Os valores de GI₅₀ calculados do gráfico abaixo denota a seletividade para as linhagens NCI-H460 (0.25µg/mL), PC-3 (0.97µg/mL), HT29 (1.49µg/mL) e 786-0 (1.90µg/mL).

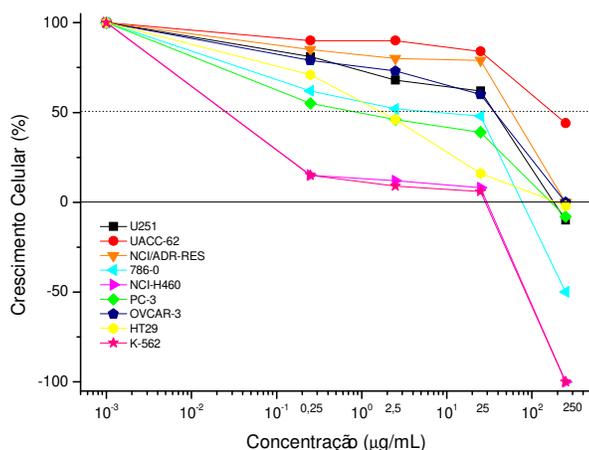


Figura 14. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração total por etanol 95% das folhas secas de *C. campestris* (CCEBEtot) em cultura de células tumorais.

Devido a sua atividade antiproliferativa observada na figura 14, o CCEBEtot foi utilizado no ensaio de tumor de pata para comparação de seus efeitos. Também foi feita a avaliação de sua constituição química por espectrometria de massas.

Como observado, os extratos foram seletivos para a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460) que foi selecionada para avaliação dos mecanismos de morte via citometria de fluxo.

A fim de verificar melhora no rendimento das extrações descritas e comparar as atividades de extratos obtidos por processamentos diferentes, verificando se os ativos contidos nos extratos seriam termolábeis, foi realizada a extração total por acetato de etila por *Soxhlet*. Com exceção da atividade para a última concentração que foi maior para o

CCEBA_{tot} (Fig. 13) e da seletividade que foi mais proeminente para o CCEBA_{tot}q (Fig. 15), o perfil entre os dois extratos foi semelhante.

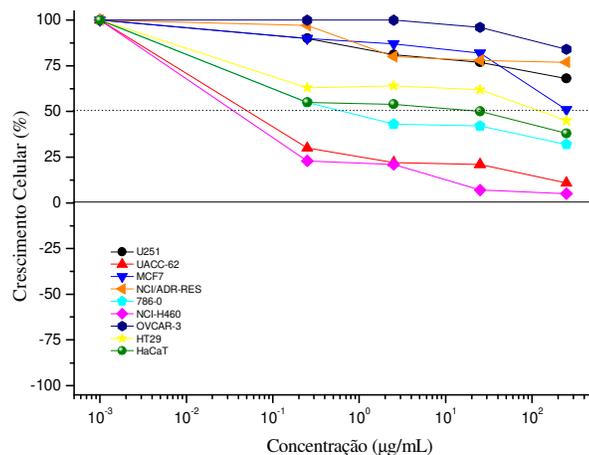


Figura 15. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração total com acetato de etila por sistema *Soxhlet* de *C. campestris* (CCEBA_{tot}q) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

Dessa forma, os menores valores de GI₅₀ foram para as linhagens 786-0 (0.79µg/mL), NCI-H460 (<0.25µg/mL) e UACC-62 (<0.25µg/mL).

2. Fracionamento do CCEBA_{tot} e atividade antiproliferativa

2.1 Fracionamento do CCEBA_{tot}

No fracionamento do extrato CCEBA_{tot} por coluna filtrante, foram obtidas 40 frações que, a partir do perfil cromatográfico analisado, foram unidas em 6 frações (Fig. 16). Todas as frações obtidas foram avaliadas no teste de atividade antiproliferativa.

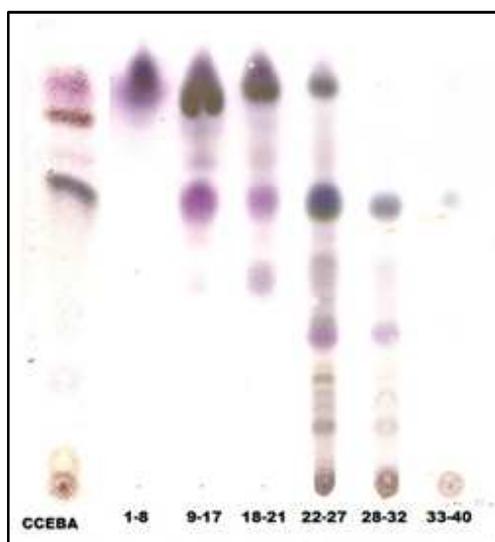


Figura 16. Perfil observado por cromatografia de camada delgada das frações unidas de acordo com o perfil cromatográfico. Uso de diclorometano/metanol (99/1) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.

O maior rendimento (Tab. 7) e, como será visto adiante, a melhor atividade antiproliferativa foi verificada para a fração CFa22-27 o que permitiu seu fracionamento em seguida.

Tabela 7. Massa e rendimento das frações obtidas em fracionamento do extrato CCEBA_{tot} por coluna filtrante.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
1-8	0,0621	5,95
9-17	0,1857	17,78
18-21	0,0547	5,24
22-27	0,4781	45,78
28-32	0,1861	17,82
33-40	0,0768	7,35

2.2 Atividade antiproliferativa in vitro das frações do extrato CCEBA_{tot}

A fim de avaliar a efetividade dos métodos usados no fracionamento e também selecionar as frações com melhor perfil de atividade, as amostras foram submetidas ao teste

de atividade antiproliferativa.

As frações mais apolares obtidas por coluna filtrante (Fig. 17, 18 e 19), constituídas de graxas e outros componentes de baixa polaridade não apresentaram atividade antiproliferativa.

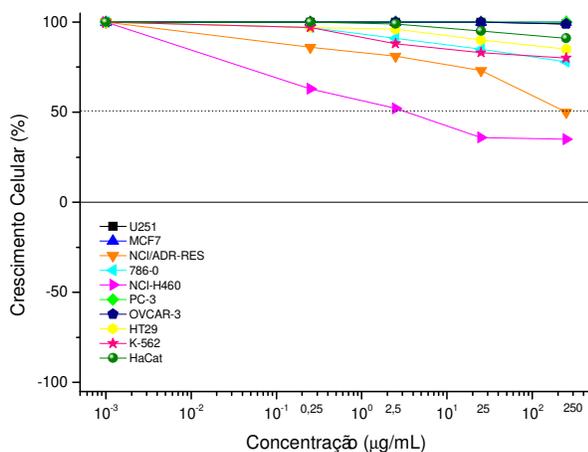


Figura 17. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFA1-8 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

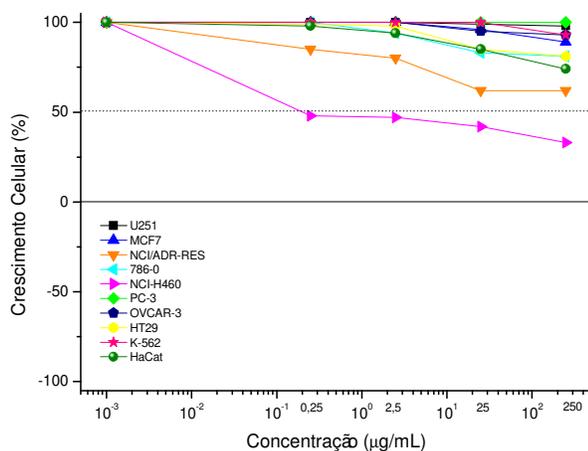


Figura 18. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFA9-17 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

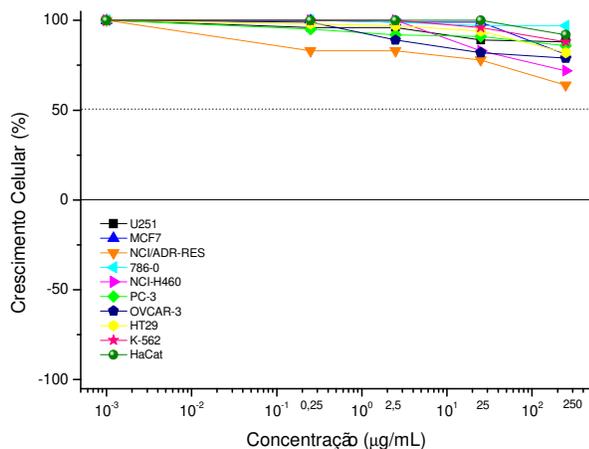


Figura 19. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CF18-21 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

As frações CFa22-27, 28-32 e 33-40 apresentaram efeito citostático com maior potência para as frações CFa22-27 com seletividade proeminente para linhagens de rim e pulmão (786-0 e NCI-H460) com $GI_{50} < 0.25 \mu\text{g/mL}$ para ambas. Conforme observado no perfil cromatográfico, a fração CFa22-27 apresentou um perfil semelhante ao extrato de origem CCEBA_{tot}, no entanto, sem os componentes mais apolares que foram recolhidos nas primeiras frações, tornando essa fração enriquecida nos compostos de média polaridade. Além disso, essa fração foi a que apresentou maior massa e permitiu que um segundo fracionamento fosse realizado.

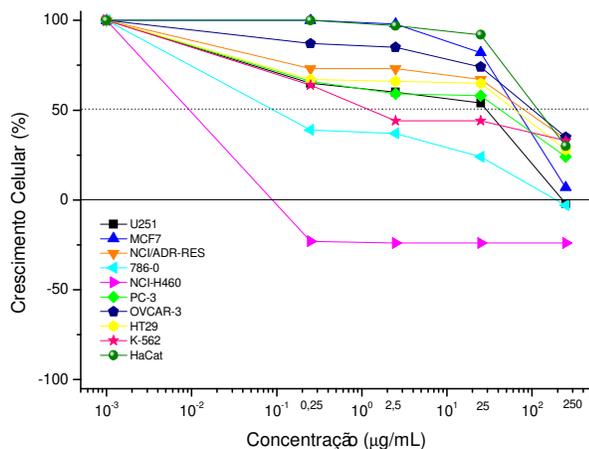


Figura 20. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa22-27 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

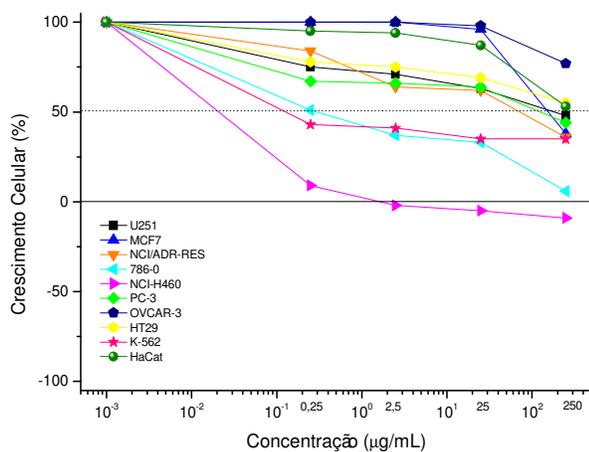


Figura 21. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa28-32 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

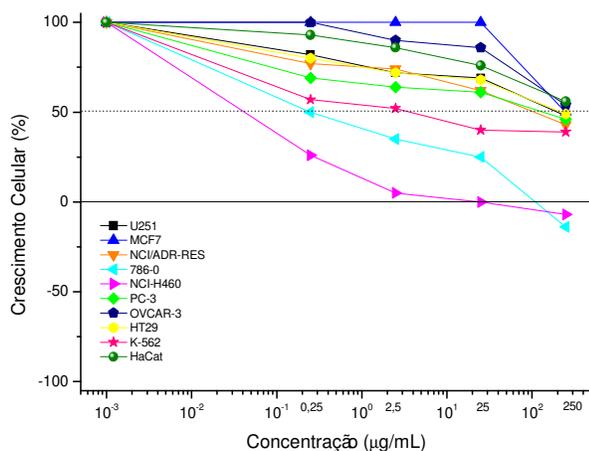


Figura 22. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFa33-40 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* (CCEBA_{tot}) em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

A tabela 8 mostra evidente seletividade das frações ativas para algumas linhagens, especialmente para NCI-H460 (pulmão) o que direcionou a avaliação dos mecanismos de morte para essa linhagem.

Tabela 8. Valores de GI₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por coluna filtrante a partir do CCEBA_{tot}.

	NCI/AD			NCI- H460	OVCAR			HT29	K-562	HaCat
	U251	MCF-7	R-RES		786-0	PC-3	-3			
CFa1-8	>250	>250	>250	>250	3,42	>250	>250	>250	>250	>250
CFa9-17	>250	>250	>250	>250	0,25	>250	>250	>250	>250	>250
CFa18-21	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
CFa22-27	5,06	58,60	69,54	<0,25	<0,25	11,98	102,80	30,98	3,01	137,49
CFa28-32	>250	183,87	51,42	0,38	<0,25	195,27	>250	>250	<0,25	>250
CFa33-40	>250	250,00	119,19	0,37	<0,25	179,97	>250	>250	2,75	>250

3. Fracionamento da fração ativa CFa22-27 e atividade antiproliferativa

3.1 Fracionamento da fração ativa CFa22-27

No fracionamento da fração CFa22-27 por coluna filtrante, foram obtidas 133 frações as quais, a partir do perfil cromatográfico analisado, foram unidas em 11 frações (Fig.23). Dessas, foram selecionadas as frações CFb25-33, 39-51, 55-69 e 96-98, que apresentaram bandas mais isoladas e que poderiam conter componentes químicos mais purificados.

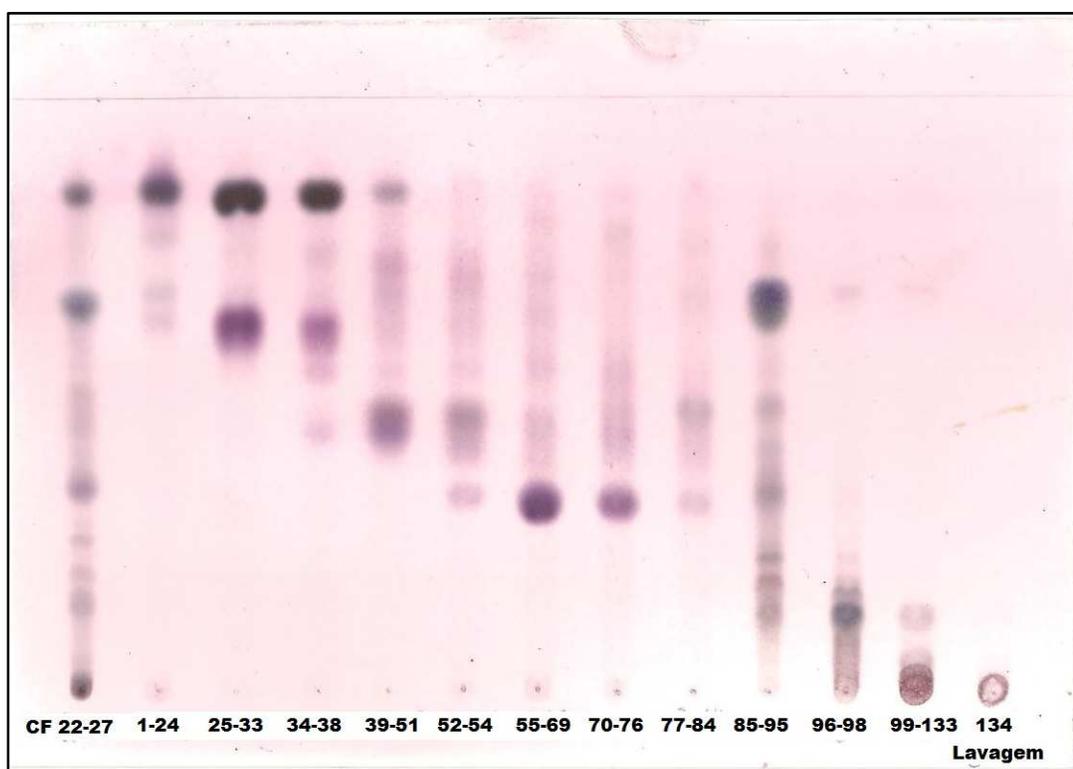


Figura 23. Perfil observado por cromatografia de camada delgada da fração CFa22-27 e suas frações obtidas por coluna filtrante unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado. Uso de diclorometano/metanol (99/1) como fase móvel e anisaldeído como revelador.

Por se tratar de um fracionamento preliminar, as massas obtidas (Tab. 9) foram pequenas, suficientes apenas para a realização dos testes antiproliferativos e para ciclo celular em citometria de fluxo.

Tabela 9. Massa e rendimento das frações obtidas em fracionamento da fração CFa22-27 por coluna filtrante.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
1-24	0,0166	4,12
25-33	0,0263	6,53
34-38	0,0104	2,58
39-51	0,0099	2,46
52-54	0,0046	1,14
55-69	0,0208	5,17
70-76	0,0214	5,32
77-84	0,0034	0,84
85-95	0,1792	44,51
96-98	0,013	3,23
99-133	0,0422	10,48

Dessa forma, por terem sido obtidas massas muito pequenas, a partir do CCEBA_{totq}, foram realizados novos fracionamentos que resultaram em frações mais puras com massa suficiente para testes *in vivo*, que serão relatados adiante.

3.2 Atividade antiproliferativa *in vitro* utilizando frações obtidas da fração CFa22-27

As frações com maior grau de pureza, ou seja, com perfil de manchas isoladas na CCD, foram submetidas ao teste de atividade antiproliferativa.

A fração CFb25-33 apresentou pouca atividade antiproliferativa, ainda com seletividade para linhagem NCI-H460 (Fig.24). Já as frações CFb39-51 e CFb55-69 apresentaram atividade citocida significativa apenas na concentração mais elevada (250 μ g/mL), não sendo esse um perfil interessante para a escolha dessas amostras para futuros estudos (Fig.25 e 26).

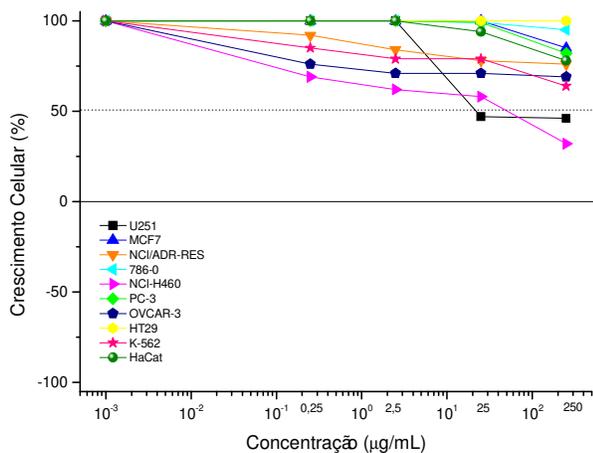


Figura 24. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb25-33 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

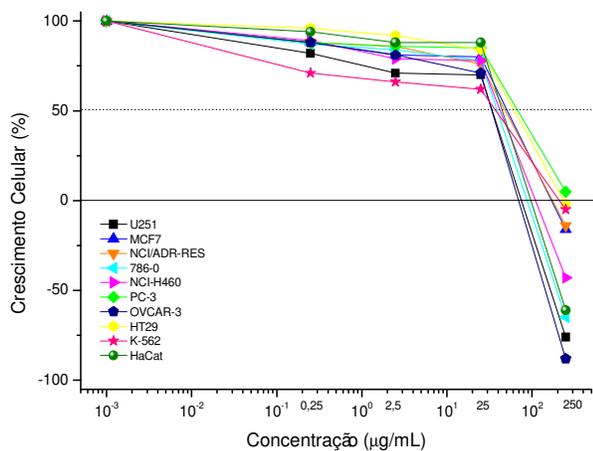


Figura 25. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb39-51 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

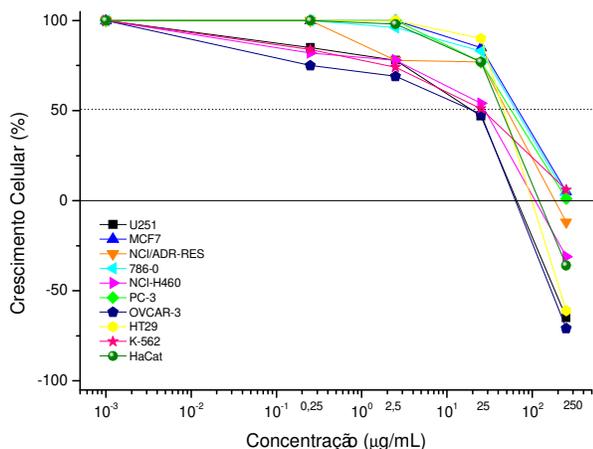


Figura 26. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb55-69 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

No entanto, a fração CFb96-98 foi a que apresentou o melhor perfil antiproliferativo (Fig.27) mantendo a atividade citostática já observada para outras amostras de *C. campestris*, mas com importante seletividade para a linhagem NCI-H460 (pulmão), confirmando resultados anteriores (Tab. 11).

