



ADRIANA DA SILVA SANTOS DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE *Aldama arenaria* BAKER
(SIN.: *Viguiera arenaria*)**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ADRIANA DA SILVA SANTOS DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE *Aldama arenaria* BAKER
(SIN.: *Viguiera arenaria*)**

**ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO MITSUO IMAMURA
CO-ORIENTADORA: DRA. VERA LÚCIA GARCIA REHDER**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
ADRIANA DA SILVA SANTOS DE OLIVEIRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO MITSUO
IMAMURA.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

OL4e Oliveira, Adriana da Silva Santos de, 1979-
Estudo da composição química e avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* de *Aldama arenaria* Baker (Sin.: *Viguiera arenaria*) / Adriana da Silva Santos de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Paulo Mitsuo Imamura.
Coorientador: Vera Lúcia Garcia Rehder.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Aldama arenaria*. 2. Atividade antiproliferativa. 3. Óleo essencial. 4. *Viguiera arenaria*. I. Imamura, Paulo Mitsuo. II. Rehder, Vera Lúcia Garcia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: A study of chemical composition and *in vitro* evaluation of antiproliferative activity of *Aldama arenaria* Baker (Syn.: *Viguiera arenaria*)

Palavras-chave em inglês:

Aldama arenaria

Antiproliferative activity

Essential oil

Viguiera arenaria

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Paulo Mitsuo Imamura [Orientador]

Gilvandete Maria Pinheiro Santiago

José Augusto Rosário Rodrigues

Data de defesa: 22-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Química

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo".

Albert Einstein

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier

Dedicatória

À minha mãe, pelo amor incondicional, incentivo aos estudos e pelos lápis e cadernos que nunca me faltaram mesmo nos momentos mais difíceis;

Aos amores da minha vida, Raul e Marcio pelo amor, companheirismo e compreensão;

À toda minha família, e em especial às minhas queridas irmãs Cida e Aline.

Dedico-lhes este trabalho!

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por tudo que sou;

Ao Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura, pela oportunidade, orientação e total confiança durante a realização deste trabalho;

À minha co-orientadora e amiga Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, que sempre me motivou a estudar e colaborou muito para o meu crescimento científico e profissional. Muito obrigada, pois sem você eu não teria alcançado tantos sonhos;

Aos amigos da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA-UNICAMP): Dra. Marili Villa Nova Rodrigues, Dr. Adilson Sartoratto e Sinésio Boaventura Júnior, pela amizade, carinho e sugestões;

À equipe da Profa. Dra. Beatriz Apezatto da Glória, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), pela oportunidade do trabalho em conjunto e em especial à Ms. Tuane de Oliveira pela obtenção das amostras;

À equipe da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-UNICAMP: Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Dr. João Ernesto de Carvalho, Ms. Adriana Della Torre, Giovanna F. Fiorito e Sirlene Valério Tinti, pelos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e valiosas contribuições essenciais à realização deste trabalho;

As amigas Dra. Mary Ann Foglio e Ms. Giovanna Barbarini Longato, pela amizade, inúmeras ajudas, correções e sugestões valiosíssimas;

Ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química-UNICAMP;

À FAPESP pelo apoio financeiro, ao CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela autorização de acesso e à equipe da Estação ecológica de Itirapina/SP pela autorização de coleta;

À Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA-UNICAMP pela liberação e disponibilização da infraestrutura necessária para realização deste trabalho;

À todos os familiares e amigos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

CURRICULM VITAE

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: **ADRIANA DA SILVA SANTOS DE OLIVEIRA**

Endereço: Rua: Antônio Meroni, 24 - Bairro Recanto do Lago

CEP: 13140-850 - Paulínia - São Paulo

RG: 30381984-4

CPF: 273963758-60

CRQ: 04443259

Fones: (19) 3874-3994 Residencial

(19) 9642-2136 Celular

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2010-2013 Mestrado, área de Concentração Química Orgânica.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP.
- 2003-2010 Graduação em Bacharel em Química Tecnológica.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP.
- 1994-1997 Ensino Profissional de nível técnico: Técnico em Química.
Escola Técnica de Paulínia, ETEP, Paulínia/SP.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2009 – 2009 Curso de Extensão Validação de Métodos Cromatográficos para Análise de Fármacos, de 09/11 a 12/11/2009 Escola de Extensão/UNICAMP.
- 2008 – 2008 Princípio de Boas Práticas de Laboratório, 16h, oferecido pela Meriodional em 17 de junho de 2008, Paulínia/SP.
- 2008 – 2008 Curso Técnico e Prático para Brigada de Incêndio do CPQBA/UNICAMP. 64 h – 25/03/08 a 25/04/08 Paulínia/SP.
- 2006 – 2006 Curso Fundamentos em GC-MS, 16h. Agilent Technologies, AGILENT, São Paulo/SP.
- 2006 – 2006 Curso de curta duração em Amostragem e Validação, 60h. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP.
- 2006 – 2006 Curso de Redimensionamento e a Técnica de Gradiente, 20 h. Waters, WATERS, São Paulo/SP.
- 2006 – 2006 Curso de Incerteza na Medição Analítica, 16 h. Paj Morel, PAJ MOREL, Campinas/SP.
- 2005 – 2005 Curso de Primeiros Socorros, 20 h. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP.
- 2003 – 2003 Boas Práticas de Laboratório NIT DICLA 028, 16h. Valle Veiga Associados Consultoria e Treinamento, Campinas/SP.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

De 04-1997 a atual: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas, Químicas, Biológicas e Agrícolas CPQBA/UNICAMP- Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica.

Função: Técnica em Química.

5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

Nacionais: 21

Internacionais: 04

6. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

- Bombo, A. B.; Oliveira, T. S.; Oliveira, A. S. S.; Rehder, V. L. G.; Magenta, M. A. G.; Apezato-Da-Glória; "Anatomy and essential oils from aerial organs in three species of *Aldama* (Asteraceae–Heliantheae) that have a difficult delimitation", *Australian Journal of Botany*, **2012**, 60, 632-642.
- Oliveira, R. N.; Rehder, V. L. G.; Oliveira, A. S. S.; Montanari Jr., I.; Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Jeraldo, V. L. S.; Linhares, A. X.; Allegretti, S. M.; "Schistosoma mansoni: Anthelmintic Activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC", *Experimental parasitology*, **2012**, 132, 135-143.
- Teramoto, J. J. R. S.; Oliveira, R. F.; Santos, A. S.; Rehder, V. L. G.; "Avaliação dos teores das lignanas filantina, hipofilantina e nirantina em quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.), sob condições de deficiência hídrica", *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2008**, 10, 67-75.
- Rodrigues, R. A. F.; Foglio, M. A.; Boaventura Jr., S.; Santos, A. S.; Rehder, V. L. G.; "Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L.", *Química Nova*, **2006**, 29, 368-372.
- Rodrigues, M. V. N.; Sartoratto, A.; Boaventura Jr., S.; Santos, A. S.; Rehder, V. L. G.; "Utilização de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais", *Revista Multiciência (UNICAMP)*, **2006**, 7, 1-14.

Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais: 36

Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais: 06

7. OUTRAS ATIVIDADES

- Monitoria de alunos do Ensino Médio no Programa PIC Jr. 2010 a 2012, da UNICAMP.
- Monitoria de aulas lecionadas para alunos de graduação dos cursos da Farmácia e Biologia da UNICAMP em disciplinas eletivas, em 2008 e 2010.
- Curso de curta duração ministrado: Curso de Segurança em Laboratório para novos alunos e colaboradores do CPQBA/UNICAMP.
- Curso de curta duração ministrado: Fundamentos em GC-MS, 2006.

RESUMO

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE *Aldama arenaria* BAKER (SIN.: *Viguiera arenaria*)

O câncer é uma das doenças que mais aflige a humanidade, principalmente pelo alto índice de mortalidade. Dados da OMS estimam 13,1 milhões de mortes em 2030. *Aldama arenaria* Baker, Asteraceae, é uma erva cespitosa a subarbusto, que mede 0,8 a 3 m de altura. Várias atividades farmacológicas foram atribuídas a esta espécie ou à compostos isolados desta, como por exemplo, ação vaso-relaxante, tripanossomicida, antimicrobiana e esquistossomicida. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* de óleos essenciais (OE's) obtidos de diferentes órgãos vegetativos de *A. arenaria* em diferentes fases fenológicas, além do extrato clorofórmico das raízes (EC), frações e compostos isolados. As linhagens celulares tumorais utilizadas nos experimentos foram: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioma) e 786-0 (rim). Na fase de dormência o EC das raízes e OE dos xilopódios foram mais ativos frente às linhagens de melanoma, ovário resistente, pulmão, próstata e cólon. Já na fase de floração o OE dos caules foi mais ativo para as linhagens de glioma, mama, ovário resistente, rim, pulmão e próstata. O fracionamento químico dos OE's e EC revelou que as frações ricas em monoterpenos foram inativas enquanto as frações enriquecidas em sesqui e diterpenos apresentaram atividades moderada e potente. Nas frações mais ativas do EC (Fr 3 e 4) os compostos majoritários identificados foram dois derivados de pimarano: o ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**1**) e *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**). Nas frações mais ativas dos OE's (Fr 3 e 4 ; R3, R5, R6, X5, F5, F6 E F7) foram os compostos: carotol, palustrol, espatulenol, pimaral e diterpeno (**3**). Os compostos **1** e **3**, isolados e testados, apresentaram atividade fraca e moderada, respectivamente, demonstrando possível sinergismo com outros compostos. Os resultados demonstraram que 56% das 50 amostras avaliadas possuíam potencial atividade antiproliferativa *in vitro* e perfil concentração-dependente para a maioria das linhagens avaliadas. Dentre estas, 34% apresentaram atividade moderada e 22% potente para pelo menos uma linhagem, com valores de TGI (*Total Growth Inhibition*) menores do que 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estes resultados indicam que *Aldama arenaria* apresenta potencial atividade antiproliferativa *in vitro* e estudos posteriores de atividade anticâncer *in vivo* poderão comprovar sua ação antitumoral.

ABSTRACT

A STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND *in vitro* EVALUATION OF ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF *Aldama arenaria* BAKER

(SYN.: *Viguiera arenaria*)

Cancer is a disease that afflicts people all over the world with a high mortality rate and World Health Organization (WHO) estimates that by 2030 cancer will be responsible for 13.1 million deaths. *Aldama arenaria* Baker (Asteraceae) is a medicinal plant that is known to contain several compounds with pharmacological properties including vasorelaxant, trypanocidal, antimicrobial and schistosomicidal activities. The aim of this study was to evaluate *in vitro* antiproliferative activity of the essential oils (EO's) obtained from vegetative organs of *A. arenaria* in different phenological phases, chloroform extract (CE), fractions and isolated compounds. The tumor cell lines used in these experiments were: leukemia (K-562), breast cancer (MCF-7), multidrug resistant ovarian cancer (NCI/ADR-RES), melanoma (UACC-62), lung (NCI-H460), prostate (PC-3), colon (HT29), ovarian (OVCAR-3), glioma (U251) and kidney (786-0). In dormant phase, CE (roots) and EO (xylopodium) were more active against the strains of melanoma, resistant ovarian, lung, prostate and colon. At flowering, the stem EO was more active to the strains of glioma, breast, resistant ovary, kidney, lung and prostate cancer. The chemical fractionation of EO's and CE revealed that fractions rich in monoterpenes were inactive, while the fractions enriched in sesqui and diterpenes showed moderate and potent activities. In the most active fractions of EC (Fr 3 and 4), two major pimarane derivatives compounds were identified as: *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid (**1**) and *ent*-8(14)15-pimaradien-3 β -ol (**3**). From the most active fractions of EO's (Fr 3 and 4; R3, R5, R6, X5, F5, F6 and F7) the following compounds were identified: carotol, palustrol, spathulenol, pimaral and diterpene **3**. The compounds **1** and **3**, isolated and tested, presented weak and moderate activity, respectively, suggesting a possible synergism with other compounds. These results showed that from 50 evaluated samples, 56% had potential *in vitro* antiproliferative activity and concentration-dependent for most strains evaluated. Among these, 34% had moderate activities and 22% had potent activities, with TGI (Total Growth Inhibition) values lower than 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in at least one of the cancer cell lines. This study indicates that *Aldama arenaria* has, *in vitro*, a good antiproliferative activity and further evaluations of the *in vivo* anticancer activities are needed in order to validate this antitumor potential.

LISTA DE ABREVIATURAS

- δ - deslocamento químico
- $[\alpha]_D$ - rotação ótica
- 3T3- células não-tumorais representado fibroblasto de camundongo
- 786-0- células tumorais representado rim
- B- Compostos biológicos
- C- Óleo essencial dos caules de *A. arenaria* (fase de floração)
- CC- Cromatografia em coluna clássica
- CCD- Cromatografia em Camada Delgada
- CCell- controle de células
- CG-EM- Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas
- C_n - Número de carbonos do hidrocarboneto n
- C_{n-1} - Número de carbonos do hidrocarboneto n-1
- CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPQBA- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
- CS- Cromatografia em coluna seca
- DEPT- Distortion-less Enhancement by Polarization Transfer
- DI- densidade de Inoculação
- Di- diterpenos
- DMSO- dimetilsulfóxido
- EC- extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria*
- ESALQ-USP- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Piracicaba/SP
- F- atividade fraca
- F- Óleo essencial das folhas de *A. arenaria* (fase de floração)
- F1 a F7- frações 1 a 7 obtidas da cromatografia em coluna seca do OE das folhas *A. arenaria*
- Fr 1 a Fr 5 CS OEX1- frações 1 a 5 obtidas da cromatografia em coluna seca do OEX1
- Fr 1 a Fr 60 CC- frações 1 a 60 obtidas da cromatografia em coluna clássica da Fr 3,4 agrupada

- Fr 1 a Fr 9 CS EC- frações 1 a 9 obtidas da cromatografia em coluna seca do EC
- Fração 3,4- Frações 3 e 4 obtidas da CS do OEX1 e EC e agrupadas
- GI₅₀- Growth Inhibition 50% – Inibição de 50% do Crescimento
- GI₇₅- Growth Inhibition 75% – Inibição de 75% do Crescimento
- HaCaT- células não-tumorais representado queratinócito humano
- HT29- células tumorais representado cólon
- I- inativa
- IA- Índice Aritmético
- INCA- Instituto Nacional do Câncer
- IPP- difosfato de isopentila
- IV- Infravermelho
- K-562- células tumorais representado leucemia
- M- atividade moderada
- MCF-7- células tumorais representado mama
- MHz- mega-hertz
- MM- massa molecular
- Mono- monoterpenos
- N- Produto natural não modificado
- NB- Produto natural botânico
- nc- não calculado
- NCI- National Cancer Institute, EUA
- NCI/ADR-RES- células tumorais representado ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos
- NCI-H460- células tumorais representado pulmão
- nd- não detectado
- ND- Produto natural modificado
- ni- não identificado
- NIST- National Institute of Standards and Technology
- OE- Óleo essencial
- OER- Óleo essencial das raízes de *A. arenaria* (fase de dormência)
- OEX1- Óleo essencial dos xilopódios de *A. arenaria* (fase de dormência)

- OMS- Organização Mundial da Saúde
- OVCAR-3- células tumorais representado ovário
- P- atividade potente
- PC-3- células tumorais representado próstata
- ppm- partes por milhão
- R- Óleo essencial das raízes de *A. arenaria* (fase de floração)
- R1 a R7- frações 1 a 7 obtidas da cromatografia em coluna seca do OE das raízes de *A. arenaria*
- RCBP- Registros de Câncer de Base Populacional
- Rf- fator de retardamento
- R_F- Fator de Retardamento
- RMN de ¹³C- Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C
- RMN de ¹H- Ressonância Magnética Nuclear de ¹H
- RPMI- Roswell Park Memorial Institute
- S- Composto sintético sem nenhuma concepção de produto natural
- S* e S*/NM- Composto sintético com o grupo farmacofórico de produto natural e NM indicando inibição competitiva
- S/NM- Composto sintético que mostra inibição competitiva do substrato de produtos naturais
- Sesqui- sesquiterpenos
- SFB- Soro Fetal Bovino
- SRB- Sulforrodamina B
- SUS- Sistema Único de Saúde
- T- média da absorbância da célula tratada
- t- traços
- T0- placa controle incubada no tempo 0
- TCA- ácido tricloroacético
- TGI- Total Growth Inhibition – Inibição Total de Crescimento
- TK10- células tumorais representado rim
- TMS- tetrametilsilano
- Tr_(Cn)- Tempo de retenção hidrocarboneto n

- $Tr_{(C_{n-1})}$ - Tempo de retenção hidrocarboneto n-1
- $Tr_{(x)}$ - Tempo de retenção do composto na amostra
- t_R = tempo de retenção
- U251- células tumorais representado glioma
- UACC-62- células tumorais representado melanoma
- UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas
- V- Vacinas
- VERO- células não-tumorais representado fibroblasto de rim de macaco-verde
- WHO- World Health Organization
- X- Óleo essencial dos xilopódios de *A. arenaria* (fase de floração)
- X1 a X7- frações 1 a 7 obtidas da cromatografia em coluna seca do OE dos xilopódios *A. arenaria*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentual da população que utiliza medicina tradicional em alguns países da Região do Pacífico Ocidental (WHO, 2012).....	01
Figura 2. Fármacos aprovados no período de 1981 a 2010, tipo de fonte/anos. (Adaptado de Cragg e Newman, 2012).....	04
Figura 3. Fontes de novos fármacos aprovados (Adaptado de Cragg e Newman, 2012).....	05
Figura 4. <i>Aldama arenaria</i> Baker.....	07
Figura 5. Compostos isolados de <i>A. arenaria</i> (Ambrósio e Colaboradores, 2004)....	08
Figura 6. Rota biossintética de produção do difosfato de isopentenila (IPP) via mevalonato. (Adaptado de Croteau, Kutchan e Lewis, 2000).....	11
Figura 7. Incidência e mortalidade de câncer na população mundial (Adaptado de Globocan, 2008).....	14
Figura 8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma*, para o Brasil. (Adaptado de Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil, INCA 2011).....	15
Figura 9. Fontes de fármacos anticâncer aprovados no período de 1940 a 2010 (Adaptado de Cragg e Newman, 2012).....	16
Figura 10. Estruturas de alguns compostos de origem natural com atividade antineoplásica (Almeida e colaboradores, 2005b).....	17
Figura 11. Estrutura do taxol, agente antineoplásico de origem natural (Almeida e colaboradores, 2005b).....	18
Figura 12. Sistema de Extração de óleo essencial com tipo Clevenger.....	22
Figura 13. Preparo do EC. (A) Extração em dispersor Ultra-Turrax; (B) Secagem em rotaevaporador a vácuo.....	22

Figura 14. Equação de Van den Dool utilizada para calcular o índice aritmético (IA), (Adaptado de Adams, 2007).....	24
Figura 15. Esquema do fracionamento por Cromatografia em Coluna seca. (A) Cromatografia em coluna seca do EC e (B) Cromatografia em coluna seca do OEX.	25
Figura 16. Cromatografia em Coluna Clássica.....	27
Figura 17: Esquema de distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos..	29
Figura 18: Placa real de 96 compartimentos contendo as linhagens tumorais.....	30
Figura 19. Rendimento do EC e OE's obtidos de <i>A. arenaria</i>	33
Figura 20. Cromatografia em camada delgada do EC e OE das raízes e xilopódios de <i>A. arenaria</i>	34
Figura 21. Curvas de crescimento celular em função das concentrações das amostras. (DOXO) Doxorrubicina, quimioterápico de referência; (EC) Extrato clorofórmico das raízes de <i>A. arenaria</i> ; (OER) Óleo essencial obtido das raízes de <i>A. arenaria</i> ; e (OEX1) Óleo essencial obtido dos xilopódios de <i>A. arenaria</i>	35
Figura 22. Estrutura do quimioterápico doxorrubicina, controle positivo dos testes de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	36
Figura 23. Curvas de crescimento celular em função das concentrações de alguns quimioterápicos de referência.....	36
Figura 24. Estruturas dos compostos cipereno e carotol identificados por CG-EM....	40
Figura 25. Gráfico dos rendimentos dos fracionamentos do EC e OEX1 por coluna cromatográfica do tipo seca.....	41
Figura 26. CCD's das frações do OEX1 e EC por cromatografia em coluna seca....	41
Figura 27. Curvas de crescimento celular em função das concentrações das amostras. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorrubicina; (Fr 1 a Fr 5 CS OEX1) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do óleo essencial dos xilopódios (OEX1) de <i>A. arenaria</i>	42

Figura 28. Curvas de crescimento celular em função das concentrações das amostras. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorubicina; (Fr 1 a Fr 9 CS EC) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do extrato clorofórmico das raízes de <i>A. arenaria</i> (CS EC).....	43
Figura 29. Estruturas de alguns compostos identificados por CG-EM nas frações obtidas da coluna cromatográfica seca do OE dos xilopódios.....	47
Figura 30. Frações 3 e 4 das cromatografias em coluna seca do EC e OEX1 agrupadas.....	48
Figura 31. Espectro de massas obtido por CG-EM para o composto com tempo de retenção 26,35 min, contido na Fração 3,4 agrupada.....	48
Figura 32. Espectro de massas obtido por CG-EM para o composto com tempo de retenção 22,63 min, contido na Fração 3,4 agrupada.....	49
Figura 33. CCD's da coluna clássica da Fração 3,4 agrupadas da cromatografia em coluna seca do EC e OEX1.....	49
Figura 34. Rendimento da purificação da Fr 3,4 por coluna clássica.....	50
Figura 35. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorubicina; (Fr 1-6 a Fr 56-61 CC) Frações obtidas da coluna clássica (CC) da Fr 3,4 agrupada.....	51
Figura 36. Fotos das CCD's das frações mais ativas. Fase móvel: (A) Hexano/Acetato de etila (70:30) e (B) Diclorometano.....	54
Figura 37. Compostos isolados da coluna clássica da Fr 3,4. (1) Ácido <i>ent</i> -pimara-8(14),15-dien-19-óico e (3) Álcool <i>ent</i> -8(14),15-pimaradien-3 β -ol.....	55
Figura 38. Rendimentos de OE's obtidos para os diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i> , coletados em fase de floração.....	59
Figura 39. CCD dos OE's das diferentes estruturas de <i>A. arenaria</i>	60
Figura 40. Cromatogramas do OE das raízes e xilopódios de <i>V. arenaria</i> expandido.....	61

Figura 41. Cromatogramas do OE dos caules e folhas de <i>V. arenaria</i> expandido.....	61
Figura 42. Distribuição da composição química dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i>	63
Figura 43. Estruturas dos compostos identificados nos OE's obtidas dos diferentes órgãos vegetais de <i>A. arenaria</i>	64
Figura 44. Curvas de crescimento celular em função das concentrações dos OE's: das raízes de <i>A. arenaria</i> (R); dos xilopódios de <i>A. arenaria</i> (X); dos caules de <i>A. arenaria</i> (C); e das folhas de <i>A. arenaria</i> (F).....	65
Figura 45. Rendimentos de recuperação das frações obtidas da cromatografia em coluna seca dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i>	68
Figura 46. CCD's dos fracionamentos dos OE's das diferentes estruturas de <i>A. arenaria</i> . (A) CCD do fracionamento do OER; (B) CCD do fracionamento do OEX; (C) CCD do fracionamento do OEF.....	68
Figura 47. Distribuição da composição química do fracionamento dos OE's das raízes (R1 a R7), xilopódios (X1 a X7) e folhas (F1 a F7) de <i>A. arenaria</i>	71
Figura 48. Estrutura do pimaral (MM 286 g.mol ⁻¹), composto majoritário da fração R3 do fracionamento do OE das raízes de <i>A. arenaria</i>	71
Figura 49. Curvas de crescimento celular em função das concentrações das frações. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorubicina; (R1 a R7) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do OE das raízes; (X1 a X7) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do OE dos xilopódios; (F1 a F7) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do OE das raízes.....	72
Figura 50. Foto da CCD contendo as frações mais ativas.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fracionamento do EC e OEX1 por cromatografia em coluna seca.....	26
Tabela 2. Fracionamento dos OE's dos diferentes órgãos vegetativos por cromatografia em coluna seca.....	26
Tabela 3. Dados da purificação da Fração 3,4 por coluna clássica.....	27
Tabela 4: Linhagens celulares tumorais e normais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas densidades de inoculação (DI).....	28
Tabela 5. Obtenção do EC e OE das raízes e xilopódios de <i>A. arenaria</i> para testes prévios de atividade antiproliferativa.....	33
Tabela 6. Compostos majoritários identificados nos OE's das raízes e xilopódios de <i>A. arenaria</i> , determinada por GC-EM.....	34
Tabela 7. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos para o EC, OER1 e OEX1 de <i>A. arenaria</i> , em cultura de células tumorais humanas.....	38
Tabela 8. Classificação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> de acordo com os valores de TGI (Fouche e colaboradores, 2008).....	39
Tabela 9. Resultados do fracionamento do OEX1 por cromatografia em coluna seca.....	40
Tabela 10. Resultados do fracionamento do EC por cromatografia em coluna seca.....	40
Tabela 11. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das frações da cromatografia em coluna seca do OEX1 de <i>A. arenaria</i> , em cultura de células tumorais humanas.....	46
Tabela 12. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das frações da cromatografia em coluna seca do EC de <i>A. arenaria</i> , em cultura de células tumorais humanas.....	46
Tabela 13. Frações obtidas do fracionamento da Fr3 e 4 agrupada por coluna clássica.....	50
Tabela 14. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos para as frações da coluna clássica das Fr 3,4 agrupada, em cultura de células tumorais humanas.....	53

Tabela 15. Porcentagens relativas determinadas por CG-EM dos compostos encontrados nas frações da coluna clássica.....	54
Tabela 16. Bandas observadas nos espectros de IV do Ácido <i>ent</i> -pimara-8(14),15-dien-19-óico (1) e do Álcool <i>ent</i> -8(14),15-pimaradien-3 β -ol (3).....	55
Tabela 17. Comparação dos deslocamentos experimentais de RMN de ¹ H (em ppm) obtidos para os compostos 1 e 3 com dados descritos na literatura.....	56
Tabela 18. Comparação dos deslocamentos experimentais de RMN de ¹³ C (em ppm) obtidos para os compostos 1 e 3 com dados descritos na literatura.....	57
Tabela 19. Pontos de fusão em °C obtidos para os compostos 1 e 3	57
Tabela 20. Valores de rotação ótica, [α] _D (em °), obtidos para os compostos 1 e 3 ...	57
Tabela 21. Dados complementares das extrações dos OE's dos órgãos de <i>A. arenaria</i>	59
Tabela 22. Composição química dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i>	62
Tabela 23. Valores de TGI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para os OE's das raízes (R), xilopódios (X), caules (C) e folhas (F) de <i>A. arenaria</i> , em cultura de células tumorais humanas.....	65
Tabela 24. Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i>	67
Tabela 25. Composição química das frações resultantes dos fracionamentos dos OE's das raízes (R1 a R7), xilopódios (X1 a X7) e folhas (F1 a F7) de <i>A. arenaria</i>	69
Tabela 26. Valores do log de GI ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para as frações dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i> (R– raiz; X– xilopódio e F- folhas).....	77
Tabela 27. Valores TGI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para as frações dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i> (R– raiz; X– xilopódio e F- folhas).....	78
Tabela 28. Classificação das amostras quanto aos valores de TGI's.....	81

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. As plantas medicinais.....	01
1.2. A espécie <i>Aldama arenaria</i> Baker.....	05
1.3. Óleos essenciais.....	11
1.4. O Câncer.....	12
2. OBJETIVOS	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Extração dos OE's.....	21
3.2. Preparo do Extrato Clorofórmico (EC).....	22
3.3. Análises Cromatográficas.....	23
3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	23
3.3.2. Cromatografia a Gás acoplada ao Detector de Massas (CG-EM).....	24
3.4. Fracionamento das amostras em Coluna cromatográfica.....	25
3.4.1. Fracionamento por Cromatografia em Coluna seca.....	25
3.4.2. Fracionamento por Cromatografia Clássica.....	26
3.5. Testes de Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	28
3.6. Identificação dos compostos isolados.....	31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Avaliação dos OE's e EC de <i>A. arenaria</i> obtidos na fase de dormência.....	33
4.2. Fracionamento do OEX1 e EC por cromatografia de coluna seca.....	40
4.3. Fracionamento da Fr 3,4 por cromatografia de coluna clássica.....	48
4.4. Identificação dos compostos isolados clássica.....	55
4.5. Avaliação dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i> obtidos na fase de floração.....	58
4.6. Fracionamento dos OE's dos diferentes órgãos de <i>A. arenaria</i>	67
4.7. Compilação dos resultados de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	80
5. CONCLUSÃO	83
6. REFERÊNCIAS	85
7. ANEXOS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. As plantas medicinais

O uso de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelos homens das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno (Lorenzi e Matos, 2008). Alguns relatos da utilização de fármacos de origem vegetal pela medicina egípcia datam de 2900 a.C. (Borchardt, 2002). Desta forma, em todas as épocas e em todas as culturas, o homem aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais, repassando este conhecimento ao longo das gerações (Lorenzi e Matos, 2008).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional refere-se aos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, utilizados na manutenção da saúde e na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais. Abrange uma ampla variedade de terapias e práticas que variam de país para país e de região para região. Desde os anos 1990 o seu uso cresceu muito em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nestes países a população utiliza a medicina tradicional como fonte de medicamento alternativo ou complementar (Figura 1, WHO-2012).

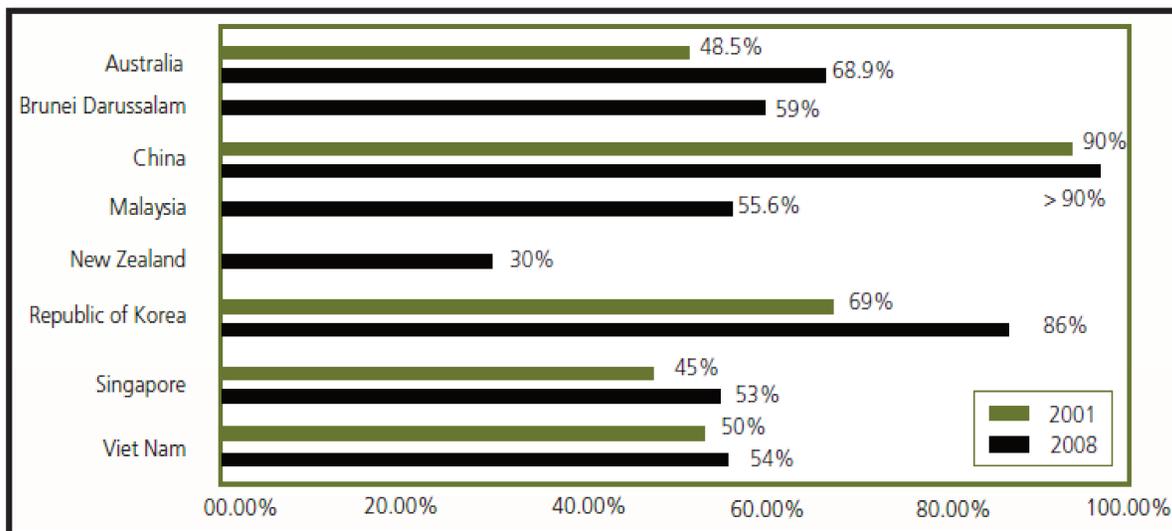


Figura 1. Porcentual da população que utiliza medicina tradicional em alguns países da Região do Pacífico Ocidental (WHO, 2012).

Tratamentos à base de plantas são as formas mais populares de medicina tradicional e são altamente lucrativos no mercado internacional, gerando bilhões de dólares em receitas (WHO, 2008 e 2013).

Em 2008 a OMS estimou que aproximadamente 65% da população mundial dependia principalmente destes medicamentos de origem vegetal como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Já em alguns países da Ásia e África, este número pode chegar a 80% da população, principalmente devido à pobreza e consequente falta de acesso à medicina moderna.

Assim, ao final da década de 1970 a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional, que recomenda aos países, o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional nos sistemas de atenção à saúde. Este programa preconiza a utilização e maximização da medicina tradicional, a fim de promover uma política de saúde com equidade, valorizando a qualidade, segurança e eficácia do medicamento, de acordo com as necessidades e disponibilidades de cada país.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica biodiversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, e tem o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados promissores em tecnologias e terapêuticas apropriadas (Calixto, 2005).

No Brasil, desde 2006 o Ministério da Saúde implantou no SUS (Sistema Único de Saúde) a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ela estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas a garantia do acesso seguro e uso racional das plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Adicionalmente grandes avanços também foram realizados em relação ao estudo e aplicação da flora brasileira, através da revisão e atualização da Farmacopéia Brasileira. Assim, a 5ª Edição da Farmacopéia Brasileira, lançada em 2010, traz um compêndio de métodos e informações técnicas que garantem a qualidade, segurança e eficácia dos princípios ativos e plantas medicinais.

Somando-se o grande potencial terapêutico da flora brasileira, comprovado pelo elevado número de publicações em revistas científicas na área de produtos naturais, aos investimentos das indústrias farmacêuticas nas áreas de pesquisa e desenvolvimento, o Brasil alcança lugar de grande destaque na produção de fitoterápicos. Só o Brasil possui cerca de 20-22% de todas as plantas e microrganismos existentes, no entanto, estimava-se que não mais de 25.000 espécies de plantas tenham sido objeto de qualquer investigação científica (Calixto, 2005).

Em 2001 estimava-se que cerca de 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo eram originários de plantas. Destes, 121 compostos ativos eram de uso corrente. Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS 11 eram exclusivamente de origem vegetal e outra grande parte eram fármacos sintéticos obtidos de precursores naturais (Rates, 2001).

Já em revisão de Gurib-Fakim (2006), o autor estimava que aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados nas clínicas, em todo mundo, originavam-se de produtos naturais e derivados. Entretanto apenas pequena parte deste potencial tinha sido explorada, sendo que, dentre 250 mil e 350 mil espécies de plantas existentes no mundo, apenas uma pequena porcentagem tinha sido investigada fitoquimicamente (15%) e biologicamente (6%).

Num artigo de revisão mais recente, publicado em 2012, Newman e Cragg apresentaram um painel da utilização dos produtos naturais como fonte de novos fármacos para o tratamento de várias doenças em todo o mundo. Eles classificaram as fontes de novos medicamentos como: N- produto natural não modificado; NB- produto natural botânico; ND- produto natural modificado; S- composto sintético sem nenhuma concepção de produto natural; S* e S*/NM- composto sintético com o grupo farmacofórico de produto natural, e NM indicando inibição competitiva; e S/NM- composto sintético que mostra inibição competitiva do substrato de produtos naturais. As vacinas (V) e alguns compostos biológicos (B) foram atribuídos à categoria N ou ND.

Esta revisão ao longo de 30 anos (1981-2010) demonstrou que dos 1073 novos agentes terapêuticos aprovados, a grande maioria (64%) continha algum tipo de inspiração em produtos naturais. A distribuição da produção de novos fármacos é notadamente significativa (Figuras 2 e 3).