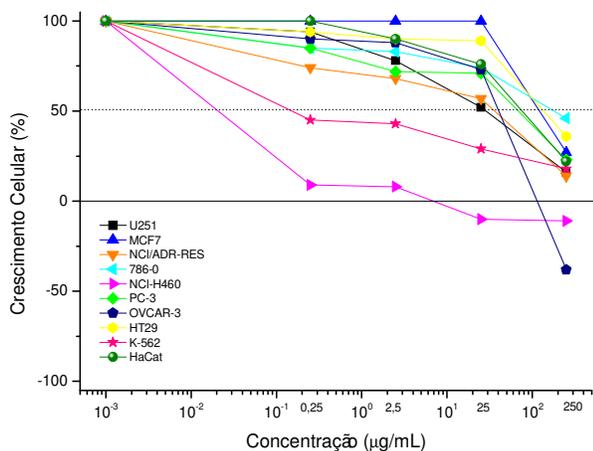


Figura 27. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFb96-98 obtida do fracionamento por coluna filtrante da fração CFa22-27 obtida a partir do extrato bruto total por acetato de etila de *C. campestris* em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.

Portanto, a partir do sucesso da atividade antiproliferativa observado para a fração CFb96-98, a mesma foi usada para avaliação de viabilidade e ciclo celular por citometria de fluxo.

Tabela 10. Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante (CFb) a partir da fração CFa22-27.

	NCI/ADR				NCI-		OVCAR			
	U251	MCF-7	-RES	786-0	H460	PC-3	-3	HT29	K-562	HaCat
CFb25-33	85,37	>250	>250	>250	24,21	>250	>250	>250	>250	>250
CFb39-51	27,43	29,77	28,98	29,10	29,08	59,26	27,87	30,54	10,32	31,43
CFb55-69	24,62	58,70	28,83	51,77	25,49	40,35	24,75	29,58	15,28	27,12
CFb96-98	23,41	227,88	14,69	236,63	<0,25	45,75	28,19	148,53	<0,25	72,63

4. Fracionamento do CCEBA_{totq} e atividade antiproliferativa

4.1 Fracionamento do CCEBA_{totq}

Através de coluna filtrantes o extrato bruto obtido com acetato de etila a quente (CCEBA_{totq}) foi fracionado em duas porções. A primeira resultou em 60 frações e a segunda em 69 frações que foram reunidas em 8 e 7 frações respectivamente, de acordo com o seu perfil cromatográfico (Fig. 28). E avaliadas no teste antiproliferativo.

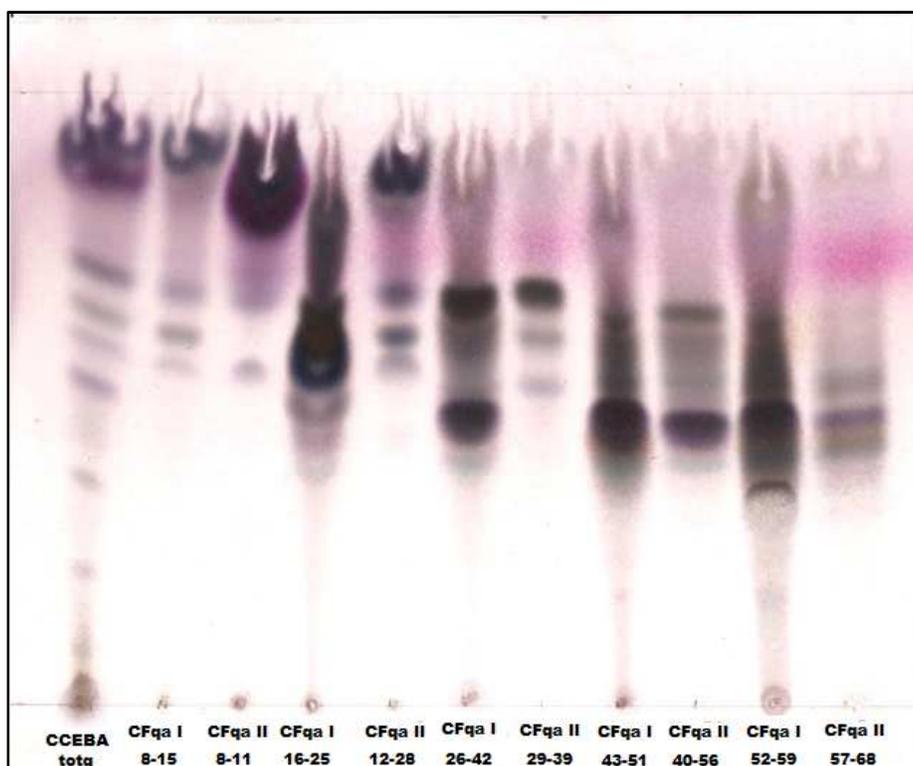


Figura 28. Perfil observado por cromatografia de camada delgada das frações unidas de acordo com o perfil cromatográfico para dois fracionamentos (CFqaI e CFqaII) a partir de CCEBA totq. Uso de diclorometano/metanol (90/10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.

De acordo com o perfil cromatográfico semelhante, o rendimento e com os resultados dos testes antiproliferativos da primeira etapa de fracionamento do CCEBA totq, as frações foram selecionadas e reunidas para que pudesse ser realizado um segundo fracionamento. Os rendimentos apresentados pelas frações escolhidas CFqaI26-51 (união de CFqaI26-42 e CFqaI43-51) e CFqaII40-56 foram 5,57% e 3,99%, respectivamente. A fim de comparar os perfis das frações separadas e da fração unida, foi feita uma CCD que confirmou o perfil da amostra a ser fracionada, como mostra a figura 29.

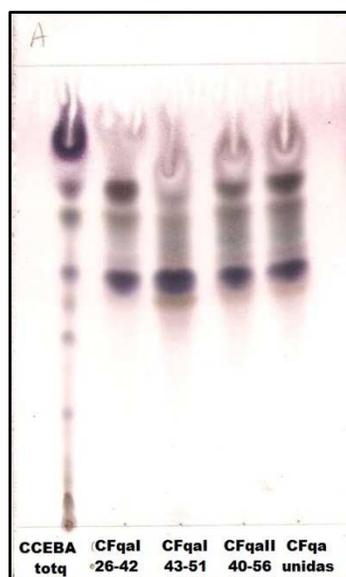


Figura 29. Perfil observado por cromatografia de camada delgada das frações CFqa e unidas a partir de CCEBA totq. Uso de diclorometano/metanol (90/10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.

4.2 Atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do extrato CCEBA totq

As frações obtidas no processo de fracionamento foram submetidas ao teste antiproliferativo (Tab. 11) sendo as frações CFqaI26-42 e CFqaII43-51, obtidas na primeira etapa e a CFqaII40-56 da segunda etapa do fracionamento do CCEBA totq as que apresentaram o melhor perfil de atividade.

Tabela 11. Valores de GI₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante (CFqa) a partir do CCEBA totq.

	NCI/ADR									
	U251	UACC-62	MCF7	-RES	786-0	NCI-H460	OVCAR-3	HT29	K562	HaCat
CFqaI26-42.	29,33	<0,25	26,84	<0,25	<0,25	<0,25	41,41	27,01	-	27,27
CFqaI43-51.	57,83	0,39	34,49	<0,25	<0,25	<0,25	75,64	2,37	-	3,58
CFqaII46-56	44,87	<0,25	221,06	94,27	2,98	<0,25	>250	52,79	<0,25	-
Frações unidas	29,74	0,45	37,46	53,08	0,69	0,80	225,24	9,37	0,41	-

Os gráficos abaixo apresentam atividade antiproliferativa para as frações testadas mantendo o mesmo perfil citostático e seletividade para linhagens como NCI-H460 e 786-0.

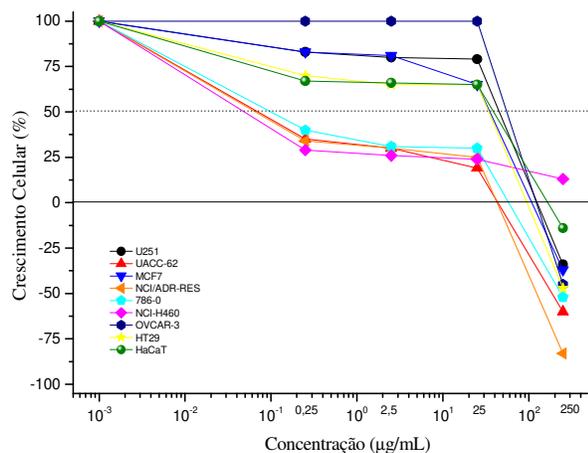


Figura 30. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração CFqaI26-42 obtida do fracionamento por coluna filtrante do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAtotq).

De acordo com a figura 30 e 31, pode-se observar que, além das linhagens geralmente selecionadas pelos extratos e frações de *C. campestris*, como H460 e 786-0, outra linhagem que se mostrou seletiva para o tratamento foi a UACC-62, o que pode ser alvo de pesquisas futuras dentro do trabalho com bioativos dessa espécie.

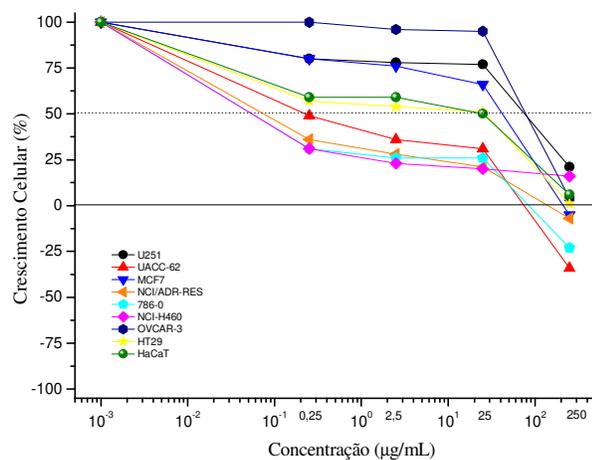


Figura 31. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFqaI43-51 obtida do fracionamento do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAtotq).

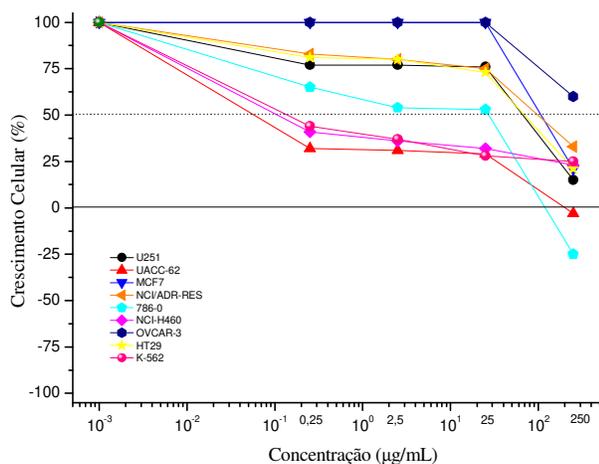


Figura 32. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a fração unida CFqaII 40-56 obtida do fracionamento do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAAtotq).

Para verificar se a união das frações (CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56) não interferiria em sua atividade antiproliferativa, as frações foram testadas em cultura em sua forma mista (Fig. 33), antes de dar prosseguimento ao segundo fracionamento.

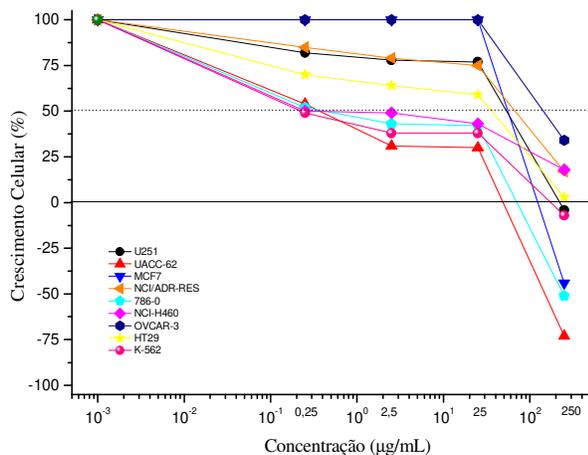


Figura 33. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com as frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56 obtida do fracionamento do extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAAtotq).

Como mostra o gráfico acima, a união das frações não interferiu na atividade antiproliferativa das mesmas, favorecendo a obtenção de maior massa para que o segundo fracionamento fornecesse massas de amostras mais puras em quantidade suficiente para prosseguir com novos testes *in vitro* e *in vivo*.

5. Fracionamento da fração ativa unida CFqaI 26-51 e CFqaII 40-56 e atividade antiproliferativa

5.1 Fracionamento da fração ativa unida CFqaI26-51 e CFqaII40-56

As frações mais ativas obtidas em duas etapas a partir do fracionamento do CCEBA_{totq}, foram reunidas de acordo a atividade produzida nos testes antiproliferativos e com o perfil cromatográfico. O fracionamento resultou em 30 frações das quais 6 foram testadas no ensaio de citotoxicidade e tiveram seus perfis analisados quanto a potência e seletividade.

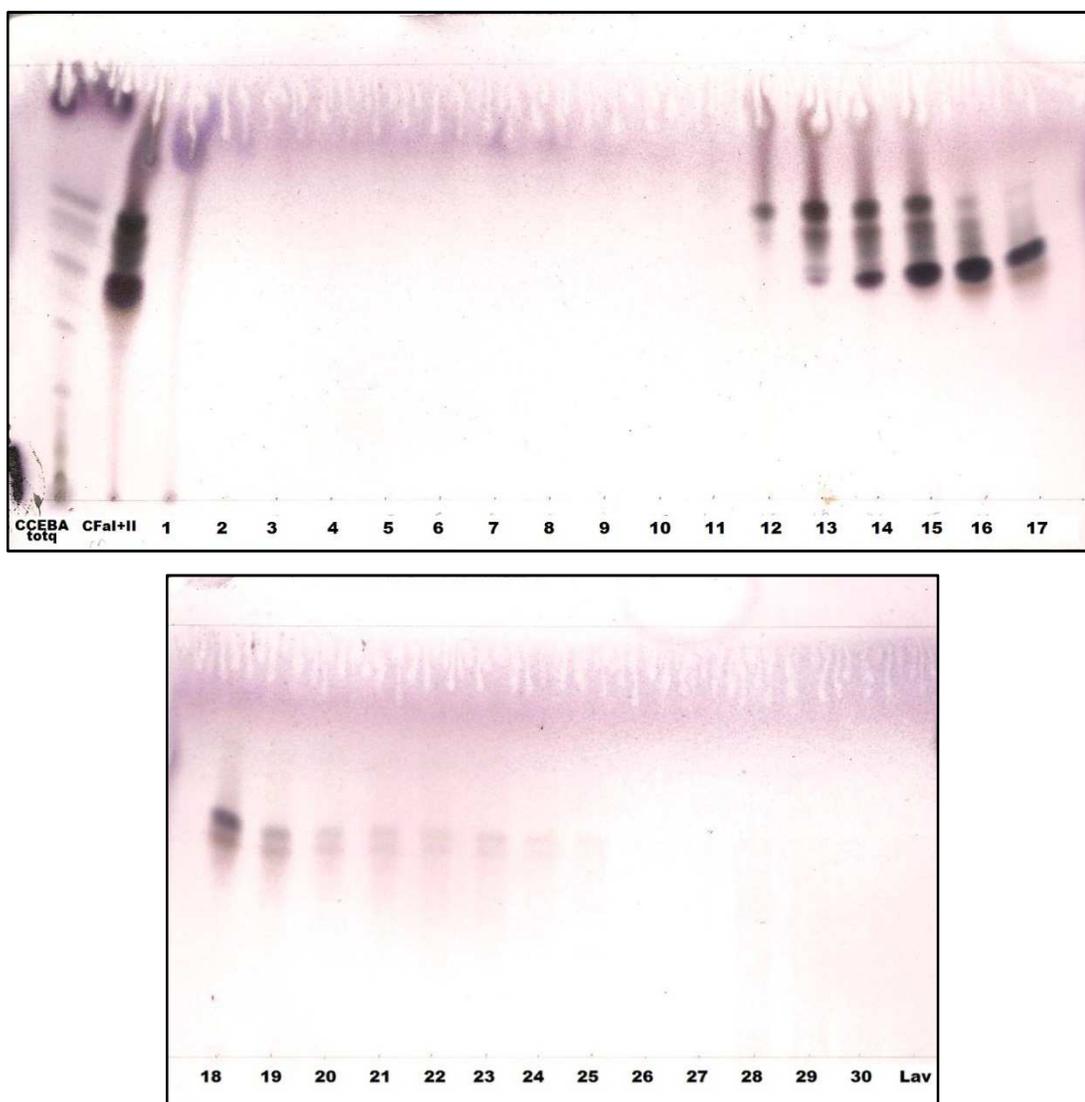


Figura 34. Perfil observado por cromatografia de camada para as frações CFqb a partir de CCEBA totq. Uso de diclorometano/metanol (90:10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.

As frações obtidas, ainda que não totalmente purificadas, demonstraram um perfil de componentes mais polares e manchas mais limpas, o que pode contribuir para algumas análises de seus componentes como a cromatografia de camada delgada com diferentes reveladores que serão discutidas adiante.

Tabela 12. Massa e rendimento das frações obtidas em fracionamento da fração CFqal 26-51 e CFqaII40-56 unidas, coluna filtrante.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
12	0,0257	1,51
13	0,2062	12,13
14	0,3366	19,80
15	0,3380	19,88
16	0,2164	12,73
17	0,1043	6,13

Os rendimentos mais representativos listados na tabela 12 indicam massa obtida suficiente para execução de testes *in vivo*.

5.2 Atividade antiproliferativa das frações CFqb

As frações obtidas foram testadas a fim de investigar quais manchas verificadas no perfil cromatográfico seriam responsáveis pela atividade, através da comparação do perfil de atividade antiproliferativa podendo auxiliar em futuros processos de purificação.

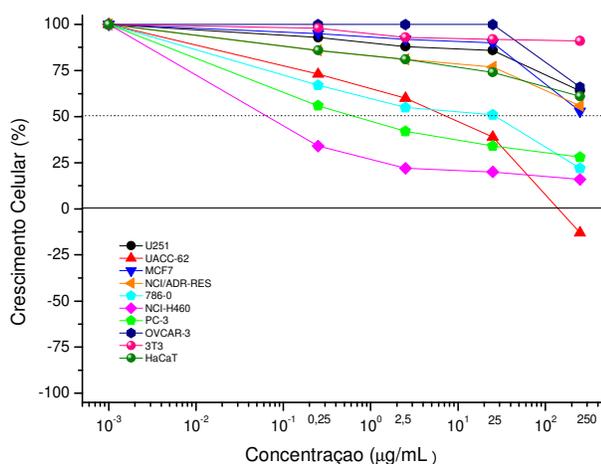


Figura 35. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb12 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqal26-42, CFqal43-51 e CFqaII40-56.

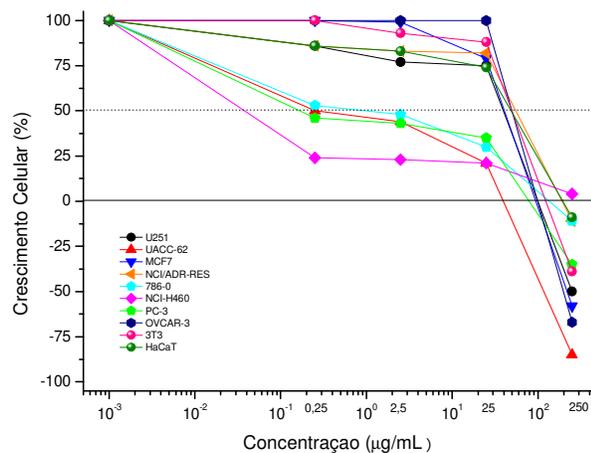


Figura 36. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqB13 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqAI26-42, CFqAI43-51 e CFqAII40-56.

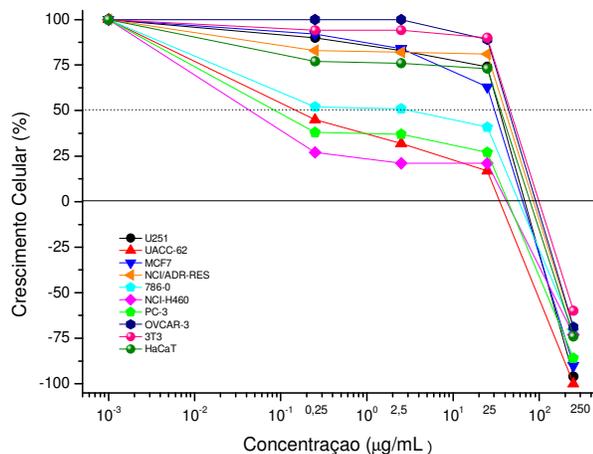


Figura 37. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqB14 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqAI26-42, CFqAI43-51 e CFqAII40-56.