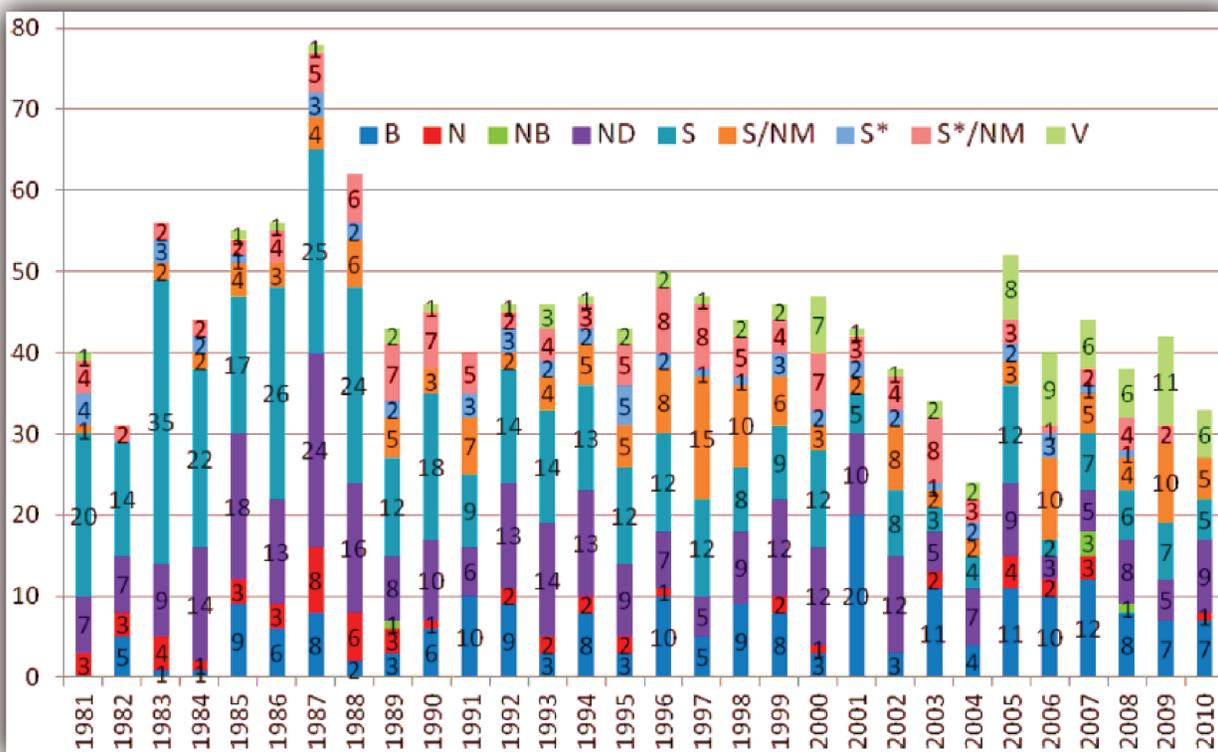


Figura 2. Fármacos aprovados no período de 1981 a 2010, tipo de fonte/anos. (Adaptado de Newman e Cragg, 2012).

Legenda: B- compostos biológicos; N- produto natural não modificado; NB- produto natural botânico; ND- produto natural modificado; S- composto sintético sem nenhuma concepção de produto natural; S e S*/NM- composto sintético com o grupo farmacóforo de produto natural, e NM indicando inibição competitiva; S/NM- composto sintético que mostra inibição competitiva do substrato de produtos naturais e V- vacinas.*

Das 1073 novas moléculas avaliadas, à exceção das vacinas, 66% foram consideradas “formalmente sintéticas”, devido à presença de “S” em sua codificação. Deste total, 17% correspondiam a moléculas sintéticas que continha grupos farmacofóricos derivadas diretamente dos produtos naturais classificadas como sintética, porém, com o grupo farmacofórico de produto natural. Além disso, 14% são realmente modeladas em um inibidor natural do produto alvo molecular de interesse, ou imitam, isto é, inibem competitivamente com o substrato endógeno do sítio ativo.

Assim, apenas 36% destas 1073 novas moléculas podem ser classificadas como verdadeiramente sintéticas, ou seja, desprovidas de qualquer inspiração natural (Figura 3). Todos os fármacos licenciados são listados neste artigo, de acordo com seu nome genérico.

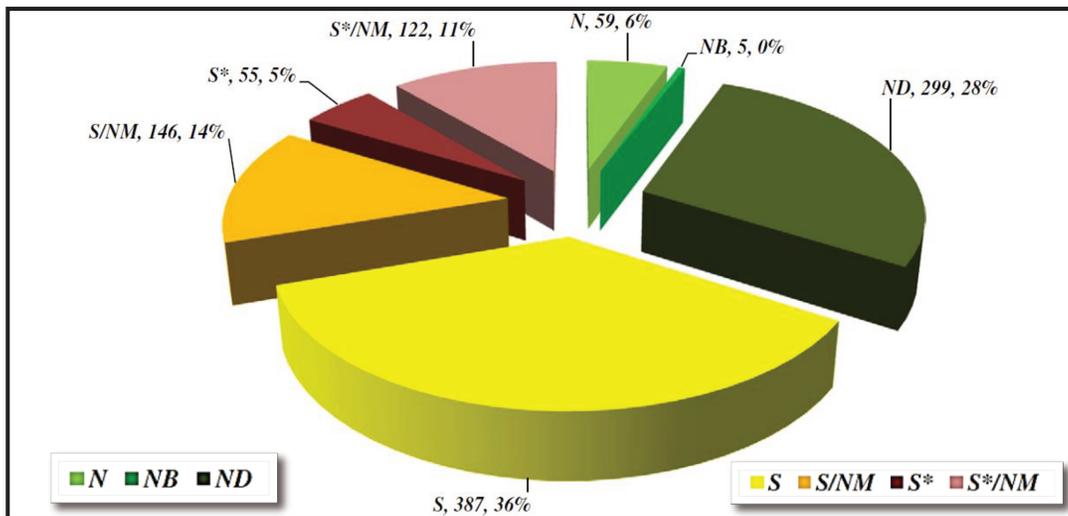


Figura 3. Fontes de novos fármacos aprovados de 01/01/1981 a 31/12/2010 (Adaptado de Newman e Cragg, 2012).

Legenda: N- produto natural não modificado; NB- produto natural botânico; ND- produto natural modificado; S- composto sintético sem nenhuma concepção de produto natural; S/NM- composto sintético que mostra inibição competitiva do substrato de produtos naturais; S e S*/NM- composto sintético com o grupo farmacóforo de produto natural, e NM indicando inibição competitiva;*

Desta forma, sabendo-se que muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado foram diretamente ou indiretamente derivados de produtos naturais, as plantas medicinais tornaram-se fontes incontestáveis para a descoberta de novos fármacos, sendo frequentemente o alvo de muitas indústrias farmacêuticas e, conseqüentemente, muito útil para o tratamento das diversas enfermidades que afetam a humanidade.

1.2. A espécie *Aldama arenaria* Baker

A família Asteraceae possui cerca de 11.000 gêneros e mais de 20.000 espécies, sendo economicamente uma das mais importantes entre as angiospermas (Magenta, 2006) e a maior dentre as Eudicotiledôneas (Souza e Lorenzi, 2008), representando 10% da flora mundial (Bremer, 1994).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de conhecer melhor sua morfologia, anatomia, ecologia e fitoquímica (Magenta, 2006; Cury e Apezatto-da-Glória, 2009; Almeida e colaboradores, 2005-a), porém a aplicação de espécies deste gênero na medicina popular é pouco comum.

O elevado número de espécies e a alta diversidade morfológica desta família permitem que a mesma seja organizada em subfamílias, tribos e subtribos, no entanto, estes táxons vêm frequentemente sendo reestruturados (Bringel Jr., 2007).

A espécie *A. arenaria* pertence à tribo Helianthae, a segunda maior entre as Asteraceae. Esta tribo é subdividida e engloba várias subtribos, apresentando 189 gêneros e cerca de 2500 espécies. É muito importante economicamente nas indústrias alimentícia, ornamental e medicinal como exemplos: girassol, dália e camomila, respectivamente.

De acordo com Jeffrey (1978) a família é aceita como um grupo bem definido, porém a uniformidade dos capítulos (inflorescências reunidas em um único receptáculo) dificulta a delimitação das tribos e dos gêneros, gerando grande frequência de paralelismos, o que dificulta sua identificação e classificação.

Esta presença marcante de paralelismos da variabilidade fenotípica faz com que algumas espécies tenham sido tratadas como sinônimos por causa de sua similaridade (Magenta, 2006). Este fato tem colocado a classificação filogenética e a circunscrição das tribos em ampla discussão (Bayer e Starr, 1998).

Em 2011 Schilling e Panero realizaram novas análises filogenéticas de espécies do gênero *Viguiera*, dividindo cerca de 350 espécies da subtribo entre 21 gêneros. Neste trabalho os autores evidenciaram conflitantes relações entre alguns grupos, sustentando ainda mais a hipótese de hibridização de algumas espécies e consequente desvio da subtribo. Assim, baseados nos resultados das análises filogenéticas moleculares, algumas espécies sul-americanas de *Viguiera* foram reclassificadas como *Aldama*, incluindo a espécie *arenaria*.

Porém, outros pesquisadores indicam que há erros e omissões nomenclaturais no trabalho e estudos complementares aos moleculares se fazem necessários tendo em vista que a circunscrição para as espécies sul-americanas ainda não está bem estabelecida (Oliveira, Bombo e Appezzato-Da-Glória, 2013).

As espécies deste gênero são exclusivamente americanas e somam 180 espécies, das quais 27 são exclusivamente brasileiras e ocorrem principalmente em regiões de inverno seco com épocas de queimadas, como o Cerrado. Algumas atividades já foram estudadas para outras espécies deste gênero.

Canales e colaboradores (2005) relataram a utilização de *Viguiera dentata* por populações mexicanas na medicina popular, para mulheres em trabalho de parto, erupções e picadas de formiga. Neste mesmo trabalho, eles também observaram atividade antimicrobiana do extrato hexânico para 7 cepas de bactérias.

Em 2008, Taylor e colaboradores (2008) publicaram um artigo que examinava as propriedades anticancerígenas de duas lactonas isoladas a partir *Viguiera sylvatica* e *Decachaeta thieleana*, contra as linhagens de células tumorais *in vitro* e *in vivo*. O tratamento com o composto isolado de *V. sylvatica* chamado millerenolideo inibiu significativamente o crescimento dos tumores subcutâneos avaliados.

Aldama arenaria Baker (Figura 4A), é uma erva cespitosa a subarbusto, que mede 0,8 a 3m de altura. Possui folhas alternas verdes claras sésseis ou pecioladas (Figura 4B), ramos aéreos eretos e cilíndricos (Figura 4C), raízes tuberosas (Figura 4D) e caule subterrâneo fortemente espessado (xilopódio), (Figura 4E).



Figura 4. *Aldama arenaria* Baker. (A) Planta no campo; (B) Detalhes das folhas e flores; (C) Caule aéreo; (D) Raízes tuberosas; e (E) Xilopódios.

Fotos: Tuane S. de Oliveira e Beatriz Apezatto da Glória.

Seu habitat concentra-se principalmente no centro-leste de São Paulo, com poucas ocorrências no sudoeste de Minas Gerais, em áreas de cerrado e beiras de estradas (Magenta, 2006). A adaptação ambiental desta planta pode estar associada principalmente ao comportamento sazonal das espécies deste gênero.

Em períodos de baixas temperaturas e escassez hídrica (fase de dormência) estas plantas tendem a murchar seus ramos aéreos (caules e folhas) e se concentram apenas em seus órgãos subterrâneos (raízes e xilopódios), fato este que dificulta sua localização em ambiente natural nessas épocas; já em períodos de alta umidade e temperaturas favoráveis (fase de floração) elas tendem a formar novos ramos e apresentar inflorescências (Magenta, 2006).

Também são plantas bastante aromáticas, indicando forte presença de compostos voláteis oriundos do metabolismo secundário (Oliveira, 2011).

Algumas espécies deste gênero produzem como principais metabólitos secundários diterpenos do tipo pimarano (**1 a 7**) e lactonas sesquiterpênicas (**8**) (Figura 5). Estes compostos isolados do extrato diclorometânico das raízes e folhas de *V. arenaria* apresentaram várias atividades biológicas (Ambrósio, Schorr e da Costa, 2004).

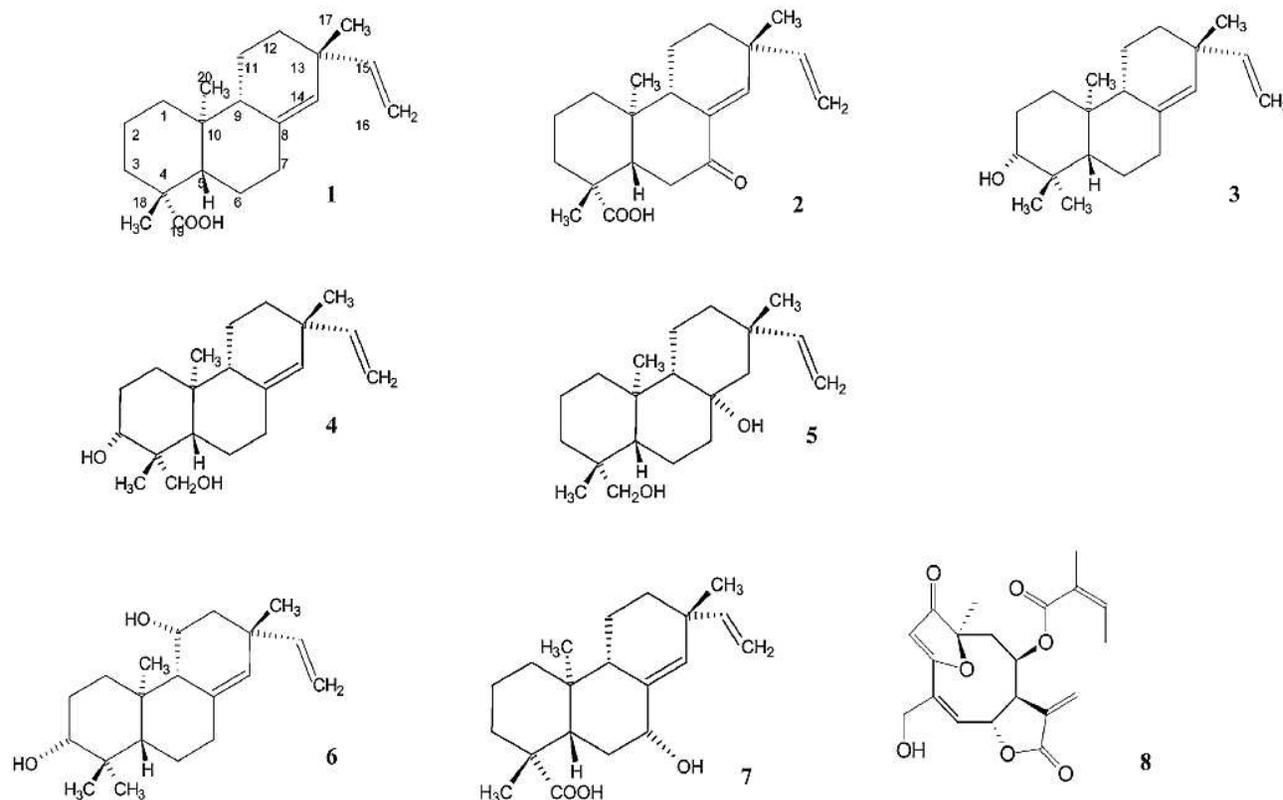


Figura 5. Compostos isolados de *A. arenaria* (Ambrósio, Schorr e da Costa, 2004).

Estudos apresentados por Ambrósio e colaboradores (2002) relataram que o *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**1**), Ácido pimaradienóico (PA), isolado do extrato diclorometânico de *V. arenaria*, age inibindo a contração do músculo liso vascular em carótidas de ratos. Esta contração induzida por cloreto de potássio e cloridrato de fenilefrina não foi reversível após a retirada deste composto do meio de teste.

Outros estudos descritos por esses mesmos autores (2006 e 2008) demonstraram que compostos diterpênicos isolados das espécies *V. Arenaria* e *V. robusta* eram capazes de inibir a contratilidade vascular do músculo liso principalmente pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} extracelular e isolados dos extratos hexânico e diclorometânico das raízes tuberosas de *A. arenaria* apresentaram atividade *in vitro* no combate ao protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estes últimos resultados evidenciaram que diferenças estruturais mínimas entre os diterpenos testados influenciavam significativamente na atividade tripanocida, trazendo novas perspectivas para o estabelecimento de relações estrutura-atividade entre este tipo de metabólito e o tratamento da doença de Chagas.

Tirapelli e colaboradores (2004 e 2008) constataram que o ácido pimaradienóico (**1**) era capaz de reduzir o influxo de Ca^{2+} extracelular através da membrana celular do músculo liso, evidenciando um mecanismo capaz de inibir a contração vascular e induzir a hipotensão em ratos normotensos.

Adicionalmente outras atividades farmacológicas foram observadas por Guimarães e colaboradores (2008), que apresentaram estudos da atividade biológica de extratos de 39 fungos endofíticos isolados de *A. arenaria* e *Tithonia diversifolia*, demonstrando atividades: antimicrobiana contra três microrganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*; antiparasitária para *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania tarentolae*; e antitumoral testada contra células de leucemia T humanas e linhagens de células tumorais de melanoma.

Já em 2009, Hipólito e colaboradores estudaram os mecanismos envolvidos na ação vaso-relaxante do pimarano *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**) na aorta isolada de ratos Wistar machos.

Porto e colaboradores (2009) realizaram estudos de atividade antibacteriana do extrato diclorometânico e compostos isolados, que apresentaram atividade contra várias bactérias responsáveis por patologias humanas.

Uma revisão realizada por Alonso-Castro e colaboradores (2011) demonstrou que 4 espécies do gênero *Viguiera* (*decurrens*, *hypargyrea*, *lactibracteata* e *quinqueradiata*) eram amplamente utilizadas na medicina popular mexicana para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, câncer gástrico, doenças inflamatórias e dermatológicas.

Em 2010, Tirapelli, Ambrosio e Oliveria publicaram uma revisão sobre a ação hipotensora de diterpenos, apresentando um tratamento extremamente promissor para a hipertensão e glaucoma. Neste trabalho, os autores apresentaram os diterpenos como fonte de novos protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, reforçando ainda mais o potencial terapêutico da espécie.

Apesar dos estudos anteriores demonstrarem que a espécie *A. arenaria* pode ser considerada uma planta promissora na descoberta de novos medicamentos, a avaliação de atividades farmacológicas de seu óleo essencial (OE) ainda tem sido pouco estudada.

Oliveira, Bombo e Appezzato-Da-Glória, 2013, apresentaram um estudo das características anatômicas dos órgãos vegetativos de *A. arenaria* e *A. robusta*, que por serem muito semelhantes, geralmente apresentam exsiccatas confusas. Este artigo avaliou a anatomia das estruturas secretoras presentes nos órgãos vegetativos, a fim de distinguir as duas espécies com base em um exame destes órgãos.

Recentemente Bombo e colaboradores (2012) publicaram outro artigo que descreve a anatomia dos órgãos aéreos e avalia a produção de óleo essencial e composição química de três espécies de *Aldama*, *A. filifolia*, *A. linearifolia* e *A. trichophylla*. Este estudo teve como objetivo diferenciar as espécies e consequentemente colaborar com a identificação correta.

Em 2012 Porto e colaboradores apresentaram um estudo dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do *ent*-pimara-8(14)-15-dien-19-óico (**1**) e dois derivados obtidos por fungos (um éster do composto 7 β -hidroxi *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**7**) e o composto 7-ceto *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**2**) frente ao parasita *Schistosoma mansoni*. O composto **1** foi a única substância que apresentou atividade esquistossomicida, com capacidade para reduzir significativamente a viabilidade dos parasitas (de 25 a 100 μ M) e promover alterações morfológicas no tegumento do *S. mansoni*, separando todos os casais e afetando a produção e o desenvolvimento dos ovos.

1.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE's) constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e outros. São originados do metabolismo secundário das plantas e constituídos por uma mistura complexa de substâncias voláteis de diversas classes, destacando-se os terpenos. São misturas líquidas, lipofílicas, odoríferas e geralmente possuem compostos de baixa massa molecular. Frequentemente apresentam odor agradável e marcante (Thakur e colaboradores, 2006).

A produção de metabolitos secundários pode ser entendida como o resultado do desenvolvimento da planta, que inclui a diferenciação no metabolismo e a morfogênese. Ela também pode ser considerada como expressão genômica de uma planta sob controle do desenvolvimento. Por outro lado, metabolitos secundários podem ser produzidos como resultado de diferentes tipos de estresse e doenças (Figura 6).

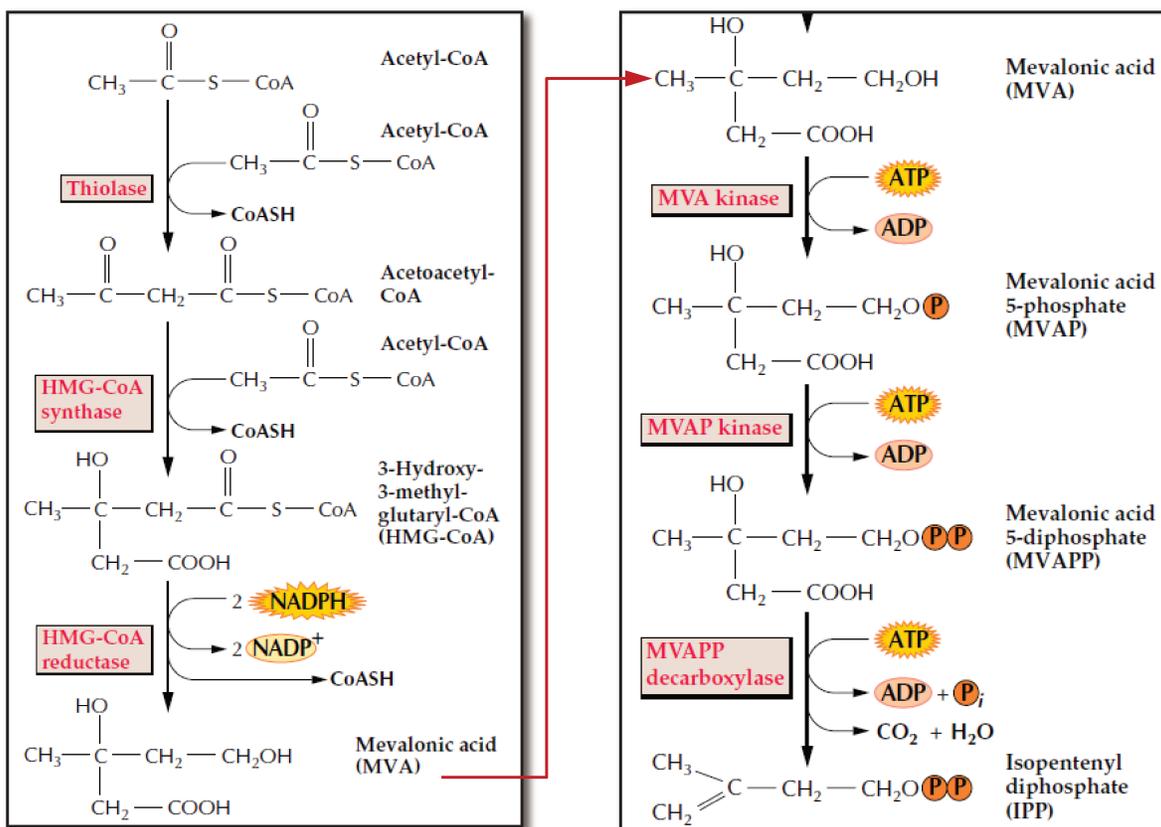


Figura 6. Rota biossintética de produção do difosfato isopentenila (IPP) via mevalonato. A síntese de cada unidade de IPP requer três moléculas de acetil-CoA (Adaptado de Croteau, Kutchan e Lewis, 2000).

Os OE's são extraídos de várias partes vegetais por arraste à vapor d'água, hidrodestilação ou outros métodos de extração como a enfleurage (ou enfloração), extração por CO₂ supercrítico e solventes orgânicos apolares.

Apesar de não haver consenso entre os pesquisadores sobre a utilização de óleos essenciais para fins terapêuticos, devido às dificuldades de absorção, distribuição, metabolização e excreção, vários estudos de OE's sinalizam atividades farmacológicas, por exemplo, antibacteriana, antifúngica, tripanocida, e anti-helmíntica. Recentemente Oliveira e colaboradores (2012) publicaram um artigo revelando que o OE de *Baccharis trimera* possui potente atividade *in vitro* contra o parasita *Schistosoma mansoni*. Alguns estudos *in vivo* também confirmam o grande potencial desta matéria-prima. Em 2013 Muhammad e colaboradores demonstraram que o OE das folhas de *Skimmia laureola* apresenta proeminente ação antinociceptiva e antipirética.

Já em uso terapêutico, um exemplo de medicamento bem sucedido que possui OE em sua formulação é o Acheflan®. Este fitoterápico possui 0,5% do OE de *Cordia verbenacea* e é padronizado em 2,3 a 2,9% de α -humuleno. Atualmente é líder de vendas no segmento de anti-inflamatórios de uso tópico sob prescrição médica.

1.4. O Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. A divisão rápida destas células tende a ser muito agressiva e incontrolável, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco à vida. Estas neoplasias podem ser diferenciadas pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento (INCA, 2013).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. A grande maioria (cerca de 80%) está relacionada ao meio externo onde é possível encontrar um número muito grande de fatores de risco. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou

costumes próprios de um ambiente social e cultural, como por exemplo: tabagismo, alcoolismo, hábitos sexuais e alimentares, medicamentos, fatores ocupacionais e radiação solar. As causas internas são em sua maioria, de caráter hereditário (INCA, 2013). Esta moléstia respondeu por 7,6 milhões de mortes (cerca de 13%) em 2008, e destas, cerca de 70% ocorreram em países de baixa e média rendas (WHO, 2013).

O processo de formação do câncer geralmente ocorre lentamente, podendo levar vários anos até que uma célula normal torne-se cancerosa e origine um tumor detectável. Os estágios do processo de carcinogênese são: iniciação- é a primeira fase da carcinogênese onde as células sofrem efeito de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador) que provoca modificações em alguns de seus genes, porém ainda não é possível detectar um tumor clinicamente; promoção- as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos (oncopromotores), transformando-a em célula maligna de forma lenta e gradual, sob continuado contato com o agente cancerígeno promotor; e progressão- caracterizada pela multiplicação descontrolada, é um processo irreversível, o câncer já instalado vai evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Em relação à ação dos agentes sobre o câncer, eles podem ser classificados em dois grupos: os agentes inibidores - fármacos que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer, muitos destes podem ser encontrados em alimentos, como por exemplo, os diterpenos do café e os polifenóis do chá-verde; e os agentes supressores - os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença, no entanto muitos deles são agentes genotóxicos (Almeida e colaboradores, 2005b).

Estimativas da OMS demonstram que anualmente surgem mais de 10 milhões de novos casos de câncer com cerca de 8 milhões de mortes, tornando-se, em países desenvolvidos, a segunda causa de morte, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares. Mundialmente, estas mortes continuam a crescer, demonstrando que estes índices tendem a aumentar nos próximos anos com estimativa de 13,1 milhões de mortes em 2030, influenciadas em parte pelo aumento da população e o envelhecimento global (Jemal e colaboradores, 2009). Na América, as mortes são projetadas para aumentar de 1,2 a 2,1 milhões entre 2008 e 2030 (WHO, 2012 e 2013).

O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato das células de pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais frequente nesses indivíduos (Carreca, Balducci e Extermann, 2005).

Dentre os diversos tipos de neoplasias, as com maior índice de letalidade continuam sendo as malignas de pulmão (1,37 milhões de mortes), estômago (737 mil mortes), fígado (695 mil mortes), cólon retal (609 mil mortes), mama (458 mil mortes), esôfago (406 mil mortes), cólon de útero (275 mil mortes), próstata (258 mil mortes) e bexiga (150 mil mortes) (Globocan, 2008). A incidência destes diferentes tipos de câncer difere entre homens e mulheres. Dados publicados pelo projeto Globocan (2008), da Agência Internacional para Pesquisas sobre Câncer, fornecem indicadores do câncer para 184 países do mundo (Figuras 7A e 7B).

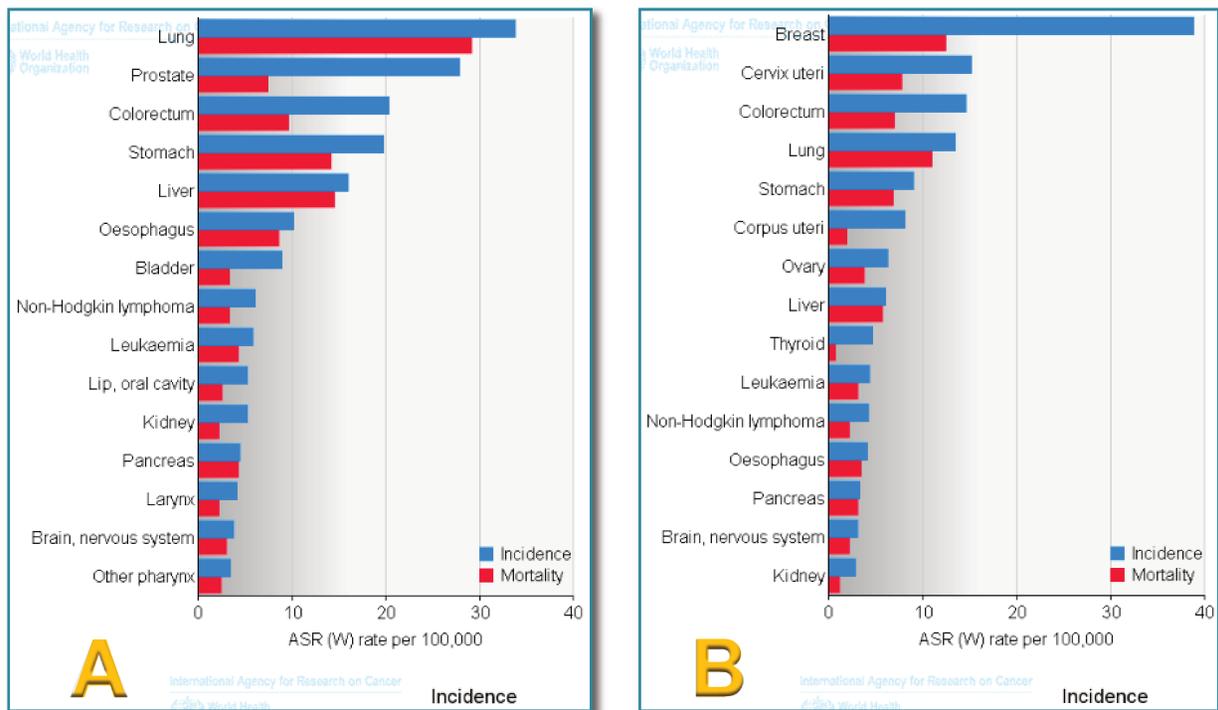


Figura 7. Incidência e mortalidade de câncer na população mundial (Globocan, 2008). (A) Neoplasias mais comuns em homens; (B) Neoplasias mais comuns em mulheres.

Legenda: Lung- pulmão; Prostate- próstata; Colorectum- cólon retal; Stomach- estômago; Liver- fígado; Oesophagus- esôfago; Bladder- bexiga; Non-Hodgkin lymphoma- linfoma não hodgkin; Leukaemia- leucemia; Lip, oral cavity- lábio ; Kidney- rim; Pancreas- pâncreas; Larynx- laringe; Brain, nervous system- sistema nervoso central; Other pharynx- outros faringe; Thyroid- tireóide; Ovary- ovário; Corpus uteri- corpo uterino; Breast- mama; Cervix uteri- colo do útero;

No Brasil a estimativa de incidência do câncer em 2012, válida também para o ano de 2013, foi apresentada pelo Ministério da Saúde e Instituto Nacional do Câncer (INCA), em relatório de 2011. Estes dados apontaram a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estimava-se um total de 385 mil novos casos.

Atualmente esta publicação é realizada a cada dois anos, sempre com base nas informações geradas pelos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP). Neste relatório foram considerados 18 tipos específicos de câncer com base na magnitude e no impacto (Figura 8).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual		
Próstata	60.180	30,8%	Homens		Mama Feminina	52.680	27,9%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Mulheres		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%		
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%		
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%		
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%		
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%		
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%		
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%		
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%		

Figura 8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma*, para o Brasil. (Adaptado de Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil, INCA 2011).

Legenda: * Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Os dados publicados pelo INCA (2011) reproduzem a situação mundial da incidência do câncer demonstrando que os homens são mais acometidos pelos cânceres de próstata e pulmão e as mulheres pelos cânceres de mama e colo do útero. A exceção do câncer de pulmão que possui maior incidência entre os homens e sua principal causa pode ser atribuída ao tabagismo, todos os demais são do tipo hormônio-dependente. Essas neoplasias compartilham do mesmo mecanismo de carcinogênese, porém sob ação de hormônios específicos (Almeida e colaboradores, 2005b).

Diante de estimativas tão alarmantes é fundamental que a comunidade científica, juntamente com os governos e as indústrias farmacêuticas unam forças no combate a esta doença, que leva anualmente milhões de pessoas a óbito e gera prejuízos econômicos e sociais inestimáveis.

Segundo Cragg e Newman (2012 e 2013), no período de 1981 a 2010, do total de novos fármacos anticâncer utilizadas na terapêutica (n=175), 80% (131) tinham como origem os produtos naturais ou compostos sintéticos ou semi-sintéticos, baseados em produtos naturais (Figura 9). Assim, apenas 20% destas moléculas podem ser consideradas sintéticas, ou seja, que não possuem nenhum tipo de inspiração em produto natural.

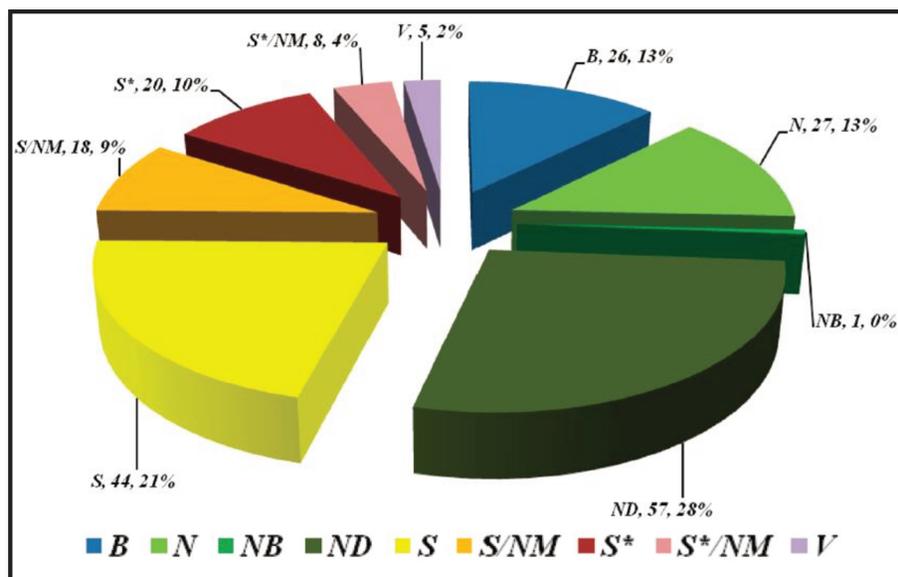


Figura 9. Fontes de fármacos anticâncer aprovados no período de 1940 a 2010. (Adaptado de Cragg e Newman, 2012).

Legenda: B- biológicos; N- produto natural não modificado; NB- produto natural botânico; ND- produto natural modificado; S- composto sintético sem nenhuma concepção de produto natural; S/NM- composto sintético que mostra inibição competitiva do substrato de produtos naturais; S e S*/NM- composto sintético com o grupo farmacóforo de produto natural, e NM indicando inibição competitiva; V- Vacinas.*

Desta forma, a busca por novas terapias para esta enfermidade torna-se algo indispensável ao modo de vida atual, sendo as plantas certamente ricas fontes de novos fármacos para o tratamento e prevenção do câncer.