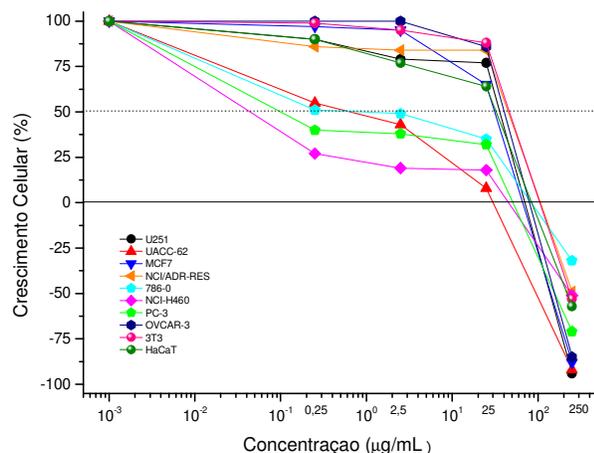


Figura 38. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFqb15 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqaI26-42, CFqaI43-51 e CFqaII40-56.

Observando a figura 35 e analisando a atividade antiproliferativa das frações CFqb, é possível verificar que a fração CFqb12 não apresenta atividade antiproliferativa tão importante quanto as frações seguintes CFqb13, 14 e 15. Verificando os gráficos para as frações CFqb16 e 17 observou-se também que a inibição do crescimento celular também apresentou redução. Portanto, é possível inferir sobre o grupo químico revelado nessas frações.

Esses resultados em conjunto com o que foi verificado pela cromatografia de camada delgada revelada com diferentes soluções reveladoras (Fig. 41), possibilitaram a caracterização de um dos grupos químicos presentes na fração ativa CFqb14, discutido a seguir.

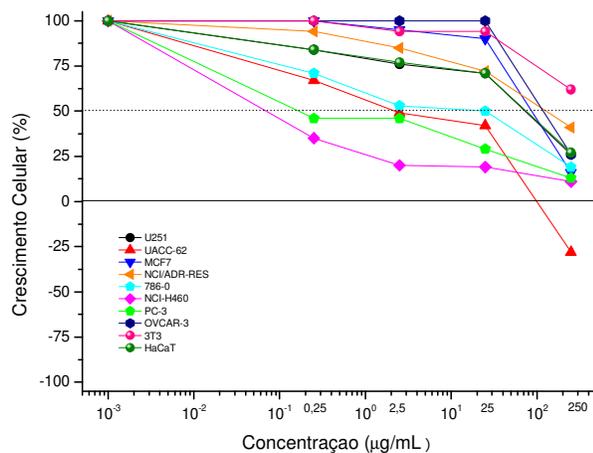


Figura 39. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFq16 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqI26-42, CFqI43-51 e CFqII40-56.

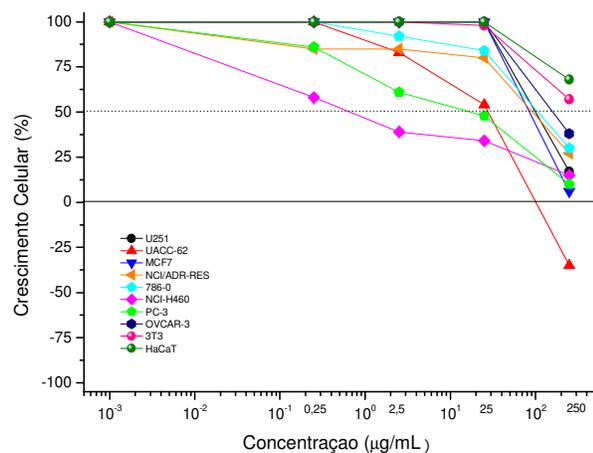


Figura 40. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com a CFq17 obtida do fracionamento por coluna filtrante das frações unidas CFqI26-42, CFqI43-51 e CFqII40-56.

Pelo perfil antiproliferativo e rendimento apresentado, a fração CFq14, que atuou semelhantemente a fração CFq15, foi selecionada para ser aplicada no modelo murino de tumor sólido de Ehrlich e para avaliação do tipo de morte celular, bem como para subsequentes processos de purificação.

Tabela 13. Valores de GI₅₀ (µg/mL) das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante (CFqb) a partir do CCEBA_{totq}.

	U251	UACC-62	MCF7	NCI/ADR		NCI-H460	PC-03	OVCAR-3	HaCat
				-RES	786-0				
CFqb12	>250	4,04	>250	>250	6,75	<0,25	0,67	>250	>250
CFqb13	28,57	0,50	30,04	29,82	0,80	<0,25	0,43	39,15	28,37
CFqb14	28,35	0,27	26,53	29,70	0,92	<0,25	<0,25	31,73	28,21
CFqb15	28,90	0,58	26,94	30,40	0,78	<0,25	<0,25	30,85	25,62
CFqb16	55,50	2,01	92,39	132,42	6,35	<0,25	0,31	226,33	58,93
CFqb17	215,64	25,48	196,88	88,10	112,37	0,77	9,92	238,63	>250

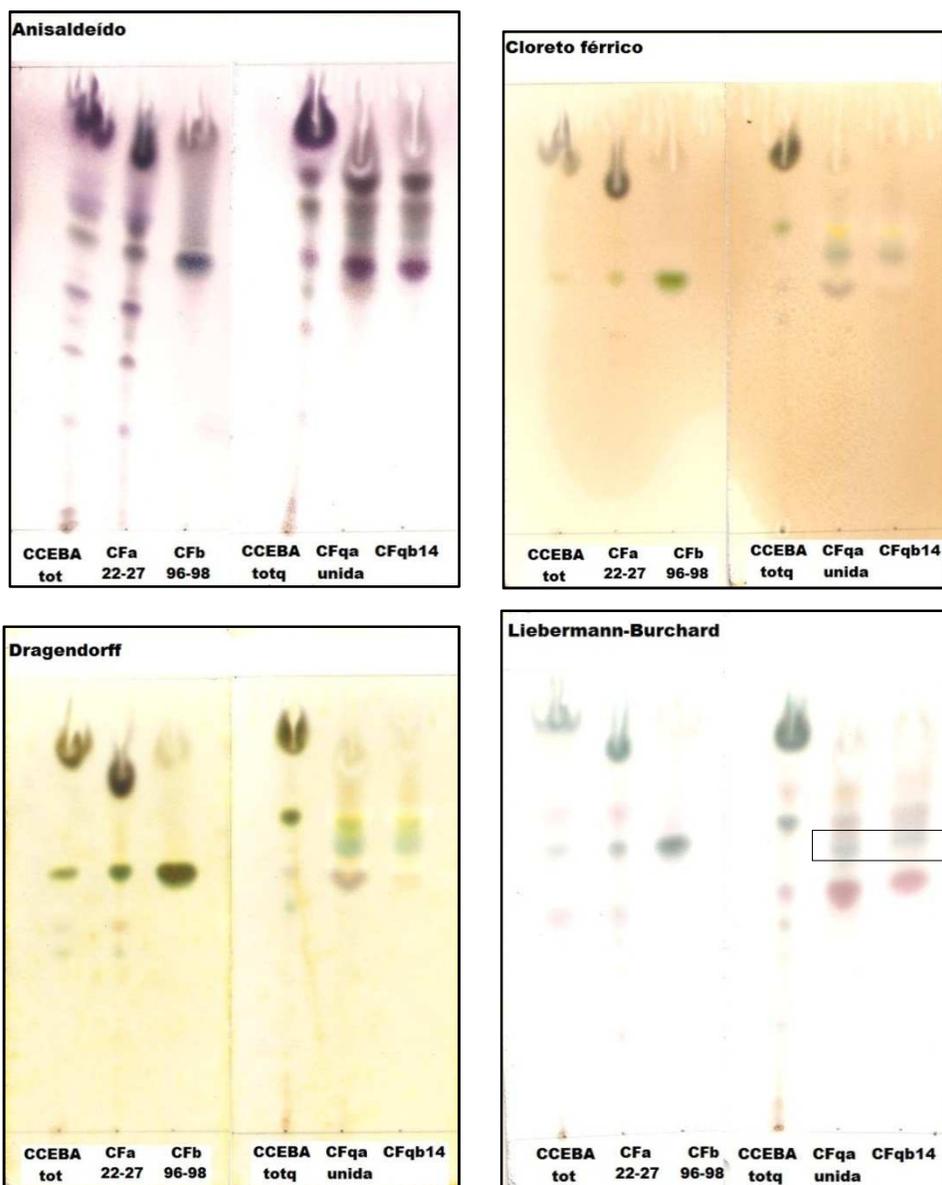
De modo geral, as frações mais ativas mantiveram a seletividade para linhagens de rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-03) e melanoma (UACC) como já observado em outros perfis para extratos e frações originais. Ou seja, com uma concentração muito baixa da fração aplicada, observou-se uma excelente atividade citostática e, na concentração mais alta (250µg/mL) houve perfil citocida para todas as linhagens. Na busca por novos fármacos anticâncer, a seletividade apresentada por novos ativos é importante na medida em que o tratamento anticâncer visa a erradicação das células tumorais com o mínimo dano a outros tecidos do paciente. Uma vez que se observou essa seletividade para a maioria das frações ativas, a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460), juntamente com a linhagem leucêmica (K562) foi selecionada para os testes viabilidade, morte celular e ciclo celular por citometria de fluxo.

6. Análise de frações por cromatografia de camada delgada

A cromatografia de camada delgada é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise de extratos vegetais brutos e para avaliação de processos de separação, podendo ser usada também para fins preparativos. Além de sua importância na avaliação preliminar do perfil químico de amostras, dezenas de reveladores são descritos na literatura, etapa que tem o intuito de detectar compostos orgânicos com os mais variados grupos funcionais (Simões *et al.*, 2004).

Como mostrado pelos fracionamentos subsequentes e pelo perfil cromatográfico das frações ativas, a substância ou grupo de substâncias ativas pertencem a um grupo

químico de característica mais polar, ainda que advindas de um extrato obtido a partir do acetato de etila, um solvente de polaridade média. A fim de caracterizar os extratos e frações ativas, foram utilizados reveladores específicos para diferentes grupos químicos.



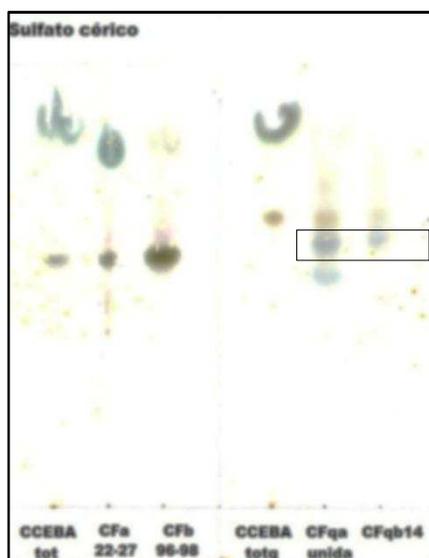


Figura 41. Cromatografia de camada delgada dos extratos e frações mais ativos revelados com diferentes reveladores: solução de anisaldeído, cloreto férrico, Dragendorff, Liebermann-Burchard e sulfato cérico. Manchas positivas para terpenóides destacadas. Uso de diclorometano/metanol (90/10) como fase móvel.

A solução de anisaldeído é um revelador universal para compostos orgânicos e foi usado para evidenciar o perfil cromatográfico geral das amostras. A revelação com Dragendorff para alcalóides e o teste para cumarinas (solução de hidróxido de potássio) não apresentaram resultado positivo.

Já o uso do revelador cloreto férrico, mostrou a presença de grupos fenólicos nas frações oriundas do CCEBA totq CFqa unida e CFqb14, sendo esse um grupo químico comum em vegetais. Outra reação positiva foi obtida pela verificação de coloração roxa com o revelador sulfato cérico, especialmente nas frações obtidas do extrato a quente. Confirmando a reação anterior, foram obtidas manchas da cor azul violáceo com o reagente de Liebermann-Burchard para triterpenóides (da Silva *et al.*, 2010), especialmente para as frações oriundas do CCEBA totq e com traços nas frações oriundas do segundo fracionamento do CCEBA tot. Isso pode ser justificado pela maior concentração desses componentes no extrato bruto obtido por sistema *Soxhlet*.

No metabolismo secundário de vegetais, os terpenos derivados do isopreno (unidade ramificada de 5 carbonos), representam o grupo mais importante de substâncias

químicas secretadas. São classificados de acordo com o número mínimo dessas unidades presentes na molécula em monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos etc (Simões *et al.*, 2004). Os terpenos fornecem matéria prima para uma grande variedade de indústrias: isto é, produtos de resinas para papéis e têxteis, aglutinantes usados no preparo de inseticidas, antissépticos, produtos farmacêuticos, perfumes e condimentos.

Esses resultados, juntamente com a caracterização realizada por espectrometria de massas, confirma a presença de terpenos nas frações ativas, bem como, a presença das moléculas já descritas na figura 3 para *C. campestris* como os diterpenos velamona e velamolona (Babili *et al.*, 1998). Esse grupo químico pode, portanto, ser o responsável pela atividade citotóxica observada nos testes, já que a melhor fração com atividade antiproliferativa teve reação positiva para terpenos.

7. Análise de frações por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

As frações mais purificadas foram submetidas à análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. O programa Enhanced Data Analysis, a partir da biblioteca NIST, identificou alguns dos picos majoritários da cromatografia gasosa realizada para as amostras. No entanto, a identificação somente pela fragmentação observada não é suficiente para a caracterização dos diversos componentes encontrados na fração, pois o padrão de fragmentação de vários compostos é similar sem diferenças significativas nas suas abundâncias relativas

Neste estudo foram identificados compostos por comparação de seus espectros de massas com os da literatura e comparação de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio com dados da literatura (Babili *et al.*, 1998). A avaliação destes parâmetros se fez necessária para não incorrerem em interpretações equivocadas dos dados analisados.

Para a fração CFa22-27 foram identificados campesterol, estigmasterol e gama e beta-sitosterol. Para as frações obtidas a partir da fração CFa22-27, foi identificado o gama tocoferol na fração CFb25-33, ciclotetracosano na CFb40-50, estigmasterol na CFb55-69 e docosenamida Z na fração CFb96-98, que mostrou significativa toxicidade com relativa

potência contra linhagem HT29 de acordo com Ratnayke *et al.* (1992).

As análises mostraram a presença majoritária de hormônios conhecidamente presentes em plantas (Awad & Fink, 2000), no entanto, são inéditos para essa espécie. Há possibilidade de haver outros ativos ainda não identificados em menor abundância. Dessa forma, os estudos seguiram para obtenção de maior quantidade dessas frações e realização de novos fracionamentos a fim de enriquecer as frações ativas e identificar os componentes ativos contra o câncer.

8. Análise de extratos brutos e frações por espectrometria de massas

As análises foram realizadas no Laboratório Thomson do IQ-UNICAMP sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Eberlin. A técnica utilizada trata-se de metodologia de análise de extratos vegetais via espectrometria de massas (MS) com infusão direta de amostra, técnica analítica denominada *fingerprinting* ou “impressão digital” química (Cabral, 2010). Essa abordagem, que envolve o mínimo preparo de amostra, foi aplicada visando detectar os componentes majoritariamente presentes e comparar a constituição de diferentes extratos e relacioná-la aos efeitos observados *in vivo*. A metodologia analítica envolveu MS (Espectrômetro de Massas Q-ToF, Micromass – U.K.) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) nos modos positivo e negativo por inserção direta dos extratos diluídos de *C. campestris*.

Os extratos CCEBA_{tot}, CCEBE_{tot} e CCEBE foram submetidos a análise de espectrometria de massas nos modos positivo e negativo (Fig. 42 e 43) a fim de se obter uma análise de seus componentes com o intuito de compará-los, visto a diferença de potência em suas atividades *in vivo* (item 7.2).

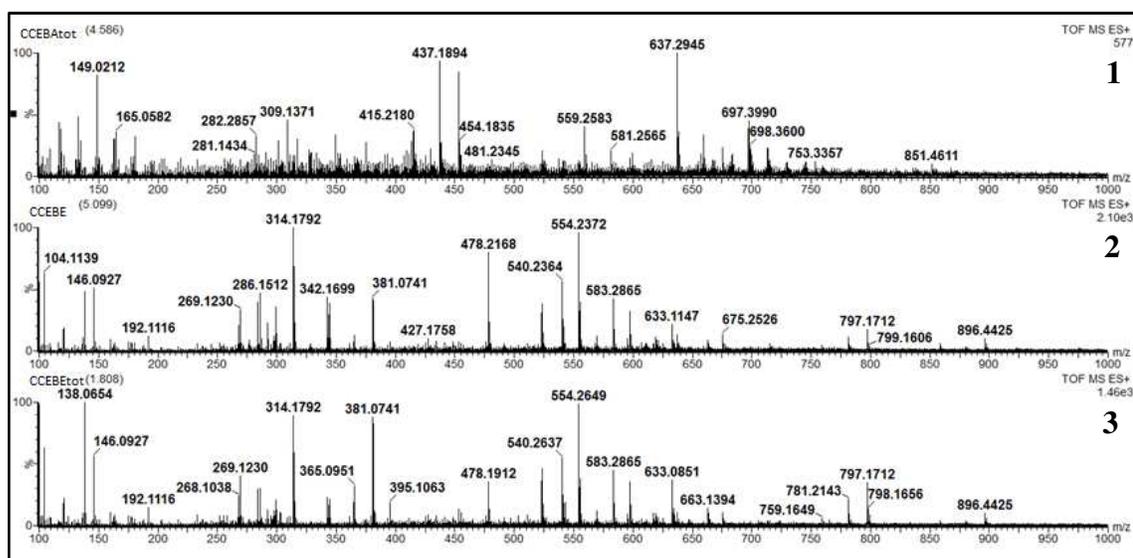


Figura 42. Perfil de ESI(+)-MS dos extratos CCEBAtot (1), CCEBE (2) e CCEBEtot (3) com condições otimizadas para os íon de m/z .

De maneira geral, tanto o extrato CCEBEtot obtido por extração total com etanol 95% quanto o CCEBE obtido por extração com etanol 95% do resíduo da extração por diclorometano e acetato de etila, apresentaram perfis semelhantes de fragmentograma.

Já o CCEBAtot apresentou perfil diferente dos outros extratos etanólicos, devido a diferença de polaridade dos solventes. Dessa forma, sugere-se que a diferença de potência e de toxicidade apresentada pelos extratos no tratamento *in vivo*, esteja relacionada com os diferentes componentes químicos extraídos em cada método. Assim, o CCEBAtot que apresentou maior potência e menor toxicidade, pode ser o detentor dos componentes ativos, ou mesmo, apresentar esses componentes em maior concentração que o CCEBEtot. Esse último extrato apresentou atividade significativa *in vivo* apenas numa dose 20 vezes maior que o CCEBAtot além de produzir elevada toxicidade nos animais tratados.

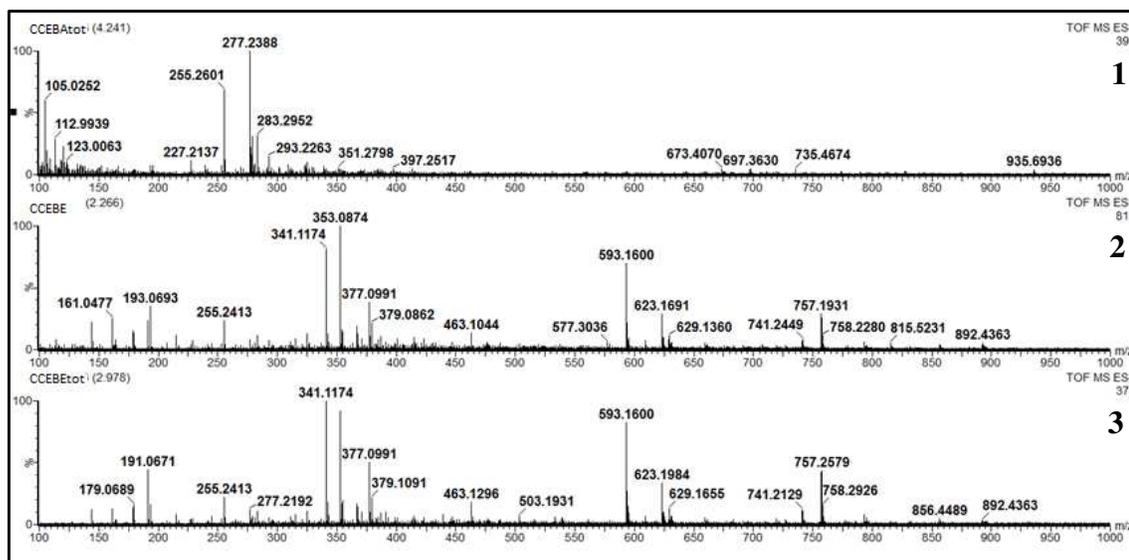


Figura 43. Perfil de ESI(-)-MS dos extratos CCEBAtot (1), CCEBE (2) e CCEBEtot (3) com condições otimizadas para os íons de m/z .

Além disso, por espectrometria de massas, os extratos totais por acetato de etila foram comparados em seu perfil composicional mostrando que o processo de extração a quente não afetou significativamente a constituição do extrato (Fig. 44)

Procurou-se identificar também alguns dos componentes já descritos para a espécie. Dentre eles, foram encontradas massas correspondentes à velamona e velamolona no CCEBAtot e na fração CFqb14 (Fig. 45). Essas moléculas foram descritas por apresentar atividade moluscicida contra *Bulinus truncatus* o hospedeiro intermediário do *Shistosoma haematobium* (Babili *et al.*,2006).

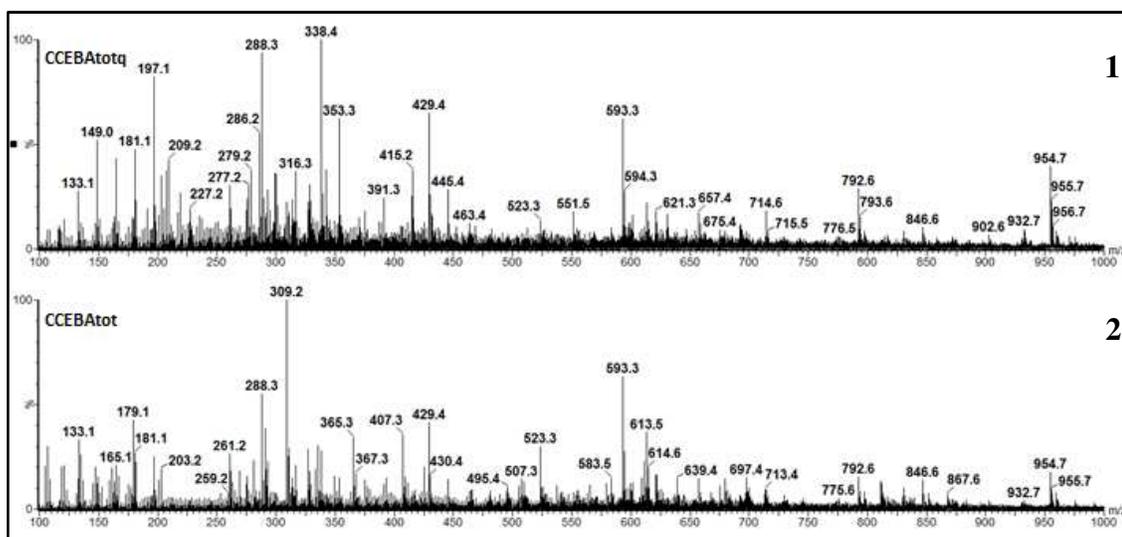


Figura 44. Perfil de ESI(+)-MS dos extratos CCEBAtotq (1) e CCEBAtot (2) com condições otimizadas para os íon de m/z.

O íon correspondente a velamona ($C_{20}H_{28}O_2 = 300,44$) apresentou massa experimental de $[M+H]^+ = 301,2304$ para CCEBAtot com erro de 45ppm e de $[M+H]^+ = 301,2086$ para CFqb14 com erro de 27ppm. E a velamolona ($C_{20}H_{28}O_3 = 316,441$) apresentou experimentalmente a massa de $[M+H]^+ = 317,2173$ para CCEBAtot com erro de 17ppm e de $[M+H]^+ = 301,2168$ para CFqb14 com erro de 16ppm. Os erros foram calculados em relação à massa teórica das moléculas velamona ($[M+H]^+ = 301,2168$) e velamolona (de $[M+H]^+ = 317,2117$), através da fórmula:

$$E_{(ppm)} = \frac{(M_{teórica} - M_{experimental})}{M_{teórica}} \times 10^6$$

E= erro

M = massa

Os valores de erro estão abaixo de 50ppm que é o máximo para dados de HRMS, ou seja, essas moléculas estão presentes em ambos os extratos, CCEBAtot e CCEBAtotq, e na fração CFqb14.

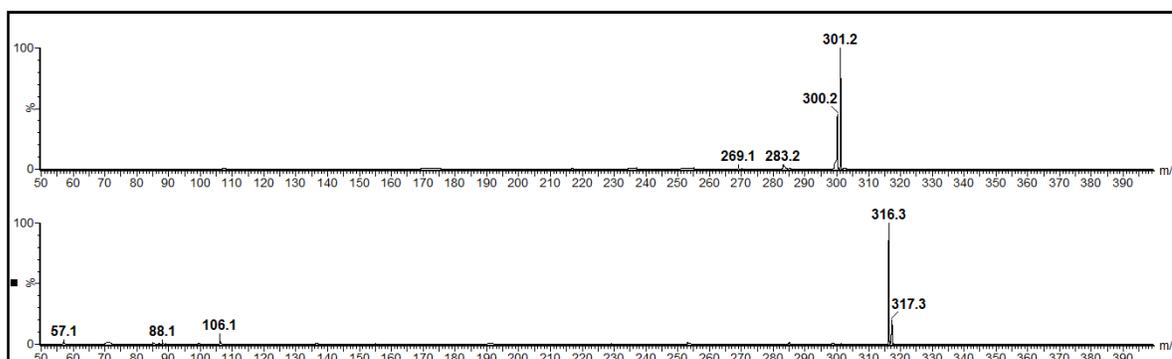


Figura 45. Perfil de ESI(+)-MS dos íons de m/z 301,2 (velamona) e 317,3 (velamolona) presentes nos extratos CCEBAtotq e CCEBAtot, e na fração CFqb14.

Em alguns aspectos do estudo fitoquímico muitos desafios estão presentes, uma vez que há uma grande biodiversidade e muitas espécies a serem estudadas a fim de caracterizar novas moléculas ou até mesmo validar o seu uso pela medicina popular. Dessa maneira, as análises fitoquímicas empregadas, ao fornecerem informações sobre a presença de metabólitos secundários, direcionam o isolamento e identificação dos princípios ativos (da Silva *et al.*, 2010).

Portanto, as duas moléculas identificadas no extrato e fração ativos são diterpenos. Esses resultados aliados à identificação de terpenos por cromatografia de camada delgada diferencial corroboram com a caracterização dos extratos e frações ativas que apresentam, portanto, terpenos em sua constituição. Como não se trata de frações puras, ainda estão presentes outros componentes que poderão ser identificados, podendo ou não atuar em sinergismo com as moléculas descritas na atividade anticâncer.

9. Parâmetros avaliados por citometria de fluxo

9.1 Viabilidade celular

Como observado no gráfico abaixo, as células tratadas com doxorrubicina apresentaram a mesma viabilidade quando comparadas ao controle, isso pode ser devido à baixa concentração utilizada da droga. As células tratadas com o extrato CCEBAtot e as frações CFa22-27 e CFb96-98, especialmente no caso da segunda fração, apresentaram

diminuição da viabilidade celular após 24h, em concordância com os resultados obtidos nos testes antiproliferativos. As células tratadas com a fração CFb25-33, não apresentaram redução da porcentagem viável confirmando a sua inatividade perante os testes antiproliferativos.

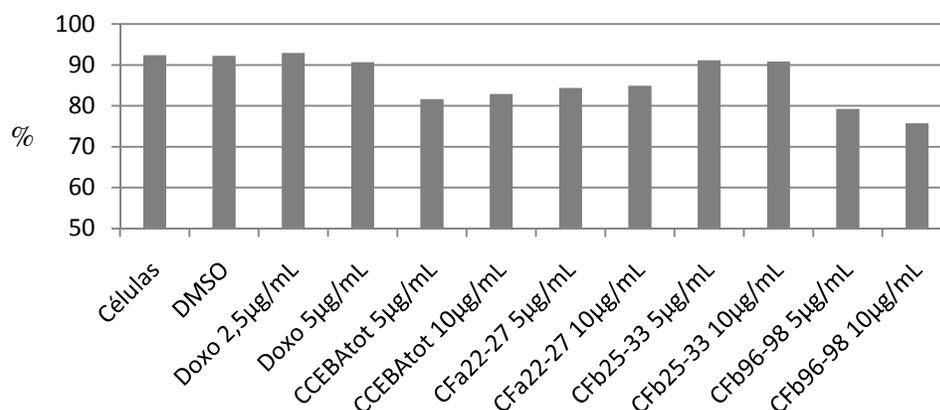


Figura 46. Porcentagem de células K562 viáveis após o tratamento de 24h com 5 e 10 µg/mL das amostras CCEBAtot, CFA22-27, CFb25-33 e CFb96-98.

O tratamento feito com a fração CFqb14 na linhagem NCI-H460 não alterou significativamente a viabilidade celular como pode ser visto no gráfico abaixo, no quais as células tratada apresentaram mesma viabilidade que as células não tratadas. No entanto, como mostra a figura 47, eventos de morte celular podem estar sendo desencadeados pelo tratamento, uma vez que o perfil antiproliferativo da fração em teste é citostático. Portanto, ainda que consideradas viáveis nas concentrações utilizadas e nos tempos de tratamento executados, as células tratadas com CFqb14 apresentaram viabilidade compatível com o perfil antiproliferativo observado.

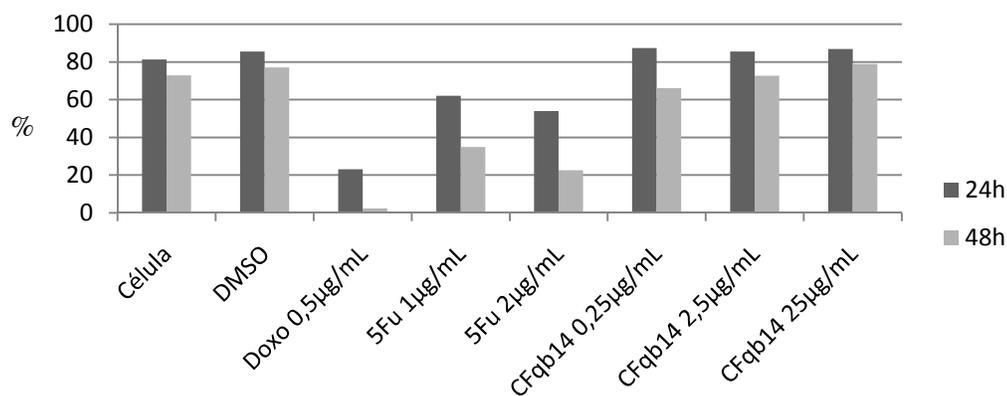


Figura 47. Porcentagem de células NCI-H460 viáveis após o tratamento de 24 e 48h com 0,25, 2,5, 25 µg/mL da fração CFqb14.

Comparativamente com a linhagem NCI-H460, a K562 apresentou-se mais sensível ao tratamento visto que houve redução na viabilidade das células tratadas. Como pode ser observado (Fig. 47 e 48) os controles celulares apresentaram-se com uma inviabilidade aumentada, o que pode ser resultado do processo de tripsinização ou da inespecificidade dos marcadores utilizados, visto os resultados observado a seguir.

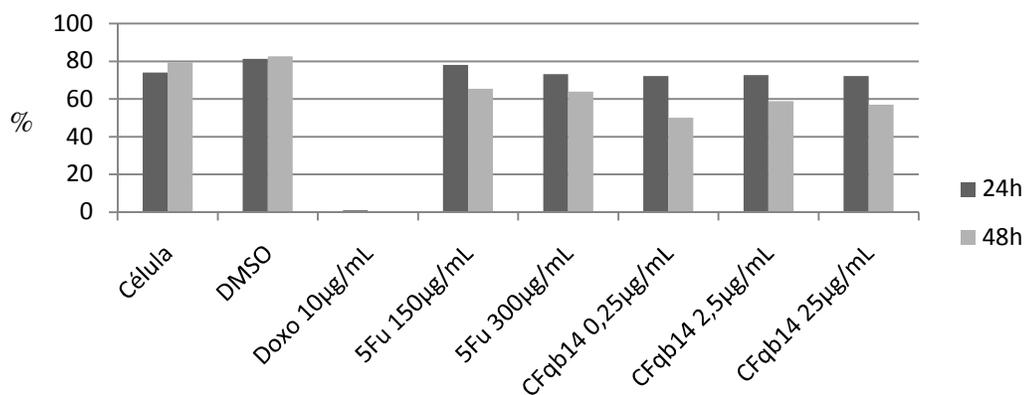


Figura 48. Porcentagem de células K562 viáveis após o tratamento de 24 e 48h com 0,25, 2,5, 25 µg/mL da fração CFqb14.

9.2 Avaliação de morte celular

O teste foi feito aplicando-se um tratamento nas linhagens NCI-H460 (24h e 48h) e K562 (48h) com 0,25; 2,5 e 25 μ g/mL da fração CFqb14.

As células em fase inicial da apoptose, com a externalização de fosfatidilserina estariam disponíveis para a ligação com anexina V, marcando, portanto as células em apoptose inicial. No entanto, as células positivas para anexina, quando presentes, apresentaram-se marcadas com 7-AAD também. Dessa forma, não foram observadas células em apoptose inicial, apenas células em necrose ou em apoptose tardia uma vez que o 7-AAD liga-se ao DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana e não é capaz de marcar células viáveis e em apoptose inicial.

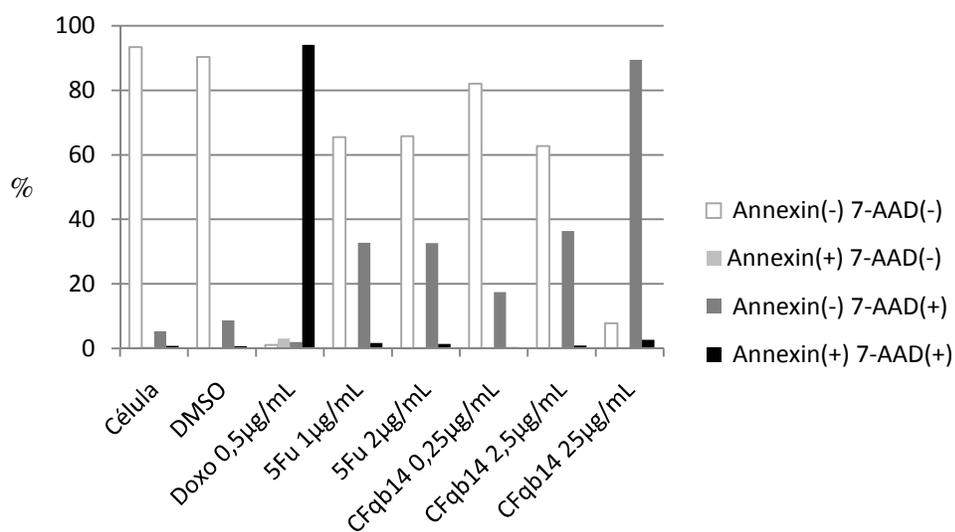


Figura 49. Porcentagem de células NCI-H460 positivas para anexina e 7-AAD após o tratamento de 24h com 0.25, 2.5, 25 μ g/mL da fração CFqb14.

A figura acima mostra as células tratadas com CFqb14 evidentemente marcadas com 7-AAD de forma concentração-dependente, com diminuição das células viáveis a medida que a concentração da fração aumenta. Nas células tratadas por 48h o perfil observado foi o mesmo, com aumento de células marcadas com 7-AAD (dados não mostrados). A marcação por 7-AAD indica perda de integridade de membrana, o que pode

ser indicação de morte celular por necrose.

Já as células K562 tratadas por 48h com a fração CFqb14 (Fig. 50) apresentaram-se duplamente marcadas, indicando apoptose tardia e/ou processo necrótico. Esse processo foi investigado com tratamento pelo período de 3h, para verificar o início do processo de morte celular (Fig. 51).

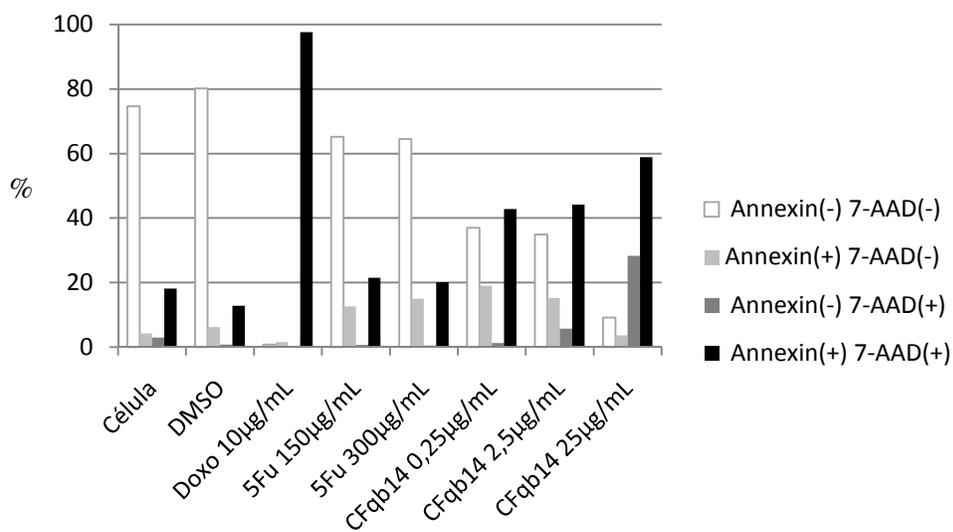


Figura 50. Porcentagem de células K562 positivas para anexina e 7-AAD após o tratamento de 48h com 0,25, 2,5, 25µg/mL da fração CFqb14.

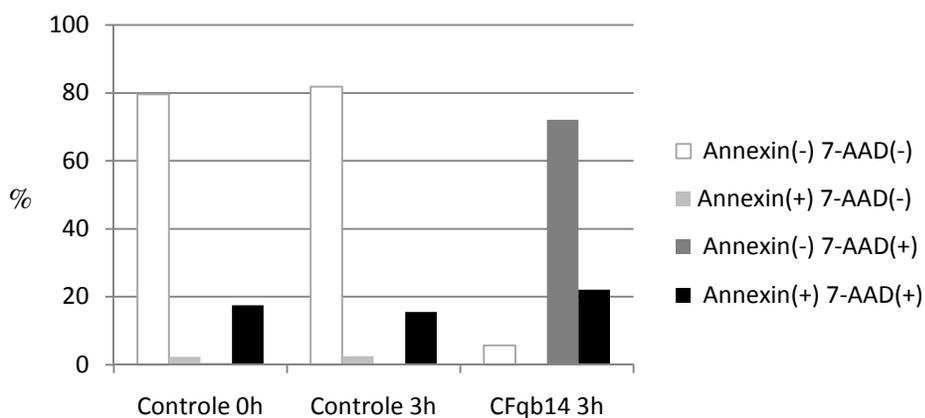


Figura 51. Porcentagem de células K562 positivas para anexina e 7-AAD após o tratamento de 3h com 25µg/mL da fração CFqb14.

Como pode ser observado na figura 51, em um pequeno tempo de tratamento já é possível observar a intensa marcação por 7-AAD que é um indicativo de morte necrótica. Como esse tipo de morte é mais evidente nos primeiros momentos do tratamento (Fig. 51), a marcação dupla observada na figura 50 mostra um processo já tardio de desestabilização de todas as estruturas celulares. Dessa maneira, o resultado que expressa a marcação por 7-AAD juntamente com o observado na figura 49, corrobora com a caracterização desse tipo de morte induzida pelo tratamento com a fração CFqb14 para as linhagens NCI-H460 (pulmão) e K562 (leucemia).

A morte celular por apoptose é um processo evolutivamente conservado que tem papel fundamental na homeostase tecidual (Lockshin & Zakeri, 2007). Pode ser desencadeada por via intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (citoplasmática). A evasão desse processo é uma característica de cânceres humanos, o que leva a progressão tumoral. Como a membrana celular permanece intacta, a apoptose é um processo brando para o tecido. Com a alteração estrutural, as células apoptóticas são reconhecidas como alvos fagocitários, sendo eliminadas rapidamente, sem extravasamento do seu conteúdo (Fulda, 2010).