Dentre alguns fármacos anticancerígenos derivados de plantas disponíveis atualmente no mercado e usados clinicamente têm-se dois alcalóides de vinca,

vinblastina e vincristina (Figura 10). Isolados da espécie *Catharanthus roseus* são ativos no tratamento de vários tipos de câncer: de mama, de ovário, de cabeça e pescoço, de testículo, de pulmão, de cérvix, de bexiga, linfomas, sarcomas, neuroblastomas e vários tipos de leucemia. (Roussi, Gueritte e Fahy, 2012; Almeida e colaboradores, 2005b).

Outros compostos utilizados na terapêutica do câncer são os alcalóides etoposida e teniposida (Figura 10). São derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina, um produto natural extraído da raiz do *Podophyllum peltatum*, para o tratamento dos seguintes cânceres: de mama, de testículo, de pulmão, linfomas, sarcomas, e dois tipos de leucemia, mieloblástica e linfoblástica (Lee e Xiao, 2012; Mann, 2002; Almeida e colaboradores, 2005b).

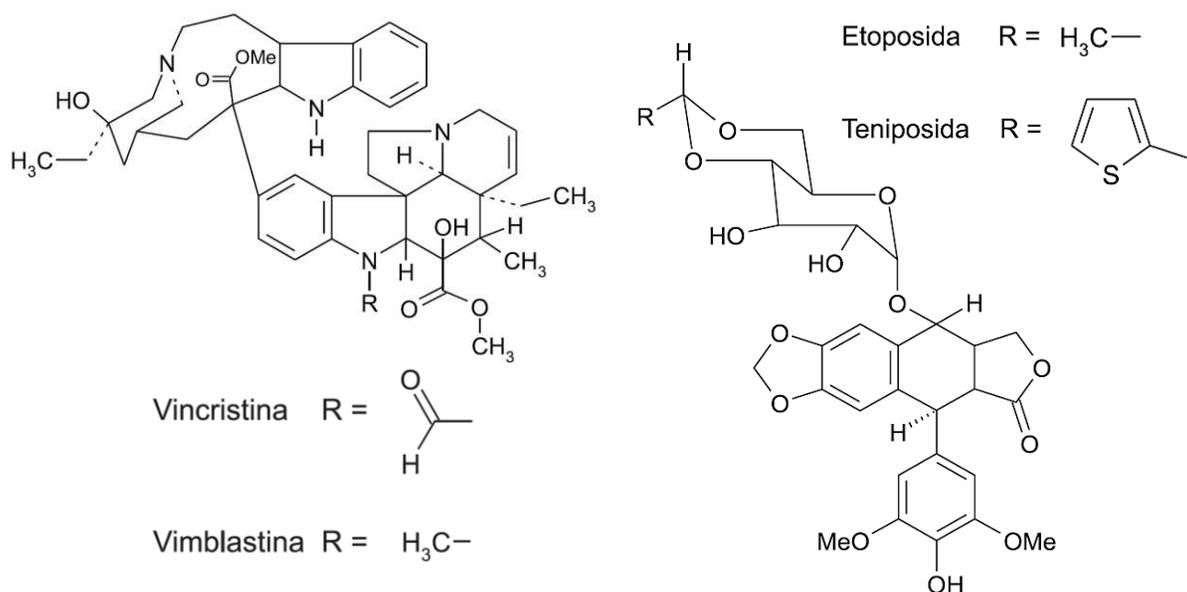


Figura 10. Estruturas de alguns compostos de origem natural com atividade antineoplásica (Almeida e colaboradores, 2005b).

Considerado o agente antitumoral mais promissor desenvolvido nos últimos 20 anos, outro potente agente quimioterápico é o Paclitaxel®. Contendo como princípio ativo o composto chamado taxol (Figura 11). Foi descoberto em 1967 e é um derivado sesquiterpenico isolado das cascas da árvore teixo ocidental (*Taxus brevifolia*), que produz cerca de 100-300 mg.kg⁻¹ de paclitaxel e demora de 60 a 100 anos para crescer. Atualmente o taxol obtido por semi-síntese utilizando como matéria-prima compostos isolados das folhas do teixo europeu (*Taxus baccata*) (Cragg e Newman, 2013).

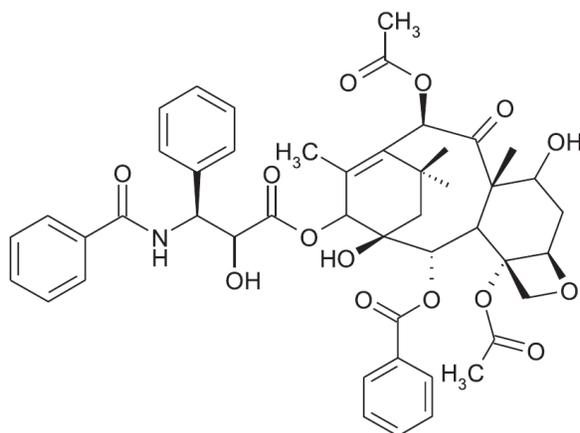


Figura 11. Estrutura do taxol, agente antineoplásico de origem natural (Almeida e colaboradores, 2005b).

Tendo sido considerado na época um “blockbuster” dos medicamentos, foi aprovado para uso clínico contra o câncer de ovário em 1992 e de mama em 1994, desde então o taxol tornou-se um sucesso de vendas, com arrecadações anuais de mais de US \$ 1 bilhão, embora atualmente ele seja um fármaco genérico para as vendas e esteja espalhado entre um número significativo de empresas. É amplamente utilizado para os cânceres de mama e ovário, resistentes a terapia tradicional. (Kingston, 2012; Wani e colaboradores, 1971; Rowinsky e colaboradores, 1995; Cragg e Newman, 2013; Almeida e colaboradores, 2005b).

Diante deste contexto, com objetivo de avaliar o maior número de moléculas possíveis e diminuir a quantidade de animais em ensaios *in vivo*, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (National Cancer Institute, EUA) desenvolveu no final dos anos 80 um protocolo para triagem *in vitro*. Composto por um painel contendo 60 linhagens de células tumorais humanas, representando alguns tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, colón, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético, esta triagem é rápida e eficiente, permitindo avaliar um número elevado de fármacos em apenas uma semana com maior especificidade (Rubistein e colaboradores, 1990; Skehan e colaboradores, 1990; Monks e colaboradores, 1991; Shoemaker, 2006).

Assim estabeleceu-se este procedimento para estudos de fármacos anticâncer (NCI60) como uma ferramenta de detecção *in vitro* e em substituição ao uso de tumores animais transplantáveis na triagem de fármacos anticâncer.

Este modelo de triagem foi rapidamente reconhecido como uma rica fonte de informações sobre os mecanismos de inibição do crescimento e morte de células tumorais (Shoemaker, 2006).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais (OE's), extrato clorofórmico (EC) e frações de *A. arenaria* frente a 10 linhagens de células tumorais humanas, cedidas pelo NCI: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioma), 786-0 (rim); além de três linhagens de células não-tumorais: fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO), queratinócito humano (HaCaT) e fibroblasto de camundongo (3T3).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar a composição química e atividade antiproliferativa *in vitro* do óleo essencial (OE), extrato clorofórmico (EC) e frações obtidas dos diferentes órgãos frescos de *A. arenaria*, frente a diferentes linhagens tumorais.

2.2. Específicos:

- ❖ Obtenção dos óleos essenciais (OE's) de diferentes órgãos frescos (raiz, xilopódio, caule e folha) de *A. arenaria* em fases de dormência e floração;
- ❖ Obtenção do extrato clorofórmico (EC) das raízes de *A. arenaria*;
- ❖ Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*;
- ❖ Fracionamento das amostras mais ativas e isolamento de alguns constituintes;
- ❖ Análises das amostras por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
- ❖ Identificação dos compostos isolados utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C), Infravermelho (IV), Rotação Ótica e Espectrometria de Massas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de dissertação foi realizado em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ-USP, Piracicaba/SP, e da Ms. Tuane S. de Oliveira Almeida, que efetuou as coletas da planta e realizou estudos morfológicos de *A. arenaria* (Oliveira, 2011).

O material vegetal foi coletado na Estação Ecológica de Itirapina-SP, 22°14'S e 47°51'W, em seu estado natural, nos períodos de dormência (24/08/2009) e floração (14/01/2011).

A identificação foi realizada pela botânica Mara Angelina Galvão Magenta e a exsicata foi depositada no herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ-USP (ESA), sob número 111847.

A autorização de acesso ao patrimônio genético foi concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e possuiu número 010216/2012-0, válido de 01/06/2012 a 01/06/2015.

Atualmente esta espécie está incluída no projeto financiado pela FAPESP “Estudos morfoanatómicos, metabólicos e moleculares como subsídios a sistemática de espécies de Asteraceae e acesso ao seu potencial farmacológico”, nº 2010/51454-3 e vigência 01/08/2011 a 31/07/2016. Neste projeto estão sendo avaliadas 20 espécies do gênero *Aldama/Viguiera*, sendo que 12 espécies foram selecionadas para avaliação do seu OE.

Um perfil geral da obtenção das amostras avaliadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* pode ser visualizado no Anexo 1.

3.1. Extração dos OE's

As extrações dos OE's (xilopódios, raízes, folhas e caules) foram realizadas por hidrodestilação, num sistema do tipo Clevenger adaptado, utilizando material vegetal fresco e picado (Figura 12). As massas dos órgãos vegetativos variaram de acordo com a disponibilidade de material no momento da coleta. O tempo de extração dos OE's foi de 3 horas, a partir do início da destilação.

Os OE's obtidos foram separados da fase aquosa com auxílio de Pipeta Pasteur, transferidos para frascos âmbar e condicionados em freezer.

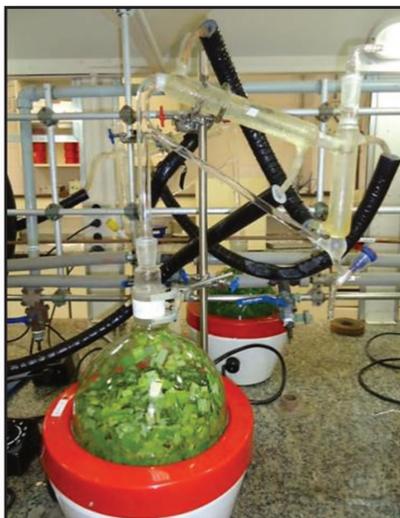


Figura 12. Extração de óleo essencial em sistema do tipo Clevenger.

3.2. Preparo do Extrato Clorofórmico (EC)

Para avaliar a ação de alguns diterpenos isolados de *A. arenaria* (Ambrósio, Schorr e da Costa, 2004), preparou-se o extrato clorofórmico das raízes.

A partir de 200 g de raízes tuberosas e não tuberosas previamente cortadas em pequenos pedaços, procedeu-se a extração em dispersor Ultra Turrax (IKA®) com 1L de clorofórmio, rotação 6000 rpm durante 3 minutos (Figura 13 A). Filtrou-se o extrato em funil de placa sinterizada e o resíduo da planta foi submetido a uma segunda extração com 800 mL de clorofórmio. Os extratos foram agrupados e secos em rotaevaporador a vácuo (Figura 13 B).

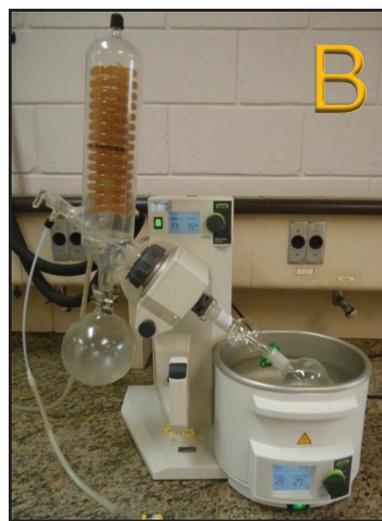
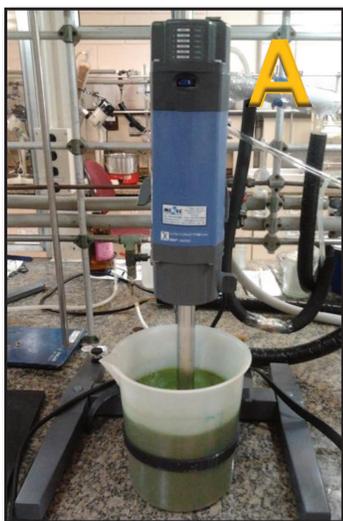


Figura 13. Preparo do EC. (A) Extração em dispersor; (B) Secagem em rotaevaporador.

3.3. Análises Cromatográficas

Todas as amostras (EC, OE's e respectivas frações) foram pesadas, solubilizadas em acetato de etila (20 mg.mL⁻¹) e analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para uma avaliação qualitativa.

Estas mesmas amostras também foram submetidas às análises por Cromatografia a Gás acoplada a Detector Seletivo de Massas (CG-EM) para determinação de sua composição química.

3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O principal mecanismo de separação está baseado no fenômeno de adsorção (Collins, Braga e Bonato, 2006). Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas, sendo também muito utilizada na análise de frações coletadas em cromatografia líquida clássica ou cromatografia preparativa (Degani, Cass e Viera, 1998).

As cromatofolhas de alumínio (20 x 20 cm) contendo como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®) foram cortadas com 10 cm de altura e as amostras aplicadas em ponto ou em banda, distantes cerca de 1 cm da base. As placas foram colocadas em cubas cromatográficas e após eluição por capilaridade com a fase móvel, diclorometano para OE's e frações ou mistura de hexano e acetato de etila na proporção 70:30 para EC e frações, as CCD's foram secas. A detecção dos compostos foi realizada por métodos físicos, através da análise sob luz UV a 254 e 366 nm, e métodos químicos, por meio de revelação da CCD com solução de Anisaldeído (Ácido acético glacial, Ácido sulfúrico e Anisaldeído na proporção 50:1:0,5), seguida de aquecimento por 5min a 105 °C (Wagner e Blatt, 1996).

Também foram calculados os fatores de retardamentos (Rf's) das substâncias. Este parâmetro expresso pela razão entre a distância percorrida pelas substâncias em relação a distância percorrida pela fase móvel é característico de cada substância. Valores ideais de Rf estão entre 0,4 e 0,6 (Degani, Cass e Viera, 1998).

3.3.2. Cromatografia a Gás acoplada ao Detector de Massas (CG-EM)

A cromatografia a gás é uma técnica utilizada para separar gases ou substâncias volatilizáveis e termicamente estáveis. Possui alto poder de resolução e a separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (Collins, Braga e Bonato, 2006 e Degani, Cass e Viera, 1998).

Para isto utilizou-se um cromatógrafo Agilent 6890 N e detector de espectrometria de massas Agilent 5975 e coluna HP5-MS (J&W Scientific) contendo 5% de Fenilmetilsiloxano, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme.

Para análise dos OE's e frações as condições cromatográficas foram: Temperaturas: injetor= 220°C, detector= 250°C, coluna= 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C e vazão do gás de arraste (He) 1,0 mL.min⁻¹. Já para o EC e frações da coluna clássica foram: Temperaturas: injetor= 250°C, detector= 300°C, coluna= 110°C, 5°C.min⁻¹, 280°C (26 min) e vazão do gás de arraste (He) 1,0 mL.min⁻¹. Para todas as análises o detector de espectrometria de massas foi operado com temperaturas: fonte 230 °C e quadrupolo 150 °C; e energia de ionização de 70 eV.

A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos espectros de massas das amostras com dados da biblioteca NIST-05 (National Institute of Standards and Technology). Para as amostras e frações de OE's também foram calculados os Índices Aritmético (IA) de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz (Figura 14), com co-injeção de padrão de hidrocarbonetos (C8 a C22) e dados descritos por Adams (2007).

$$IA = 100 \cdot C_{(n-1)} + \frac{[(Tr_{(x)} - Tr_{(Cn-1)}) \cdot (C_{(n)} - C_{(n-1)})] \cdot 100}{Tr_{(Cn)} - Tr_{(Cn-1)}}$$

Figura 14. Equação de Van den Dool utilizada para calcular o índice aritmético (IA), (Adaptado de Adams, 2007).

Legenda: C_{n-1}- Número de carbonos do hidrocarboneto n-1; Tr_(x)- Tempo de retenção do composto na amostra; Tr_(Cn-1)- Tempo de retenção hidrocarboneto n-1; C_n- Número de carbonos do hidrocarboneto n; Tr_(Cn)- Tempo de retenção hidrocarboneto n.

3.4. Fracionamento das amostras em Coluna cromatográfica

3.4.1. Fracionamento por Cromatografia em Coluna seca

Inicialmente optou-se por realizar uma pré-purificação das amostras utilizando uma coluna de membrana de acetato de celulose como suporte e sílica-gel como fase estacionária.

Este tipo de cromatografia fornece uma resolução moderada na separação dos constituintes e apresenta um bom rendimento de recuperação das frações (Foglio e colaboradores, 1999).

A coluna de membrana de acetato de celulose com diâmetro de 1,5 cm foi inicialmente limpa com hexano e após evaporação do solvente, empacotada a seco com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm Merck®). As amostras foram aplicadas separadamente e eluídas por gravidade com sistema de solvente previamente otimizado por CCD, até o solvente atingir o final da coluna (Figura 15).



Figura 15. Esquema do fracionamento por Cromatografia em Coluna seca. (A) *Cromatografia em coluna seca do EC* e (B) *Cromatografia em coluna seca do OEX1*.

Após eluição, a coluna foi cortada com auxílio de estilete em vários pedaços, de acordo com os Rf's determinados anteriormente por CCD. As frações resultantes foram extraídas com a fase móvel, filtradas em funil de placa sinterizada e o solvente removido em rotaevaporador a pressão reduzida (Tabela 1).

Tabela 1. Fracionamento do EC e OEX1 por cromatografia em coluna seca.

Amostra	Massa (g)	Altura (cm)	Frações	Fase móvel
EC	2,0363	45	9 frações de 5 cm	Hexano/Acetato de Etila (70:30)
OEX1	0,1800	25	5 frações de 5 cm	Diclorometano

Os fracionamentos dos OE's dos diferentes órgãos (OER, OEX e OEC) foram realizados de modo análogo ao descrito anteriormente, com exceção do OE dos caules, que não forneceu massa suficiente (Tabela 2).

Tabela 2. Fracionamento dos OE's dos diferentes órgãos vegetativos por cromatografia em coluna seca.

Amostra	Massa (mg)	Altura (cm)	Frações	Fase móvel
OER	688,2	35	7 frações de 5 cm	Diclorometano
OEX	312,2	35	7 frações de 5 cm	Diclorometano
OEC	---	---	Não fracionado	---
OEF	633,8	35	7 frações de 5 cm	Diclorometano

As frações foram então analisadas por CCD e CG-EM e submetidas aos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*.

3.4.2. Fracionamento por Cromatografia Clássica

Guiados pelos valores de TGI (Total Growth Inhibition) que indica a concentração necessária para inibir 100% do crescimento, e baseados nas análises por CCD e CG-EM, foi realizado o agrupamento das frações 3 e 4 para um novo fracionamento utilizando coluna clássica (Figura 16).

A coluna cromatográfica clássica geralmente utiliza como suporte uma coluna de vidro que é recheada com a fase estacionária e é desenvolvida sobre pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel líquida devido apenas a força da gravidade (Collins, Braga e Bonato, 2006). O principal mecanismo de separação é a adsorção, resultando num método de separação muito mais eficiente que o anterior e possibilitando o isolamento de alguns constituintes. Esta técnica é muito utilizada para isolamento de compostos oriundos de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas (Degani, Cass e Vieira, 1998).



Figura 16. Cromatografia em Coluna Clássica.

Para isto, utilizou-se uma coluna de vidro de 2,0 cm de diâmetro empacotada com sílica gel 60 (0,040-0,063 mm Merck®) e altura de 30 cm. Esta sílica, por possuir tamanho de partícula muito menor do que a anterior possui maior área de contato e conseqüentemente maior eficiência de separação. Para a eluição utilizou-se um gradiente de polaridade com hexano, misturas de hexano/acetato de etila e finalizando-se com acetato de etila (Tabela 3).

Tabela 3. Dados da purificação da Fração 3,4 por coluna clássica.

Amostra	Massa (g)	Frações	Volume coletado (mL)	Fase móvel
Fr 3,4	0,52	1 a 4	50 mL	Hexano
		5 e 6	50 mL	Hexano/Acetato de Etila (95:5)
		7 a 51	20 mL	Hexano/Acetato de Etila (95:5)
		52 a 55	50 mL	Hexano/Acetato de Etila (70:30)
		56 a 60	50 mL	Acetato de etila

Após análises por CCD as frações semelhantes foram agrupadas e concentradas em rotaevaporador a vácuo, analisadas por CG-EM e submetidas a novos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*. As frações mais puras enriquecidas em alguns compostos foram recristalizadas em metanol e submetidas às análises de identificação.

3.5. Testes de Atividade antiproliferativa *in vitro*

Os testes de atividade antiproliferativa foram realizados *in vitro* de acordo com o protocolo descrito por Monks e colaboradores (1991). Estes testes foram realizados pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP) sob orientação da Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.

As linhagens tumorais humanas [K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioma), 786-0 (rim)] foram doadas pelo NCI (*National Cancer Institute*, EUA) ao CPQBA/UNICAMP; além delas, foram empregadas três linhagens de células não-tumorais, a saber, célula epitelial de rim de macaco-verde (VERO), queratinócito humano (HaCaT) doado pelo prof. Dr. Ricardo Della Coletta (Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP–UNICAMP) e fibroblasto de camundongo (3T3) (Tabela 4).

Tabela 4: Linhagens celulares empregadas na avaliação da atividade antiproliferativa.

Organismo	Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária	DI (10 ⁴ cel.mL ⁻¹)
Humano	U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
	UACC-62	Pele; melanoma	Ectoderme	4,0
	MCF-7	Mama; adenocarcinoma	Ectoderme	6,0
	NCI-ADR/RES*	Ovário; adenocarinoma	Ectoderme	5,0
	786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
	NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
	PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
	OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
	HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
	K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima	6,0
	HaCaT	Pele (queratinócito)/Não tumoral	Ectoderme	4,0
Camundongo	3T3	Pele (fibroblasto)/Não tumoral	Ectoderme	4,0
Macaco	VERO	Rim (cel. epitelial)/ Não tumoral	Mesoderme	4,0

Legenda: DI- Densidade de Inoculação; * linhagem que apresenta resistência a múltiplos fármacos;

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm³ (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As amostras (extrato, óleos e frações) foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 100 mg.mL⁻¹. Estas soluções estoque foram diluídas em meio RPMI 1640/SFB 5% acrescido de 1mL.L⁻¹ de penicilina:estreptomicina (1000 U.mL⁻¹ :1000 µg.mL⁻¹, 1 mL.L⁻¹ RPMI 1640).

No ensaio antiproliferativo, 100 µL de cada suspensão celular foram inoculados, por compartimento, em placas de 96 compartimentos (Figuras 17), de acordo com as respectivas DI (Tabela 4). Após 24h, as amostras foram adicionadas (100 µL por compartimento) nas concentrações de 250, 25, 2,5 e 0,25 µg.mL⁻¹, em triplicata, e em seguida as placas foram incubadas, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por 48 horas (Monks e colaboradores, 1991).

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

Figura 17: Esquema de distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos.

Legenda: A coluna 1 (amarelo claro) representa o controle do meio de cultura contendo o branco do meio e a coluna 2 (amarelo escuro) o controle das células tumorais. Os poços em diferentes tonalidades de coloração azul contêm as substâncias testadas. Já os poços em coloração contendo diferentes tonalidades de vermelho referem-se ao controle das substâncias testes (branco das amostras).

Cada placa continha apenas uma linhagem celular o que possibilitou a avaliação de cinco amostras distintas em triplicata em cada placa, além de uma placa controle (T0). Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg.mL⁻¹ (100 µL/compartimento) em triplicata.

Ao término das aplicações das amostras e início do tratamento de 48 horas, a placa controle (T0) foi fixada através da adição de 50 μL /compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (m/v), para determinação da real quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas.

Ao final do tratamento, as células foram fixadas com 50 μL de TCA a 50% e incubadas 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. Após estas lavagens, as placas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem das placas, adicionou-se 50 μL /compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (m/v), dissolvido em ácido acético a 1% e as mesmas foram mantidas em temperatura ambiente, durante 30 minutos (Figura 18).

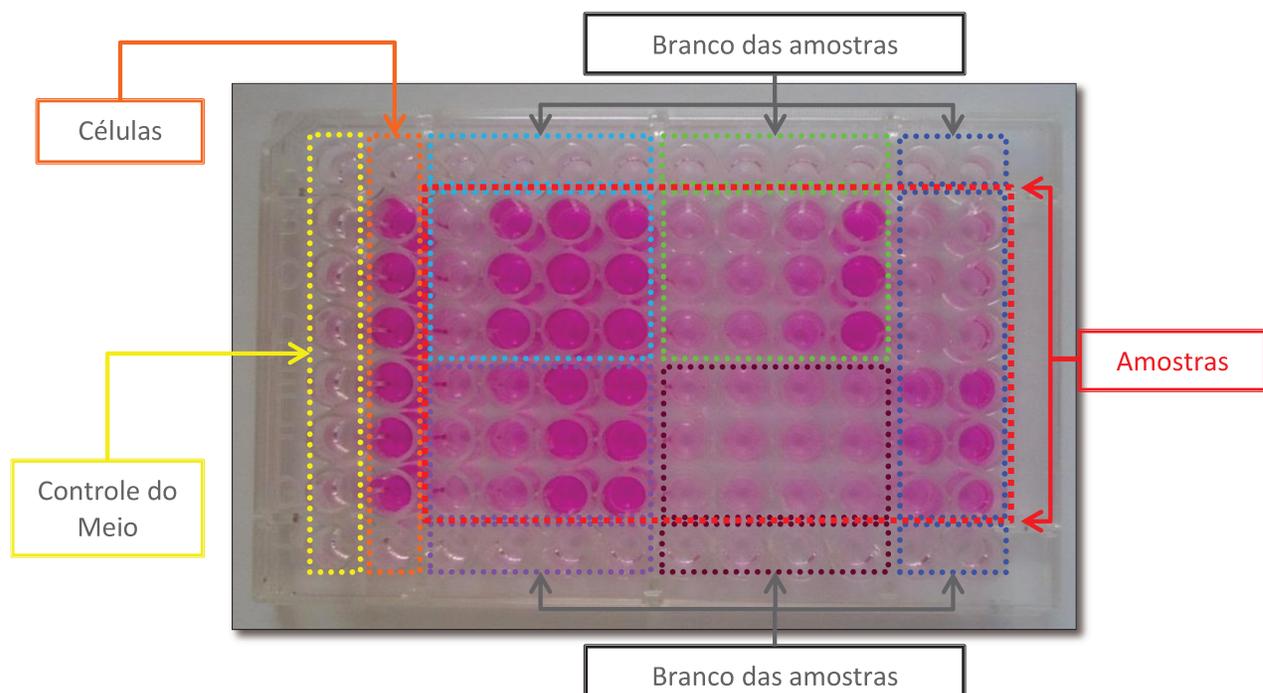


Figura 18: Placa de 96 compartimentos após 48h de tratamento de uma linhagem celular com as cinco amostras e coloração final com sulforrodamina B.

Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% para a completa remoção dos resíduos de SRB. Após secagem, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado pela adição de 150 μL

de solução de Trizma Base (10 μ M pH 10,5) e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm. A sulforrodamina B liga-se aos resíduos dos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação e, portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (RUBINSTEIN e colaboradores, 1990; SKEHAN e colaboradores, 1990).

Assim, para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas do valor de seus respectivos brancos e calculada a porcentagem de inibição de crescimento.

Sendo T a média da absorbância da célula tratada, CCel o controle de célula e T0 o controle das células no dia da adição das amostras, o resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se a porcentagem de crescimento. Desta forma:

Se $T > CCel$, a amostra estimulou o crescimento e, portanto, não apresentou inibição de crescimento;

Se $T \geq T0 < CCel$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T0) / (CC - T0)]$;

E se $T \leq T0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T0) / (T0)]$.

Com os dados obtidos, foram construídas curvas correlacionando o crescimento celular com a concentração das amostras.

Além disso, foram calculadas duas concentrações efetivas GI_{50} (do inglês *Growth Inhibition 50*, concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) e TGI (do inglês *Total Growth Inhibition*, concentração necessária para inibição total do crescimento celular) através de regressão não linear, do tipo sigmoidal, empregando-se software Origin versão 8.0 (Monks e colaboradores, 1991; Shoemaker, 2006).

3.6. Identificação dos compostos isolados

Os dois compostos isolados da coluna clássica (F8 contendo um ácido e F33 contendo um álcool) foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de 1H e ^{13}C), Infravermelho (IV) e Polarimetria. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química da UNICAMP e os resultados foram comparados com dados descritos por Matsuo e colaboradores (1976) e Ansell e colaboradores (1993).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro aparelho Bruker 250, operando a 250 MHz na frequência do hidrogênio e 62,5 MHz na frequência do carbono. As amostras foram diluídas e clorofórmio deuterado e os deslocamentos químicos (δ), foram expressos em ppm (partes por milhão) utilizando-se como referências o sinal do tetrametilsilano (TMS).

Os espectros no IV foram obtidos das amostras sólidas, em pastilhas de brometo de potássio (KBr), em equipamento Bomem MB-Series com resolução de 4 cm^{-1} e varredura de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

A determinação da rotação ótica foi realizada em Polarímetro Perkin Elmer 341 com caminho ótico de 10 mm e concentração da amostra $0,01\text{ g.mL}^{-1}$. Os solventes de diluição para a F8 e F 33 foram o clorofórmio e diclorometano, respectivamente.

A verificação dos pontos de fusão foi realizada em equipamento MicroQuímica MQAPF-301, com rampa de aquecimento de $5\text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até $100\text{ }^\circ\text{C}$ e $2\text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até a fusão total dos sólidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos OE's e EC de *A. arenaria* em fase de dormência

As amostras de OE's e EC obtidas na fase de dormência da planta permitiram obter resultados prévios da atividade antiproliferativa *in vitro* de *A. arenaria*. Dados complementares do preparo do extrato e extração dos OE's são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Obtenção do EC e OE's de *A. arenaria* em fase de dormência.

Órgão	Amostra	Massa de Planta (g)	Massa de EC/OE (g)	Rendimento (% m/m)
Raiz	EC	200,0	15,48	7,74
Raiz	OER1	700,0	4,66	0,67
Xilopódio	OEX1	432,0	0,61	0,14

Comparando-se os rendimentos obtidos para a extração dos OE's verificou-se que a raiz apresentou rendimento cerca de 5 vezes maior que o xilopódio (Figura 19).

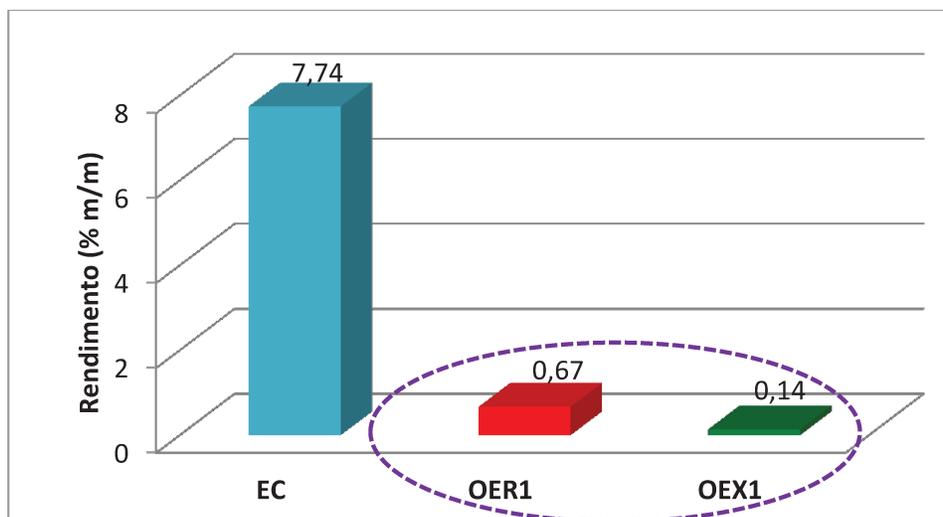


Figura 19. Rendimento do ECR e OE's obtidos de *A. arenaria*.

Estas amostras foram submetidas à análise qualitativa por CCD (Figura 20), e revelaram uma variação de composição das três amostras, demonstrando a presença de compostos similares no EC e OE's, na parte inferior da placa. Estas substâncias apresentavam mesma coloração e R_F (Fator de Retardamento) menor do que 0,30.

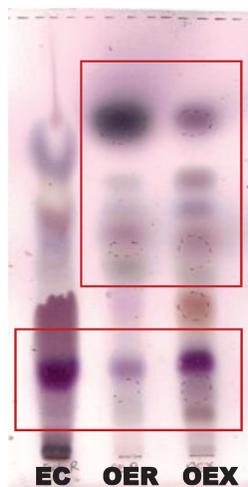


Figura 20. Cromatografia em camada delgada do EC e OE das raízes e xilopódios de *A. arenaria*. Fase móvel: Diclorometano e Revelador: Anisaldeído.

Avaliando-se os OE's do xilopódio e raízes, maior similaridade dos compostos estava na parte média/superior da placa (compostos com R_F maiores do que 0,45).

A análise do EC por CG-EM permitiu identificar a presença dos sesquiterpenos cipereno (204 g.mol^{-1}) e carotol (222 g.mol^{-1}), que também foram identificados nos OE's (Anexos 2 a 4). A maioria dos demais compostos pertence à classe dos diterpenos já descritos por Ambrósio e colaboradores, (2004). Quanto aos OE's da raiz e xilopódio por CG-EM, verificou-se mono, sesqui e diterpenos (Tabela 6).

Tabela 6. Compostos majoritários identificados por GC-EM nos OE's das raízes e xilopódios de *A. arenaria* em fase de dormência.

Composto	MM (g.mol^{-1})	% Área relativa		Comparação IA	
		OER1 (Raízes)	OEX1 (Xilopódios)	IA _{calculado}	IA _{Adams}
α -Pineno	136	42,44	38,20	936	932
β -Pineno	136	13,51	8,53	978	974
δ -3-Careno	136	11,30	4,41	1011	1008
Limoneno	136	6,86	5,86	1028	1024
Monoterpenos		74,11	57,00		
Cipereno	204	5,80	1,82	1396	1398
Carotol	222	3,44	12,89	1594	1594
Sesquiterpenos		9,24	14,71		
Pimara-8(14),15-dieno	272	0,50	2,83	1940	1948
8 β -Podocarpan-8-ol	290	t	1,83	nc	-
Pimaral	286	t	2,21	nc	-
ent-8(14),15-pimaradien-3 β -ol	288	t	7,54	nc	-
Diterpenos		0,50	14,41		
Total		83,85	86,12		

Legenda: MM= Massa molecular em g.mol^{-1} ; IA= Índice aritmético; t= traços; nc= não calculado.

Estes resultados mostraram que 74,1% dos compostos identificados no OE das raízes eram monoterpenos enquanto que nos xilopódios, esta porcentagem foi de 57,0%. A porcentagem de sesquiterpenos observada para o OER e OEX1 foi 9,2% e 14,7%, respectivamente. Já diterpenos, o OEX1 possui 14,4% e o OER apenas 0,5%.

As amostras de EC, OER1 e OEX1 foram submetidas aos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e resultaram em curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras que variaram de 0,25 a 250 µg/mL (Figura 21).

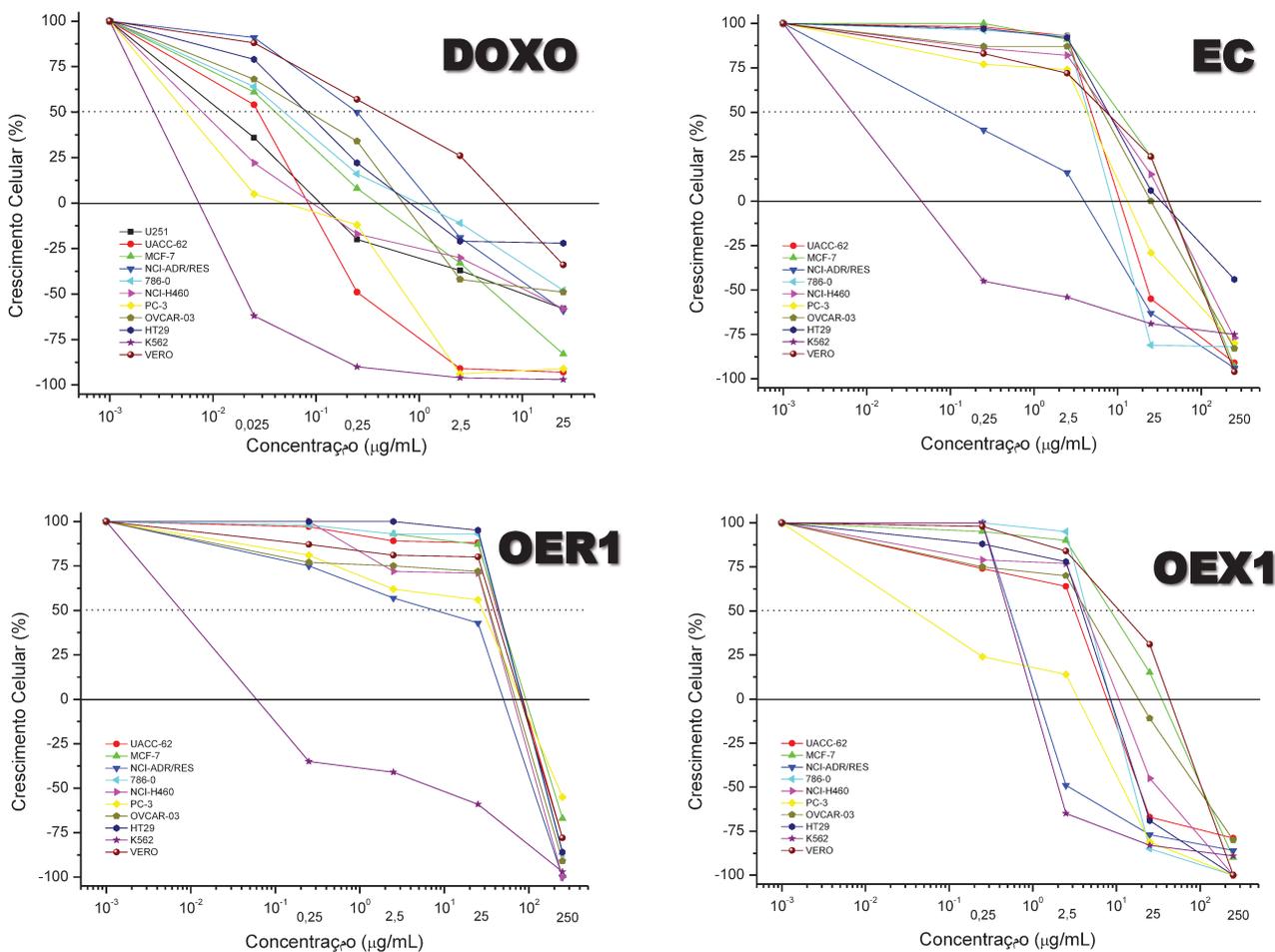


Figura 21. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (DOXO) Doxorrubicina, quimioterápico de referência; (EC) Extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria*; (OER) Óleo essencial obtido das raízes de *A. arenaria*; e (OEX1) Óleo essencial obtido dos xilopódios de *A. arenaria*.

Legenda: UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

A doxorubicina (Figura 22) foi utilizada como controle positivo dos testes. Esta substância é um antineoplásico de amplo espectro que exerce efeito citotóxico, agindo sobre a replicação, transcrição e fragmentação do DNA. Através dela podemos verificar se os resultados são adequados ou não.

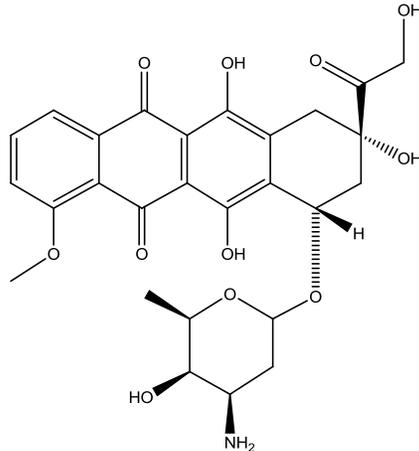


Figura 22. Estrutura do quimioterápico doxorubicina, controle positivo dos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*.

Outros quimioterápicos também podem ser utilizados como controle positivo do teste, porém seu mecanismo de ação pode ser diferente do apresentado para a doxorubicina (Figura 23).

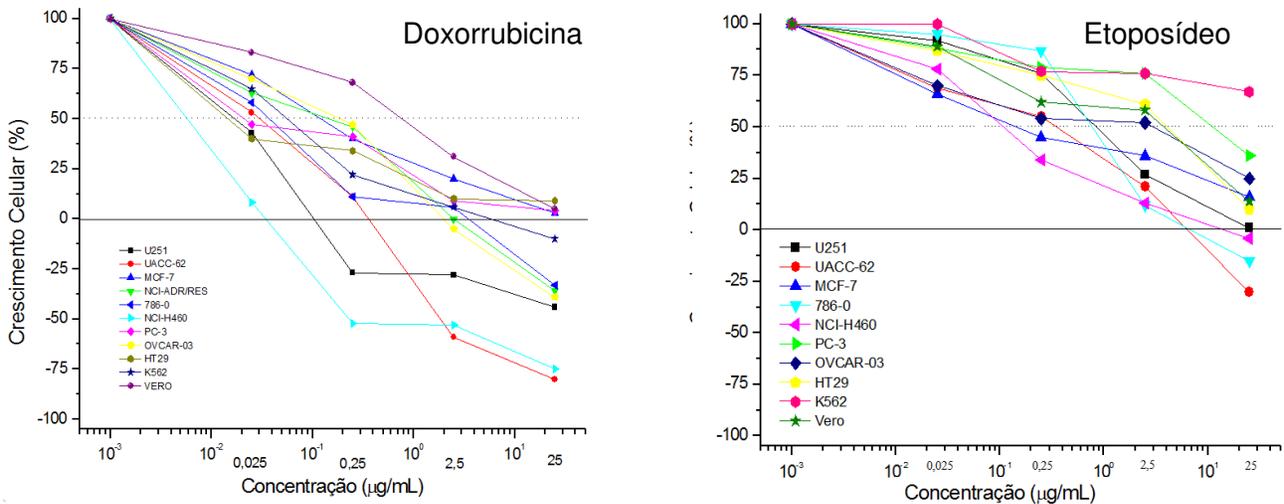


Figura 23. Curvas de crescimento celular em função da concentração de alguns quimioterápicos de referência.

Legenda: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCA-3 (ovário), U251 (glioma), 786-0 (rim) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

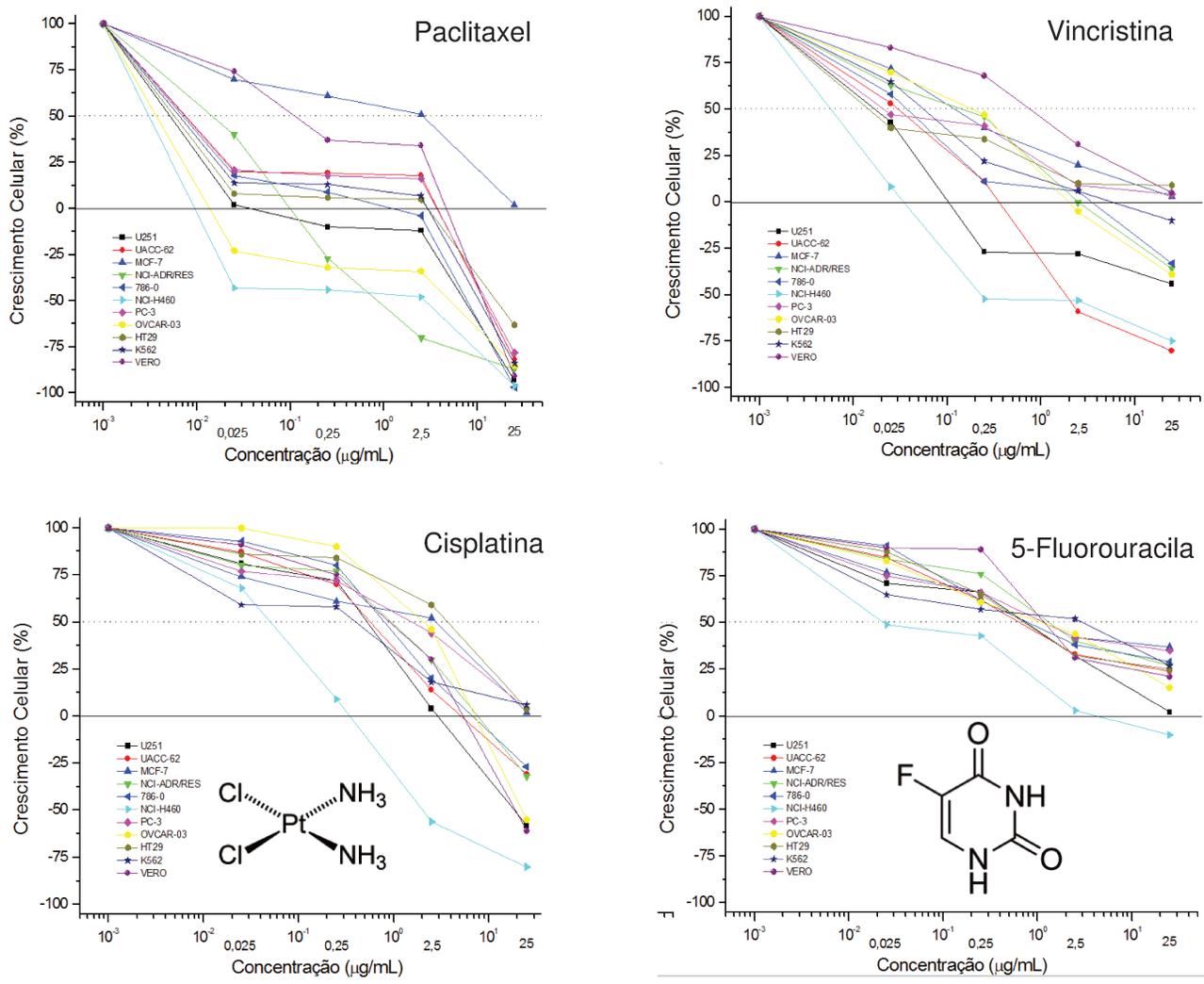


Figura 23. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração de alguns quimioterápicos de referência.

Legenda: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioma), 786-0 (rim) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

A DOXO apresenta elevada potência e seletividade mesmo em baixas concentrações. Através do gráfico de concentração/resposta (Figura 21) obtido destes experimentos podemos perceber que a linhagem NCI/ADR-RES (linhagem de ovário resistente a múltiplos fármacos) foi a mais resistente a este quimioterápico, enquanto a linhagem UACC-62 (melanoma) foi a mais sensível.

Os gráficos do EC, OER1 e OEX1 permitem inferir que todas as amostras avaliadas apresentaram atividades citostática e citocida.

Dentre as amostras, o OEX demonstrou maior atividade uma vez que na terceira concentração avaliada ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) já se observou ação citocida para a maioria das linhagens. Estes resultados foram confirmados quando avaliamos os valores de TGI (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos para o EC, OER1 e OEX1 de *A. arenaria*, em cultura de células tumorais humanas.

	UACC-62	MCF-7	NCI/ADR	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	VERO
DOXO	0,09	0,43	1,62	0,22	0,07	0,85	1,97	6,13
EC	13,21	34,50	2,39	32,81	14,41	25,34	44,86	33,73
OER1	92,25	104,34	40,76	43,82	71,29	59,46	96,40	80,92
OEX1	7,57	31,01	1,58	11,62	1,44	18,36	8,86	34,58

Legenda: DOXO: Doxorubicina, quimioterápico de referência; EC: Extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria*; OER: Óleo essencial obtido das raízes de *A. arenaria*; OEX1: Óleo essencial obtido dos xilopódios de *A. arenaria*; UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

A avaliação da resposta da atividade antiproliferativa *in vitro* em função das concentrações estudadas foi baseada em um estudo realizado por Fouche e colaboradores (2008).

Neste trabalho os autores apresentaram uma avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* de extratos de 7500 plantas da África do Sul, representando 700 espécies de plantas, contra as linhagens de mama (MCF7), rim (TK10) e melanoma (UACC62), linhagens selecionadas por serem altamente sensíveis na detecção da atividade anticancerígena.

Os extratos que exibiram inibição de crescimento superior a 75% (GI_{75}) para duas ou mais linhagens, 950, foram selecionados para testes no NCI contra 60 linhagens tumorais, organizadas em sub-painéis, representando: leucemia, melanoma, pulmão, cólon, rim, ovário, sistema nervoso central, mama e próstata.

Os resultados obtidos destes 950 extratos foram separados em 4 categorias (Tabela 8) e demonstraram que a maioria dos extratos avaliados que apresentaram atividade moderada ou potente faziam parte da família das Asteraceae. A maioria dos extratos aquosos não apresentou qualquer atividade.

Tabela 8. Classificação da atividade antiproliferativa *in vitro* de acordo com os valores de TGI (Fouche e colaboradores, 2008).

Valores de TGI	Atividade
$> 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Inativa (I)
$15 \mu\text{g.mL}^{-1} < \text{TGI} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Fraca (F)
$6,25 \mu\text{g.mL}^{-1} < \text{TGI} < 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Moderada (M)
$\text{TGI} < 6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Potente (P)

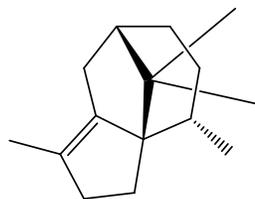
Utilizando-se como referência este trabalho e avaliando-se os valores de TGI obtidos para as amostras de EC e OE's de *A. arenaria*, observou-se que estas apresentavam ação antiproliferativa *in vitro* para todas as linhagens tumorais, sendo citocida na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Verificamos também que o OER1 foi o menos ativo dentre as amostras avaliadas, apresentando em sua maioria valores de TGI maiores do que $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O EC apresentou boa atividade, com valores de TGI de 2,4 a $44,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Contudo, resultados mais promissores foram observados para o OE dos xilopódios (OEX1).

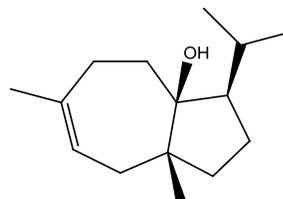
Neste caso, o OEX1 apresentou atividade fraca para as linhagens de mama (MCF-7, TGI= $31,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ovário (OVCAR-3, TGI= $18,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e moderada para melanoma (UACC-62, TGI= $7,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pulmão (NCI-H460, TGI= $11,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e cólon (HT29, TGI= $8,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Para as linhagens de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES, TGI= $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e próstata (PC-3, TGI= $1,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) esta mesma amostra apresentou alta seletividade e potência.

Para a linhagem de células normais (VERO) a concentração efetiva do OEX foi cerca de 5,5 vezes maior do que aquela observada para a doxorrubicina, sugerindo menor toxicidade frente às células normais. Este é um fato muito importante, já que a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto sadias (Almeida e colaboradores, 2005b).

Quanto à composição química determinada por GC-EM foi possível relacionar a interessante atividade destas amostras com a presença de alguns compostos terpênicos, destacando-se o cipereno e carotol, compostos identificados tanto no EC quanto nos OE's (Figura 24).



Cipereno (MM 204 g.mol⁻¹)



Carotol (MM 222 g.mol⁻¹)

Figura 24. Estruturas dos compostos cipereno e carotol identificados por CG-EM.

4.2. Fracionamento do OEX1 e EC por cromatografia em coluna seca

Sabendo-se que o OEX1 e EC apresentaram os melhores valores de TGI e com o objetivo de isolar alguns compostos potencialmente ativos, efetuou-se o fracionamento destes por cromatografia em coluna seca que resultaram em cinco e nove frações, respectivamente (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Resultados do fracionamento do OEX1 por cromatografia em coluna seca.

Amostra	Fração	Código	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
OEX1	1	Fr1 CS OEX1	80,7	44,83
	2	Fr2 CS OEX1	38,8	21,56
	3	Fr3 CS OEX1	14,4	8,00
	4	Fr4 CS OEX1	29,8	16,56
	5	Fr5 CS OEX1	5,0	2,78
Rendimento Total (% m/m)				90,94

Tabela 10. Resultados do fracionamento do EC por cromatografia em coluna seca.

Amostra	Fração	Código	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
EC	1	Fr1 CS EC	45,8	2,25
	2	Fr2 CS EC	933,4	45,84
	3	Fr3 CS EC	434,2	21,32
	4	Fr4 CS EC	117,5	5,77
	5	Fr5 CS EC	44,9	2,20
	6	Fr6 CS EC	68,6	3,37
	7	Fr7 CS EC	85,1	4,18
	8	Fr8 CS EC	61,2	3,01
	9	Fr9 CS EC	104,5	5,13
Rendimento Total (% m/m)				93,07

Avaliando os rendimentos da cromatografia em coluna seca do OEX1, percebeu-se que as frações de baixa e média polaridade (Fr1 a Fr 3) representaram cerca de 74% da massa recuperada. Este perfil também foi observado na cromatografia em coluna seca do EC, com cerca de 75% de recuperação nas frações Fr1 a Fr4 (Figura 25).

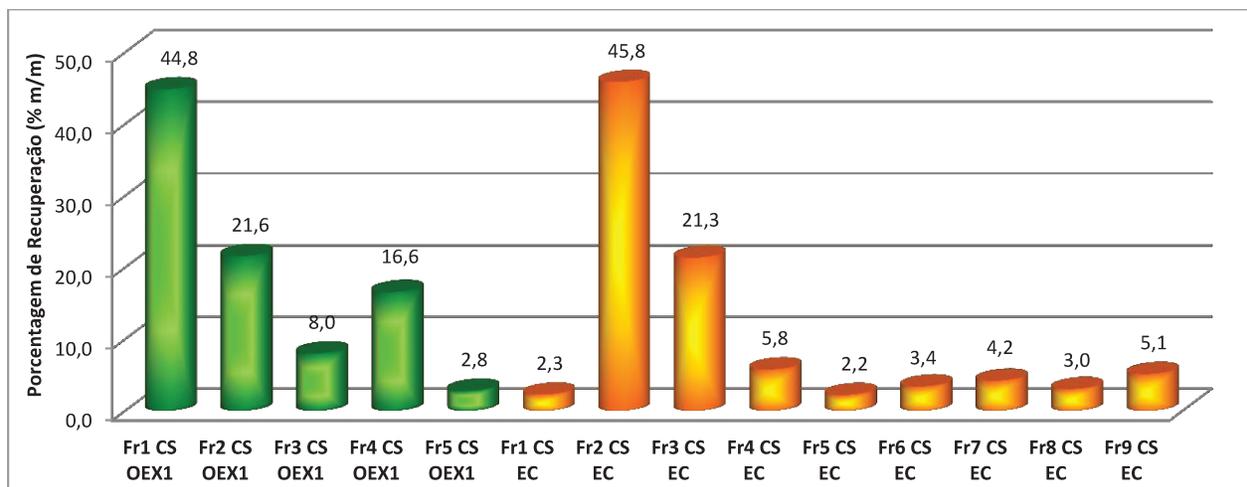


Figura 25. Gráfico dos rendimentos dos fracionamentos do EC e OEX1 por coluna cromatográfica do tipo seca.

Apesar das CCD's terem sido avaliadas em diferentes fases móveis (Figuras 26A e 26B) observa-se que as substâncias estão bem dispersas na placa, demonstrando resolução entre as bandas.

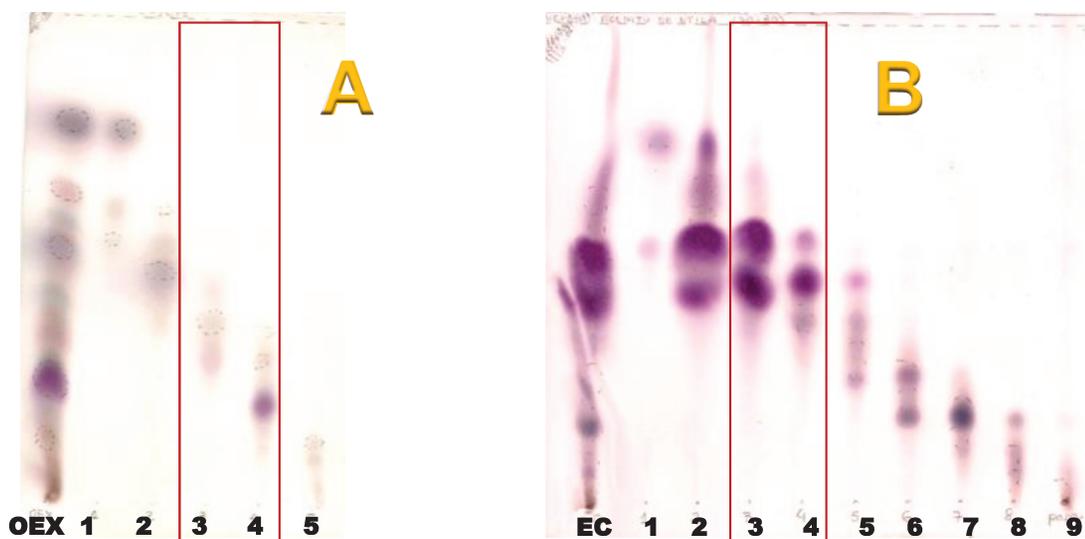


Figura 26. CCD's das frações do OEX1 e EC por cromatografia em coluna seca. A- Fase móvel diclorometano. B- Fase móvel hexano/acetato de etila (70:30).

As análises por CCD das duas colunas apresentaram composição química diferenciada, porém com a presença de alguns compostos de mesma coloração, que são comuns tanto no EC como no OEX1, principalmente nas frações Fr3 e Fr4 CS OEX1 e Fr3 e Fr4 CS EC destacadas nas figuras 26A e 26B.

Estas amostras foram submetidas aos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e forneceram os gráficos de crescimento celular em função da concentração (Figura 27).

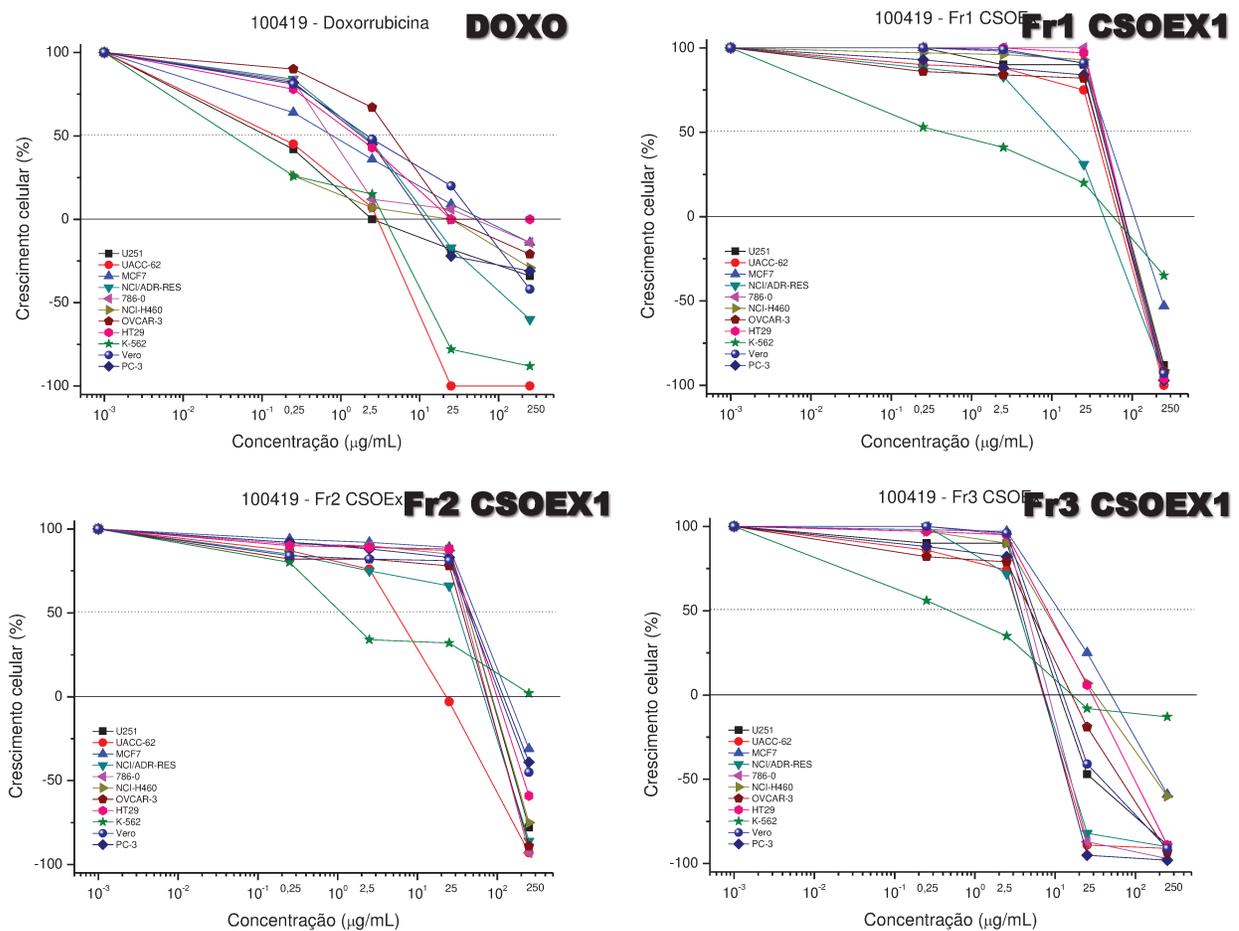


Figura 27. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (DOXO) Doxorubicina, quimioterápico de referência; (Fr 1 a Fr 3 CS OEX1) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do óleo essencial dos xilopódios de *A. arenaria* (CS OEX1).

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

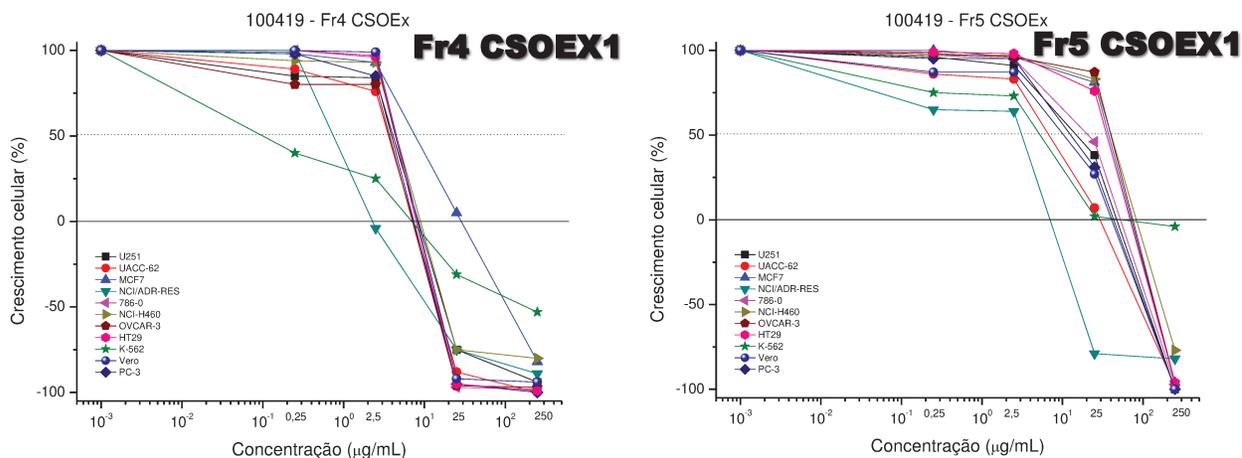


Figura 27. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (Fr 4 e Fr 5 CS OEX1) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do óleo essencial dos xilopódios de *A. arenaria* (CS OEX1).

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

As frações resultantes do fracionamento do EC também apresentaram atividade antiproliferativa (Figura 28).

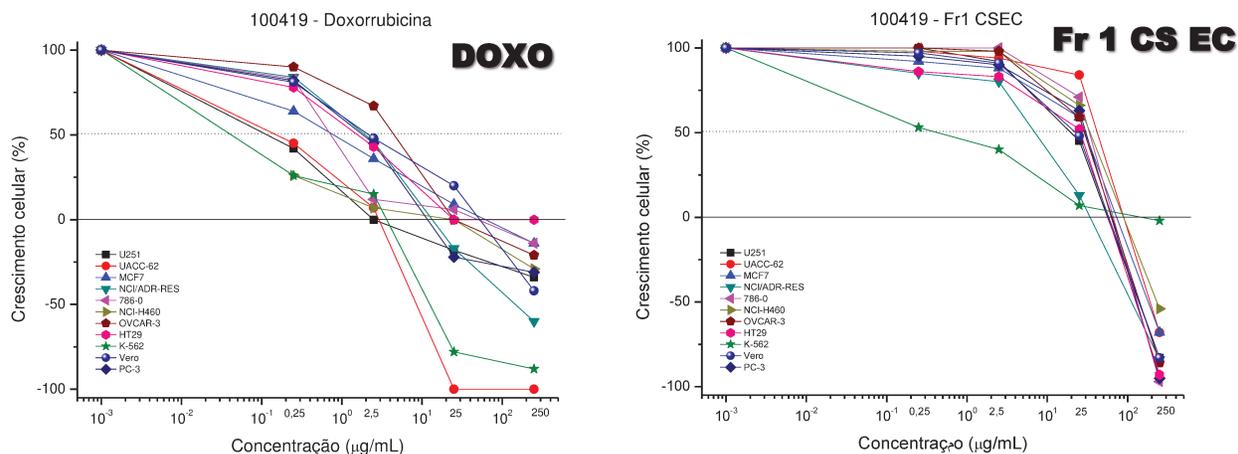


Figura 28. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorrubicina; (Fr 1 CS EC) Fração obtida da coluna cromatográfica do tipo seca do extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria* (CS EC).

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

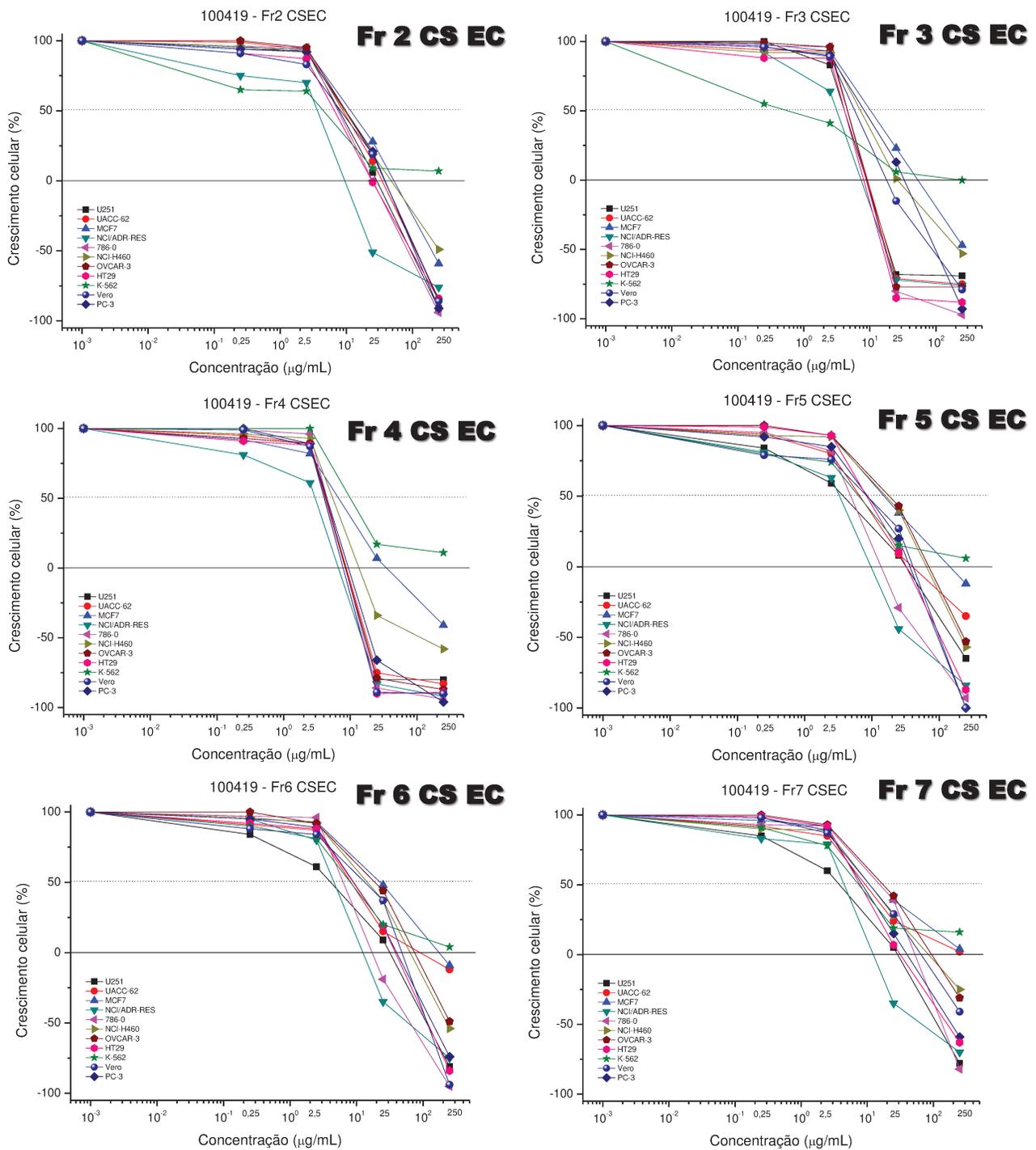


Figura 28. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (Fr 2 a Fr 7 CS EC) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria* (CS EC).