Já em processos necróticos, as células mortas sofrem ação de enzimas o que pode levar ao rompimento da membrana celular e lesão exógena. No entanto, estudos recentes indicam que a necrose não seria simplesmente um evento passivo e desregulado, e sim eventos mediados por sinalizadores de forma programada em alguns tecidos como no cardíaco (Kung *et al.*, 2011). Zong *et al.* (2004) também sugere que o dano provocado pela alquilação do DNA estimularia uma forma regulada de morte necrótica. A “necrose programada” ou “necroptose” seria induzida pela excessiva ativação de PARP (poli-ADP-ribose-polimerase) que usa NAD^+ como substrato para inserir cadeias de poli-ADP-ribose nas proteínas da cromatina e facilitar o acesso do mecanismo de reparo ao DNA danificado. A degradação citosólica de NAD^+ provocaria a inibição da glicólise, que levaria a morte necrótica. Dessa forma, a necrose induzida por PARP seria um *back up* no caso de falha no processo de apoptose (Zong *et al.*, 2004; Edinger & Thompson, 2004). A atuação de agentes alquilantes têm sido importante na quimioterapia anticâncer clássica, mas ainda são necessários mais estudos para avaliar a efetividade na ocorrência de processos

necróticos advindos dos mecanismos envolvidos na atuação desses quimioterápicos (Borst & Rottenberg, 2004). Evidências mais recentes mostram que o início da necrose programada por receptores de morte, como o fator de necrose tumoral (TNF), requer a atividade da proteína quinase de interação com receptor (RIP1) (Galluzzi & Kroemer, 2008; Vandenabeele *et al.*, 2010). Dessa forma, os indícios de morte necrótica apresentados pelas linhagens NCI-H460 e K562 tratadas com a fração CFqb14 pode ser favorável já que, a indução de necrose em células cancerosas resistentes a apoptose pode ser um importante alvo no estudo de novos quimioterápicos. Além disso, esse resultado pode ser uma ferramenta nos estudos futuros de mecanismo de ação envolvido.

9.3 Avaliação do ciclo celular

As células situadas no pico hipodiplóide (sub-G₁) possuem conteúdo de DNA menor que 2c e podem representar aumento na ocorrência de *debris* celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular. Dessa forma, as células tratadas com doxorubicina (Fig. 52) apresentaram maior porcentagem de células em sub-G₁, como já era de se esperar.

O ciclo celular das células controle tratadas com doxorubicina apresentou perfil característico com parada em S-G₂/M devido à sua ligação na topoisomerase II, com elevada expressão na fase S e fase G₂/M, favorecendo a ocorrência de quebras no DNA e subsequente parada no ciclo principalmente nessa fase com relação às demais (Potter & Rabinovitch, 2005). As células do controle negativo tratadas com o veículo não apresentaram diferença com relação ao controle de células.

Nas células tratadas com os extratos e frações, com exceção para as células tratadas com a fração CFb25-33, houve uma diminuição na população de células na Fase S, no entanto, sem alterações na população de células nas fases G₁ e G₂/M. Entre os perfis das diferentes concentrações usadas no tratamento, não houve diferenças significativas.

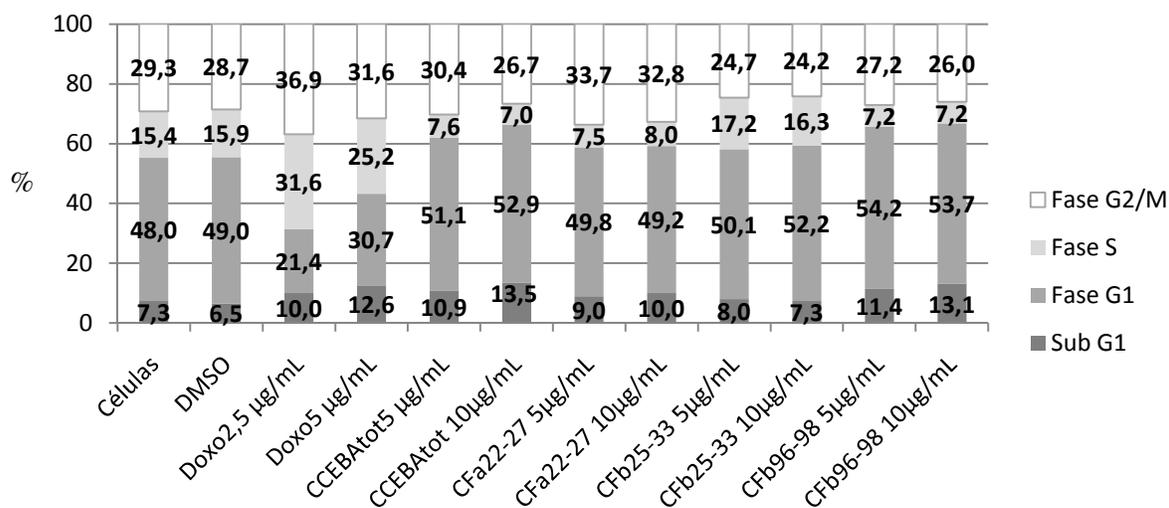


Figura 52. Porcentagem das populações celulares (K562) presentes em cada fase do ciclo após tratamento de 24h com 5 e 10µg/mL das amostras CCEBA tot, CFa22-27, CFb25-33 e CFb96-98.

Confirmando o perfil antiproliferativo observado, a fração CFb96-98 induziu morte celular, de forma que a população celular em sub-G₁, comparada ao controle, foi maior, demonstrando o potencial antiproliferativo dos componentes químicos presentes nessa fração. Esse perfil foi também apresentado pelo extrato CCEBA tot e pela fração CFa22-27 o que confirma o sucesso do processo de fracionamento, mostrando que a fração CFb96-98 foi ativa.

Houve importante aumento na população Sub-G₁, nas células tratadas com a fração CFb96-98 e a sua fração e extrato de origem, CFa22-27 e CCEBA tot, respectivamente. Portanto, de acordo com os dados obtidos, as amostras CCEBA tot, CFa22-27 e CFb96-98 produziram parada na proliferação celular, visto a diminuição da população na fase S e aumento da população sub-G₁, sugerindo morte celular.

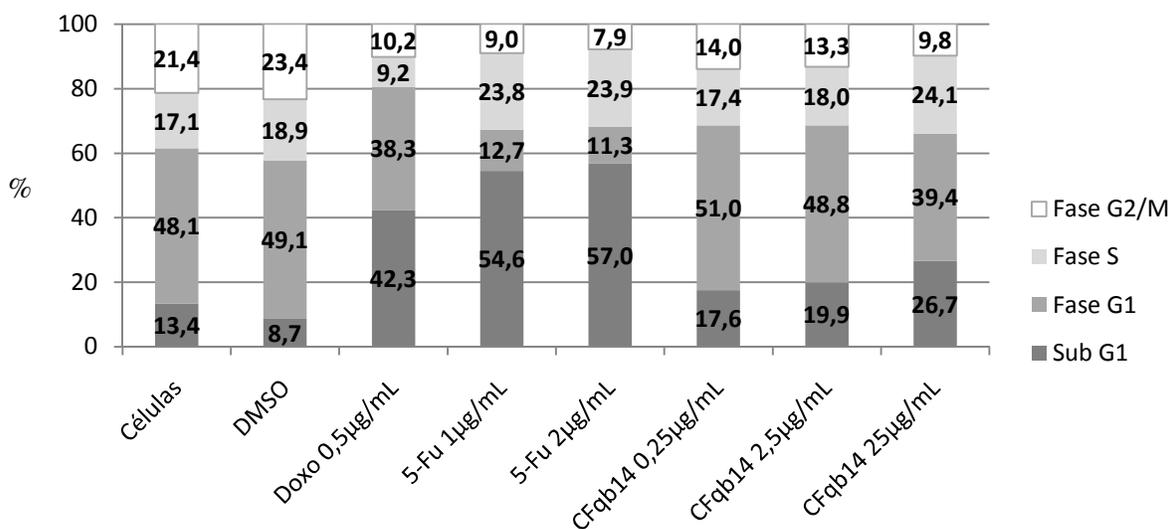


Figura 53. Porcentagem das populações celulares H460 presentes em cada fase do ciclo após o tratamento de 24h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.

As células NCI-H460 tratadas com a fração CFqb14 não apresentaram alteração no perfil de ciclo celular quando comparadas ao controle. Com um tratamento mais longo, outro perfil poderá ser observado.

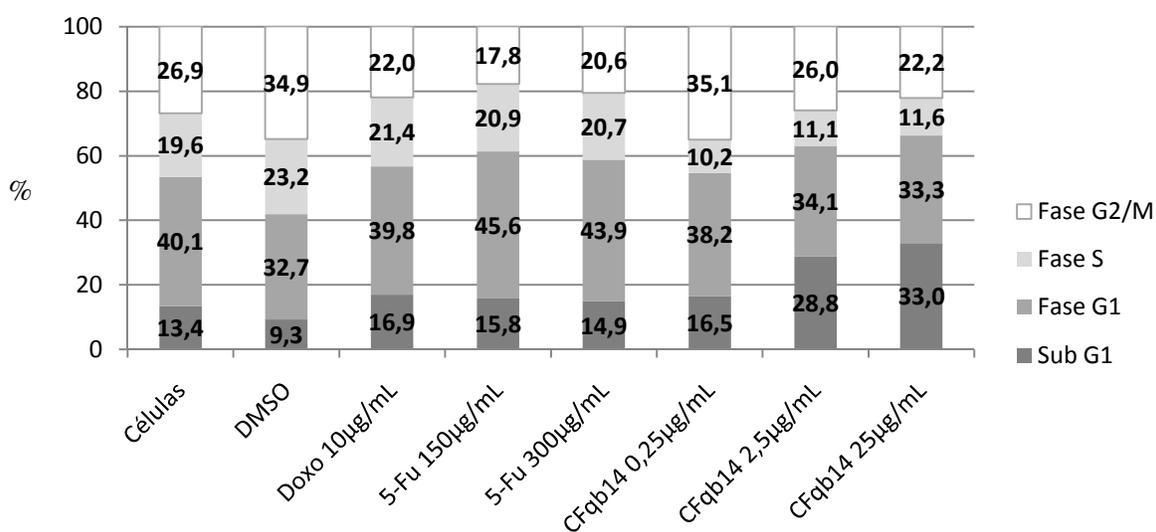


Figura 54. Porcentagem das populações celulares K562 presentes em cada fase do ciclo após o tratamento de 24h com 0.25, 2.5, 25µg/mL da fração CFqb14.

Já a análise do ciclo celular para as células K562 tratadas por 24h mostrou aumento da população na fase sub-G₁, como foi observado para as células K562 tratadas com CFb96-98, indicando aumento de morte celular. No entanto, o controle de células apresentou-se com alterada quantidade de células mortas. Esse fato pode estar relacionado com artefatos de técnica, uma vez que ao microscópio ótico a cultura apresentava-se dentro dos padrões de normalidade. Não houve alteração do perfil de ciclo celular para as células tratadas por 48h (dados não mostrados), havendo apenas aumento das células inviáveis e diminuição da população celular na fase S.

Nas células tratadas por doxorrubicina não foi observado o perfil do primeiro grupo de experimentos, uma vez que não houve elevação da população na fase G₂ do ciclo celular. Esse fato pode ter ocorrido devido à alta concentração da droga, o que causou morte das células. No entanto, nas células NCI-H460 tratadas com 5-Fluorouracil houve aumento da população na fase S, perfil compatível com seu mecanismo de ação antimetabólico o qual, interfere na duplicação do DNA, por impedir a síntese de timina (Pandolfo *et al.*, 2005). No entanto essa reação não foi observada para a linhagem K562, o que pode estar relacionado a diferentes vias de morte ativadas preferencialmente em cada linhagem.

10. Ensaio *in vivo*

10.1 Teste Hipocrático

Animais receberam injeções intraperitoniais de 15, 30, 50, 75, 150 e 300mg/kg de extrato CCEBA_{tot} e de 125, 250 e 500mg/kg de extrato CCEBE. Nas 4 horas iniciais ao tratamento foram observados os aspectos toxicológicos através de parâmetros como: estado consciente e disposição, coordenação motora e tônus muscular, reflexos, sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo. Os animais tratados com o extrato CCEBA_{tot} nas doses de 50 a 300mg/kg apresentaram sinais extremos de toxicidade como atividade locomotora diminuída, tremores, piloereção, diarreia, contorção ao longo do período de 4h e, em menos de 24h, morreram. Nas doses de 30 e 15mg/kg os animais apresentaram sinais de leves toxicidade não havendo morte no período de 14 dias de teste, além de

continuarem ganhando peso normalmente. No entanto, a fim de garantir que os experimentos futuros se desenvolvessem até o fim sem a ocorrência de morte dos animais devido ao tratamento com os extratos, a dose de 20mg/kg foi escolhida como dose máxima desse extrato a ser utilizada. Já os animais tratados com o extrato CCEBE, apesar de não terem morrido ao longo dos 14 dias de observação, apresentaram sinais de toxicidade durante as primeiras 4 horas de observação. Dessa forma, para segurança dos experimentos, a dose máxima escolhida no uso do CCEBE_{tot} foi de 100mg/kg.

No teste hipocrático para a fração CFqb14, foram usadas as doses 1.5, 3, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100mg/kg. As doses mais altas foram extremamente tóxicas produzindo exacerbada hipotermia, contorções abdominais e diarreia. Alguns animais também apresentaram cegueira e hemorragia intestinal. Na dose de 6,25mg/kg os animais apresentaram leves sinais de toxicidade nas 24h seguintes a administração, mas uma parte do grupo morreu em menos de 48h. Já nas doses de 3 e 1,5mg/kg houve apenas leve toxicidade no tratamento agudo. Por isso a dose máxima utilizada para o tratamento dos animais foi de 4mg/kg.

10.2 Atividade anticâncer em modelo de tumor de pata

A fim de verificar a atividade *in vivo* dos extratos mais ativos nos testes antiproliferativos, foi utilizado o modelo de tumor de pata (Ehrlich). Como o tratamento foi iniciado no terceiro dia após inoculação das células tumorais, ficou garantido o início desenvolvimento tumoral. Além disso, como os extratos foram administrados pela via intraperitoneal, pôde-se avaliar se os princípios ativos foram absorvidos e metabolicamente ativos atingindo o tumor.

10.2.1 Atividade anticâncer do CCEBA_{tot} em modelo de tumor de pata

O efeito anticâncer *in vivo* do extrato CCEBA_{tot} (5, 10 e 20mg/kg), foi realizado através da determinação do volume das patas dos animais em intervalos de 3 dias para observar a evolução tumoral frente ao tratamento realizado. Do volume obtido a cada medida, foi descontado o valor obtido com a mensuração do volume basal da pata, antes da inoculação do tumor.

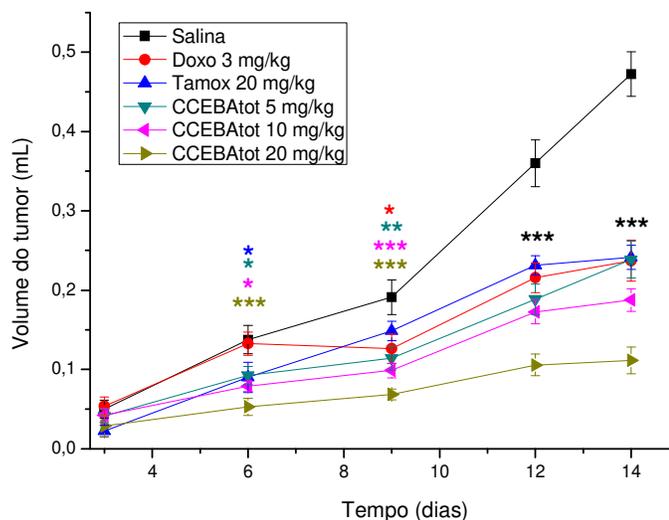


Figura 55. Variação do volume tumoral induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento com o extrato CCEBAtot de *Croton campestris*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

Através do teste de Duncan, as amostras foram comparadas estatisticamente ao grupo salina (controle negativo). A partir do sexto dia de experimento, o volume do tumor foi estatisticamente menor (Fig. 55) para as três doses usadas no tratamento. No último dia de experimento, os animais foram eutanasiados e tiveram ambas as patas dos animais foram retiradas e através da diferença de massa entre elas e relacionando o peso corporal do animal, foi estabelecido o peso relativo tumoral para os grupos (Fig. 57).

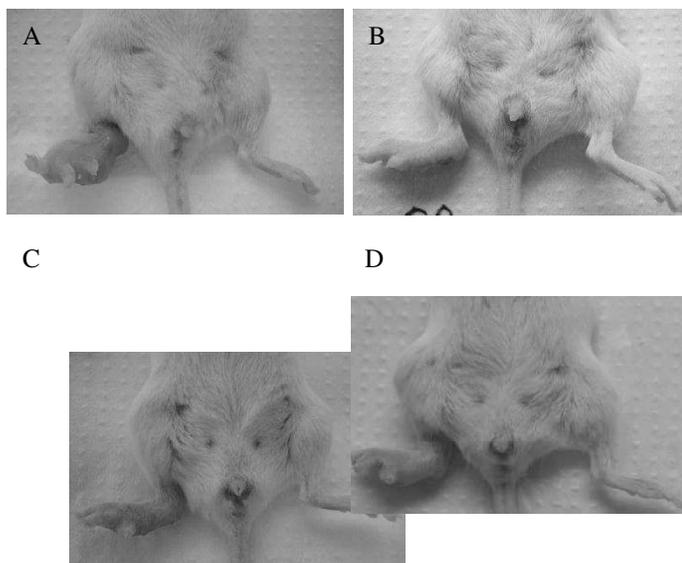


Figura 56. Pata evidenciando a massa tumoral de animal não tratado (A), tratado com quimioterápicos doxorubicina (B) e tamoxifeno (C) e tratado com 20mg/kg de CCEBA tot (D).

Visivelmente, os animais tratados com os quimioterápicos e as diferentes doses do CCEBA tot, especialmente para a maior dose, apresentaram massa tumoral menor que a o grupo controle negativo (Fig. 57). A massa tumoral comparada ao grupo não tratado foi reduzida em até 65,3% para o grupo tratado com 20 mg/kg.

Por se tratar de um extrato bruto e considerando que mesmo a menor dose de 5mg/kg apresentou diminuição significativa do desenvolvimento tumoral comparado ao grupo não tratado e semelhante aos quimioterápicos já utilizados na clínica, trata-se de componentes ativos extremamente potentes, o que justifica a importância de identificar quais os princípios ativos anticâncer presentes.

Ao final do experimento, todas as doses foram efetivas comparadas ao controle negativo com $p < 0,001$, ou seja, mesmo na dose de 5mg/kg a diferença do volume tumoral foi estatisticamente significativa. Portanto, pôde-se concluir que o extrato CCEBA tot foi efetivo em produzir diminuição do crescimento tumoral com significativa potência, corroborando com a continuidade dos estudos.

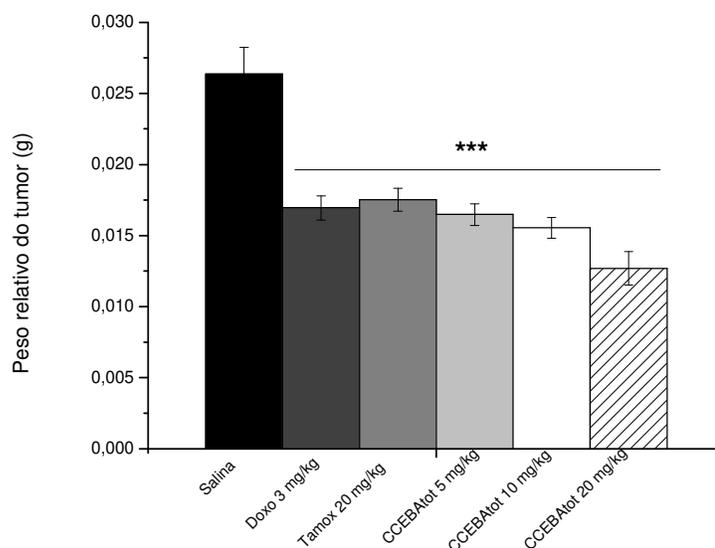


Figura 57. Peso relativo do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo após o tratamento com o extrato CCEBAtot de *Croton campestris*; *** $p < 0.001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

Ao longo do experimento, os animais apresentaram sinais de toxicidade, com perda de peso em todos os grupos experimentais (Fig.58), mas que também pode estar relacionada ao desenvolvimento do tumor e não necessariamente às amostras utilizadas, já que não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle ao final do experimento.