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

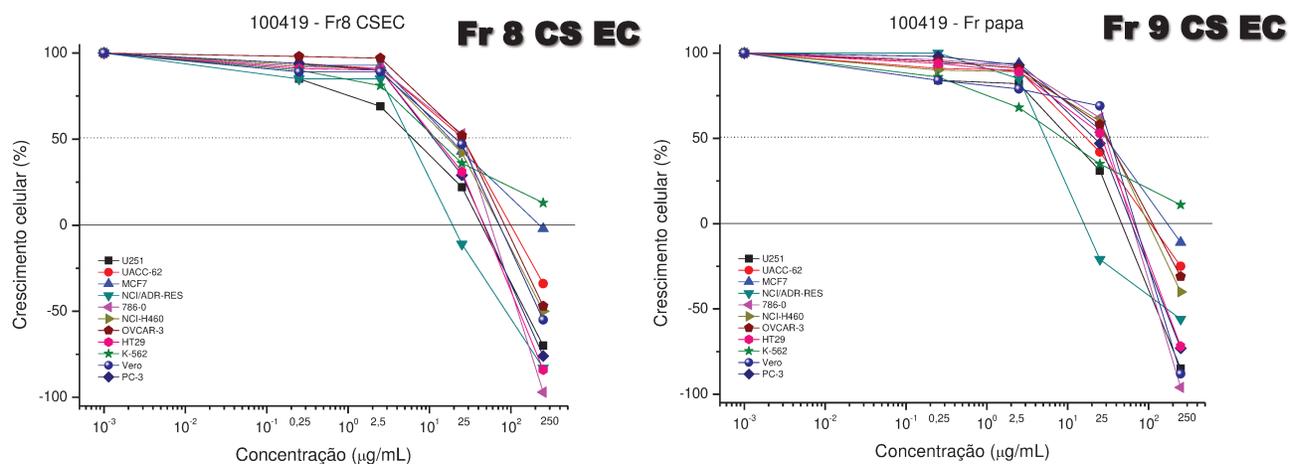


Figura 28. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das amostras. (Fr 8 e Fr 9 CS EC) Frações obtidas da coluna cromatográfica do tipo seca do extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria* (CS EC).

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

Estes gráficos demonstram que todas as frações provenientes do fracionamento do OEX1 e EC apresentaram ação citocida.

As frações Fr 1, Fr2 e Fr 5 da CSOX1 e Fr1, Fr2, e Fr5 a Fr9 da CSEC foram ativas entre as concentrações de 25 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Já as frações Fr3 e Fr4 da CSOEX1 e CSEC foram mais promissoras, com ação antiproliferativa entre as concentrações de 2,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a maioria das linhagens.

Dentre as frações avaliadas, algumas foram inativas apresentando valores de TGI maiores do que 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabelas 11 e 12).

Estes valores de TGI confirmaram que as frações 3 e 4 de ambos os fracionamentos foram mais ativas do que as demais, apresentando em sua maioria valores de TGI menores do que 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando forte atividade em baixa concentração.

No caso específico da linhagem de leucemia (K-562), os valores apresentados para as frações 3 e 4 obtidas da cromatografia em coluna seca do OEX1 foram melhores do que os apresentados para as mesmas frações da cromatografia em coluna seca do EC.

Tabela 11. Valores de TGI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) das frações da cromatografia em coluna seca do OEX1 de *A. arenaria*, em cultura de células tumorais humanas.

	U251	UACC-62	MCF-7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	VERO
DOXO	0,25	0,17	5,98	2,50	4,27	2,50	2,19	2,50	2,50	0,17	4,19
OEX	10,82	2,43	38,85	6,44	15,92	13,74	7,03	20,40	13,68	8,30	10,44
Fr1 CSOEX	82,12	41,97	131,47	37,13	178,92	82,86	58,61	66,05	82,43	40,94	75,40
Fr2 CSOEX	92,25	21,66	162,73	60,29	67,49	94,30	136,64	66,41	116,22	235,00	122,77
Fr3 CSOEX	13,56	6,32	49,34	6,91	9,48	35,62	6,11	17,18	27,54	37,42	15,97
Fr4 CSOEX	8,96	6,58	28,13	2,60	7,91	10,58	6,38	5,78	8,19	6,01	10,53
Fr5 CSOEX	34,89	26,53	58,25	6,52	39,55	86,21	32,43	63,78	54,58	105,67	33,16

Legenda: DOXO: Doxorubicina, quimioterápico de referência; OEX: Óleo essencial dos xilopódios de *A. arenaria*; Fr 1 a Fr 5 CSOEX, frações obtidas do fracionamento do OEX por coluna cromatográfica seca; U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (côlon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

Tabela 12. Valores de TGI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) das frações da cromatografia em coluna seca do EC de *A. arenaria*, em cultura de células tumorais humanas.

	U251	UACC-62	MCF-7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	VERO
DOXO	0,25	0,17	5,98	2,50	4,27	2,50	2,19	2,50	2,50	0,17	4,19
EC	37,36	46,03	54,39	14,90	35,55	58,82	34,91	41,32	19,49	224,12	35,56
Fr1 CSEC	48,83	98,26	69,84	30,01	49,62	92,40	49,11	55,20	46,43	100,01	50,68
Fr2 CSEC	27,28	31,83	51,18	10,04	25,03	51,06	33,36	33,94	24,75	212,07	33,23
Fr3 CSEC	9,71	11,05	56,36	7,24	10,87	35,63	29,71	11,19	8,32	108,71	20,55
Fr4 CSEC	9,14	9,77	45,44	5,95	9,96	16,86	10,95	9,27	7,61	235,59	7,63
Fr5 CSEC	26,46	52,19	144,53	10,11	15,53	62,31	31,30	68,96	29,85	212,38	34,24
Fr6 CSEC	23,81	104,75	175,06	14,37	20,08	62,24	37,01	73,89	34,05	199,14	39,51
Fr7 CSEC	22,51	193,51	244,64	14,45	45,84	91,28	41,04	98,04	34,61	> 250	66,70
Fr8 CSEC	35,64	102,82	207,75	20,99	42,49	70,27	42,39	85,48	40,44	> 250	70,00
Fr9 CSEC	39,90	110,22	175,88	22,16	47,26	102,98	56,44	117,52	61,61	> 250	60,47

Legenda: DOXO: Doxorubicina, quimioterápico de referência; EC: Extrato clorofórmico das raízes de *A. arenaria*; Fr 1 a Fr 9 CSEC, frações obtidas do fracionamento do EC por coluna cromatográfica seca; U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (côlon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

Dentre as frações obtidas a partir do OEX1, a fração 4 foi a mais ativa, inibindo o crescimento da maioria das linhagens tumorais com TGI entre 2,60 e 28,13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta fração também se apresentou mais potente do que o OEX, sugerindo que os compostos ativos foram reunidos preferencialmente nesta fração.

Avaliando-se a composição química das frações do OEX1, determinada por CG-EM, verificamos que a Fr 1 estava enriquecida em monoterpenos, destacando-se o α -pineno (19,3%). Já as Fr 2 e Fr 5, mais ricas em sesquiterpenos, apresentaram como majoritários os compostos carotol (72,1%) e daucol (68,1%), respectivamente. Estas três frações apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* menor do que o OE bruto (Figura 29).

Por outro lado, a Fr 3, com atividade similar ao OEX1, revelou-se rica em carotol (37,5 %) enquanto que na Fr4, mais ativa do que o OEX1, foi detectado um álcool diterpênico, o *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol, de MM 288 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (61,0%) (Figura 29). Estas frações apresentaram atividade potente e moderada para a maioria das linhagens celulares avaliadas.

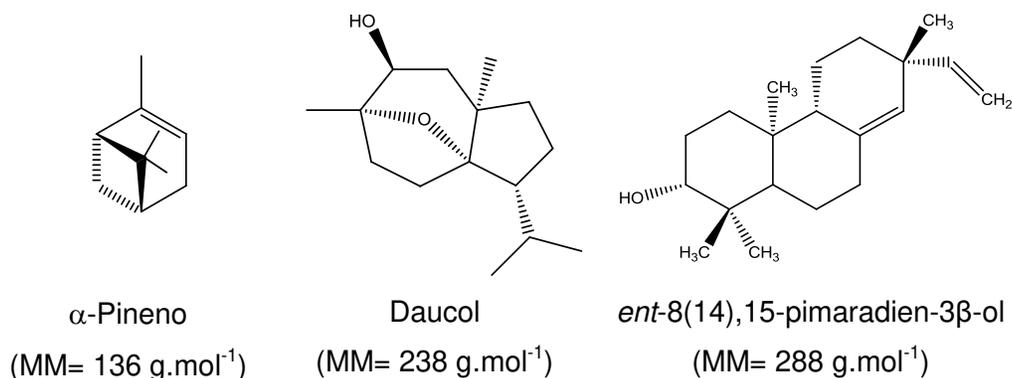


Figura 29. Estruturas de alguns compostos identificados por CG-EM nas frações obtidas da coluna cromatográfica seca do OE dos xilopódios.

Os dados citados anteriormente permitiram inferir que a espécie possuía potencial antiproliferativo *in vitro* e que o fracionamento tanto do EC quanto do OEX potencializou e direcionou esta ação.

Com o objetivo de isolar alguns constituintes e possivelmente identificar o princípio ativo, optou-se pela purificação das amostras mais ativas oriundas das colunas cromatográficas do tipo seca do OEX1 e EC.

4.3. Fracionamento da Fr 3,4 por cromatografia de coluna clássica

Sabendo-se que as frações mais promissoras, Fr 3 e 4 de ambas as colunas apresentaram perfil semelhante de sua constituição química e atividade, representados pelos valores de TGI's, decidiu-se por agrupá-las, originando a Fração 3,4 agrupada (Figura 30). Nesta CCD é possível visualizar dois compostos majoritários, um de coloração roxa (Rf 0,40) e outro de coloração cinza e rosa (Rf 0,47).



Figura 30. Frações 3 e 4 das cromatografias em coluna seca do EC e OEX1 agrupadas. Fase móvel hexano/acetato de etila (70:30).

A análise por CG-EM, desta fração (Anexo 5) apresentou dois compostos majoritários com massa molecular 302 e 288 g.mol⁻¹ (Figuras 31 e 32).

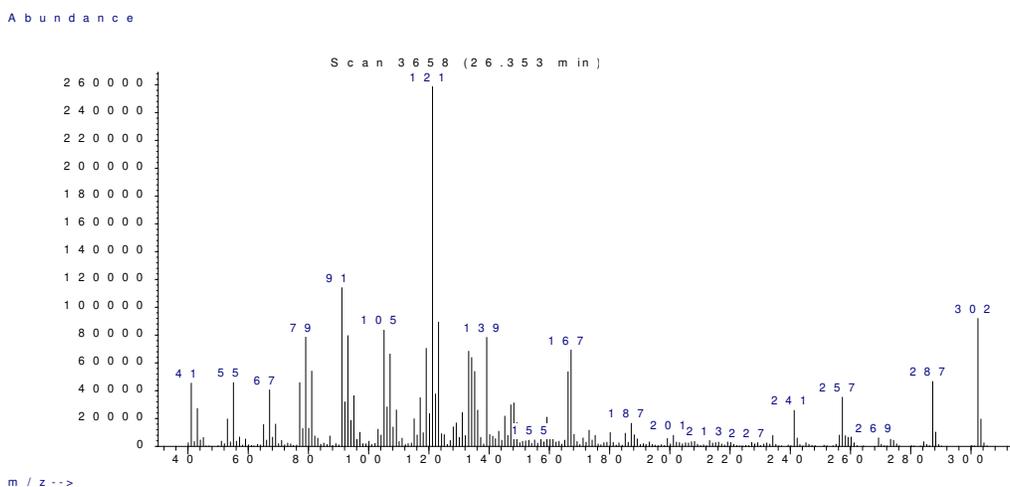


Figura 31. Espectro de massas obtido por CG-EM para o composto com tempo de retenção 26,35 min, contido na Fração 3,4 agrupada.

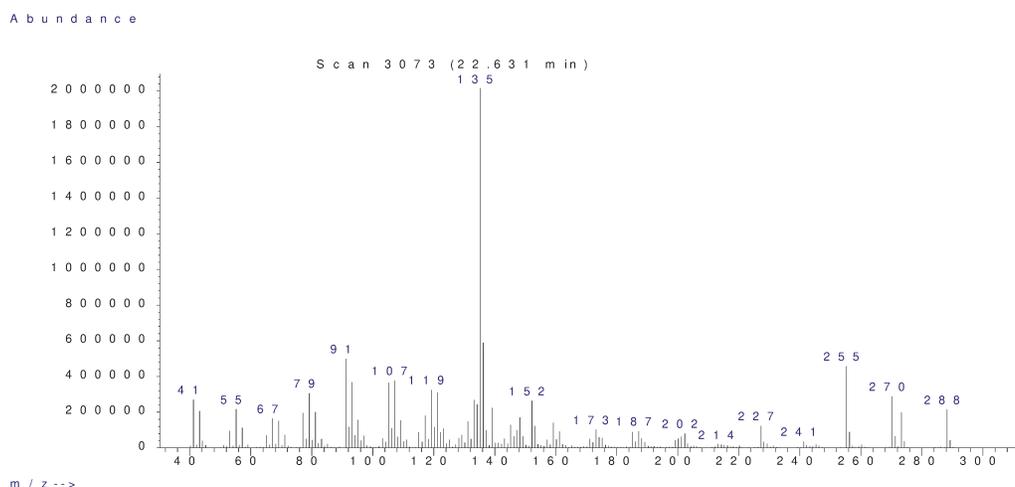


Figura 32. Espectro de massas obtido por CG-EM para o composto com tempo de retenção 22,63 min, contido na Fração 3,4 agrupada.

Esta fração 3,4 combinada foi purificada por cromatografia em coluna clássica originando 60 frações. Após avaliação por CCD estas amostras foram agrupadas e analisadas novamente por CCD (Figura 33).

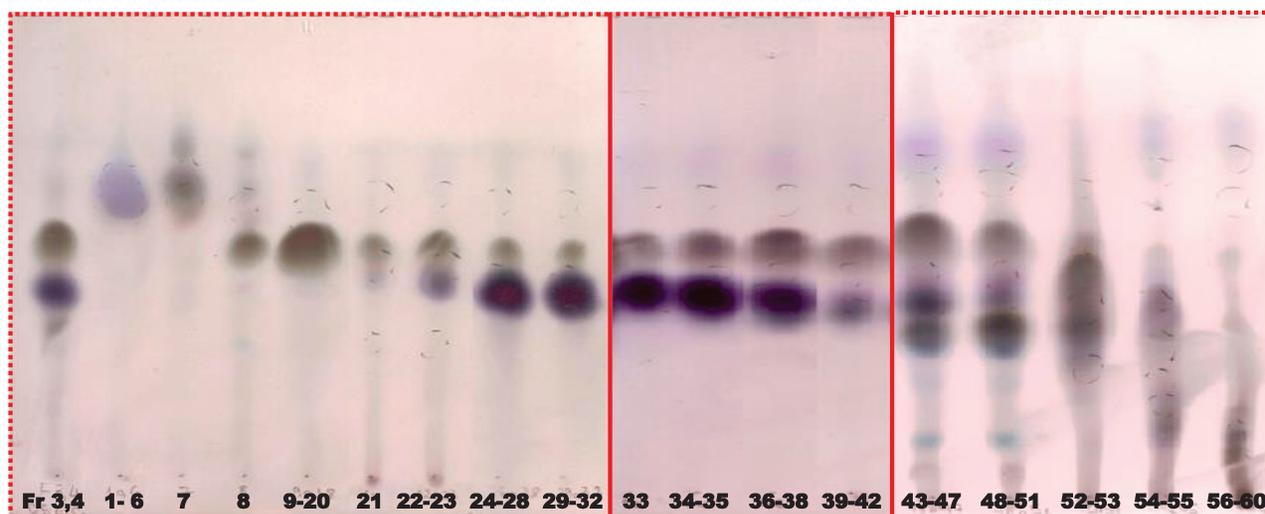


Figura 33. CCD's das frações obtidas da coluna clássica da Fração 3,4 agrupadas da cromatografia em coluna seca do EC e OEX1. *Fase móvel hexano/acetato de etila (70:30)*.

Nesta CCD é possível visualizar a distribuição dos compostos entre as frações. Após secagem em rotaevaporador a vácuo o rendimento de recuperação foi cerca 98% (Tabela 13).

Tabela 13. Frações obtidas do fracionamento da Fr3 e 4 agrupada por coluna clássica.

Amostra	Fração	Código	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
Fr 3,4 agrupada	1 a 6	Fr 1 a 6 CC	28,4	5,50
	7	Fr7CC	11,9	2,30
	8	Fr8CC	7,8	1,51
	9 a 20	Fr 9 a 20 CC	177,8	34,42
	21	Fr 21 CC	6,8	1,32
	22 e 23	Fr 22 e 23 CC	13,3	2,57
	24 a 28	Fr 24 a 28 CC	88,7	17,17
	29 a 32	Fr 29 a 32 CC	47,2	9,14
	33	Fr 33 CC	8,2	1,59
	34 e 35	Fr 34 e 35 CC	11,6	2,25
	36 a 38	Fr 36 a 38 CC	8,3	1,61
	39 a 42	Fr 39 e 42 CC	6,3	1,22
	43 a 47	Fr 43 e 47 CC	6,3	1,22
	48 a 51	Fr 48 e 51 CC	5,1	0,99
	52 e 53	Fr 52 e 53 CC	46,9	9,08
	54 e 55	Fr 54 e 55 CC	8,1	1,57
	56 a 60	Fr 56 a 60 CC	22,5	4,36
	Rendimento Total (% m/m)			

Avaliando-se as massas recuperadas foi possível verificar que as frações 9-20 e 24-24 constituíam mais de 50%, frações estas enriquecidas nos dois compostos citados anteriormente (Figura 34). Assim, as frações 8 e 33 mais puras nestes compostos foram então recristalizadas em metanol e submetidas à análises de identificação (Item 4.3).

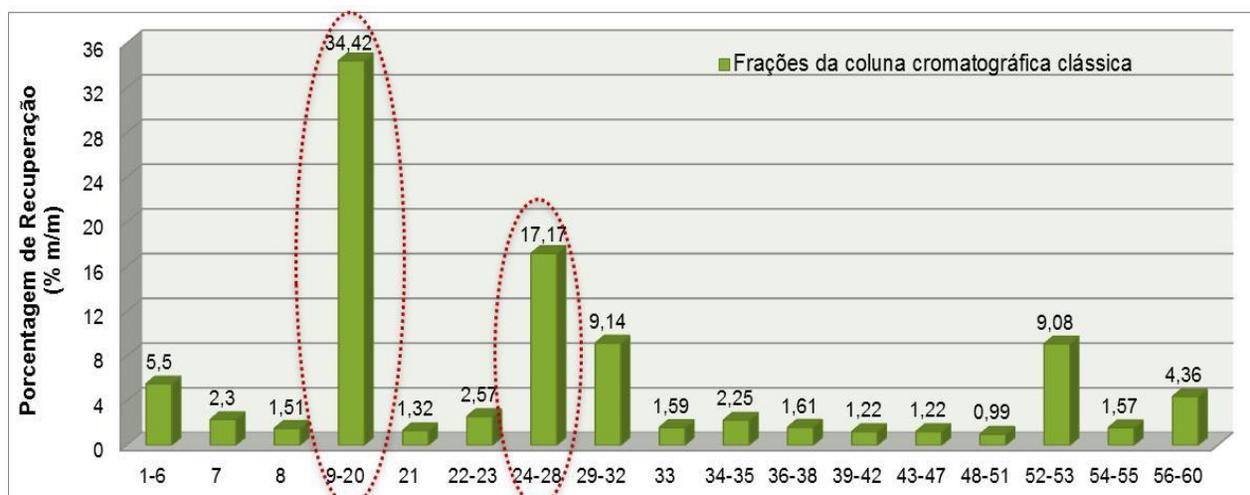


Figura 34. Rendimento da purificação da Fr 3,4 por coluna clássica. Em destaque as frações enriquecidas nos compostos de massas moleculares 288 e 302 g.mol⁻¹.

As frações em destaque na tabela 13 foram submetidas aos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* (Figura 35).

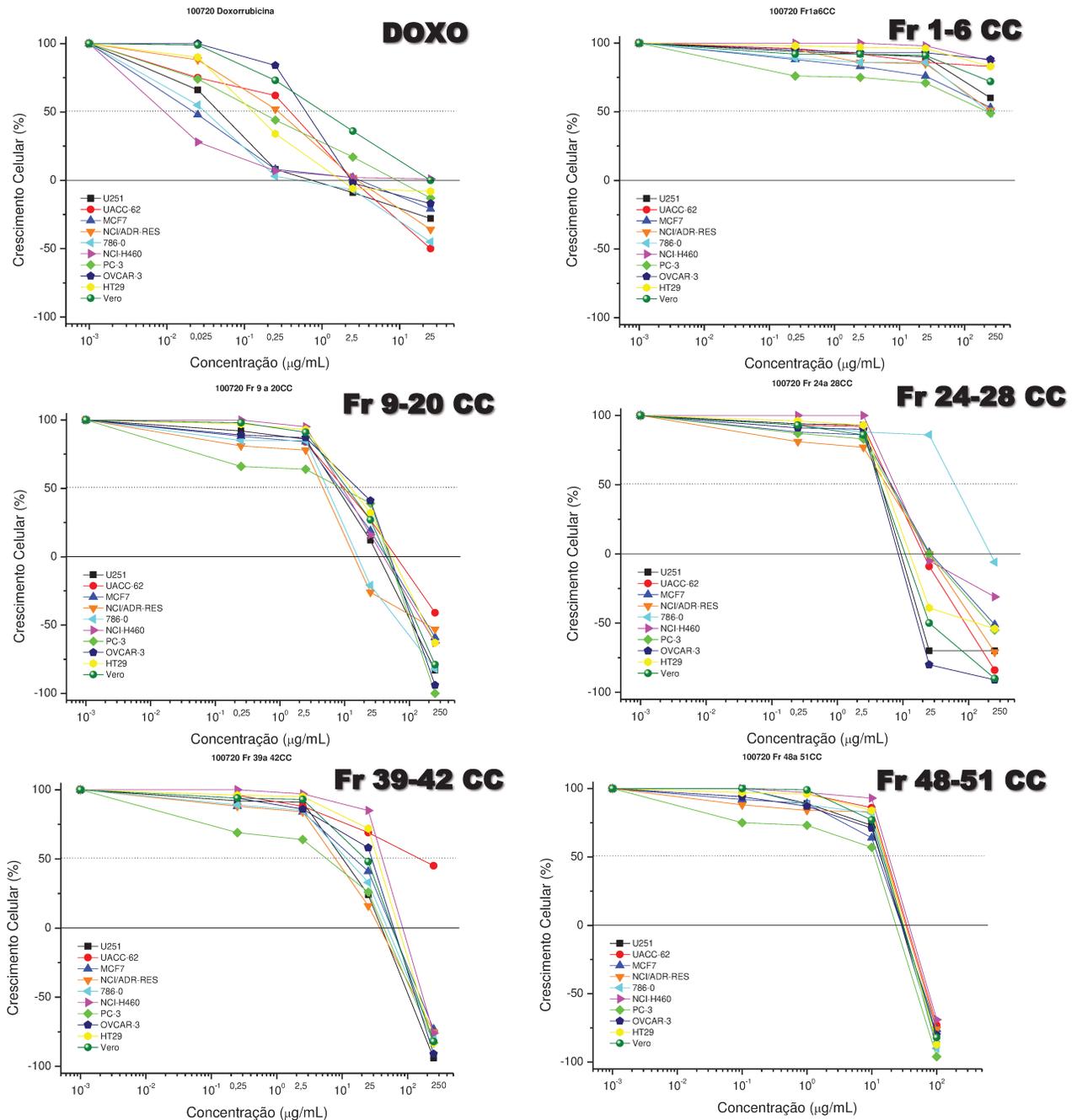


Figura 35. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorubicina; (Fr 1-6 a Fr 48-51 CC) Frações obtidas da coluna cromatográfica clássica (CC) da Fr 3,4 agrupada.

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

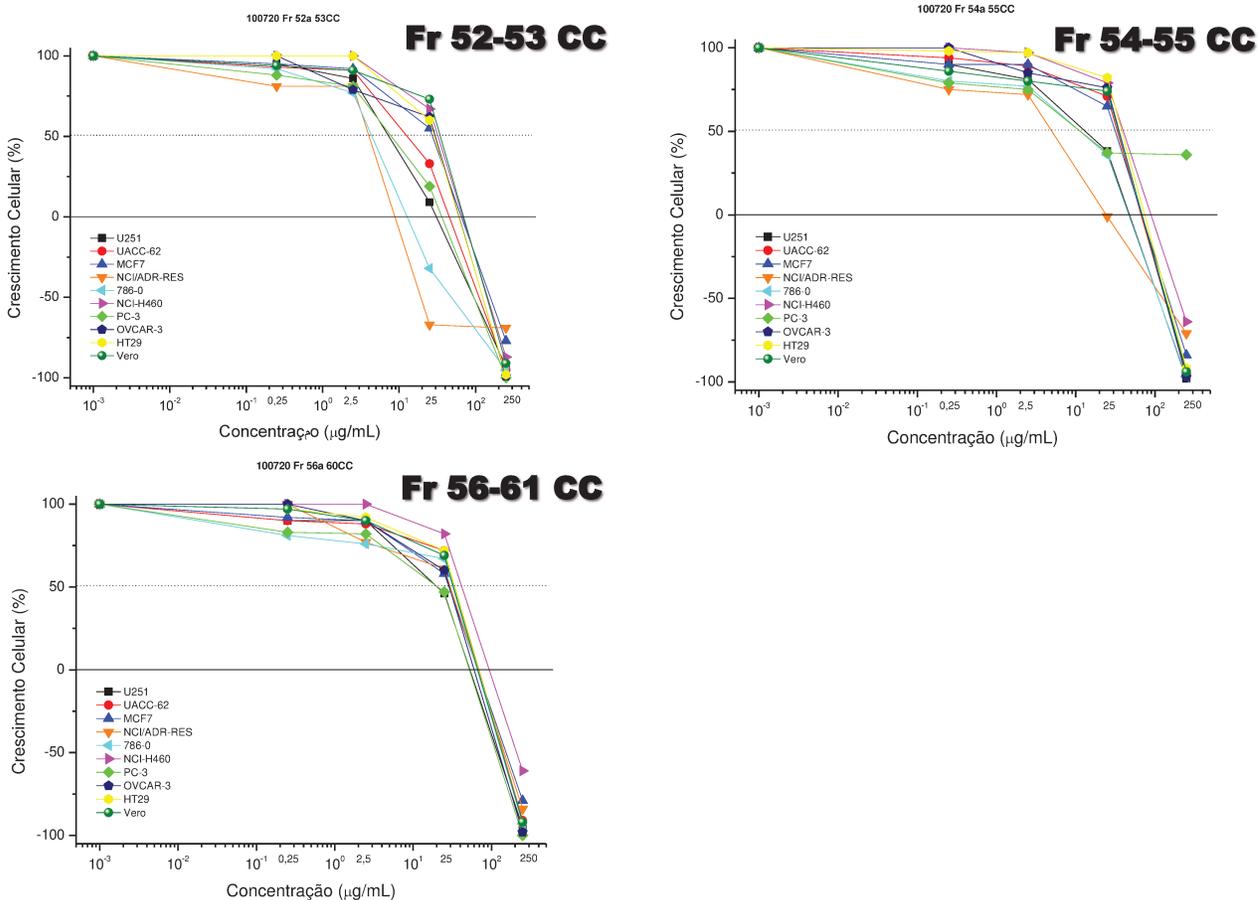


Figura 35. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações. (Fr 52-53 a Fr 56-61 CC) Frações obtidas da coluna cromatográfica clássica da Fração 3,4 agrupada.

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT29 (côlon), e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

Estes gráficos em conjunto com os valores de TGI demonstraram que o fracionamento da Fr 3,4 agrupada por coluna clássica originou frações com atividades distintas, mostrando maior seletividade entre as linhagens, porém sem muita potencialização da atividade (Tabela 14).

É interessante notar que a fração 1-6 CC foi inativa, apresentando valores de TGI maiores do que $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para praticamente todas as linhagens testadas.

No caso das frações mais polares, 54-55 e 56-60, foram observados valores de TGI maiores, demonstrando menor atividade em relação às demais. Estas frações apresentaram dois compostos majoritários de MM 292 e $390 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 14. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos para as frações da coluna clássica das Fr 3,4 agrupada, em cultura de células tumorais humanas.

	U251	UACC-62	MCF-7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	VERO
DOXO	1,64	2,81	2,25	3,56	0,97	4,38	8,42	6,66	5,23	0,20	20,88
1-6	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	102,88	>250
9-20	30,61	63,47	42,51	17,86	35,31	40,49	39,08	28,71	51,51	56,97	40,06
24-28	11,14	22,38	35,48	25,66	22,27	49,31	32,30	9,32	15,61	14,43	12,45
39-42	33,84	> 250	51,44	34,26	42,96	90,21	31,60	50,80	67,75	117,18	51,29
48-51	25,77	38,15	26,97	34,81	27,55	45,84	18,63	27,92	30,06	50,79	29,42
52-53	27,95	36,86	59,54	9,47	14,08	59,71	31,11	43,73	42,61	109,02	59,87
54-55	38,04	53,40	61,22	23,75	38,34	96,14	> 250	53,09	65,97	125,86	56,94
56-61	41,85	59,21	60,22	58,49	54,12	104,26	38,43	43,71	57,92	118,29	55,99

Legenda: DOXO: Doxorubicina, quimioterápico de referência; OEX: Óleo essencial dos xilopódios de *A. arenaria*; Fr 1 a Fr 5 CSOEX, frações obtidas do fracionamento do OEX por coluna cromatográfica seca; U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT29 (côlon), K-562 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto de rim de macaco-verde (VERO).

A fração 9-20, rica em um composto de $\text{MM } 302 \text{ g.mol}^{-1}$, apresentou melhor valor de TGI ($40,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para a linhagem NCI-H460 (pulmão). Valores de TGI similares foram obtidos para as frações 24-28 ($49,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 48-51 ($45,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Analisando-se as diferentes frações observa-se que a Fr 24-28 foi a mais ativa entre todas, demonstrando ação para 5 das 10 linhagens avaliadas e apresentando valores de TGI entre 9 e $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as linhagens: glioma, ovário, côlon e leucemia. Este perfil não revela seletividade, porém expõe uma atividade interessante, pois apresenta uma fração com maior potencial.

Dentre as amostras que apresentaram maior seletividade podemos destacar as frações: Fr 52-53 para a linhagem de ovário resistente (NCI/ADR) com TGI de $9,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Fr 48-51 contra linhagem de próstata (PC-3) com TGI de $18,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Fr 24-28 contra as linhagens de ovário (OVCAR-3) com TGI de $9,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e côlon (HT29) com TGI de $15,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Avaliando-se a CCD das amostras mais ativas verificamos que a Fr 9-20, continha 100% de um composto de coloração verde e R_f 0,55. Observamos também que a 24-28 estava enriquecida em um composto com coloração azul e R_f 0,42 (Figura 36).

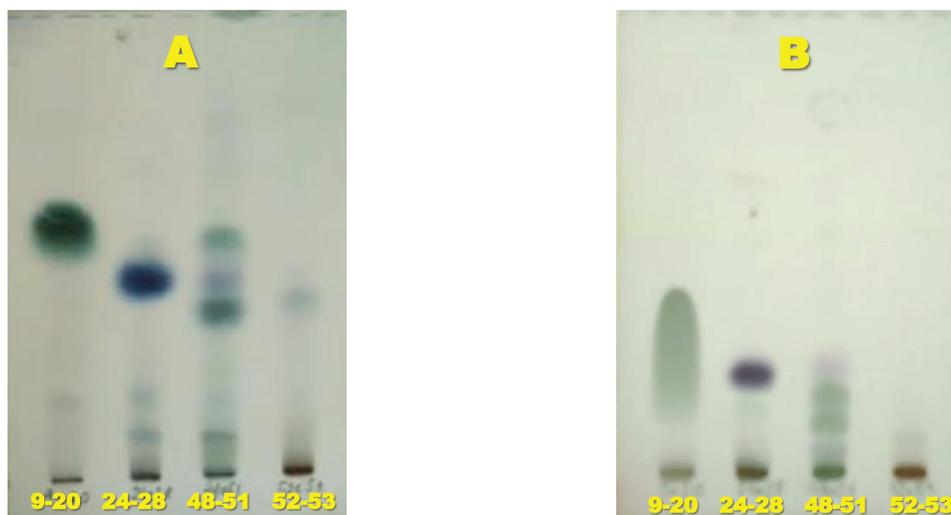


Figura 36. Fotos das CCD's das frações mais ativas. *Fase móvel:* (A) Hexano/Acetato de etila (70:30) e (B) Diclorometano.

A composição química determinada por CG-EM (Anexos 6 a 16), demonstrou que a Fr 9-20 continha 100% de um composto de MM 302 g.mol⁻¹ e a Fr 24-28 apresentava dois compostos com MM 288 g.mol⁻¹ e t_R 22,618 e 23,350 min (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagens relativas determinadas por CG-EM dos compostos encontrados nas frações da coluna clássica.

t _R (min)	Composto	MM (g.mol ⁻¹)	Frações (% Relativa)			
			9-20	24-28	48-51	52-53
11,72	Daucol	238	nd	nd	2,39	nd
22,12	ni (fragmentos m/z: 288, 273, 255, 187, 135)	288	nd	nd	21,90	27,70
22,61	<i>ent</i> -8(14),15-pimaradien-3-β-ol	288	nd	81,42	3,73	t
23,36	ni (fragmentos m/z: 288, 257, 91, 121, 81)	288	nd	16,83	1,54	t
25,15	ni (fragmentos m/z: 302, 289, 195, 91, 79)	302	nd	nd	56,74	72,31
26,39	ácido <i>ent</i> -pimara-8(14),15-dien-19-óico	302	100,00	nd	nd	nd
27,89	ni (fragmentos m/z: 302, 289, 195, 91, 79)	390	nd	t	6,53	t
38,52	Estigmasterol	412	nd	nd	7,18	nd

Legenda: t_R= tempo de retenção em min; MM- Massa molecular em g.mol⁻¹; ni= não identificado; nd= não detectado; t= traços; nc= não calculado.

Comparando-se os espectros de massas da Fr 9-20 e 24-28 da CC conclui-se que estes eram os mesmos compostos encontrados em maior proporção na Fr 3,4 agrupada (cerca de 76%). As demais frações ativas também possuíam estes compostos diterpênicos, porém em menor proporção.

Para determinação das estruturas destes dois compostos isolados, as frações 8 e 33 da coluna clássica foram submetidas à análises por RMN (^1H e ^{13}C), IV, ponto de fusão e polarimetria, apresentados no item 4.4.

4.4. Identificação dos compostos isolados

A análise por CG-EM dos compostos contidos na Fr 8 e Fr 33, isolados da cromatografia em coluna clássica mostrou a presença de dois compostos diterpênicos derivados dos pimaranos, o ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**1**), e o álcool *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**), respectivamente (Figura 37).

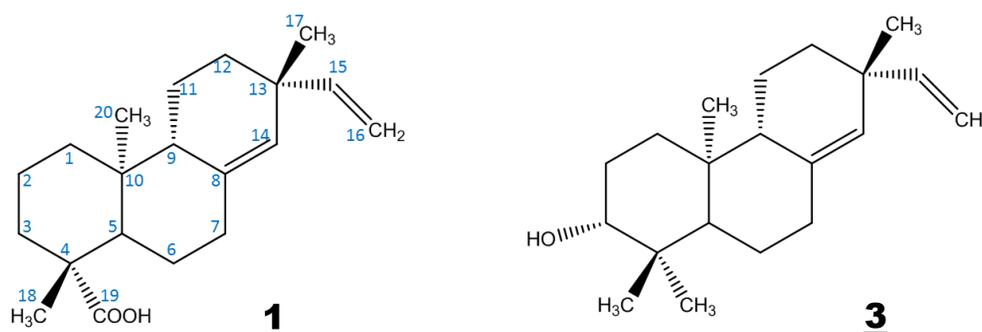


Figura 37. Compostos isolados da coluna clássica da Fr 3,4. Ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**1**) e o Álcool *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**).

Os espectros no infravermelho dos compostos **1** e **3** (Anexos 59 e 60) demonstraram a presença de bandas características dos compostos ácidos e álcoois (Tabela 16).

Tabela 16. Bandas observadas nos espectros no IV do Ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**1**) e do Álcool 8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**).

Composto	Frequência (cm $^{-1}$)	Intensidade	Atribuição
Ácido <i>ent</i> -pimara-8(14),15-dien-19-óico (1)	3433	Média e Larga	OH de ácido
	2847 a 2951	Forte	C-H
	1694	Forte	C=O
	1260	Média	C-O
Álcool <i>ent</i> -8(14),15-pimaradien-3 β -ol (3)	3329	Forte e Larga	OH de álcool
	2867 e 2941	Forte	C-H
	1452	Média	C-O-H
	900 a 1100	Média	C-O

As comparações dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para os compostos **1** e **3** (Anexos 61 a 69) foram realizadas com dados descritos por Matsuo e colaboradores (1976) e Ansell e colaboradores (1993), respectivamente (Tabelas 17 e 18).

O espectro de RMN de ^1H do composto **1**, Ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico, de MM 302 g.mol⁻¹ mostrou sinais de hidrogênios de 3 grupos metílicos (δ 0,66; 1,01 e 1,27 ppm), um grupo vinílico (δ 4,91; 4,96 e 5,72 ppm) e um sinal de H da ligação dupla trissubstituída isolada (δ 5,16 ppm). No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 20 sinais referentes a 20 átomos de C com um sinal em δ 184,3 ppm característico do C da carbonila do ácido.

O espectro de RMN de ^1H do composto **3**, Álcool *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol de MM 288 g.mol⁻¹, mostrou sinais de hidrogênios de 4 grupos metílicos (δ 0,83; 1,02; 1,07 e 1,17 ppm), um hidrogênio carbinólico (δ 3,3 ppm), um grupo vinílico (δ 4,89; 4,96 e 5,74 ppm) e um sinal do H da ligação dupla trissubstituída isolada (δ 5,16 ppm). No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 20 sinais referentes a 20 átomos de C com um sinal em δ 79,2 ppm referente ao carbono carbinólico.

O espectro de ^{13}C obtido pelo experimento de “intensificação sem distorção por transferência de polarização”, o DEPT (*Distortion-less Enhancement by Polarization Transfer*), possibilitou diferenciar os grupos metínicos (CH), metila (CH₃) e metileno (CH₂), de acordo com a inversão ou não destes no espectro. Carbonos quaternários não são visualizados neste experimento.

Tabela 17. Comparação dos deslocamentos experimentais de RMN de ^1H (em ppm) obtidos para os compostos **1** e **3** com dados descritos na literatura.

Hidrogênio	Multiplicidade	1 (δ ppm)	Referência 1	Multiplicidade	3 (δ ppm)	Referência 3
18 (a,b e c)	singleto	1,27	1,23	singleto	0,83	0,84
19 (a,b e c)	---	---	---	singleto	1,02	0,92
20 (a,b e c)	singleto	0,66	0,66	singleto	1,07	1,09
17 (a,b e c)	singleto	1,01	1,01	singleto	1,17	1,10
3	---	---	---	duplo dubleto	3,30	3,31
16-b	duplo dubleto	4,96	4,96	duplo dubleto	4,89	4,90
16-a	duplo dubleto	4,91	4,91	duplo dubleto	4,96	4,96
14	singleto	5,16	5,16	dubleto	5,16	5,16
15	duplo dubleto	5,72	5,71	duplo dubleto	5,74	5,74

Referência: 1- Matsuo e colaboradores (1976) e 3- Ansell e colaboradores (1993).

Tabela 18. Comparação dos deslocamentos experimentais de RMN de ^{13}C (em ppm) obtidos para os compostos **1** e **3** com dados descritos na literatura.

Carbono	1 (δ ppm)	Referência 1	3 (δ ppm)	Referência 3
1	39,2	39,3	37,1	37,3
2	19,2	19,3	27,5	27,7
3	37,9	38,0	79,2	79,2
4	44,0	44,1	39,0	39,1
5	56,1	56,2	54,1	54,3
6	24,1	24,2	22,1	22,3
7	35,8	35,8	35,7	35,8
8	137,9	137,9	137,9	137,9
9	50,5	50,6	51,2	51,3
10	39,2	39,3	38,1	38,3
11	19,6	19,6	19,1	19,2
12	36,4	36,5	35,7	35,8
13	38,5	38,5	38,6	38,6
14	128,0	128,0	128,1	128,3
15	147,2	147,2	147,3	147,3
16	112,9	112,9	112,8	112,8
17	29,3	29,4	29,4	29,5
18	29,2	29,2	28,4	28,5
19	184,3	184,5	15,7	15,7
20	13,8	13,9	14,7	14,8

Referência: 1- Matsuo e colaboradores (1976) e 3- Ansell e colaboradores (1993).

A determinação dos pontos de fusão destes compostos foi realizada em triplicata e os valores de rotação ótica dos compostos **1** e **3** confirmaram a identidade destes (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19. Pontos de fusão em $^{\circ}\text{C}$ obtidos para os compostos **1** e **3**.

Composto	Medida 1 ($^{\circ}\text{C}$)	Medida 2 ($^{\circ}\text{C}$)	Medida 3 ($^{\circ}\text{C}$)	Referências 1 e 2 ($^{\circ}\text{C}$)
1	163,0 a 165,0	163,0 a 164,0	163,0 a 163,8	163-164
3	116,0 a 117,0	116,5 a 117,1	117,0 a 117,2	122-123*

Referência: 1- Matsuo e colaboradores (1976) e 3- Ansell e colaboradores (1993); * Recristalizado em hexano.

Tabela 20. Valores de rotação ótica, $[\alpha]_{\text{D}}$ (em $^{\circ}$), obtidos para os compostos **1** e **3**.

Composto	$[\alpha]_{\text{D}}$ Experimental	$[\alpha]_{\text{D}}$ Referências 1 e 3 ($^{\circ}$)
1	- 113 $^{\circ}$	- 108 $^{\circ}$
3	- 93 $^{\circ}$	- 93 $^{\circ}$

Referência: 1- Matsuo e colaboradores (1976) e 3- Ansell e colaboradores (1993);

Estes dois compostos foram os mesmos diterpenos isolados do extrato diclorometânico de *A. arenaria* por Ambrosio e colaboradores (2004).

O composto **1**, foi descrito pela primeira vez por Mihashi e colaboradores (1969), isolado da espécie *Aralia cordata* e posteriormente por Matsuo e colaboradores (1976) isolado do extrato metanólico de *Jungermannia thermarum*.

Estudos mais recentes apresentam potencial atividade desta molécula, como anti-inflamatória, através da inibição da indução dos mediadores inflamatórios (Kang e colaboradores, 2008), e inibitória da contratilidade do músculo liso vascular (Hipólito e colaboradores, 2009). Resultados apresentados em estudos propostos por Kato e colaboradores (2012) demonstraram que este composto foi eficaz na redução da genotoxicidade induzida por doxorrubicina e metilmetanosulfonato, indicando uma ação quimiorpreventiva (Kato e colaboradores, 2012).

Já o composto **3**, identificado pela primeira vez por Ansell e colaboradores (1993) em algumas espécies do gênero *Erythroxylum*, apresenta ação vaso-relaxante (Hipólito e colaboradores, 2009).

Estes dois compostos também apresentaram promissora ação antimicrobiana para várias bactérias Gram-positivas (Porto e colaboradores, 2009).

Desta forma, estes resultados corroboram mais uma vez a potencial atividade antiproliferativa da espécie *A. arenaria*, em especial, destes compostos pimaranos.

4.5. Avaliação dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria* em fase de floração

As espécies de Asteraceae são muito ricas em canais, cavidades e tricomas, estruturas secretoras de substâncias lipofílicas. No caso de *A. arenaria*, os canais e tricomas estão distribuídos por todos os órgãos vegetativos, enquanto que as cavidades são encontradas apenas nos órgãos subterrâneos (Oliveira, 2011).

Desta forma, sabendo-se que as diferentes partes avaliadas na fase de dormência (xilopódio e raízes) apresentaram diferentes composições químicas e atividades antiproliferativas *in vitro* distintas, decidiu-se por estudar os OE's dos diferentes órgãos vegetativos de *A. arenaria* na fase de floração. Os rendimentos de OE's foram bem variados (Tabela 21).

Tabela 21. Dados complementares das extrações dos OE's dos órgãos de *A. arenaria*.

Órgão	Massa de planta (g)	Massa de OE (g)	Rendimento (% m/m)
Raiz	1068	1,9877	0,19
Xilopódio	756	0,5509	0,07
Caule Aéreo	885	0,1442	0,02
Folha	603	1,3950	0,23

O maior rendimento de OE foi obtido das folhas e raízes (0,23 e 0,19% m/m), enquanto que os xilopódios e os caules apresentaram rendimentos bem menores (0,07 e 0,02% m/m) (Figura 38).

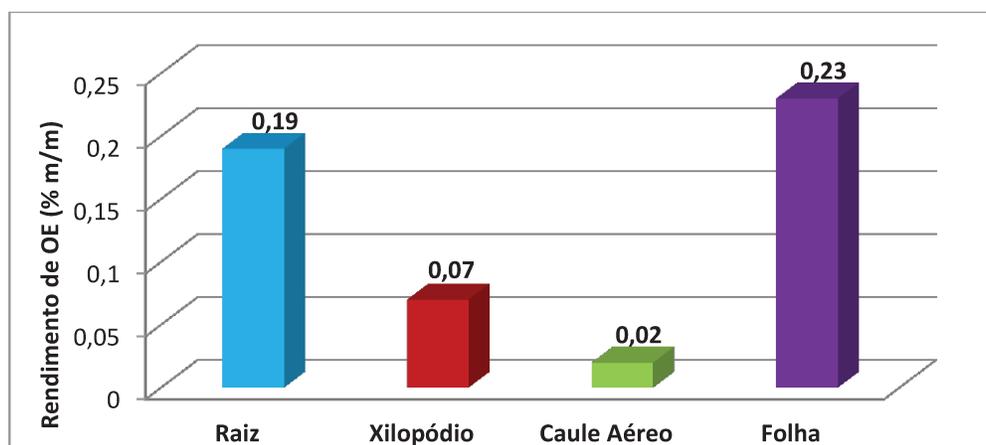


Figura 38. Rendimentos de OE's obtidos para os diferentes órgãos de *A. arenaria*, coletados em fase de floração.

Avaliando-se o total de óleo extraído nas duas fases, maior rendimento foi observado na fase de dormência (0,41 g de OE a cada 100 g de planta) em relação a fase de floração (0,13 g de OE a cada 100 g de planta). Quando analisamos apenas os OE's do xilopódio e raiz em paralelo à extração anterior, na fase de dormência, o rendimento do OE dos xilopódios foi reduzido pela metade (0,14 para 0,07% m/m) enquanto que o OE das raízes foi reduzido em 3,5 vezes (0,67 para 0,19% m/m).

Esta diferença de rendimento num mesmo órgão pode ser atribuída principalmente à fase fisiológica em que a planta se encontrava no momento da coleta. No inverno, em estado de dormência, as plantas sofrem alterações estruturais e fisiológicas a fim de suportar as condições desfavoráveis de sobrevivência como ausência de chuvas, frio ou mesmo pós-queimadas. Assim, este estado de inibição temporário de crescimento

estimula a planta a reduzir seu metabolismo e acumular substâncias de reserva. Este processo assevera a planta e garante a perpetuação da espécie em condições adversas. É justamente por este motivo que no inverno encontramos apenas os órgãos subterrâneos de *A. arenaria* em campo, visto que as folhas e caules caem.

De maneira contrária, no período de floração, a concentração de alguns compostos pode ser aumentada devido à presença de órgãos fotossintetizantes e alta disponibilidade hídrica e luminosidade. Nesta fase a maioria das flores está se abrindo nas inflorescências para a liberação do pólen para polinização e consequente fertilização. Por isso, a planta concentra toda sua energia no sistema reprodutivo, ou seja, passa a gastar toda sua reserva. Isto pode justificar o baixo teor de OE encontrado nos xilopódios em comparação com a coleta realizada em 24/08/2009.

Outro importante fator a ser analisado é a idade das plantas no momento da coleta. Como as plantas são encontradas em seu estado natural e utilizadas por inteiro, não foi possível utilizar a mesma planta nas duas extrações. Apenas um estudo morfológico das estruturas poderia estimar o tempo real de vida do vegetal.

Na análise por CCD pode-se verificar que os OE's dos órgãos possuem bandas de R_f 's e colorações semelhantes, porém, com perfil diferente (Figura 39). Maiores similaridades podem ser observadas nos OE's das raízes e xilopódios (estruturas subterrâneas) e nos OE's do caule e da folha (estruturas aéreas).

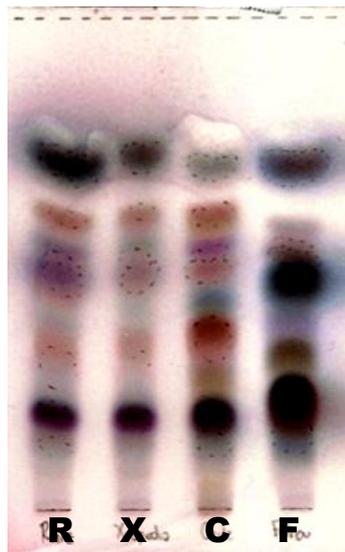


Figura 39. CCD dos OE's das diferentes estruturas de *A. arenaria*, raiz (R), xilopódio (X), caule (C) e folha (F). Fase móvel: Diclorometano

Avaliando-se o perfil químico através dos cromatogramas obtidos por CG-EM (Anexos 17 e 18), verificamos que os OE's das estruturas subterrâneas (raízes e xilopódios) são bastante similares, variando-se apenas as porcentagens relativas (Figura 40). O mesmo pôde ser observado para as estruturas aéreas (caules e folhas) (Anexos 19 e 20 e Figura 41).

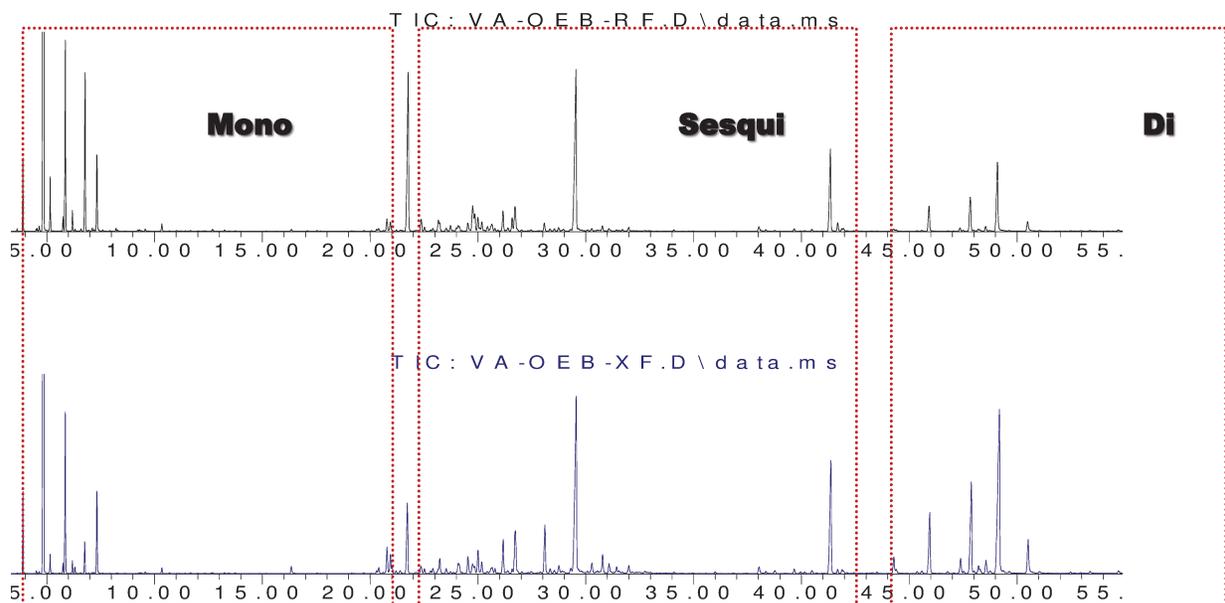


Figura 40. Cromatogramas do OE das raízes e xilopódios de *V. arenaria* expandido. (Mono) Monoterpenos; (Sesqui) Sesquiterpenos; e (Di) Diterpenos.

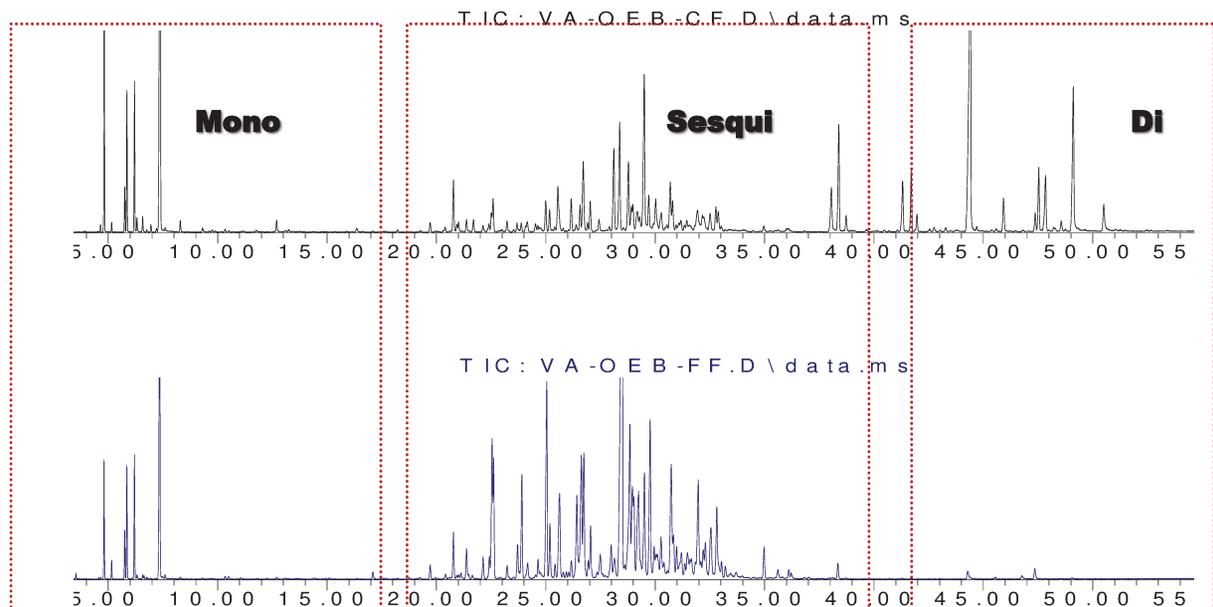


Figura 41. Cromatogramas do OE dos caules e folhas de *V. arenaria* expandido. (Mono) Monoterpenos; (Sesqui) Sesquiterpenos; e (Di) Diterpenos.

A maioria dos compostos encontrados nos OE's da raiz, xilopódio, caule e folha foram identificados por CG-EM (Tabela 22).

Tabela 22. Composição química dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*.

t _R (min)	Composto	MM (g.mol ⁻¹)	Índice Aritmético		% Relativa (%)			
			IA _{calculado}	IA _{Adams}	Raiz	Xilopódio	Caule	Folha
4,88	α-Pineno	136	933	932	40,72	31,44	4,05	1,14
5,87	β-Pineno	136	977	974	5,61	4,15	2,21	1,26
6,19	Mirceno	136	991	990	0,59	0,33	2,43	1,41
6,78	δ-3-Careno	136	1011	1008	5,17	0,86	t	t
7,33	Limoneno	136	1028	1024	2,46	2,45	15,30	5,18
Monoterpenos					54,55	39,22	23,98	8,99
21,77	Cipereno	204	1395	1398	9,50	3,22	0,37	t
22,52	Cariofileno	204	1415	1417	t	t	0,53	3,02
22,59	α-Santaleno	204	1417	1416	nd	nd	0,94	2,10
23,91	α-Humuleno	204	1450	1452	nd	nd	t	2,19
25,00	γ-Muuroleno	204	1477	1478	0,53	0,95	0,88	4,38
25,63	Biciclogermacreno	204	1495	1500	t	t	1,81	2,38
26,42	γ-Cadineno	204	1513	1513	t	t	t	2,32
26,63	ni 1	220	1518	-	0,67	t	0,80	3,13
26,72	δ-Cadineno	204	1520	1522	1,78	2,81	2,52	2,91
28,11	ni 2	220	1557	-	t	2,41	2,65	0,66
28,49	Palustrol	222	1564	1567	t	t	3,32	16,22
28,75	Espatuleno	220	1573	1577	t	t	2,26	4,52
28,96	Óxido de Cariofileno	220	1579	1582	nd	nd	0,70	2,39
29,24	ni 3	220	1586	-	nd	nd	0,44	3,40
29,50	Carotol	222	1593	1594	11,74	11,79	5,49	2,80
29,71	Ledol	222	1598	1602	nd	nd	1,01	3,79
30,73	Muurola-4,10-(14)-dien-1-1β-ol	220	1626	1631	t	0,84	1,66	3,29
31,93	ni 4	222	1660	-	nd	nd	0,82	2,76
32,88	ni 5	220	1835	-	nd	nd	0,58	2,17
38,40	ni 6	250	1845	-	t	t	3,20	0,31
Sesquiterpenos					24,22	22,02	29,96	64,72
41,35	Pimara-8(14),15-dieno	272	1940	1948	5,08	6,55	1,76	nd
44,41	ni 7	290	nc	-	t	0,66	14,13	0,24
45,92	8β-Podocarpan-8-ol	290	nc	-	1,51	3,37	1,11	nd
47,83	Pimaral	286	nc	-	2,08	5,08	2,01	nd
49,10	ent-8(14),15-pimaradien-3β-ol	288	nc	-	4,46	12,80	5,45	nd
Diterpenos					13,12	28,46	24,46	0,24
Total (%)					91,89	89,70	78,40	73,95

Legenda: t_R= tempo de retenção em min; MM= Massa molecular em g.mol⁻¹; IA= Índice aritmético; ni= não identificado; nd= não detectado; t= traços; nc= não calculado.

Os fragmentogramas dos compostos não identificados são apresentados nos anexos 42 a 48.

Estes dados constataam a presença principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos. Comparando-se às análises anteriores dos OE's dos xilopódios e raízes (OEX1 e OER1) obtidos na fase de dormência com os OE's da raiz (R) e xilopódios (X) da fase de floração verificou-se que a quantidade de monoterpenos diminuiu (74,1 para 54,1% e 57,0 para 39,2%, respectivamente), em contrapartida os sesquiterpenos aumentaram (9,2 para 23,6%; 14,7 para 25,0%, respectivamente).

A análise do OE dos caules apresentou 24,3% de monoterpenos e 26,6% de sesquiterpenos. Já a análise do OE das folhas expôs um perfil diferenciado, com apenas 9,0% de mono e 64,7% de sesquiterpenos, sendo a única estrutura dentre as avaliadas que praticamente não possuía diterpenos em sua constituição química. Quanto aos diterpenos, as estruturas mais ricas nestes constituintes são o xilopódio com 27,8%, e o caule com 24,5%. Já a raiz possui 13,1% (Figura 42).

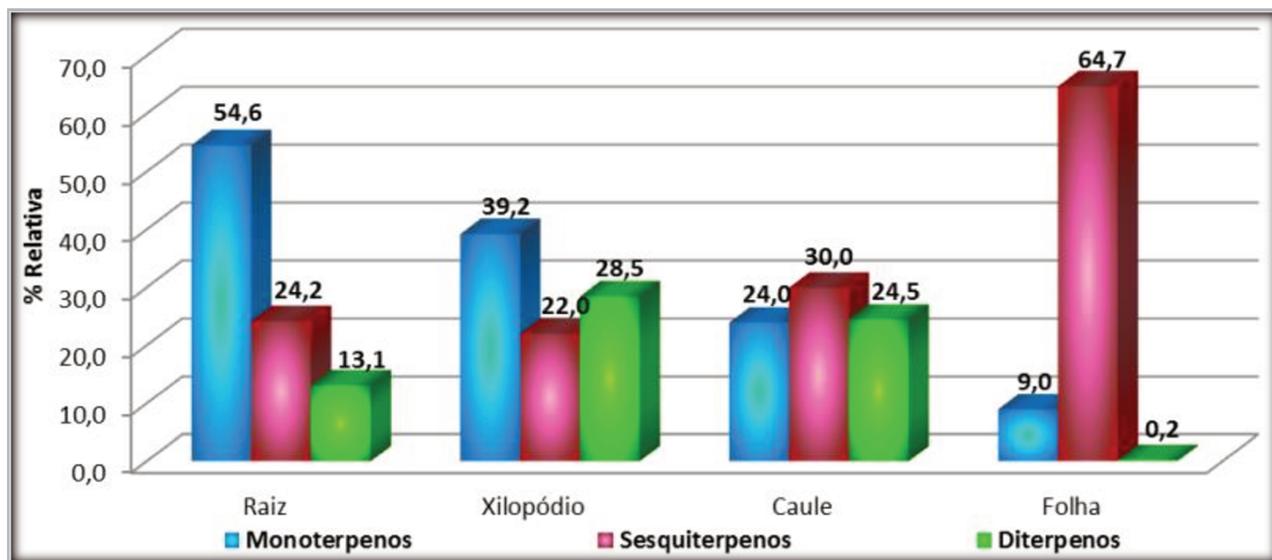


Figura 42. Distribuição da composição química dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*.

Os principais compostos identificados nos OE's das estruturas subterrâneas foram: α -pineno, β -pineno, δ -3-careno, cipereno, carotol, pimara-8(14),15-dieno e *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol; para os órgãos aéreos temos: limoneno, δ -cadineno, palustrol, espatulenol e carotol (Figura 43).

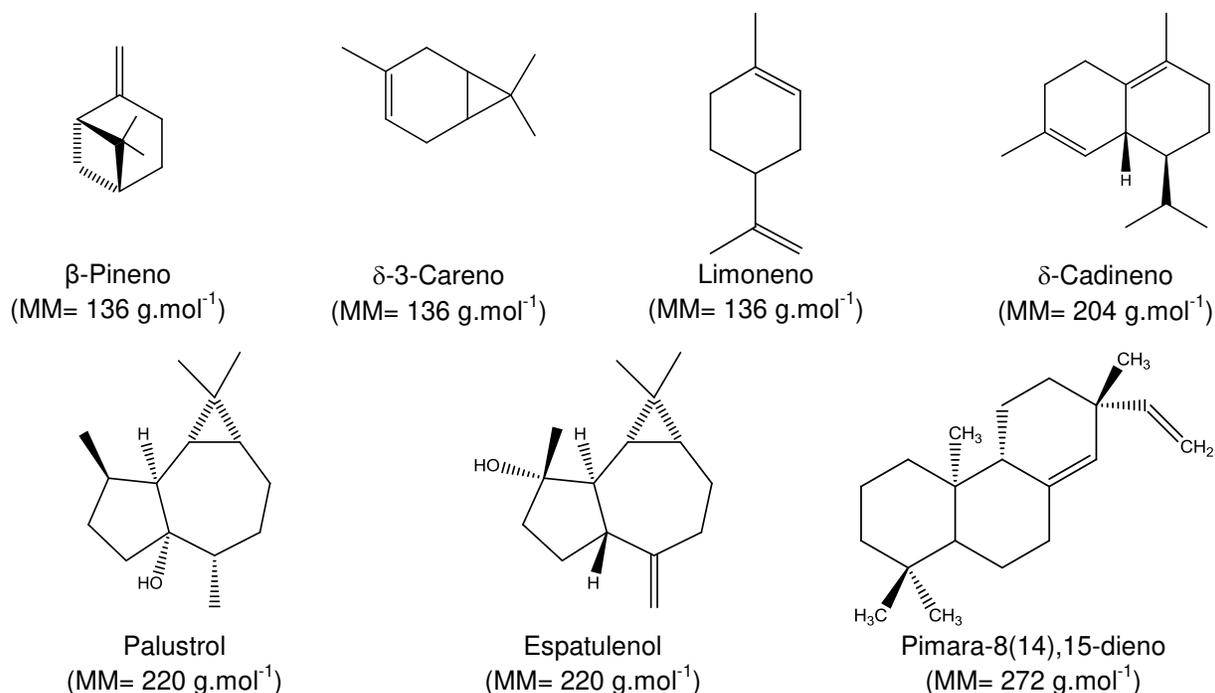


Figura 43. Estruturas de alguns compostos identificados nas amostras de OE's obtidas dos diferentes órgãos de *A. arenaria*.

Além destes, outros constituintes também foram identificados nos OE's do caule e da folha, demonstrando uma constituição química mais rica (mais compostos).

Os gráficos de concentração/resposta destas amostras (Figura 44) permitiram inferir que todos os órgãos estudados apresentaram ação antiproliferativa *in vitro*, destacando-se os OE's dos caules e raízes. Neles observa-se ação citostática já na primeira concentração testada (0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), fato não observado para os OE's dos xilopódios e folhas.

Os baixos valores de TGI destas amostras (Tabela 23) indicaram atividade potente destes OE's (TGI < 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Assim, de maneira geral as amostras apresentaram ação citocida para todas as linhagens avaliadas, sendo os valores obtidos para o OE do caule mais significativos. O único inconveniente da utilização do OE do caule foi o rendimento na produção do OE que é muito baixo (0,02%) quando comparado aos demais órgãos. Nestes testes foi observado também alta seletividade do OE do X frente à linhagem de Leucemia (K-562), com TGI de 2,58 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, dados consideráveis, já que esta linhagem é resistente e apresentou citotoxicidade em estudo anterior (Guimarães e colaboradores, 2008).

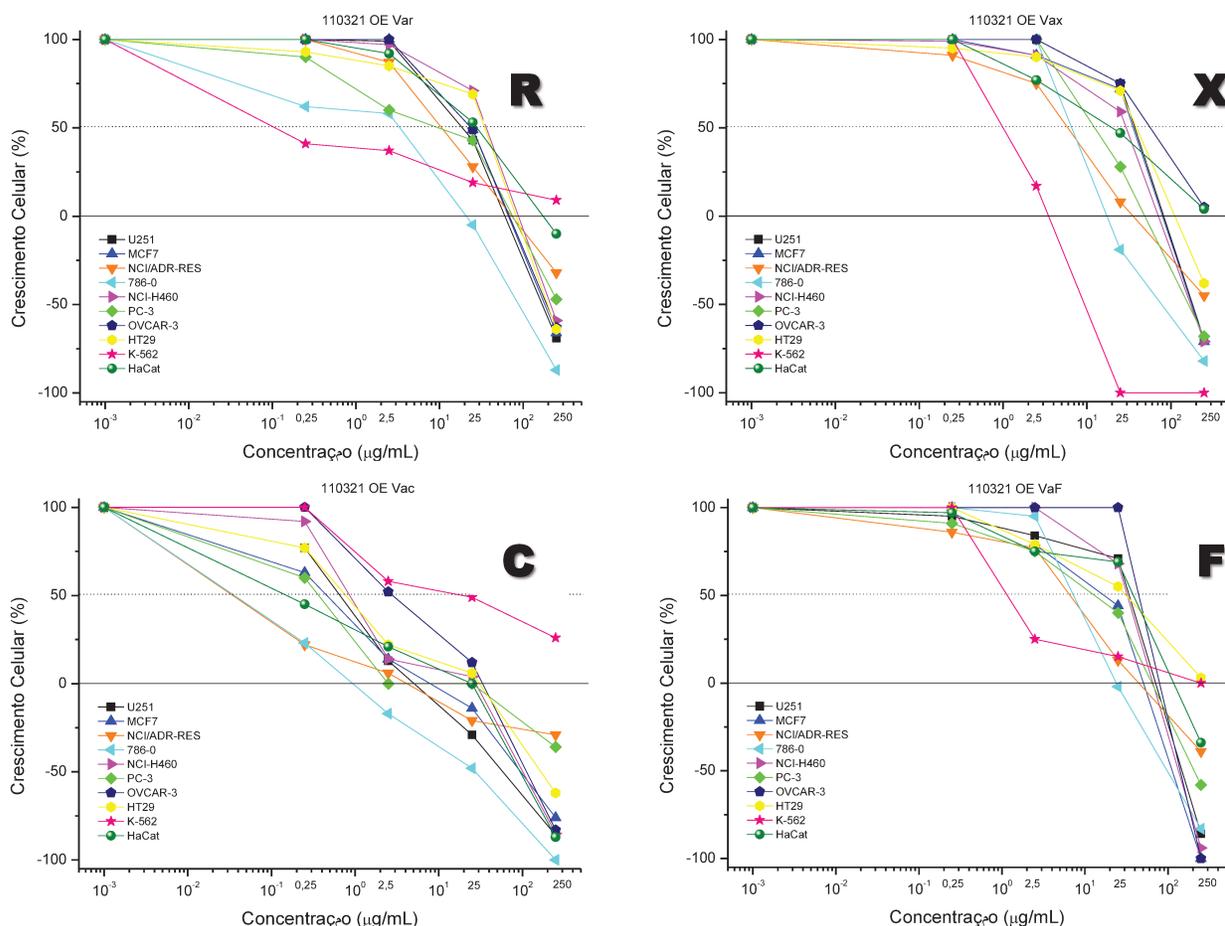


Figura 44. Curvas de crescimento celular em função da concentração – Concentração/Resposta. (R) OE das raízes de *A. arenaria*; (X) OE dos xilopódios de *A. arenaria*; (C) OE obtido caules de *A. arenaria*; (F) OE das folhas de *A. arenaria*.

Legenda: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e queratinócito humano (HaCat).

Tabela 23. Valores de TGI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para os OE's das raízes (R), xilopódios (X), caules (C) e folhas (F) de *A. arenaria*, em cultura de células tumorais humanas.

	U251	MCF-7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	HaCat
DOXO	0,33	7,84	3,63	4,48	3,77	7,61	>250	11,05	5,18	12,03
R	56,45	63,61	77,98	15,44	92,10	64,46	66,15	83,32	>250	176,93
X	84,49	79,77	41,15	20,11	67,48	46,28	>250	120,83	2,58	>250
C	5,69	6,89	5,80	1,04	11,32	12,99	23,53	15,51	>250	7,02
F	63,90	38,30	50,32	25,19	52,58	57,76	77,86	>250	113,53	122,21

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e queratinócito humano (HaCat).

Quando comparados os resultados dos testes na fase de dormência (OEX1 e OER1), com os resultados obtidos para os OE's das diferentes estruturas em fase de floração (R, X, C, F), constatou-se que o OE do xilopódio na fase de floração apresentou menor ação antiproliferativa. Esta divergência pode ser associada à época de coleta da planta. Analisando-se concomitantemente as tabelas 7 e 23 (páginas 38 e 65) verificamos que nos primeiros testes os melhores valores de TGI foram obtidos para as linhagens de ovário resistente (NCI-ADR), próstata (PC-03) e cólon (HT-29). Porém, nos últimos testes, dados mais promissores foram encontrados para linhagens do sistema nervoso central (U251), mama (MCF-7), ovário resistente (NCI-ADR), e rim (786-0). Estes resultados tornam-se extremamente interessantes, pois a linhagem NCI-ADR expressa fenótipo de resistência a múltiplos fármacos de referência.

Avaliando-se a composição química dos diferentes OE's é possível afirmar que a ação antiproliferativa observada para a espécie certamente não está associada à concentração de monoterpenos, visto que o OE das raízes apresentou maior porcentagem desses compostos, porém sem significativos valores de TGI quando comparados às outras estruturas.

Em relação à quantidade de sesquiterpenos verificou-se que as folhas possuíam a maior porcentagem relativa destes, fato que não ocasionou nenhuma influência nos valores de TGI calculados. Quanto aos sesquiterpenos, podemos fazer a mesma afirmação, já que o OE dos xilopódios apresentou praticamente a mesma porcentagem relativa que o OE dos caules, porém com atividade inferior.

Os OE's das raízes e xilopódios apresentaram como majoritários os compostos: α -pineno, cipereno e carotol. A somatória destes totalizou 62,0% no OE das raízes e 46,5% no OE dos xilopódios. Já nos OE's do caule e folhas a porcentagem desses compostos é menor do que 10%. Os compostos encontrados em maior quantidade no OE dos caules são: limoneno, carotol e dois diterpenos, o composto **3** (álcool) e um outro não identificado 7 de $MM = 290 \text{ g.mol}^{-1}$. Para o OE das folhas os compostos majoritários foram: limoneno, palustrol e diterpeno **3**.

Estes dados permitem relacionar a atividade antiproliferativa *in vitro* com a concentração de sesqui e diterpenos, corroborando que a ação antiproliferativa está intimamente ligada à quantidade destes compostos na amostra.

4.6. Fracionamento dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria* por cromatografia em coluna seca

Apesar da amostra de OE dos caules ter apresentado maior atividade, este órgão apresentou baixa produção de óleo essencial, impossibilitando seu fracionamento. Em contrapartida, como os OE's das outras estruturas também apresentaram perfis citocidas com atividade fraca para algumas linhagens, estes OE's foram fracionados por coluna cromatográfica do tipo seca.

O fracionamento dos OE's das diferentes estruturas apresentou bons rendimentos de recuperação, acima de 75% (Tabela 24).

Tabela 24. Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*.

Amostra	Massa (mg)	Amostra	Massa (mg)	Amostra	Massa (mg)
R1	376,8	X1	133,1	F1	143,3
R2	33,9	X2	34,0	F2	35,3
R3	13,5	X3	39,3	F3	47,2
R4	19,0	X4	18,9	F4	99,1
R5	53,3	X5	27,3	F5	101,6
R6	17,4	X6	33,6	F6	118,3
R7	24,8	X7	8,7	F7	18,3
Total (mg)	538,7	Total (mg)	294,9	Total (mg)	563,1
(% m/m)	78,3	(% m/m)	94,5	(% m/m)	88,8

Legenda: R1 a R7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE das raízes; X1 a X7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE dos xilopódios; F1 a F7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE das folhas;

Para o OE das raízes e dos xilopódios, as frações 1 forneceram maior massa recuperada, correspondendo à cerca 54,8 e 42,6%, respectivamente, do total de massa de partida. Para o OE das folhas, porém, podemos observar maior distribuição de massa entre as frações (Figura 45).

As análises por CCD destas frações (Figura 46) demonstraram que o fracionamento foi eficiente. Pode-se verificar também similaridade da composição química entre as frações (Tabela 12).

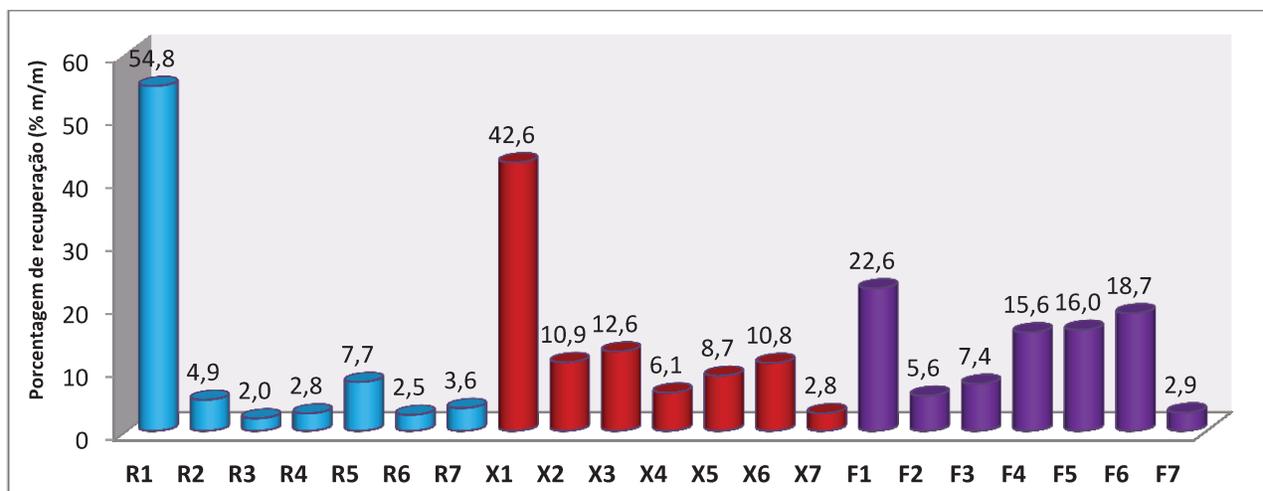


Figura 45. Rendimentos de recuperação das frações obtidas da cromatografia em coluna seca dos diferentes órgãos de *A. arenaria*.

Legenda: R1 a R7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE das raízes; X1 a X7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE dos xilopódios; F1 a F7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE das folhas.

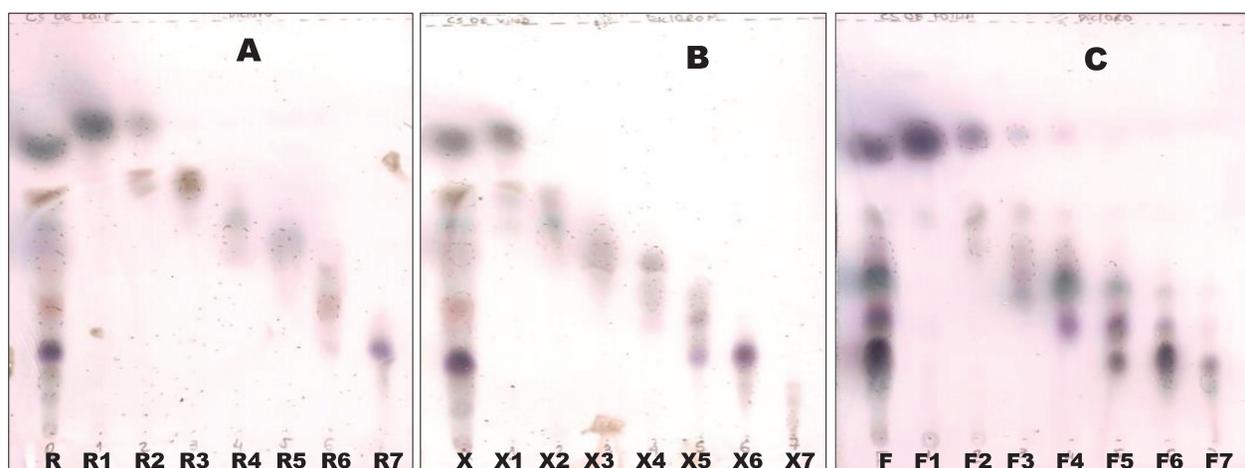


Figura 46. CCD's dos fracionamentos dos OE's das diferentes estruturas de *A. arenaria*. (A) CCD do fracionamento do OE R; (B) CCD do fracionamento do OE X; (C) CCD do fracionamento do OE F; Fase móvel: Diclorometano.

Legenda: R1 a R7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE das raízes; X1 a X7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE dos xilopódios; F1 a F7: Frações obtidas do fracionamento por cromatografia em coluna seca do OE das folhas.

A maioria dos compostos contidos nestas frações foi identificada por CG-EM (Tabela 25). Os fragmentogramas dos compostos não identificados são apresentados nos anexos 42 a 58.

Tabela 25. Composição química das frações resultantes dos fracionamentos dos OE's das raízes (R1 a R7), xilopódios (X1 a X7) e folhas (F1 a F7) de *A. arenaria*.

t _R (min)	Composto	MM (g.mol ⁻¹)	% Relativa							% Relativa							% Relativa						
			R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
5,97	α-Pineno	136	33,7	21,2	t	t	t	t	t	22,7	0,3	t	t	t	t	t	1,3	0,7	0,1	t	t	t	t
7,11	β-Pineno	136	7,5	5,5	t	t	t	t	t	5,5	t	t	t	t	t	nd	2,2	1,6	0,3	t	t	t	t
8,13	δ-3-Careno	136	7,3	5,8	nd	nd	nd	nd	nd	1,2	t	nd	nd	nd	nd	nd	t	t	t	t	nd	nd	nd
8,73	Limoneno	136	4,1	3,5	t	t	t	t	t	4,4	0,1	t	t	t	t	t	11,7	9,4	1,7	0,5	0,1	t	t
18,19	Orcinol dimetil eter	152	nd	t	2,5	1,7	nd	nd	nd	t	5,9	t	t	nd	nd	nd	nd	t	t	nd	nd	nd	nd
MONOTERPENO			52,5	36,0	2,5	1,7	0,0	0,0	0,0	33,8	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,2	11,6	2,0	0,5	0,1	0,0	0,0
23,84	Cipereno	204	15,9	17,1	0,3	t	t	t	t	9,1	0,3	t	t	t	t	t	t	t	t	nd	nd	nd	nd
24,60	Cariofileno	204	t	t	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15,0	13,3	2,8	0,5	0,2	t	0,2
26,10	α-cariofileno	204	1,1	1,2	nd	nd	nd	nd	nd	1,8	t	nd	nd	nd	nd	nd	7,1	7,4	1,3	0,2	nd	nd	nd
27,08	Germacreno D	204	0,8	1,1	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17,1	12,6	2,4	0,4	0,1	t	0,1
27,77	Biciclogermacreno	204	t	0,7	nd	nd	nd	nd	nd	0,8	t	nd	nd	nd	nd	nd	5,2	4,9	0,9	t	nd	nd	1,7
28,24	β-Bisaboleno	204	1,8	1,9	nd	nd	t	1,3	nd	4,1	t	0,8	0,7	nd	nd	nd	1,6	1,3	0,3	t	t	t	t
28,44	Copaeno	204	t	t	nd	nd	nd	t	0,6	t	nd	nd	t	t	t	nd	0,2	t	t	t	3,0	7,0	4,9
28,66	β-Patchouleno	204	1,1	1,3	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	nd	nd	3,4	10,2	6,9						
28,77	δ-Cadineno	204	2,7	3,0	nd	nd	nd	nd	0,3	4,1	t	nd	nd	nd	nd	nd	10,1	8,4	1,9	0,4	nd	nd	nd
30,29	ni 2	220	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	0,6	14,7	9,9	nd	nd	nd	nd	t	nd	nd	0,4	nd	nd
30,37	Nerolidol	222	nd	nd	nd	nd	nd	2,8	0,9	nd	nd	nd	nd	2,5	nd	nd	0,2	0,3	4,7	1,7	nd	nd	nd
30,68	Palustrol	222	nd	nd	nd	nd	t	3,2	0,2	nd	nd	1,1	1,1	nd	nd	nd	nd	0,4	29,1	54,7	18,9	3,4	3,8
30,90	Espatuleno	220	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,9	nd	nd	nd	nd	2,4	t	nd	nd	nd	0,8	2,2	8,5	11,2	7,7
31,15	Óxido de Cariofileno	220	nd	nd	nd	nd	nd	4,8	0,6	nd	nd	nd	4,2	1,3	nd	nd	t	t	0,6	5,1	4,3	2,9	2,3
31,31	ni 8	220	nd	nd	0,7	nd	nd	nd	nd	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	t	2,9	t	1,3	nd	5,3	4,4
31,42	ni 9	222	nd	nd	nd	t	nd	nd	1,3	nd	nd	nd	nd	2,8	t	nd	nd	nd	1,5	nd	10,3	2,9	2,1

Tabela 25. Continuação. Composição química das frações resultantes dos fracionamentos dos OE's das raízes (R1 a R7), xilopódios (X1 a X7) e folhas (F1 a F7) de *A. arenaria*.

t _R (min)	Composto	MM (g.mol ⁻¹)	% Relativa							% Relativa							% Relativa						
			R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
31,65	Carotol	222	nd	nd	nd	49,5	100	34,2	1,4	nd	9,3	67,4	46,7	1,7	nd	nd	nd	0,8	14,9	7,5	2,4	0,5	0,8
31,89	Ledol	222	nd	nd	nd	nd	t	2,3	t	nd	0,5	nd	1,2	0,8	nd	nd	nd	nd	0,3	t	6,6	9,6	8,3
32,89	Muuroala-4,10-(14)-dien-1-1β-ol	220	nd	nd	nd	4,0	t	nd	0,3	nd	10,1	3,1	nd	nd	t	nd	nd	4,4	5,8	7,0	8,1	1,3	1,6
33,22	Daucol	238	nd	nd	nd	nd	t	t	1,5	nd	nd	t	0,3	0,4	t	37,0	nd	t	nd	t	1,3	2,4	2,4
34,12	ni 4	222	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	3,0	nd	nd	nd	t	6,1	t	nd	t	t	nd	1,5	9,9	4,5	2,1
34,45	ni 10	222	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	nd	nd	t	t	t	t	t	t	nd	nd	nd	4,2	3,0
35,00	ni 5	220	nd	nd	nd	nd	nd	0,8	0,4	nd	nd	nd	0,3	0,7	t	0,7	nd	nd	nd	nd	1,2	5,6	11,2
38,18	ni 11	220	nd	nd	nd	nd	nd	nd	t	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,5	nd						
40,18	ni 12	ni	nd	nd	t	t	nd	12,3	t	nd	nd	nd	nd	1,1	nd	nd	t	t	t	nd	nd	nd	nd
SESQUITERPENO			23,4	26,3	1,0	53,5	100	62,7	13,9	21,2	21,5	87,0	64,5	19,7	0,0	42,2	56,5	56,6	67,2	82,5	78,4	71,0	63,4
43,62	Pimara-8(14),15-dieno	272	8,0	8,4	t	nd	nd	t	nd	17,1	0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
43,79	ni 13	ni	nd	2,3	12,3	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	0,7	nd						
46,43	ni 7	290	nd	nd	nd	nd	nd	6,9	nd	nd	nd	nd	t	1,2	nd	nd	nd	nd	nd	t	0,6	t	t
48,23	8β-Podocarpán-8-ol	290	nd	nd	5,3	35,1	t	t	nd	1,6	49,1	1,6	0,4	nd	nd	nd	nd	t	t	nd	nd	nd	nd
49,61	ni 14	ni	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,7	nd	nd	nd	nd	9,2	t	nd	nd	nd	nd	nd	0,7	0,3	0,3
50,20	Pimaral	286	nd	7,9	56,6	0,7	nd	nd	nd	2,2	8,0	t	t	t	t	t	nd						
50,96	ni 15	288	nd	t	8,7	0,6	nd	nd	nd	1,0	4,2	t	t	t	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
51,49	ent-8(14),15-pimaradien-3β-ol	288	nd	nd	nd	nd	nd	3,6	56,1	nd	nd	nd	t	23,9	88,9	2,0	nd						
52,96	ni 16	288	nd	nd	nd	nd	nd	2,4	10,9	nd	nd	nd	nd	14,5	11,1	nd							
53,40	ni 17	402	nd	1,4	0,8	t	t	0,8	1,0	t	0,3	t	t	1,2	t	11,7	t	t	t	t	t	t	0,2
DITERPENO			8,0	20,0	83,5	36,3	0,0	13,7	69,7	21,9	62,2	1,6	0,4	50,1	100	14,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,3	0,5
Total (%)			84,0	82,3	87,2	91,6	100	76,4	83,6	77,1	90,1	88,7	64,8	69,8	100	56,6	71,7	68,4	69,4	83,0	80,0	71,3	64,0

Legenda: t_R= tempo de retenção em min; MM= Massa molecular em g.mol⁻¹; ni= não identificado; nd= não detectado; t= traços.

A distribuição da composição química de todos os fracionamentos demonstrou que as frações de menor polaridade (1, 2 e 3) foram às que mais apresentaram monoterpenos. Adicionalmente as frações 4 a 7 foram enriquecidas em sesqui e diterpenos (Figura 47).

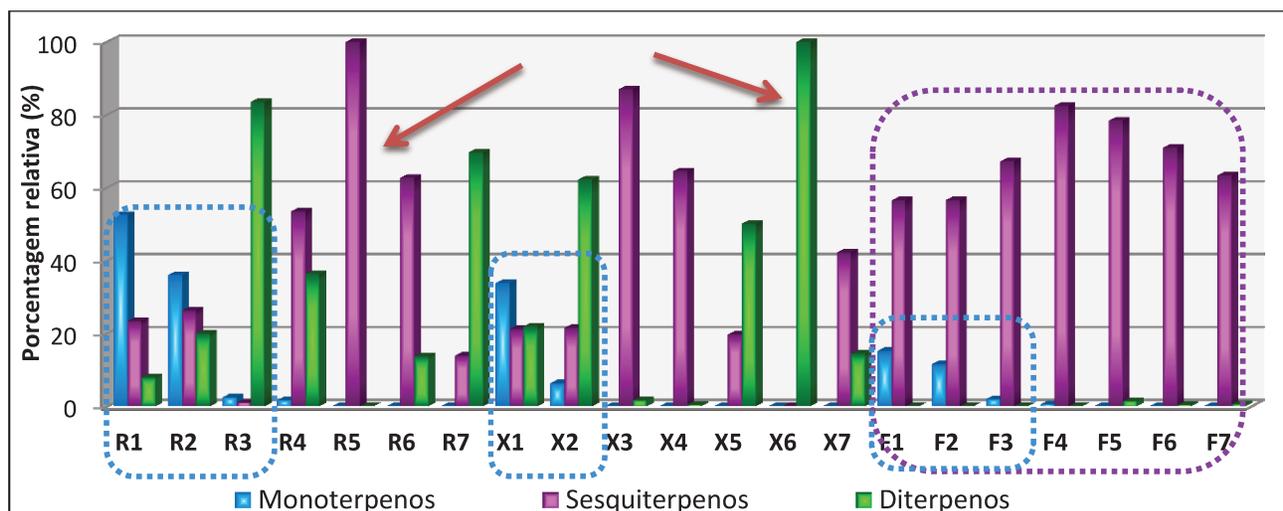


Figura 47. Distribuição da composição química do fracionamento dos OE's das raízes (R1 a R7), xilopódios (X1 a X7) e folhas (F1 a F7) de *A. arenaria*.

No fracionamento do OE das raízes a maioria dos compostos encontrados nas frações R1 e R2 foram monoterpenos, com 52,5 e 36,0%, respectivamente. O α -pineno e o limoneno foram os compostos mais abundantes. As frações R3 e R7 estavam enriquecidas no pimaral (Figura 48) e no *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**), respectivamente. No caso das frações R4, R5 e R6, o composto majoritário foi o sesquiterpeno carotol, representando 100% da R5.

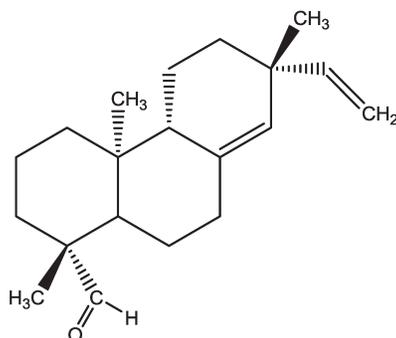


Figura 48. Estrutura do pimaral (MM 286 g.mol⁻¹), composto majoritário da fração R3 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.

No fracionamento do OE dos xilopódios, apenas as frações X1 e X2 apresentaram monoterpenos, com 33,8 e 6,3%. As demais frações apresentaram sesqui e diterpenos, destacando-se nas frações X3 e X4 o carotol, nas frações X5 e X6 o *ent-8(14),15-pimaradien-3 β -ol* e na fração X7 o daucol.

Quanto ao fracionamento do OE das folhas, todas as frações provenientes apresentaram maior proporção de sesquiterpenos, constituindo mais do que 56% da composição das frações. As frações F1, F2 e F3 apresentavam monoterpenos, 15,2, 11,6 e 2,0%, respectivamente, destacando-se o limoneno. Adicionalmente nas frações F4, F5, F6 e F7 os compostos majoritários identificados foram o palustrol, espatulenol e ledol.

A análise dos gráficos de concentração versus crescimento celular demonstrou que o fracionamento direcionou a atividade, indicando maior seletividade entre as linhagens (Figura 49).

Neste teste algumas linhagens não foram avaliadas, devido à indisponibilidade de células viáveis na data de realização do ensaio.

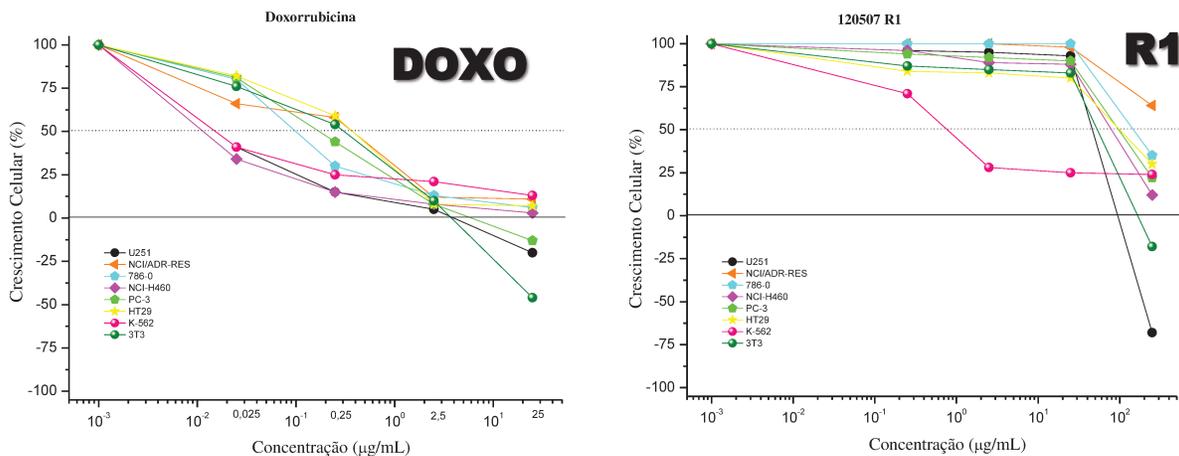


Figura 49. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações obtidas dos fracionamentos dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*. (DOXO) Quimioterápico de referência, doxorubicina; (R1) Fração obtida da coluna seca do OE das raízes de *A. arenaria*.

Legenda: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e 3T3 (fibroblasto de camundongo).

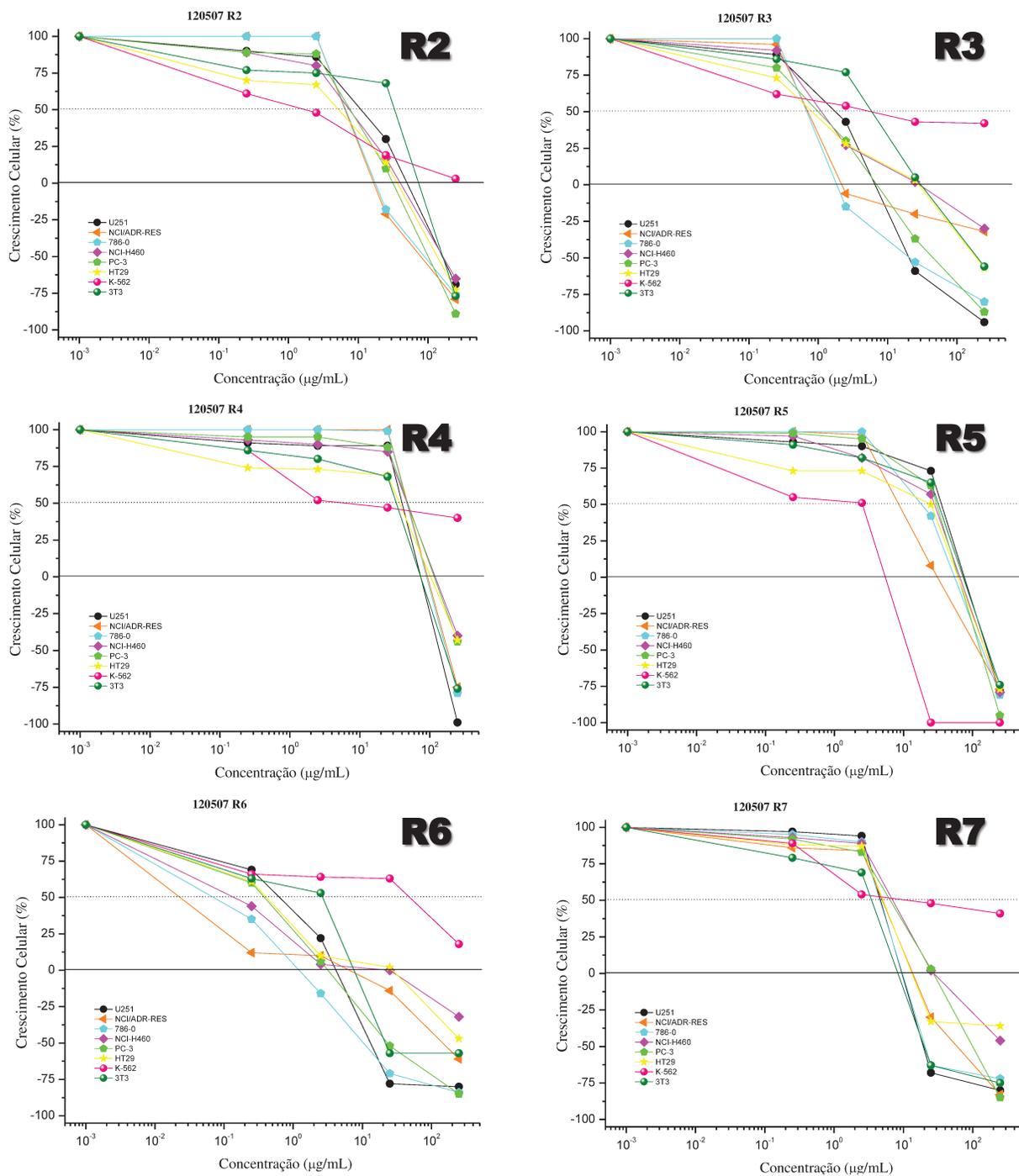


Figura 49. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações obtidas dos fracionamentos dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*. (R2 a R7) Frações obtidas da coluna seca do OE das raízes de *A. arenaria*.

Legenda: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e 3T3 (fibroblasto de camundongo).

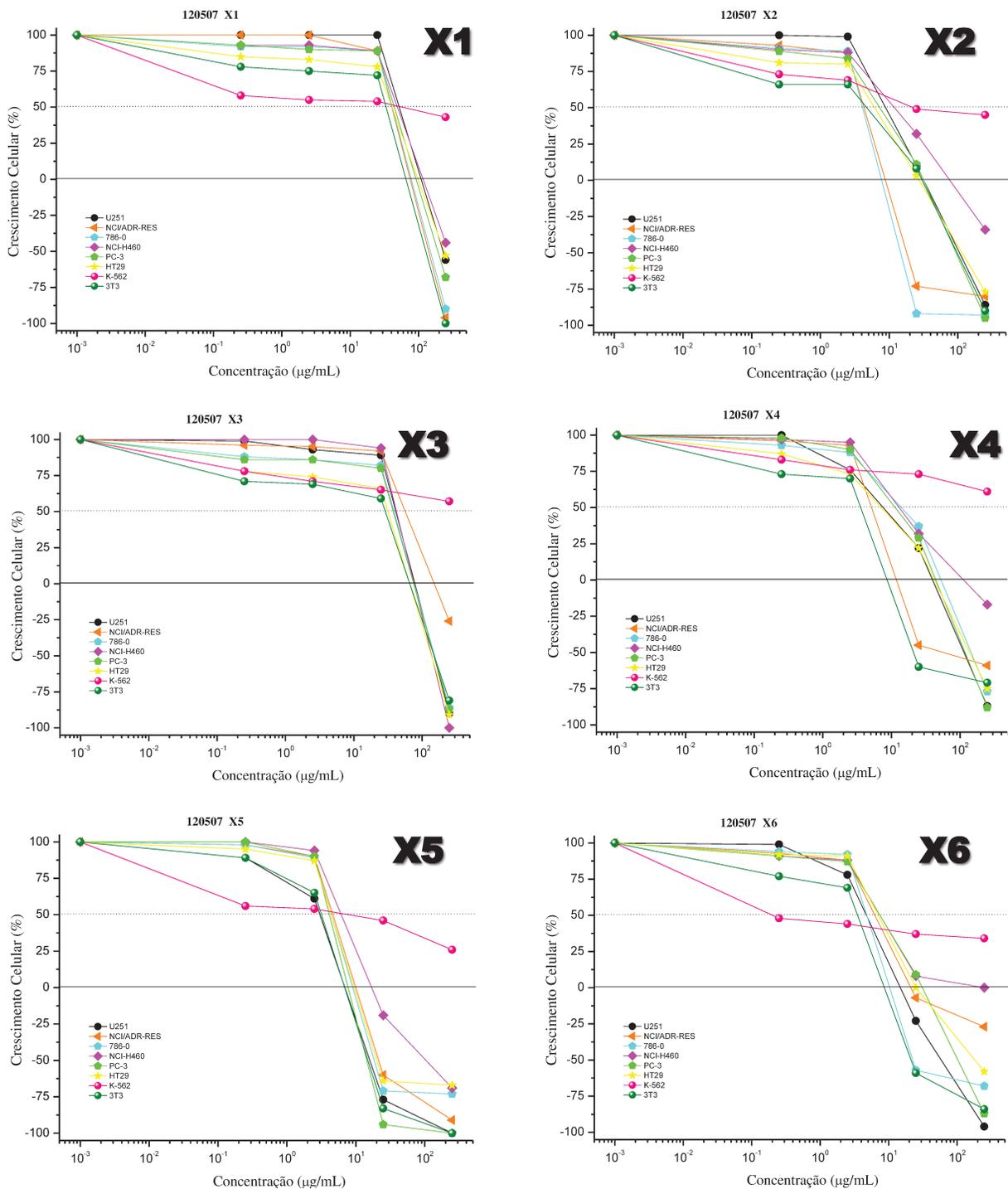


Figura 49. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações obtidas dos fracionamentos dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*. (X1 a X6) Frações obtidas da coluna seca do OE dos xilopódios.

Legenda: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e 3T3 (fibroblasto de camundongo).

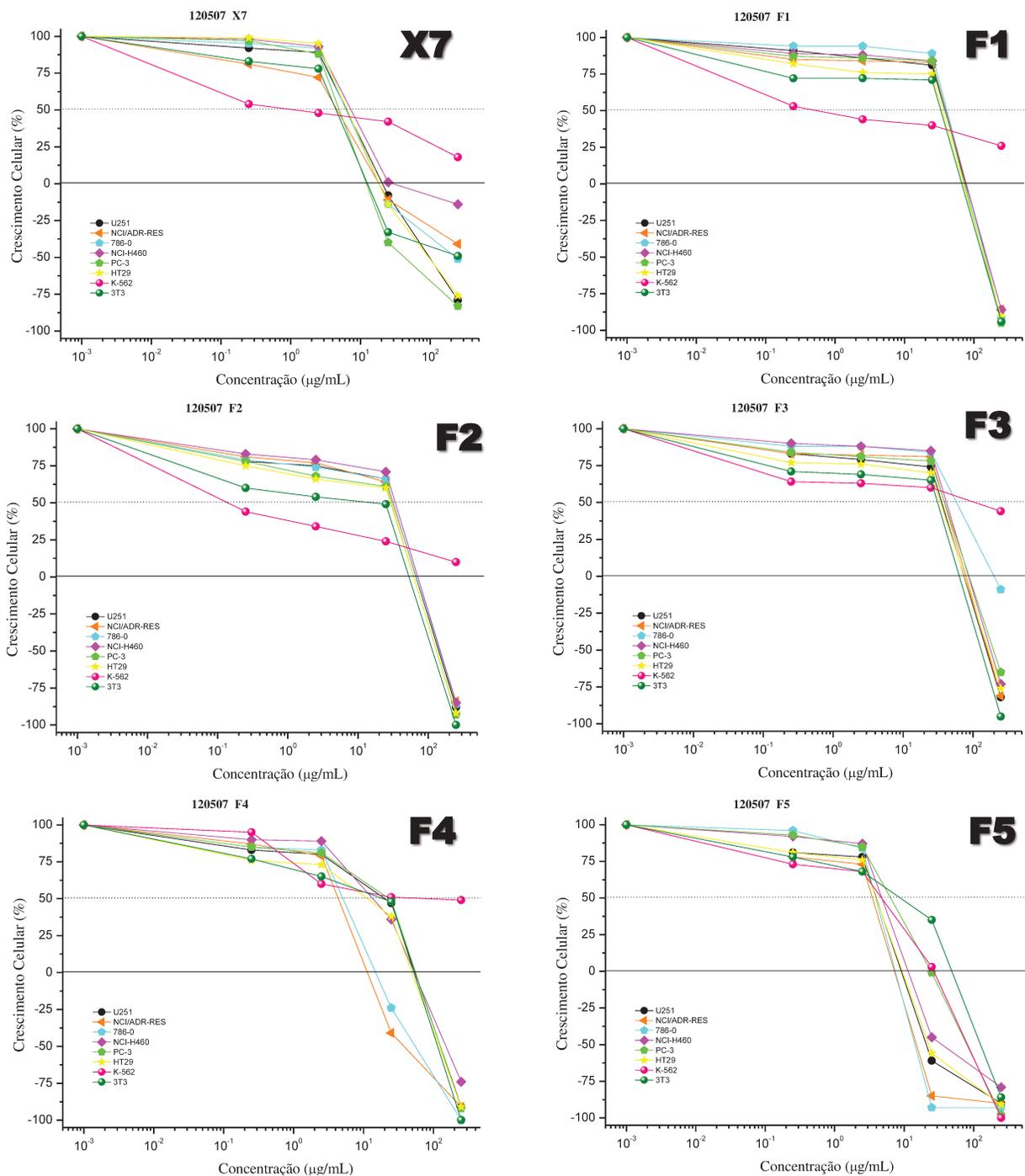


Figura 49. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações obtidas dos fracionamentos dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*. (X7) Fração obtida da coluna seca do OE dos xilopódios de *A. arenaria*; (F1 a F5) Frações obtidas da coluna seca do OE das folhas de *A. arenaria*.

Legenda: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e 3T3 (fibroblasto de camundongo).

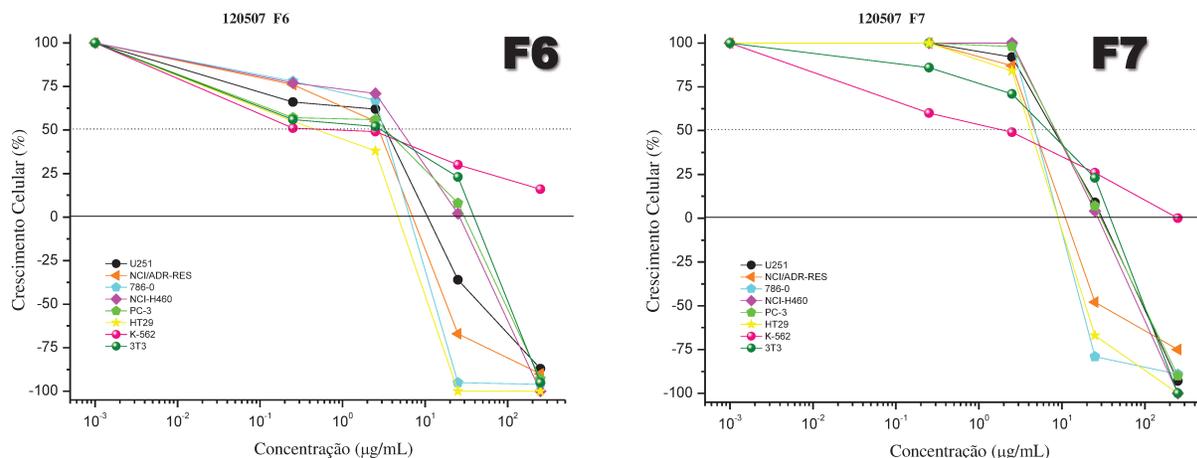


Figura 49. Continuação. Curvas de crescimento celular em função da concentração das frações obtidas dos fracionamentos dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria*. (F6 e F7) Frações obtidas da coluna seca do OE das folhas de *A. arenaria*.