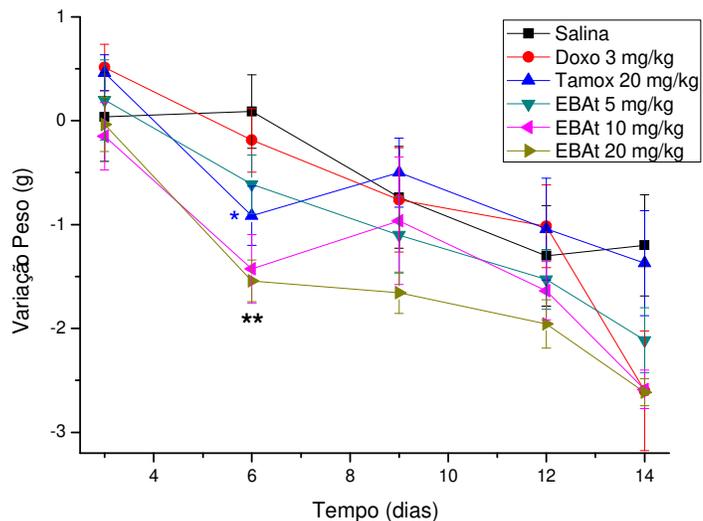


Figura 58. Variação do peso corporal dos grupos durante o tratamento com o extrato CCEBA tot de *Croton campestris*. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

O aumento de peso dos órgãos quando associado às análises histopatológicas, podem indicar toxicidade. Por outro lado, esse fato pode ser resultado de resposta adaptativa do organismo e não necessariamente indicação de toxicidade (Rhomberg *et al.*, 2007). Dessa forma, as análises realizadas (Fig. 59) mostram diminuição do peso de órgãos como fígado e baço, quando comparados aos controles.

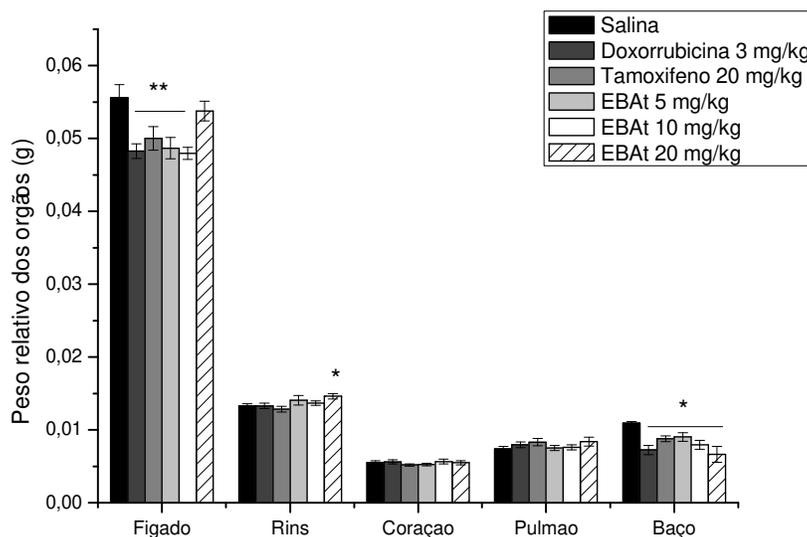


Figura 59. Peso relativo dos órgãos após tratamento com o extrato CCEBAAtot de *Croton campestris*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Duncan's test, $p < 0,001$ (ANOVA).

Como mostrado nas análises de espectrometria de massas (Fig. 45), o CCEBAAtot apresentou massas correspondentes a duas substâncias com atividade moluscicida já descritas para a *C. campestris* (Babili *et al.*, 2006), os diterpenos velamona e velamolona. Esses resultados, aliado ao perfil cromatográfico para terpenóides observado para extratos e frações ativas (Fig. 41), sugerem que possa haver participação dessas substâncias na atividade anticâncer observada.

10.2.2 Atividade anticâncer do CCEBEtot em modelo de tumor de pata

A comparação da atividade anticâncer *in vivo* do extrato CCEBEtot (25, 50 e 100mg/kg) e do CCEBAAtot, foi realizada também em modelo de tumor de pata. Além disso, esse novo experimento utilizando o CCEBAAtot possibilitou a avaliação de parâmetros hematológicos dos animais tratados. As doses escolhidas foram baseadas no teste hipocrático feito para o extrato CCEBE que, como mostrado nas análises de espectrometria de massas, apresenta constituição semelhante ao CCEBEtot. Além disso, como o experimento anterior foi realizado em fêmeas, nesse novo experimento, onde foram

utilizados machos, foi incluído um grupo tratado com 10mg/kg de CCEBA_{tot} para tornar a comparação fiel além de possibilitar a avaliação de parâmetros hematológicos até então não realizados.

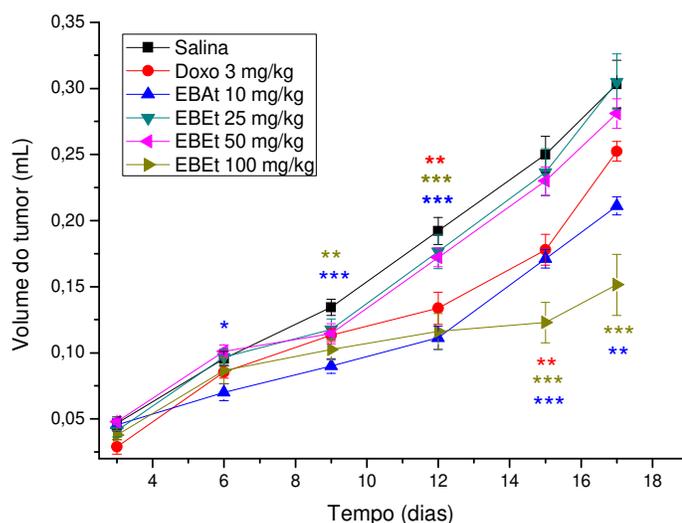


Figura 60. Variação do volume tumoral induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento com os extratos CCEBA_{tot} e CCEBE_{tot} de *Croton campestris*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0,001$ (ANOVA).

Ao final do experimento, a atividade antitumoral foi significativamente efetiva apenas para a dose de 100mg/kg de extrato CCEBE_{tot} (Fig. 60 e 61) e reproduziu a resposta anterior para o extrato CCEBA_{tot} na dose de 10mg/kg com redução de 36,6% do desenvolvimento tumoral. Esse resultado indicou que os princípios ativos antitumorais estavam presentes em maior concentração no extrato CCEBA_{tot}, visto que em uma dose vinte vezes menor, foi capaz de inibir o desenvolvimento tumoral, quando comparado ao tratamento com extrato CCEBE_{tot} que reduziu a desenvolvimento tumoral significativamente apenas na dose de 100mg/kg em 55,6%. Dessa forma, como um solvente de polaridade intermediária, o acetato de etila foi mais efetivo em extrair componentes ativos, o que direcionou a pesquisa para elementos com essas características químicas.

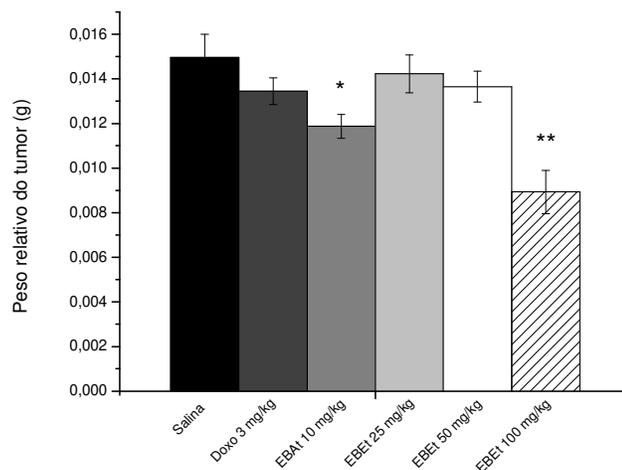


Figura 61. Peso relativo do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo após o tratamento com os extratos CCEBA tot e CCEBE tot de *Croton campestris*; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

O CCEBE tot apresentou notável toxicidade especialmente verificada com a perda de peso exacerbada dos animais (Fig. 62) e também verificada com a morte de animais ao longo do experimento.

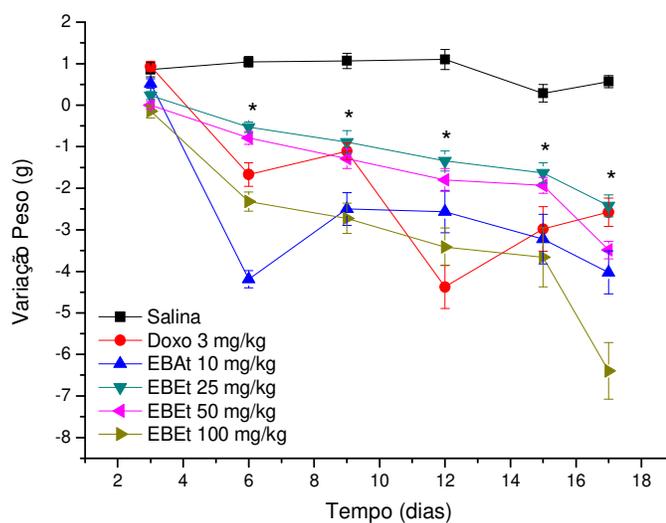


Figura 62. Variação do peso corporal dos grupos durante o tratamento com os extratos CCEBA tot e CCEBE tot de *Croton campestris*. * $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

De acordo com os resultados, não apenas a extração total feita com etanol 95% não foi efetiva para concentrar os ativos eficientemente, mas também extraiu constituintes mais tóxicos que o CCEBA_{tot}.

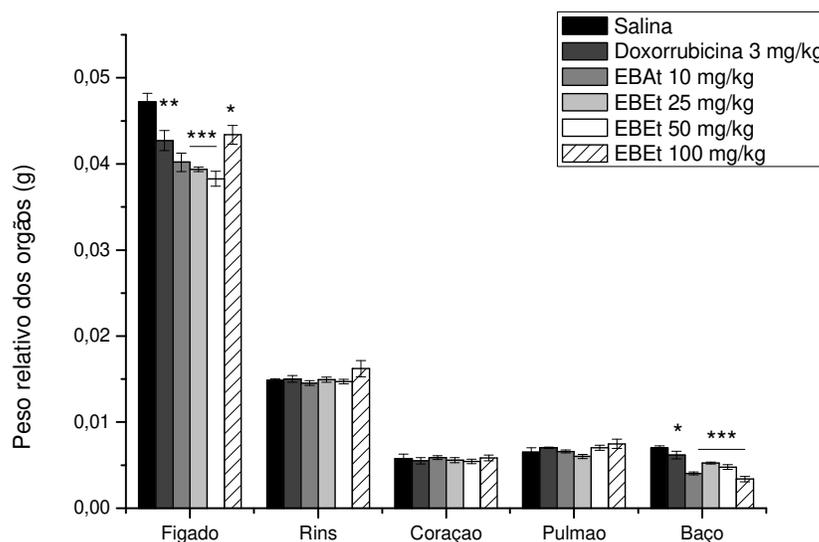
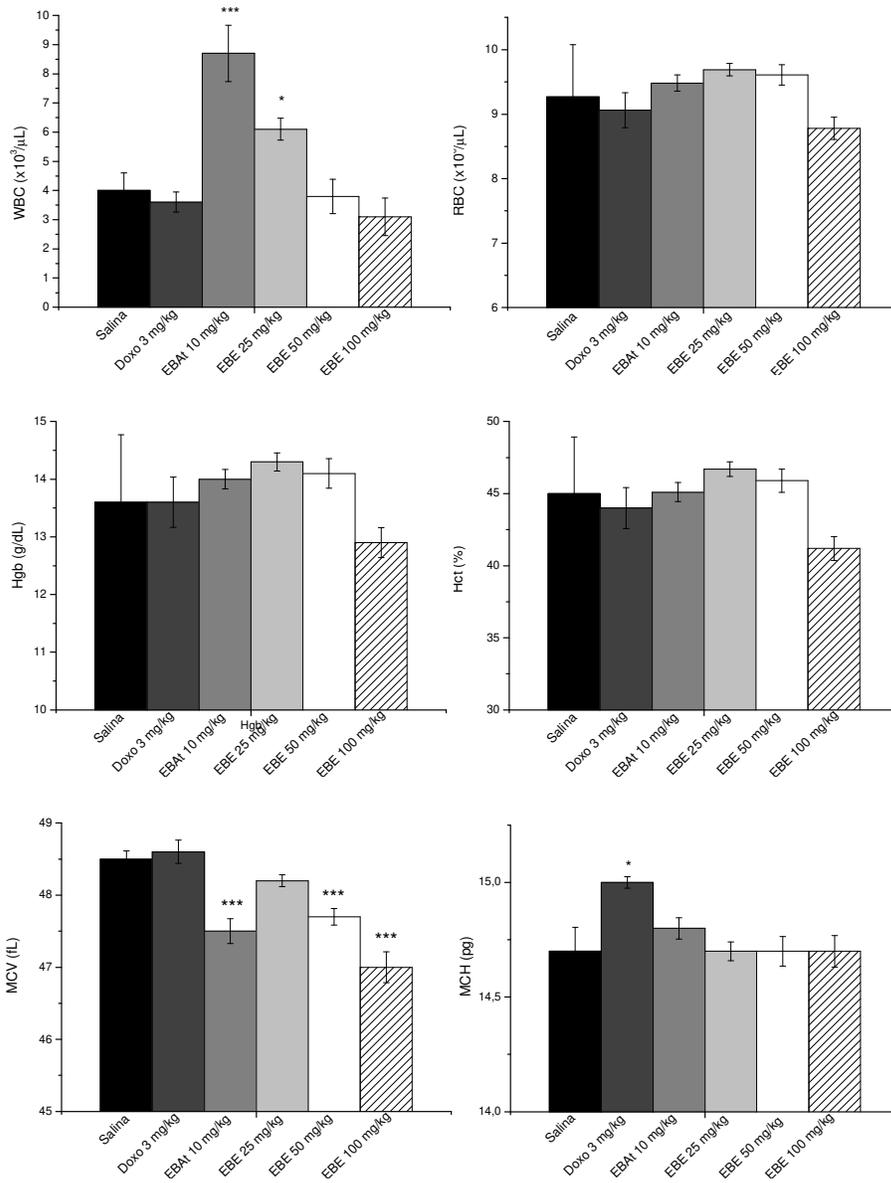


Figura 63. Peso relativo dos órgãos após tratamento com os extratos CCEBA_{tot} e CCEBE_{tot} de *Croton campestris*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0,001$ (ANOVA).

A alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são sinais de toxicidade (Cunha *et al.*, 2009). Como observado no tratamento com o extrato CCEBA_{tot}, houve diminuição das massas do fígado e baço nesse segundo experimento (Fig. 63).

A quimioterapia tange a eficácia e a toxicidade, por isso muitas vezes como consequência desse tratamento, os pacientes apresentam uma série de dados alterados, como é o caso do hemograma. Como observado nos gráficos dos parâmetros hematológicos (Fig.64), os leucócitos totais apresentaram-se aumentados para o grupo tratado com o extrato CCEBA_{tot} e levemente aumentado nos animais tratados com 25mg/kg de extrato CCEBE_{tot}.



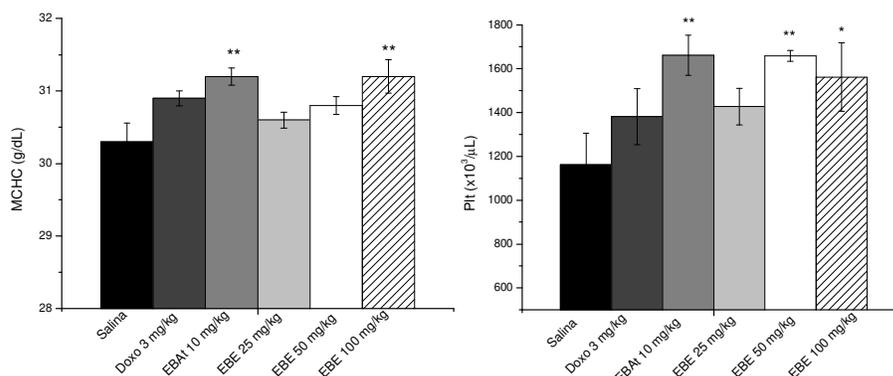


Figura 64. Hemograma do sangue total dos animais após tratamento com os extratos CCEBA e CCEBE de *Croton campestris*: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito (Hct), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. Duncan's test, p < 0.001 (ANOVA).

Por atuar em células com taxas elevadas de divisão celular, os quimioterápicos acabam atuando também em células não neoplásicas tais como trato gastrointestinal, folículos pilosos, gônadas e as da medula óssea (Souza *et al.*, 2008). Por isso, valores de leucócitos geralmente encontram-se diminuídos pela depressão da produção de precursores da linhagem hematopoiética causada como efeito colateral do uso de diversos quimioterápicos. No entanto, comparados ao controle negativo os animais tratados com CCEBA tot e CCEBE tot 25mg/kg, apresentaram valores elevados de leucócitos. A leucocitose, apesar de ser comum em processos infecciosos, nesse caso, pode tratar-se de “efeito rebote”, ou seja, um efeito do tipo hormético, quando doses baixas de uma substância tóxica estimulam uma resposta adaptativa. Nesse caso, doses mais elevadas do extrato bruto foram tóxicas o suficiente para causar leucopenia, como observado em diversos tratamentos, principalmente na quimioterapia. Na dose de 10mg/kg de CCEBA tot e na menor dose de CCEBE tot, houve um aumento significativo na produção de leucócitos. Isso pode ser explicado à medida que a medula, ao ser prejudicada pela toxicidade do tratamento ainda com uma baixa dose, eleva sua produção de leucócitos de forma a compensar a perda dessas células, resultado do efeito rebote. Na medida em que as doses foram aumentando esse efeito desapareceu.

Com relação à série eritrocitária, o volume corpuscular médio (MCV) apresentou-se diminuído para os grupos tratados com os extratos CCEBA_{tot} e CCEBE_{tot} (50 e 100mg/kg), revelando uma tendência a anemia microcítica o que está relacionado com o aumento da concentração da hemoglobina corpuscular (MCHC) nesses mesmos grupos. Ou seja, os eritrócitos apresentaram-se diminuídos, mas a concentração de hemoglobina corpuscular presente nessa série manteve-se constante o que elevou o parâmetro de MCHC.

A diminuição plaquetária, frequentemente observada nos pacientes tratados por quimioterapia devido à supressão medular, não foi observada para os grupos experimentais. De forma oposta, para os grupos tratados com CCEBA_{tot} e CCEBA_{tot} nas maiores doses observou-se um estado de plaquetose, o que foi coerente com os resultados da série leucocítica, uma vez que a produção dessas células está relacionadas com a produção medular. Além disso, a disfunção esplênica observada com a diminuição do órgão pode ter contribuído para o aumento no número de plaquetas.

10.2.3 Atividade anticâncer da fração CFqb14 em modelo de tumor de pata

Após o fracionamento do CCEBA_{tot}, a fim de obter massa para a execução de um teste anticâncer *in vivo*, a fração CFqb14 por sua excelente atividade no teste antiproliferativo e seu perfil cromatográfico mais purificado, foi eleita para o tratamento no modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, a fim de verificar sua atividade sistêmica. Como no teste hipocrático os animais apresentaram respostas tóxicas em doses mais altas, foram escolhidas doses mínimas para o tratamento.

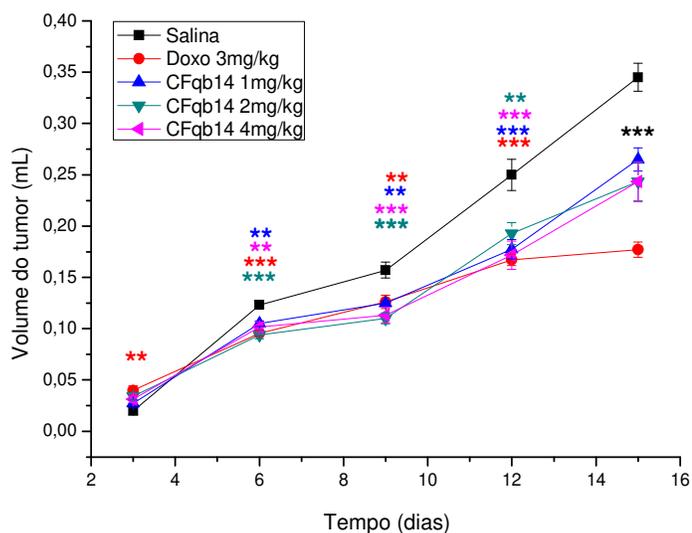


Figura 65. Variação do volume tumoral induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo durante o tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*; ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

Ao final do experimento, a atividade antitumoral foi significativamente efetiva para todos os grupos tratados, com a CFqb14 e doxorrubicina. Confirmando o efeito potente observado no teste antiproliferativo, a fração CFqb14 apresentou excelente atividade anticâncer *in vivo*, pois a dose de 1mg/kg foi efetiva contra a evolução tumoral. O volume tumoral comparado ao grupo não tratado foi reduzido em até 22,5% para o grupo tratado com 4mg/kg. Essa atividade foi obtida com uma dose muito baixa de uma fração que ainda não está pura, revelando a presença de princípios ativos de elevada potência.

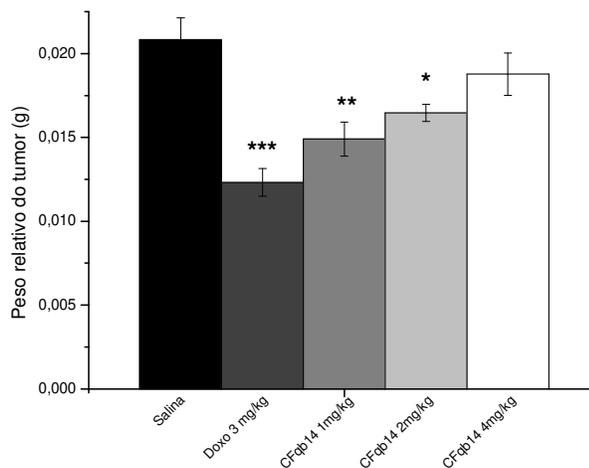


Figura 66. Peso relativo do tumor induzido por células de Ehrlich em pata de camundongo após o tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

A inibição do crescimento tumoral foi semelhante entre os grupos tratados, como observado na figura 66. No entanto o peso relativo do tumor mostrou-se diminuição inversamente proporcional às doses utilizadas ao longo do experimento. Isso pode ser explicado pela maior perda de peso nos grupos tratados com as doses mais elevadas, pois, quanto maior a massa corporal, menor o peso relativo tumoral.

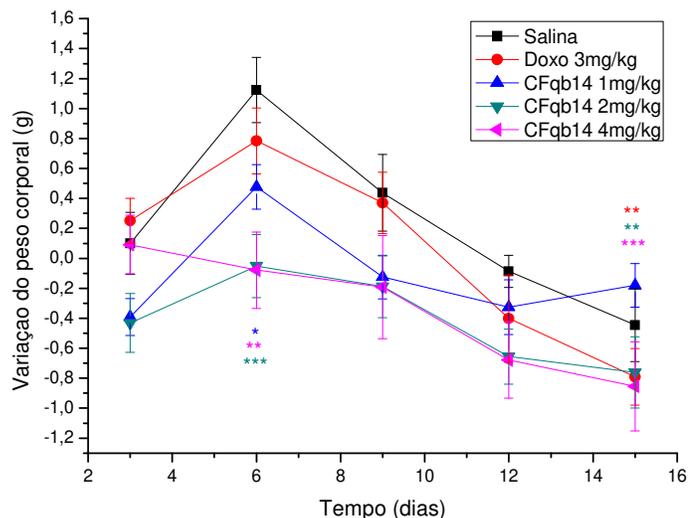


Figura 67. Variação do peso corporal dos grupos durante o tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0,001$ (ANOVA).

A perda de peso foi global entre os grupos, especialmente os grupos experimentais tratados com as maiores doses, o que reflete a toxicidade do tratamento, como observado para os animais tratados com os extratos brutos. O processo de fracionamento, ao diminuir a concentração de substâncias tóxicas, contribuiu para a melhoria da atividade e diminuição dos efeitos colaterais indesejados no tratamento dos animais. Isso demonstra o sucesso do processo de purificação e incentiva a continuidade dos estudos visando à identificação dos componentes anticâncer envolvidos.

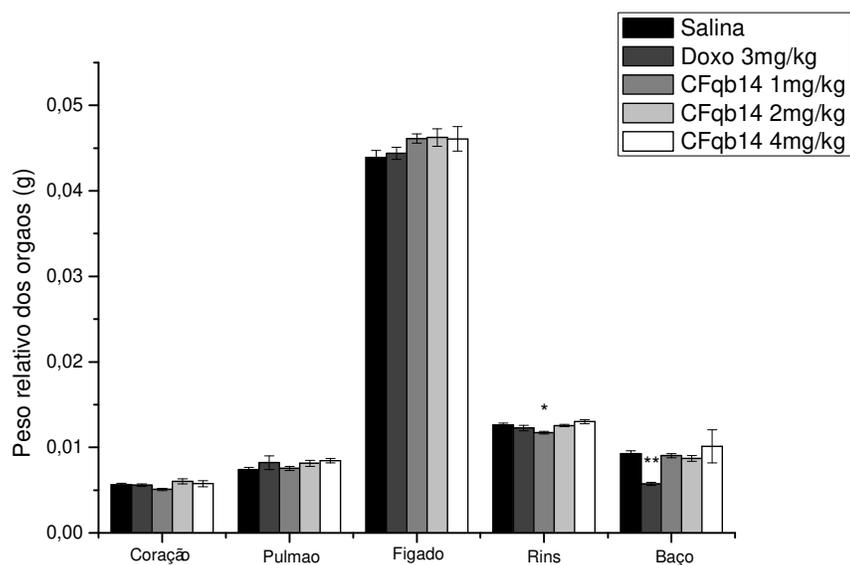
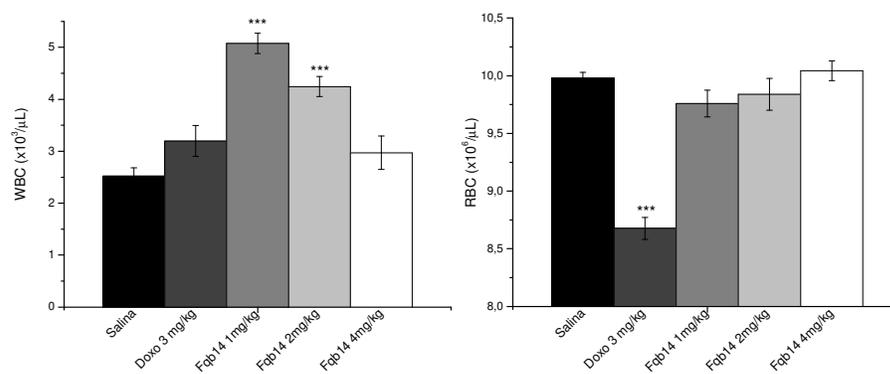


Figura 68. Peso relativo dos órgãos após tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

De modo geral, os órgãos não apresentaram grandes alterações o que comprova a diminuição dos efeitos tóxicos observados nos extratos brutos já que a alteração na massa relativa pode significar toxicidade (Cunha *et al.*, 2009).



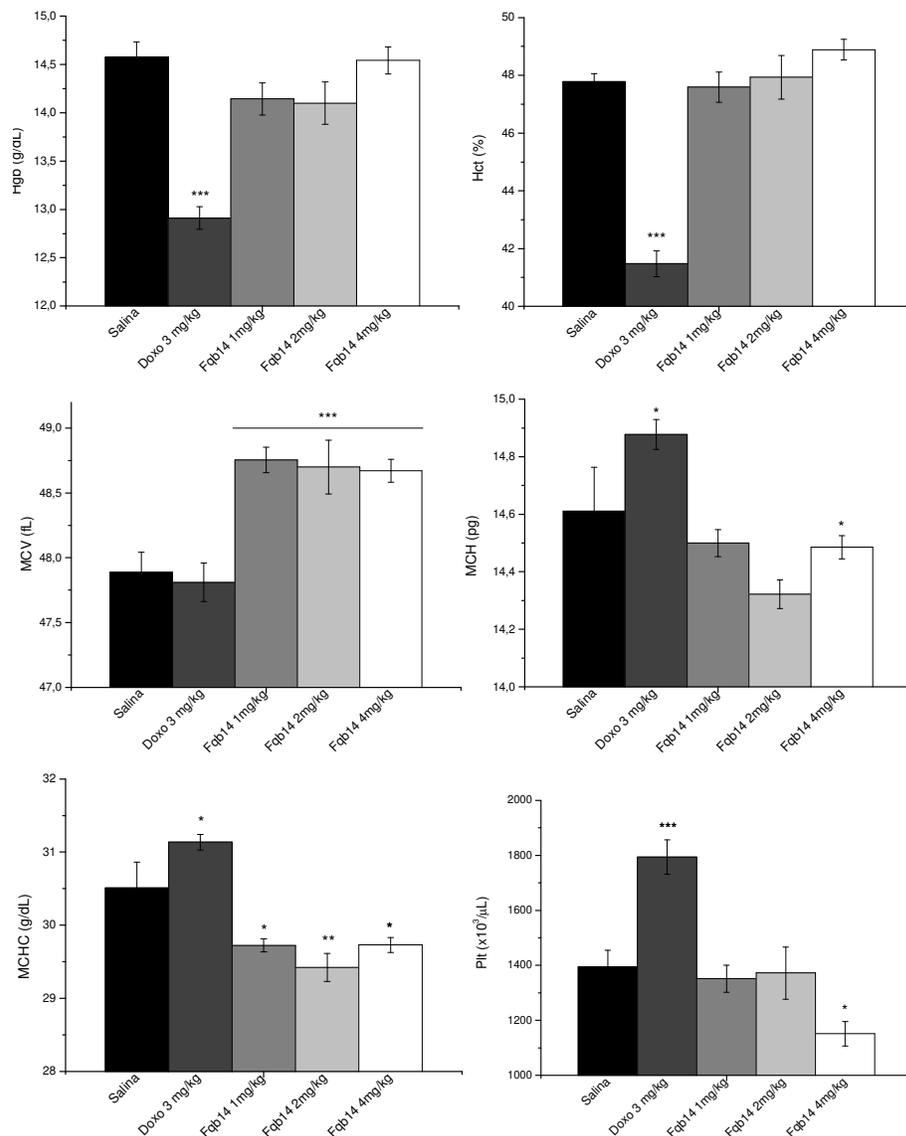


Figura 69. Hemograma do sangue total dos animais após tratamento com a fração CFqb14 de *Croton campestris*: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito (Hct), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Duncan's test, $p < 0.001$ (ANOVA).

Os resultados observados para leucócitos acompanharam a tendência observada nos grupos tratados com os extratos brutos já apresentados, o que sustenta a leucocitose como um dos efeitos gerados por doses baixas dos princípios ativos de *C. campestris*.

Com exceção do volume corpuscular médio (MCV) e da concentração da hemoglobina corpuscular (MCHC) que se apresentaram alterados, os outros parâmetros eritrocitários apresentaram-se normais quando comparados ao controle positivo. Além disso, o grupo tratado com doxorubicina apresentou sinais de toxicidade uma vez que os parâmetros hematológicos indicaram anemia, o que é coerente com a mielosupressão causada pelo uso desse fármaco (Coppoc, 1992). Houve também um aumento exacerbado de plaquetas que não foi observado anteriormente podendo ser sinal de toxicidade.

Ao comparar os resultados do hemograma para animais tratados com a CFqb14 e com os animais tratados com os extratos brutos de *C. campestris*, especialmente para os resultados de plaquetas, observa-se que o aumento observado nos grupos tratados com o extratos não se reproduziu nos animais tratados pela fração. Isso mostra que ao longo do processo de fracionamento, as substâncias responsáveis pela plaquetose foram perdidas o que pode prevenir futuros processos trombolíticos. Além disso, a massa dos órgãos dos grupos tratados com a fração apresentou valores iguais aos do grupo não tratado, o que também corrobora com a diminuição da toxicidade.

Do ponto de vista clínico, como todo e qualquer desvio dos parâmetros normais, as alterações observadas são dignas de maiores investigações. Do ponto de vista farmacológico, as alterações hematológicas observadas somadas aos resultados de inibição tumoral observados, classificam o extrato CCEBA_{tot} e a fração CFqb14 como excelentes candidatos a outros estudos que corroborem com o uso de seus componentes no tratamento do câncer. Isso por que, diferentemente de muitos quimioterápicos utilizados na clínica, a supressão na produção de leucócitos não foi observada nos grupos experimentais.

Portando, os resultados obtidos nesses estudos sugerem alta potência dos ativos envolvidos o que corrobora com a continuação dos estudos a fim de verificar a ação anticâncer em outros modelos murinos. Além disso, a confirmação dos componentes químicos envolvidos na atividade antitumoral propiciará o isolamento e aplicação do mesmo em estudos futuros para a elucidação do mecanismo de ação envolvido.

Conclusões

Conclusões

- O extrato CCEBA_{totq} e a fração CF_{qb14} de *Croton campestris* apresentaram melhor efeito antiproliferativo *in vitro* e sua atividade antitumoral foi confirmada *in vivo*, demonstrando atividade sistêmica através da inibição do crescimento tumoral.

- Dentre os métodos testados, o melhor método de extração para prosseguir com os estudos foi a extração total por acetato de etila bem como o fracionamento por coluna filtrante, utilizando as folhas secas e moídas de *Croton campestris*.

- Os extratos avaliados *in vivo* apresentaram toxicidade, que é comum para agentes quimioterápicos. No entanto, essa toxicidade foi diminuída pelo processo de purificação, sugerindo a eliminação de substâncias tóxicas sem atividade antiproliferativa.

- As células NCI-H460 (pulmão) que apresentaram seletividade para extratos e frações ao longo do estudo, foram tratadas com a fração CF_{qb14} e apresentaram marcação de morte por necrose.

- A atividade antiproliferativa e o potente efeito antitumoral incentivam a continuidade dos estudos a fim de identificar os princípios ativos e elucidar seus mecanismos de ação anticâncer.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2010) *Biologia Molecular da célula*. 5ª edição, Artmed, Porto Alegre, 1205-1206.

Awad AB and Fink CS. (2000) Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 130: 2127-2130.

Babili FE, Moulis C, Bon M, Respaud MJ, Fourasté I. (1998) Three furano-diterpenes from the bark of *Croton campestris*. *Phytochemistry*, vol 48 (1): 165-169.

Babili FE, Fabre N, Moulis C, Fourasté I. (2006) Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fitoterapia*, 77: 384-387.

Balunas MJ, Jones WP, Chin YW, Mi Q, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Swanson SM, Pezzuto JM, Chai HB, Kinghorn AD. (2006) Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected , and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. *Chemistry & Biodiversity*, 3:897-915.

Balunas MJ, Kinghorn AD. (2005) Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sciences*, 78: 431-441.

Borst P & Rottenberg S. (2004) Cancer cell death by programmed necrosis? *Drug Resistance Updates*, 7: 321-324.

Brandão MG, Zanetti NN, Oliveira P, Graef CF, Santos AC, Monte-Mór RL. (2008) Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 141-148.

Cabral EC. (2010) Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Carvalho, JE (2006). Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Multiciência* (UNICAMP), 7: 01-18.

Carvalho JE. (2001) Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: Mercadante AZ, Bobbio FO, Bobbio PA, Pereira JL, Pastore GM, ed. *Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas*. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas vol. II, p.196-202.

Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. (2006) Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8(2):239-252.

Coppoc GL. (1992) Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: Booth NH, McDonald LE. *Farmacologia e terapêutica veterinária*. 6ªed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 687-670.

Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR, Caruzo MBR, Berry P, Riina RG. (2010) *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB017507>). Acesso em junho/2011.

Cragg GM & Newman DJ. (2009) Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev*, 8: 313–331

Cunha LC, Azeredo FS, Mendonça ACV, Vieira MS, Pucci LL, Valadares MC, Freitas EOG, Sena AAS, Junior RSL. (2009) Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19(2): 403-411.

Da Silva NLA, Miranda FAA, Conceição GM. (2010) Triagem fitoquímica de plantas do cerrado, da Área de proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, vol.6(2): 1-17.

Diwanay S, Chitre D, Patwardhan B. (2004) Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. *Journal of Ethnopharmacology*, 90:49-55.

Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. (2005) Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. *Cancer Lett.*, 233: 181.

Edinger AL & Thompson CB. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opininn in Cell Biology*, 16: 663-669.

Ehrlich, P. (1906) Experimentelle carcinomstudien na Mäusen. *Arb Inst. Exp Ther Frankfurt*, 1:78-80.

Figueiredo IM, Santos LV, Costa WF, Carvalho JE, Silva CC, Sacoman JL, Kohn LK, Sarragiotto MH. (2006) Synthesis and antiproliferative activity of novel limonene derivates with a substituted thiourea moiety. *J Braz Chem Soc*, 5:954-960.

Fulda S. (2010) Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Medica* 76:1075-1079.

Galluzzi L & Kroemer G. (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135: 1161-1163.

Grahame-Smith DG, Aronson JK. (2004) *Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia*. 3ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 398.

Harvey AL, Cree IA. (2010) “High-throughput screening of natural products for cancer therapy”. *Planta Medica*, 76: 1080-1086.

Hanahan D & Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

Harvey AL & Cree IA. (2010) High-Throughput Screening of Natural Products for Cancer Therapy. *Planta Medica*, 76(11):1080-1086.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2011) <http://www.inca.gov.br>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2011) <http://www.globocan.iarc.fr>.

Kung G, Konstantinidis K, Kitsis RN. (2011) Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circ Res* 108(8): 1017-36.

Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. (2005) Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence from Laboratory Investigations”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 284.

Lockshin RA & Zakeri Z. (2007) Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med*. 11: 1214-1224.

Longato GB, Rizzo LY, Sousa IMO, Tinti SV, Possenti A, Figueira GM, Ruiz ALTG, Foglio MA, Carvalho JE. (2011) *In vitro* e *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions and eupomatenoide-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. *Planta Medica*, 13: 1482-1488.

Ma X & Wang Z. (2008) Anticancer drug Discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug discovery today*, 14: 1137-1142.

Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS. (2010) Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenácea* DC. *Brazilian Journal of Biosciences*, vol. 8 (3): 294-298.

Matsuzaki P. (2004) Avaliação dos extratos etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do Tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. *Tese de mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.

Mann J. (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*, 2:143-148.

Marchetti GM. (2008) Atividade anticâncer do extrato bruto e das frações das folhas de *Calea pinnatifida* Banks. *Tese de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. (2009) Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in tradicional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123:439-445.

Monga & Sausville. (2002) Developmental therapeutics program an the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia*, 16: 520-526.

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. (1991) Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766.

Montesano R, Hall J. (2001) Environmental causes of human cancer. *European Journal of Cancer*, 37: 67-67.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 66: 1022-1037.

Pandolfo M, Araujo RA, Nascimento L, Goulart LR. (2005) Farmacogenoma do fluorouracil: análise de polimorfismo no gene da diidropirimidina desidrogenase. *Infarma* 17(3/4): 62:65.

Prata EMR, Paulo MQ, Brito ARMS. (1993) Isolamento do princípio ativo de *Croton campestris* St.Hil. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 74(2): 36-41.

Potter AJ and Rabinovitch PS. (2005) The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res.* 572(1-2):27-44.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. (2007) *Farmacologia*. 6ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 718.

Rates SMK. (2001) Plants as Source of Drugs. *Toxicon*, 39:603-13.

Ratnayke S, Fang XP, Anderson JE, McLaughlin JL. (1992) Bioactive constituents from the twigs of *Asimina parviflora*. *Journal of Natural Products*, 55 (10): 1462-1467.

Rhomberg L R, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S. (2007) Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Critical Reviews in Toxicology*,37(9):729-837.

Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. (1990) Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*, 82: 1113-1118.

Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE. (2008) Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellate*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 41: 411-415.

Salatino A, Salatino MLF, Negri G. (2007) Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol 18, 1:11-33.

Santos PML, Schripsema J, Kuster RM. (2005) Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4): 321-325.

Sátiro LN & Roque N. (2008) A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta botânica brasileira*, 22(1): 99-118.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª edição, Editora da Universidade, Florianópolis, 229-245.

Siu D. (2011) Natural products and their role in cancer therapy. *Med Oncol*, 28(3):888-900.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82: 1107-1118.

Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. (2005) An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecologic Oncology*, 98: 141-145.

Souza WA, Negrão AJM, Filho CG, Ferreira VH, Lino RS, Freitas RE, Biazoto G, Pereira DM. (2008) Toxicidade de antineoplásicos: revisão bibliográfica. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, 11, ISSN: 1679-7353.

Vandenabeeble P, Galluzzi L, Berghe TV, Kroemer G. (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biology*, 11:700-714.

Vendramini-Costa DB, Castro IBD, Ruiz ALTG, Marquissolo C, Pilli RA, Carvalho JE. (2010) Effect of goniothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 6742-6747.

Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*, 18: 1272-1282.

Anexos

Anexo 1

A escolha do método de extração

Diferentes metodologias foram empregadas a fim de encontrar a melhor forma de obtenção de extratos, obtendo um rendimento satisfatório sem prejudicar os ativos contidos nos produtos a serem testados farmacologicamente e processados para a caracterização dos bioativos. As extrações foram realizadas utilizando-se folhas frescas e secas, por método a frio e a quente (*Soxhlet*) e utilizando solventes de diferentes polaridades.