Legenda: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e 3T3 (fibroblasto de camundongo).

Estes gráficos demonstraram que a maioria das frações avaliadas possuía atividade citostática, sendo as mais promissoras R3, R6, R7, X4, X5, X6, X7, F5, F6 E F7. Quanto aos valores de GI₅₀ foi possível perceber que dentre as frações oriundas do OE das raízes, as mais ativas foram R3, R6 e R7, as quais conseguiram inibir 50% do crescimento celular de algumas linhagens já na primeira concentração (0,25 µg.mL⁻¹). As demais frações também tiveram ação citostática, porém em maiores concentrações.

Com o objetivo de segregar as amostras mais interessantes, avaliou-se a atividade citostática média (média do log GI₅₀), baseada nos critérios do NCI e apresentada no mesmo estudo proposto anteriormente por Fouche e colaboradores (2008). Ela foi determinada através do software MS Excel e as atividades foram classificadas como: inativa (média do log GI₅₀ > 1,5), fraca (1,1 < média do log GI₅₀ < 1,5), moderada (0 < média do log GI₅₀ < 1,1) ou potente (média do log GI₅₀ < 0). A avaliação da média do logaritmo do GI₅₀ permitiu verificar quantitativamente a inibição celular do crescimento (Tabela 26).

Através da avaliação dos valores do logaritmo do GI₅₀ foi possível verificar quantitativamente a inibição de 50% do crescimento celular. Estes resultados demonstraram que as frações mais promissoras foram R3 e R6, as quais apresentaram atividade potente para pelo menos 5 das 7 linhagens avaliadas.

Já as frações F2 e F6 foram mais seletivas para K-562 (Leucemia, log GI₅₀ – 0,45) e HT-29 (Cólon, log GI₅₀ – 0,42), respectivamente.

Tabela 26. Valores do log de GI₅₀ (µg.mL⁻¹) obtidos para as frações dos OE's e dos diferentes órgãos de *A. arenaria* (R – raiz; X – xilopódio e F- folhas).

	U251	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT29	K-562	3T3
DOXO	-1,71	-0,69	-0,95	-1,82	-0,77	-0,53	-1,50	-0,67
R1	1,52	2,57	2,36	1,89	2,03	1,98	0,05	1,48
R2	1,11	0,80	0,76	1,37	0,85	0,56	0,06	1,42
R3	0,39	-0,44	-0,44	-0,38	0,11	-0,01	-0,10	1,04
R4	1,50	1,60	1,58	1,49	1,50	1,44	1,32	1,42
R5	1,45	1,34	1,40	1,41	1,43	1,40	0,40	1,43
R6	-0,29	-1,36	-0,64	-0,68	-0,49	-0,43	1,19	0,40
R7	0,53	0,49	0,51	0,74	1,31	0,49	1,42	0,44
X1	1,59	1,47	1,50	1,50	1,50	1,46	1,35	1,45
X2	1,22	0,50	0,51	1,39	0,81	1,29	1,69	0,50
X3	1,50	1,52	1,48	1,53	1,47	1,43	2,82	1,42
X4	0,81	0,52	1,38	1,25	1,39	0,76	3,36	0,44
X5	0,42	0,51	0,50	0,86	0,51	0,45	0,66	0,43
X6	0,47	0,51	0,52	0,85	0,43	0,64	0,25	0,44
X7	0,50	0,45	0,52	0,76	0,50	0,96	0,31	0,47
F1	1,47	1,48	1,50	1,48	1,48	1,46	0,28	1,45
F2	1,43	1,43	1,43	1,45	1,42	1,42	-0,45	1,40
F3	1,45	1,47	1,48	1,48	1,46	1,44	1,82	1,43
F4	1,39	0,47	0,73	1,38	1,40	1,37	1,84	1,39
F5	0,47	0,45	0,48	0,50	1,07	0,47	0,57	0,74
F6	0,43	0,40	0,44	0,60	0,01	-0,42	0,07	-0,03
F7	0,90	0,50	0,58	1,19	1,01	0,48	0,11	1,36

Legenda: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (côlon), K-562 (leucemia) e 3T3 (fibroblasto de camundongo).

Critério do NCI de Atividade para o log de GI₅₀: Inativa: média do log GI₅₀>1,5; Fraca: 1,1<média do log GI₅₀<1,0; Moderada: 0<média do log GI₅₀<1,1); e Potente: média do log GI₅₀ <0.

A maioria das frações testadas, aproximadamente 81%, apresentou atividade moderada ou potente para pelo menos uma das oito linhagens, demonstrando citotoxicidade inespecífica.

Quando avaliamos a inibição total do crescimento, através dos valores de TGI, percebemos que estas amostras também apresentam potencial citocida, com valores de TGI menores do que $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para várias linhagens (Tabela 27).

Tabela 27. Valores de TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos para os OE's e diferentes frações dos OE's dos diferentes órgãos de *A. arenaria* (R – raiz; X – xilopódio e F- folhas).

Amostra	U251	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT29	K-562	3T3
DOXO	2,71	25,42	14,70	7,67	6,82	16,99	31,23	3,35
X	56,45	77,98	15,44	92,10	64,46	83,32	> 100	176,93
R1	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
R2	45,69	19,62	20,47	37,52	28,91	28,17	> 100	69,67
R3	6,30	11,52	2,94	31,22	6,82	16,77	> 100	33,29
R4	56,10	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	70,68
R5	73,68	30,80	48,05	59,41	48,82	55,15	4,26	69,82
R6	3,47	3,32	1,16	12,66	3,09	13,02	> 100	7,76
R7	11,70	15,57	11,35	39,84	25,90	24,35	> 100	8,55
X	84,49	41,15	20,11	67,48	46,28	120,83	2,58	>250
X1	> 100	66,09	77,46	> 100	> 100	> 100	> 100	43,59
X2	29,59	9,83	7,42	79,40	28,43	26,37	> 100	22,16
X3	77,46	> 100	74,06	33,47	70,72	55,70	> 100	59,30
X4	33,92	14,01	46,95	> 100	37,95	35,46	> 100	8,96
X5	6,41	11,88	10,25	20,66	7,19	10,71	> 100	6,21
X6	16,32	48,76	12,39	> 100	28,67	32,53	> 100	8,87
X7	22,99	29,97	28,07	79,45	14,29	21,59	> 100	18,42
F	63,90	50,32	25,19	52,58	57,76	>250	113,53	122,21
F1	72,97	75,18	74,16	76,40	62,94	61,59	> 100	55,33
F2	58,51	60,59	60,31	64,91	51,38	51,86	> 100	42,44
F3	70,45	78,77	> 100	93,53	92,61	72,40	> 100	51,16
F4	45,71	12,69	16,67	47,80	45,94	41,66	> 100	41,00
F5	9,73	6,68	6,65	13,25	23,84	10,06	20,99	40,37
F6	10,48	6,65	5,17	21,72	17,30	3,91	> 100	20,63
F7	28,18	12,86	14,73	25,28	27,76	9,98	> 100	32,36

Legenda: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), K-562 (leucemia) e queratinócito humano (HaCat).

Quando comparamos os valores de TGI's obtidos para as amostras de OE's de partida (R, X e F) estes dados mostram que a atividade antiproliferativa foi potencializada em função do fracionamento.

Comparando-se os valores de TGI de todas as frações, verificou-se que as frações R1, R4, X1, F1, F2 e F3 foram inativas, apresentando TGI maiores do que $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Adicionalmente as frações R2 e X3 apresentaram fraca atividade. Todas as outras frações foram ativas, apresentando seletividade para algumas linhagens.

As frações R3, R6 e X5 foram muito ativas para linhagem U251 (Glioma), apresentando valores de TGI inferiores a $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a linhagem de NCI/ADR-RES (ovário resistente), as frações que apresentaram melhor atividade foram: R6, F5 e F6. Estas frações apresentaram valores de TGI menores do que $6,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Quanto à linhagem 786-0 (Rim), destacaram-se as frações R3 e R6. Para estas frações, os valores de TGI foram menores do que $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a linhagem de NCI-H460 (Pulmão), a melhor atividade foi encontrada para as frações R6 e F5, com valores de TGI abaixo de $13,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Já para a linhagem PC-3 (Próstata), as frações mais ativas foram R3, R6 e X5, com valores de TGI menores do que $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Quanto a linhagem HT29 (Cólon), as frações mais ativas foram X5, F5, F6 e F7, com valores de TGI inferiores a $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O perfil de ação obtido para a linhagem K-562 (Leucemia) foi bastante interessante, sendo que praticamente todas as frações foram inativas contra esta linhagem, com exceção das frações R5 e F5 ($\text{TGI} < 21 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

É importante salientar que as frações mais ativas apresentaram valores de TGI bem abaixo do valor encontrado para a doxorrubicina, refletindo uma excelente ação e maior potência.

Após análises dos valores de TGI verificou-se que as frações mais ativas foram: F4, F5, F6, F7, R3, R5, R6, R7, X4, X5 e X6. Estas frações foram avaliadas por CCD (Figura 50).

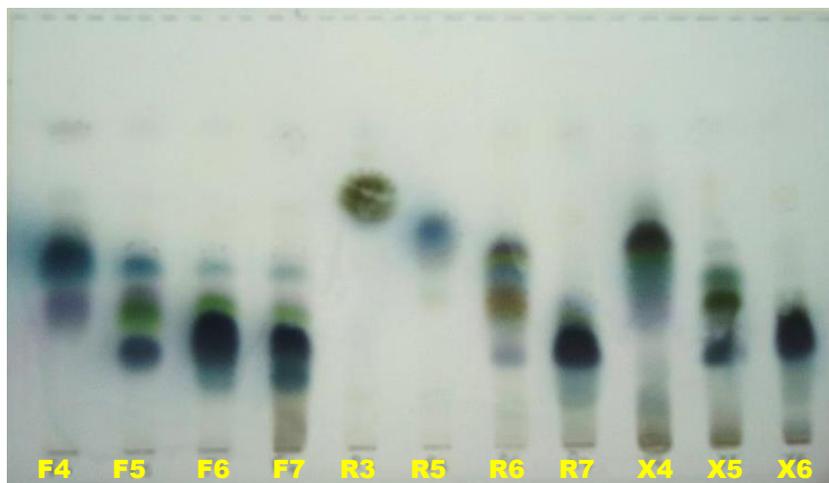


Figura 50. Foto da CCD contendo as frações mais ativas. *Fase móvel: Diclorometano.*

Estas frações após analisadas por CG-EM apresentaram em sua composição química principalmente terpenos de média polaridade, sendo majoritários os compostos palustrol, espatulenol, carotol, ledol, pimaral e *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol.

Desta forma, constatou-se que as frações R6 e F6 foram as mais promissoras, pois inibiram o crescimento de um maior número de linhagens tumorais com elevada potência. Deve-se destacar também que as frações R5 e F5 foram as únicas capazes de inibir o crescimento da linhagem tumoral K-562 (Leucemia). Estas frações apresentavam como compostos majoritários o carotol e palustrol.

4.7. Compilação dos resultados de atividade antiproliferativa *in vitro*

Baseado no estudo apresentado por Fouche e colaboradores (2008) as amostras obtidas de *A. arenaria* foram classificadas e agrupadas de acordo com o valor de TGI (Tabela 28).

Estes dados demonstraram que das 50 amostras avaliadas, 22 foram inativas ou apresentaram fraca atividade para algumas linhagens tumorais, representando 44% do total testado.

Dentre aquelas com potencial atividade (56%), 17 apresentaram exclusivamente atividade moderada (34%) e 11 atividade potente para pelo menos uma linhagem. Este mapeamento demonstrou que mais da metade das amostras estudadas possuíam atividade antiproliferativa *in vitro*, sendo que as mais promissoras estavam enriquecidas em compostos sesqui e diterpenos.

Tabela 28. Classificação das amostras quanto aos valores de TGI's.

Amostra	U251	UACC-62	MCF-7	NCI/ADR	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562
EC	n.a.	M	F	P	n.a.	F	M	F	F	n.a.
OER1	n.a.	I	I	F	n.a.	F	I	I	I	n.a.
OEX1	n.a.	M	F	P	n.a.	M	P	F	M	n.a.
Fr1 CSEC	F	I	I	F	F	I	F	I	F	I
Fr2 CSEC	F	F	I	M	F	I	F	F	F	I
Fr3 CSEC	M	M	I	M	M	F	F	M	M	I
Fr4 CSEC	M	M	F	P	M	F	M	M	M	I
Fr5 CSEC	F	I	I	M	F	I	F	I	F	I
Fr6 CSEC	F	I	I	M	F	I	F	I	F	I
Fr7 CSEC	F	I	I	M	F	I	F	I	F	I
Fr8 CSEC	F	I	I	F	F	I	F	I	F	I
Fr9 CSEC	F	I	I	F	F	I	I	I	I	I
Fr1 CSOEX	I	F	I	F	I	I	I	I	I	F
Fr2 CSOEX	I	F	I	I	I	I	I	I	I	I
Fr3 CSOEX	M	M	F	M	M	F	P	F	F	F
Fr4 CSOEX	M	M	F	P	M	M	M	P	M	P
Fr5 CSOEX	F	F	I	M	F	I	F	I	I	I
Fr 1- 6 CC	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Fr 9- 20 CC	F	I	F	F	F	F	F	F	I	I
Fr 24-28 CC	M	F	F	F	F	F	F	M	F	M
Fr 39-42 CC	F	I	I	F	F	I	F	I	I	I
Fr 48-51 CC	F	F	F	F	F	F	F	F	F	I
Fr 52-53 CC	F	F	I	M	M	I	F	F	F	I
Fr 54-55 CC	F	I	I	F	F	I	I	I	I	I
Fr 56-61 CC	F	I	I	I	I	I	F	F	I	I
R	I	n.a.	I	I	F	I	I	I	I	I
X	I	n.a.	I	F	F	I	F	I	I	P
C	P	n.a.	M	P	P	M	M	F	F	I
F	I	n.a.	F	I	F	I	I	I	I	I
R1	I	n.a.	n.a.	I	I	I	I	n.a.	I	I
R2	F	n.a.	n.a.	F	F	F	F	n.a.	F	I
R3	M	n.a.	n.a.	M	P	F	M	n.a.	F	I
R4	I	n.a.	n.a.	I	I	I	I	n.a.	I	I
R5	I	n.a.	n.a.	F	F	I	F	n.a.	I	P
R6	P	n.a.	n.a.	P	P	M	P	n.a.	M	I
R7	M	n.a.	n.a.	F	M	F	F	n.a.	F	I
X1	I	n.a.	n.a.	I	I	I	I	n.a.	I	I
X2	F	n.a.	n.a.	M	M	I	F	n.a.	F	I
X3	I	n.a.	n.a.	I	I	F	I	n.a.	I	I
X4	F	n.a.	n.a.	M	F	I	F	n.a.	F	I
X5	M	n.a.	n.a.	M	M	F	M	n.a.	M	I
X6	F	n.a.	n.a.	F	M	I	F	n.a.	F	I
X7	F	n.a.	n.a.	F	F	I	M	n.a.	F	I
F1	I	n.a.	n.a.	I	I	I	I	n.a.	I	I
F2	I	n.a.	n.a.	I	I	I	I	n.a.	I	I
F3	I	n.a.	n.a.	I	I	I	I	n.a.	I	I
F4	F	n.a.	n.a.	M	F	F	F	n.a.	I	I
F5	M	n.a.	n.a.	M	M	M	F	n.a.	M	F
F6	M	n.a.	n.a.	M	P	F	F	n.a.	P	I
F7	F	n.a.	n.a.	M	M	F	F	n.a.	M	I

Legenda: I – Inativa; F- Atividade Fraca; M- Atividade Moderada; P- Atividade Potente; n.a.- não avaliada

Os OE's, extrato e frações obtidos de *A. arenaria* quando avaliados para praticamente todas as linhagens exibiram melhor atividade (moderada e potente) para ovário resistente (NCI/ADR-RES), rim (786-6) e glioma (U251), correspondendo, respectivamente, a 44,0, 31,9 e 27,8% das amostras testadas.

Estes resultados permitiram confirmar a potencialização da atividade antiproliferativa *in vitro* em função do fracionamento dos OE's das diferentes estruturas, mesmo para os OE's inicialmente considerados inativos.

6. CONCLUSÃO

Os rendimentos de OE's dos diferentes órgãos vegetativos de *A. arenaria* variaram de acordo com a fase fisiológica da planta. Maior produção de OE foi observada nas raízes e folhas.

Quanto à composição química, os OE's dos órgãos subterrâneos e aéreos possuem maior proporção de monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente. O extrato clorofórmico mostrou-se enriquecido em diterpenos da classe dos pimaranos.

Os EC e OE's obtidos da espécie *A. arenaria* apresentaram promissora atividade antiproliferativa *in vitro* para praticamente todas as linhagens avaliadas, demonstrando atividade citocida em baixas concentrações e perfil concentração dependente.

O fracionamento do EC e OE's potencializou a ação antiproliferativa *in vitro* e demonstrou que as frações ricas em monoterpenos são inativas, enquanto as frações com maior proporção de sesqui e diterpenos apresentaram atividade moderada e potente, destacando as frações Fr 3 e 4 do EC enriquecidas em dois derivados pimaranos o ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (**1**) e álcool *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (**3**), e as frações Fr 3 e 4, R3, R5, R6, X5, F5, F6 e F7 dos OE's contendo como compostos majoritários carotol, palustrol, espatulenol, pimaral e diterpeno (**3**).

Os diterpenos **1** e **3** apresentaram atividade fraca e moderada, demonstrando possível sinergismo com outros compostos presentes nas frações mais ativas.

Na fase de dormência o EC das raízes e OE dos xilopódios foram mais ativos frente às linhagens de melanoma, ovário resistente, pulmão, próstata e cólon, já na fase de floração o OE dos caules foi mais ativo para as linhagens de glioma, mama, ovário resistente, rim, pulmão e próstata.

Os resultados demonstraram que 56% das 50 amostras avaliadas possuíam potencial atividade antiproliferativa *in vitro* e dentre estas, 34% apresentaram atividade moderada e 22% potente para pelo menos uma linhagem, com valores de TGI (*Total Growth Inhibition*) menores do que 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Estes resultados indicam que *Aldama arenaria* apresenta potencial atividade antiproliferativa *in vitro* e estudos posteriores de atividade anticâncer *in vivo* poderão comprovar sua ação antitumoral.

6. REFERÊNCIAS

- Adams, R. P.; *Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured Publishing Corporation: USA, 804p, **2007**.
- Almeida, A. M.; Fonseca, C.R.; Prado, P. I.; Almeida-Neto, M.; Diniz, S.; Kubota, U.; Braun, M.R.; Raimundo, R.L.G.; Dos Anjos, L.A.; Mendonça, T.G.; Futada, S.M.; Lewinsohn, T.M.; *Biota Neotrópica*, **2005**, 5, 2, 1-17 (a).
- Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, C.A., Donnici, C.L.; *Química Nova*, **2005**, 28, 1, 118-129 (b).
- Alonso-Castro, A. J.; Villarreal, M. L.; Salazar-Olivo, L. A.; Gomez-Sanchez, M.; Dominguez, F.; Garcia-Carranca, A.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133, 945-972.
- Ambrosio, S. R.; Tirapelli, C. R.; Bonaventura, D.; Oliveira, A. M.; da Costa, F. B.; *Fitoterapia*, **2002**, 73, 484-489.
- Ambrosio, S. R.; Tirapelli, C. R.; da Costa, F. B.; Oliveira, A. M.; *Life Sciences*, **2006**, 79, 925–933.
- Ambrósio, S.R.; Arakawa, N.S.; Esperandim, V.R.; Albuquerque, S.; Da Costa, F.B.; *Phytotherapy Research*, **2008**, 22, 1423-1415.
- Ambrósio, S. R.; Schorr, K.; da Costa, F. B.; *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32, 221-224.
- Ansell, S. M.; Pegel, K. H.; Taylor, D. A. H.; *Phytochemistry*, **1993**, 32, 4, 953-959.
- Balducci L.; Ershler, W. B.; *Nature Reviews Cancer*, **2005**, 5(8), 655-662.
- Bayer, R. J.; Star, J. R.; *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **1998**, 85, 242-256.
- Bombo, A. B.; Oliveira, T. S.; Oliveira, A. S. S.; Rehder, V. L. G.; Magenta, M. A. G.; Apezato-Da-Glória; *Australian Journal of Botany*, **2012**, 60, 632-642.
- Bremer, K.; *Asteraceae: cladistics and classification*; Portland: Timber Press, 752p, **1994**.
- Bringel Jr.; J. B. A.; A tribo Heliantheae Cassini (Asteraceae) na bacia do rio Paranã (GO, TO), *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasil, 152p, **2007**.
- Calixto, J. B.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 100, 131-134.
- Canales, M.; Hernández, T.; Caballero, J.; Vivar, A. R.; Avila, G.; Duran, A.; Lira, R.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 429-439.
- Carreca, I.; Balcucci, L.; Extermann, M.; *Cancer Treatment Reviews*, **2005**, 31, 380-402.
- Collins, H. C.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, Editora da UNICAMP, Campinas/SP, 456p, **2006**.
- Cragg, G. M.; Newman, D.; *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, 1830, 3670-3695.

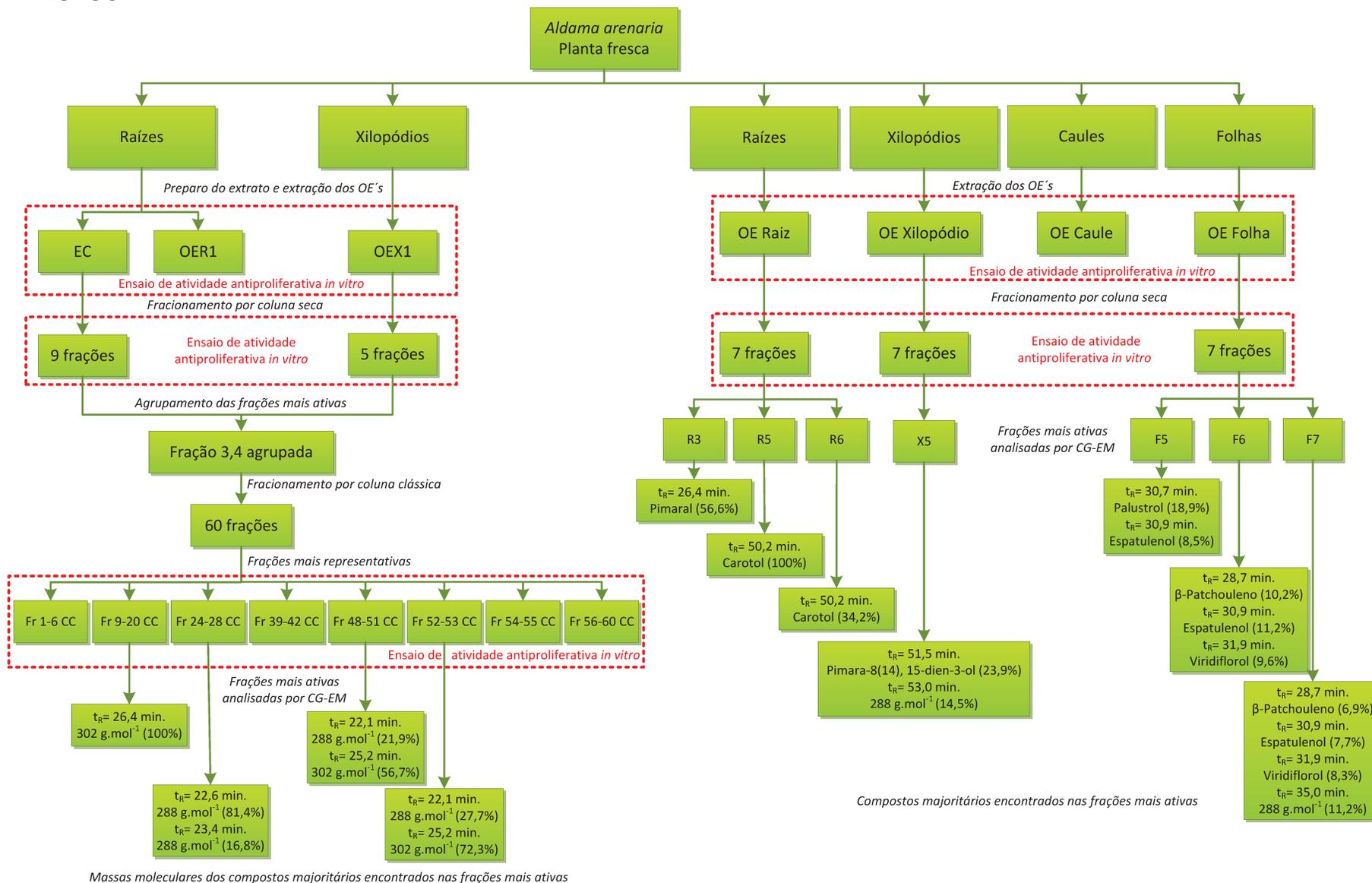
- Croteau, R. Kutchan, T. M.; Lewis, N. G., Natural Products (Secondary Metabolites) in Buchanan, B. B.; Grisse, W.; Jones, R. L. (Eds); *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1408p, **2000**.
- Cury, G.; Appezzato-Da-Glória, B., *Australian Journal of Botany*, **2009**, 57, 3, 229-239.
- Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C.; *Química Nova na Escola*, **1998**, 7, 21-25.
- Foglio, M. A.; Rehder, V. L. G.; Santos, A. S.; Queiroga, C. L.; *22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, **1999**, Poços de Caldas – MG.
- Fouche, G.; Cragg, G.M.; Pillay, P.; Kolesnikova, N.; Maharaj, V.J.; Senabe, J.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, 119, 455–461.
- GLOBOCAN, *Agência Internacional para Pesquisas sobre Câncer, WHO*; <http://globocan.iarc.fr/> acessado em julho de **2013**.
- Guimarães, D. O., Borges, W. S., Kawano, C. Y., Ribeiro, P.H., Goldman, G. H., Nomizo, A., Thieman, O. H., Oliva, G., Lopes, N. P. Pupo, M. T.; *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **2008**, 52, 134–144.
- Gurib-Fakim, A.; *Molecular Aspects of Medicine*, **2006**, 27, 1-93.
- Hipólito, U. V.; Rodrigues, G.J.; Lunardi, C.N; Bonaventura, D.; Ambrosio, S.R.; Oliveira, A.M.; Bendhack, L.M.; Da Costa, F.B.; Tirapelli, C.R.; *European Journal of Pharmacology*, **2009**, 612, 183-191.
- Instituto Nacional do Câncer – INCA; Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro/Brasil, 118p, **2011**.
- Instituto Nacional do Câncer – INCA; www.inca.gov.br, acessado em abril de **2013**.
- Instituto Nacional do Câncer – INCA; Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional; Vol. 4, *Instituto Nacional do Câncer*, Rio de Janeiro, INCA, **2010**.
- Borchardt, J.K.; *Drug News Perspect.* **2002**, 15, 187–192.
- Jeffrey, C.; Book Review; *Compositae News*, **1978**, 7, 1-6.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M. J.; *CA Cancer Journal Clinicians*, **2009**, 59, 4, 225-249.
- Kang, O.; Chae H.S.; Choi, J.G.; Oh, Y.C.; Lee; Y.S.; Kim, J.H., Seung, M.J.; Jang, H.J., Bae, K.H.; Lee, J.H.; Shin, D.W.; Kwon, D. Y.; *European Journal Pharmacology*, **2008**, 601 179–185.
- Kato, F. H.; Viana, N. I.; Santini, C. B.; Souza, C. G. G.; Veneziani, R. C. S., Ambrósio, S. R.; Tavares, D. C.; *Mutation Research*, **2012**, 749, 87– 92.
- Kingston, D. G. I.; Taxol and its analogs, in Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. (eds); *Anticancer Agents from Natural Products*, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 123-175, **2012**.
- Lee, K.-H.; Xiao, Z., Podophyllotoxin and analogs, in Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. (eds); *Anticancer Agents from Natural Products*, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 95-122, **2012**.

- Lorenzi, H; Matos, F. J. A.; *Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas*; 2ª Edição; Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum, 544p, **2008**.
- Magenta, M.A.G., Viguiera Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil, *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 353p, **2006**.
- Mann, J.; *Nature, Reviews (Cancer)*, 2, **2002**, 143-148.
- Matsuo, A., Uto, S. Nakayama, M., Hayashi, S.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O.; *Tetrahedron Letters*, **1976**, 28, 2451-2454.
- Mihashi, S.; Yanagisawa, I.; Tanaka, O.; Shibata, S.; *Tetrahedron Letters*, **1969**, 21, 1683-1686.
- Monks A., Scudeiro 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.; *Journal of National Cancer Institute*, **1991**, 83, 757-766.
- Muhammad, N.; Barkatullah; Ibrar, M.; Khan, H.; Saeed, M.; Khan, A. Z.; Kaleem, W. A.; *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2013**, 3(3), 206-206.
- Newman, D.; Cragg, G. M.; *Journal of Naural Products*, **2012**, 75, 311-335.
- Oliveira, R. N.; Rehder, V. L. G.; Oliveira, A. S. S.; Montanari Jr., I.; Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Jeraldo, V. L. S.; Linhares, A. X.; Allegretti, S. M.; *Experimental Parasitology*, **2012**, 132, 135-143.
- Oliveira, T. S.; Anatomia, germinação de sementes e análise do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae – Helianthae), *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Brasil, 95p, **2011**.
- Oliveira, T.; Bombo, A. B.; Appezzato-da-Glória, B.; *Botany*, **2013**, 91 (6), 335-342.
- Porto, T. S., Furtado, N. A.J.C., Heleno, V. C.G., Martins, C. H.G., Da Costa, F. B., Severiano, M. E., Silva, A. N., Veneziani, R. C.S., Ambrósio, S. R.; *Fitoterapia*, **2009**, 80, 432–436.
- Porto, T. S.; Silva Filho, A. A.; Magalhães, L. G.; Santos, Raquel A.; Furtado, N. A. J. C.; Arakawa, A. S.; Said, S.; Oliveira, D. C. R.; Gregório, L. E.; Rodrigues, V.; Veneziani, R. C. S.; Ambrosio, S. R.; *Chemistry & Biodiversity*, **2012**, 9, 1465-1474.
- Rates, S. M. K.; *Toxicon Review*, **2001**, 39, 603-613.
- Roussi, F.; Gueritte, F.; Fahy, J., The Vinca Alkaloids in: Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. (eds); *Anticancer Agents from Natural Products*, Taylor and Francis, Boca Raton, Fl, 177-198, **2012**.
- Rowinsky, E. K.; Gilbert, M.; McGuere, W. P.; Noe, D. A.; Grochow, L. B.; Forastiere, A. A.; Ettinger, D. S.; Lubejko, B. G.; Clark, B.; Sartorius, S. E.; Cornblath, D. R.; Hendricks, C. B.; Donehower, R. C.; *Journal of Cliical Oncology*, **1995**, 9, 1692-1703,
- Rubinstein, L. V.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Simon, R. M.; Tosini, S.; Skehan, P.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Boyd M. R.; *Journal of National Cancer Institute*, **1990**, 82, 13, 1113-1118.

- Schilling, E. E.; Panero, J. L.; *Botanical Journal Linnean Society*, **2011**, 167, 311-331.
- Shoemaker R.H.; *Nature Reviews Cancer*, **2006**, 6, 813-823.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R.; *Journal of National Cancer Institute*, **1990**, 82, 1107-1112.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H.; *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 703p, **2008**.
- Taylor, P. G.; Loo, O. A. D.; Bonilla, J. A.; Murillo, R.; *Fitoterapia*, **2008**, 79, 428-432.
- Thakur, R. A.; Wang, Y.; Michniak, B. B., Essential Oils and Terpenes, in Smith, E. W.; Maibach, H. (Ed.); *Percutaneous Penetration Enhancers*, 2. Ed., Taylor & Francis, 159-173, **2006**.
- WHO, The Regional Strategy for Traditional Medicine in the Western Pacific (2011-2020); *World Health Organization*; Geneva, Switzerland, **2012**.
- Tirapelli, C. R.; Ambrosio, S. R., Da Costa, F. B.; Coutinho, S. T.; Oliveira, D. C. R.; Oliveira, A. M.; *European Journal of Pharmacology*, **2004**, 492, 233-241.
- Tirapelli, C. R.; Ambrosio, S. R.; Oliveira, A. M.; Tostes, R. C.; *Fitoterapia*, **2010**, 81, 690-702.
- Tirapelli, C. R.; Dos Anjos Neto Filho, M.; Bonaventura, D.; Melo, M. C. C.; Ambrosio, S. R.; Oliveira, A. M.; Bendhack, L. M.; da Costa, F. B.; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2008**, 60, 453-459.
- Wagner, H.; Bladt, S.; *Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2th Edition; 384p, **1996**.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Cogoon, P.; McPhail, A. T.; *Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)*, **1971**, 93, 2325-2327.
- WHO, World Health Organization, Cancer, www.who.int/, acessado em julho de **2013**.

ANEXOS

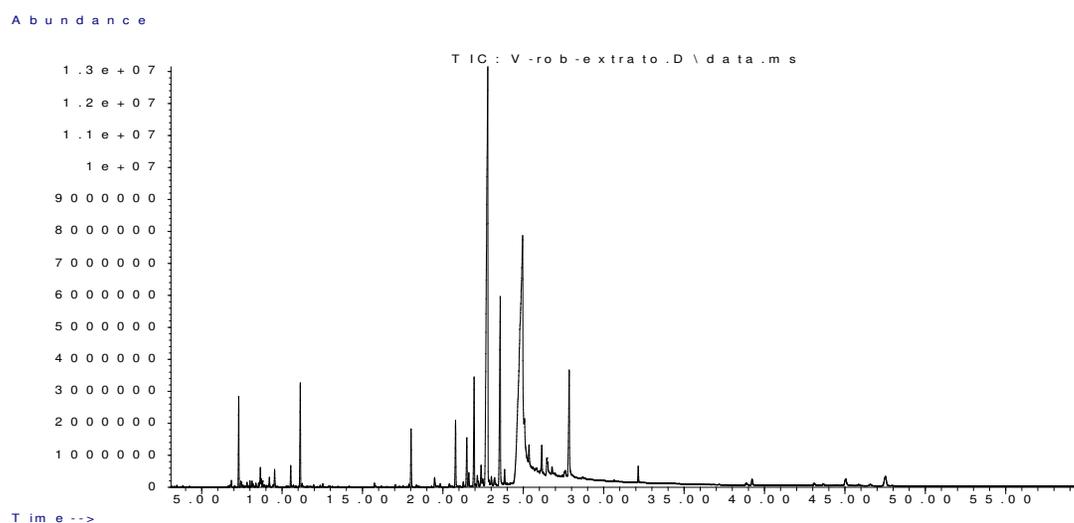
1. FLUXOGRAMA