1.1 Obtenção dos Extratos Brutos

Folhas frescas (9,13g) e secas (99,95g) moídas foram extraídas a frio por maceração dinâmica com diclorometano resultando em 0,15g (1,67%) de CCEBDf e 5,87g (5,87%) de CCEBDs. Ao resíduo da extração com diclorometano foi aplicado nova extração com etanol 95% resultando em 0,41g de extrato bruto etanólico de folhas frescas (CCEBEf) e 6,04g de extrato bruto etanólico de folhas secas (CCEBEs), com rendimento de 4,49% e 6,04% respectivamente.

Através de cromatografia de camada delgada (Fig. 70), os perfis dos extratos foram avaliados e notou-se uma pequena variação entre os extratos etanólicos extraídos de folhas frescas e secas. No entanto, como descrito a seguir, nos testes antiproliferativos *in vitro* não houve diferenças significativas entre os quatro extratos testados o que, juntamente com a vantagem do maior rendimento e viabilidade de armazenamento, fez com que as folhas secas fossem selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

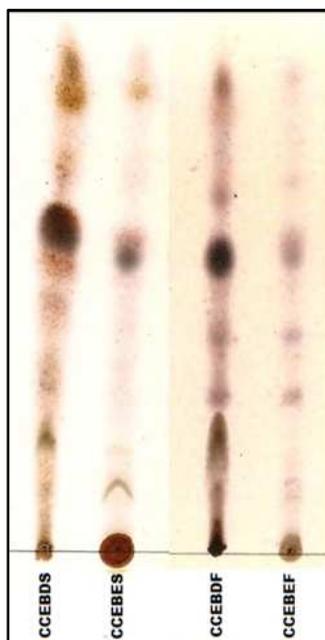


Figura 70. Perfil observado por cromatografia de camada delgada dos extratos brutos diclorometânicos (CCEBD) e etanólicos (CCEBE) de folhas secas (S) e frescas (F) de *Croton campestris*. Uso de diclorometano/metanol 99:1 como fase móvel e anisaldeído como revelador.

De acordo com o perfil cromatográfico semelhante entre os dois extratos, sugeriu-se a inclusão de uma etapa intermediária de extração utilizando um solvente de polaridade intermediária, o acetato de etila, a fim de separar de forma mais efetiva os grupos químicos de polaridade. Nesse segundo processo de extração foram utilizados 184g de folhas secas moídas, obtendo-se 5,74g (3,13%) de extrato bruto diclorometânico (CCEBD), 1,15g (0,62%) de extrato bruto por acetato de etila (CCEBA) e 15,71g (8,54%) de extrato bruto etanólico (CCEBE).

Como os três extratos ainda apresentavam atividade antiproliferativa notável, optou-se por realizar extração por sistema *sohxlet* a fim de melhorar o processo de extração, com esgotamento dos constituintes e aumento do rendimento. Folhas secas moídas (24,73g) foram extraídas e foram obtidos 1,40g (5,66%) de extrato bruto diclorometânico a quente (CCEBDq), 0,30g (1,23%) de extrato bruto por acetato de etila a quente (CCEBAq) e 2,90g (11,74%) de extrato bruto etanólico (CCEBEq). Através de CCD, foi observado, ainda que com menor intensidade pela diluição das amostras, um

perfil cromatográfico semelhante entre os extratos obtidos a quente e a frio (Fig. 71). Observou-se maior seletividade para os extratos obtidos a frio do que com as amostras por extração a quente. Esse fato, somado ao aumento do rendimento obtido por esse método de extração, mostrou que esse protocolo extrativo é elegível para utilização desde que acompanhado de controle do perfil cromatográfico.

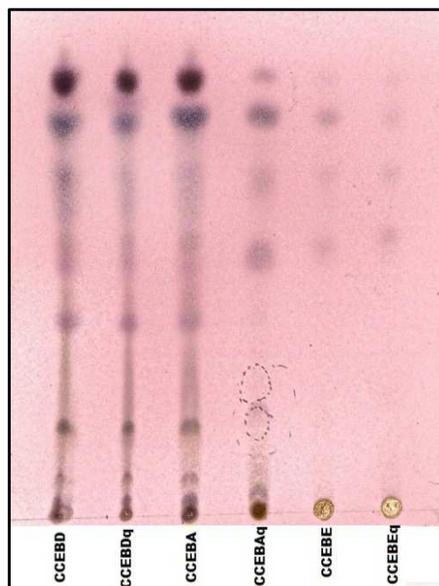


Figura 71. Perfil observado por cromatografia de camada delgada dos extratos brutos diclorometânicos (CCEBD), acetato de etila (CCEBA) e etanólicos (CCEBE) obtidos à frio e à quente (q) de *Croton campestris*. Uso de diclorometano/ metanol 99:1 como fase móvel e anisaldeído como revelador.

Como o perfil cromatográfico mostrou grande semelhança entre os extratos CCEBD e CCEBA (Fig. 71) aliado à atividade antiproliferativa *in vitro* parecida, decidiu-se por realizar uma extração a frio total com acetato de etila, de forma a obter uma maior massa que possibilitasse o início do processo de fracionamento, como foi descrito na *Metodologia* do trabalho.

1.2 Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos

Os gráficos abaixo relacionam a porcentagem de crescimento e a concentração das amostras testadas, evidenciando a ação dos extratos de *C. campestris* sobre a cultura de células tumorais humanas, como descrito na *Metodologia*. Os valores entre 100% e 0 representam inibição de crescimento enquanto os valores negativos representam morte celular, pois a quantidade de células (dosagem de proteínas coradas por absorvância, inferindo sobre a quantidade de células ao final do experimento) nesse caso, é menor do que aquela que iniciou o experimento, ou seja, a quantidade de células analisadas na placa T₀.

A atividade anticâncer dos extratos CCEBD e CCEBE de folhas frescas e secas *C. campestris* são mostradas nas figuras de 72 a 75.

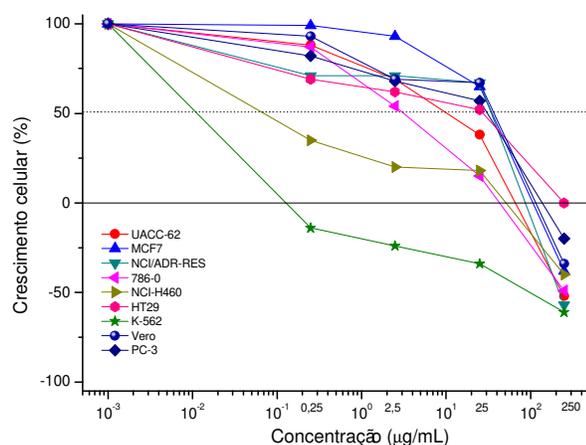


Figura 72. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico das folhas frescas de *Croton campestris* (CCEBDf) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

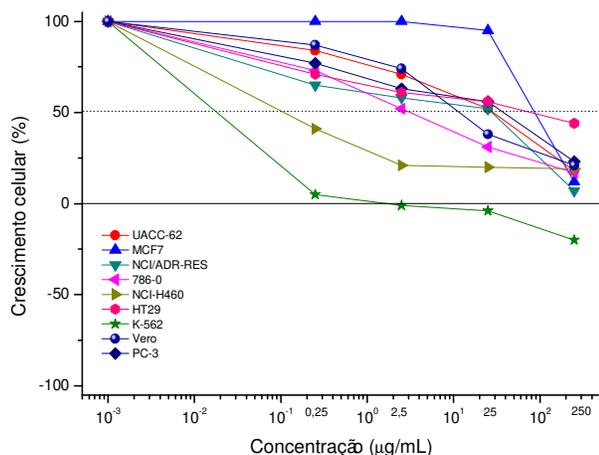


Figura 73. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico das folhas secas de *Croton campestris* (CCEBDs) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

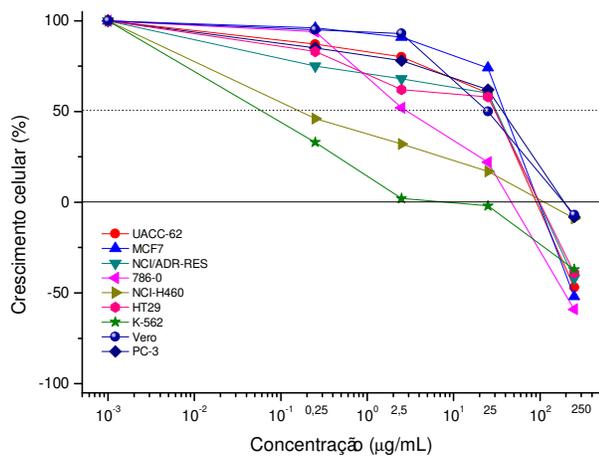


Figura 74. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico das folhas frescas de *Croton campestris* (CCEBEf) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

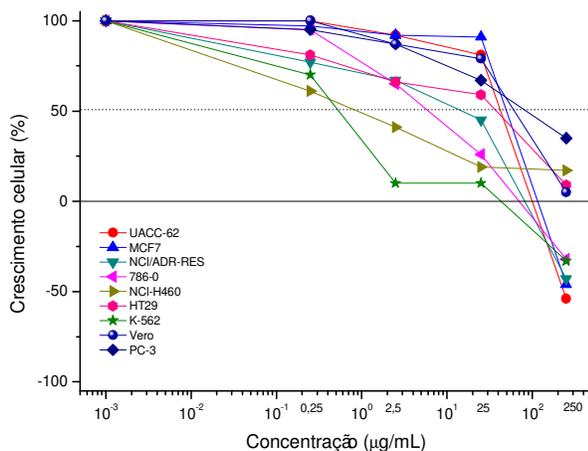


Figura 75. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico das folhas secas de *Croton campestris* (CCEBEs) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

Por apresentar um perfil citostático, ou seja, de inibição de crescimento e com atividade citocida apenas para algumas linhagens e na maior concentração, o parâmetro comparativo ideal a ser utilizado para as análises foi o GI_{50} , ou seja, a concentração de amostra necessária para inibir a proliferação celular em 50%.

Tabela 14. Valores de GI_{50} (concentração inibitória 50% crescimento) dos extratos diclorometânicos (CCEBD) e etanólicos (CCEBE) antes (f) e após secagem (s).

	UACC-62	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT29	K-562	Vero
CCEBDf	7,10	26,95	27,28	2,77	0,10	11,72	6,25	0,00	27,15
CCEBDs	18,27	98,71	5,01	3,23	0,01	17,05	67,63	0,00	13,47
CCEBEf	26,27	28,36	11,23	2,95	0,23	30,33	26,04	0,15	25,00
CCEBEs	29,70	32,43	6,57	5,20	0,83	84,42	15,32	0,48	52,10

De acordo com os valores da tabela 14, podemos observar que, de maneira geral, os perfis de atividade antiproliferativa dos extratos obtidos a fresco e com as folhas secas não foram acentuadamente diferentes, com exceção da linhagem NCI/ADR-RES na qual os extratos diclorometânicos e etanólicos obtidos das folhas secas apresentaram valores de

GI₅₀ de 5,01 e 6,57µg/mL respectivamente, mostrando melhor atividade que nos extratos obtidos das folhas frescas. Já com relação à ação diferenciada sobre as linhagens, a seletividade foi evidente para as linhagens 786-0 (rim) e NCI-H460 (pulmão). Ambos os extratos apresentaram atividade citostática, isso indica que podem existir diferentes componentes químicos ativos, isto é, com diferentes polaridades ou mesmo que uma porção dos componentes característicos do extrato diclorometânico não foi esgotado completamente e permaneceu no segundo extrato.

Os extratos obtidos em nova extração pelo método a frio já descrito e por sistema *Soxhlet* utilizando também acetato de etila como solvente de polaridade intermediária, foram testados em outro experimento antiproliferativo que estão relacionados nas figuras de 76 a 84.

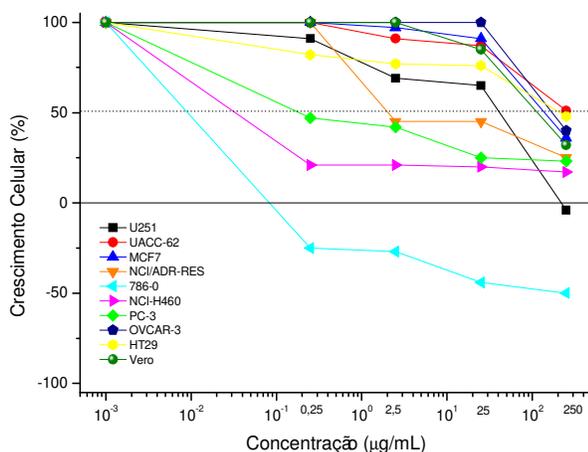


Figura 76. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico das folhas secas de *C. campestris* (CCEBD) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

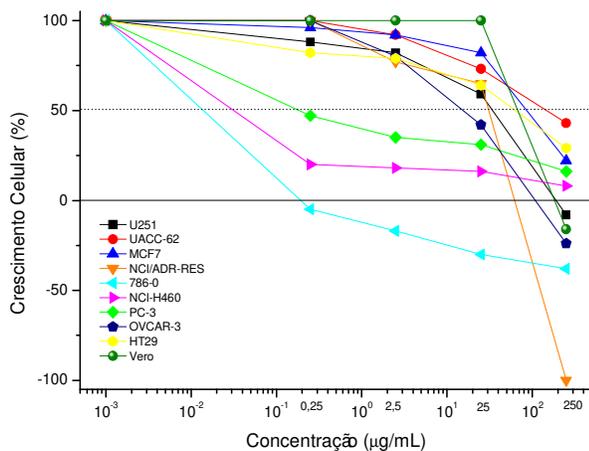


Figura 77. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto diclorometânico obtido por extração à quente das folhas secas de *C. campestris* (CCEBDq) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

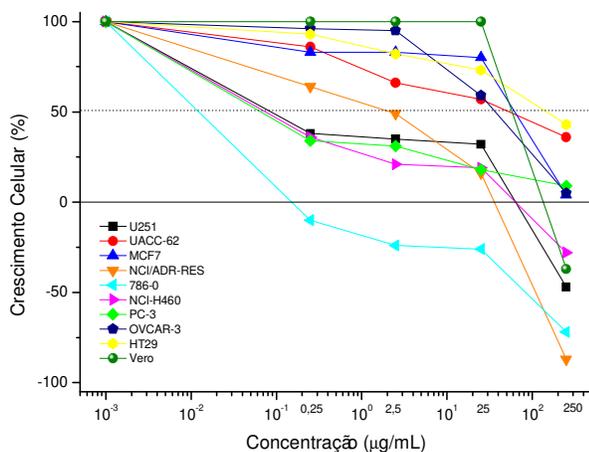


Figura 78. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto por acetato de etila das folhas secas de *C. campestris* (CCEBA) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

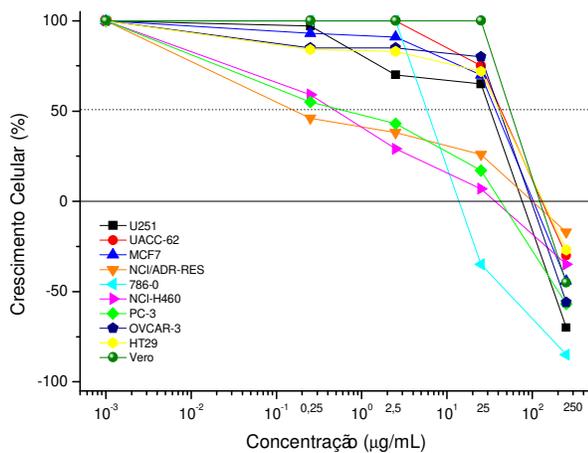


Figura 79. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto obtido por extração à quente por acetato de etila das folhas secas de *C. campestris* (CCEBAq) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

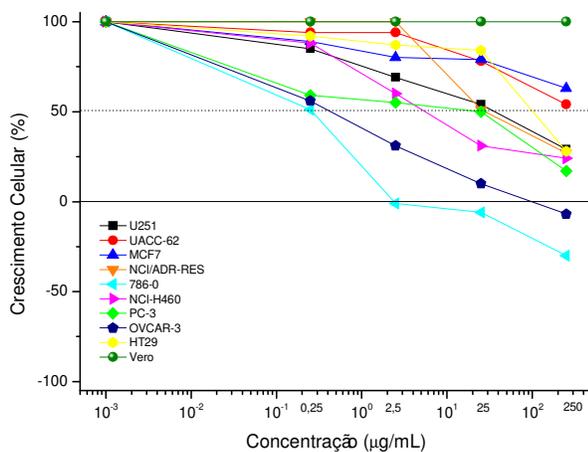


Figura 80. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico das folhas secas de *C. campestris* (CCEBE) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

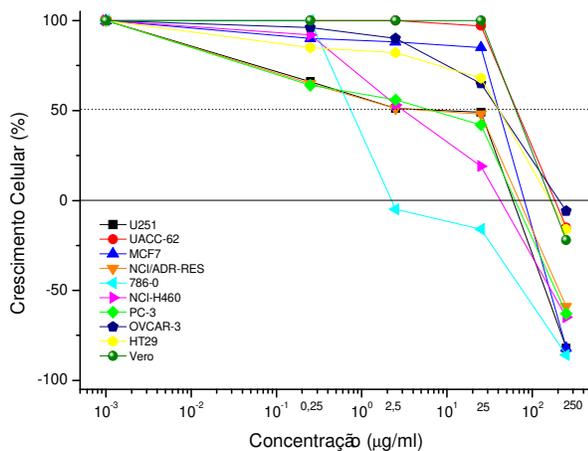


Figura 81. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48h com extrato bruto etanólico obtido por extração a quente das folhas secas de *C. campestris* (CCEBEq) em cultura de células tumorais e linhagem Vero.

Houve uma tendência dos extratos obtidos a frio apresentarem maior seletividade do que os extratos obtidos a quente, mas de forma geral, os perfis antiproliferativos foram bem semelhantes. No entanto, algumas linhagens especialmente NCI/ADR-RES, apresentaram menor valor de GI_{50} para os extratos obtidos a quente, que pode ser resultado de maior concentração de certos componentes ativos, otimizada por essa extração mais vigorosa.

Com a análise do GI_{50} das linhagens testadas (Tab. 15) verificamos a confirmação da seletividade para 786-0 e NCI-H460, além de seletividade mostrada para a linhagem PC-3.

Tabela 15. Valores de GI_{50} (concentração inibitória de 50% do crescimento) dos extratos diclorometânicos (CCEBD), por acetato de etila (CCEBA) e etanólicos (CCEBE) obtidos a quente (q) e a frio (f).

	UACC- U251	MCF- 62	NCI/AD 7	R-RES	786- 0	NCI- H460	PC-3	OVCAR- 3	HT29	Vero
CCEBD	21,31	>250	157,30	9,91	0,00	0,00	0,17	240,59	>250	124,96
CCEBDq	29,34	149,19	86,03	26,94	0,00	0,00	0,14	14,45	51,06	39,87
CCEBA	0,17	42,72	51,87	1,16	0,00	0,09	0,02	32,33	156,54	38,99
CCEBAq	26,52	26,89	27,71	0,31	6,93	0,49	0,63	29,50	28,09	41,41
CCEBE	27,75	>250	>250	41,89	0,25	7,45	3,58	0,44	103,66	>250
CCEBEq	24,90	35,08	30,62	24,79	1,32	2,89	2,18	26,97	27,53	39,17

Como foi observado nos gráficos acima, os extratos diclorometânicos e obtidos por acetato de etila apresentaram atividade antiproliferativa muito semelhante o que corroborou para a realização da extração total por acetato de etila, descrito na *Metodologia*.

Anexo 2




**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

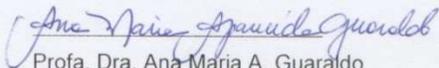
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2280-1**, sobre "**Avaliação da atividade de extratos do gênero Croton sobre modelo de Tumor Sólido de Ehrlich**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araújo Monteiro**, 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 no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **18 de outubro de 2010**

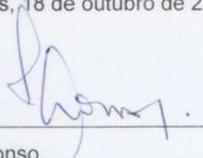
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2280-1**, entitled " _____ ", 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 **October 18, 2010**.

Campinas, 18 de outubro de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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



UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

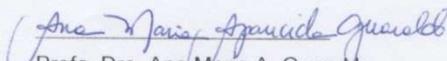
CERTIFICADO

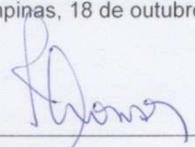
Certificamos que o Protocolo nº 2281-1, sobre "Teste de toxicidade aguda de extratos e frações do gênero Croton", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araújo Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 18 de outubro de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2281-1, entitled " _____ ", 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 October 18, 2010.

Campinas, 18 de outubro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "ATIVIDADE ANTICÂNCER DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *Croton campestris* A.St.-Hil.":

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2280-1 e 2281-1, Instituição: Instituto de Biologia, UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/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.*

Paula Araújo Monteiro

Aluna: Paula Araújo Monteiro

João Ernesto de Carvalho

Orientador: João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura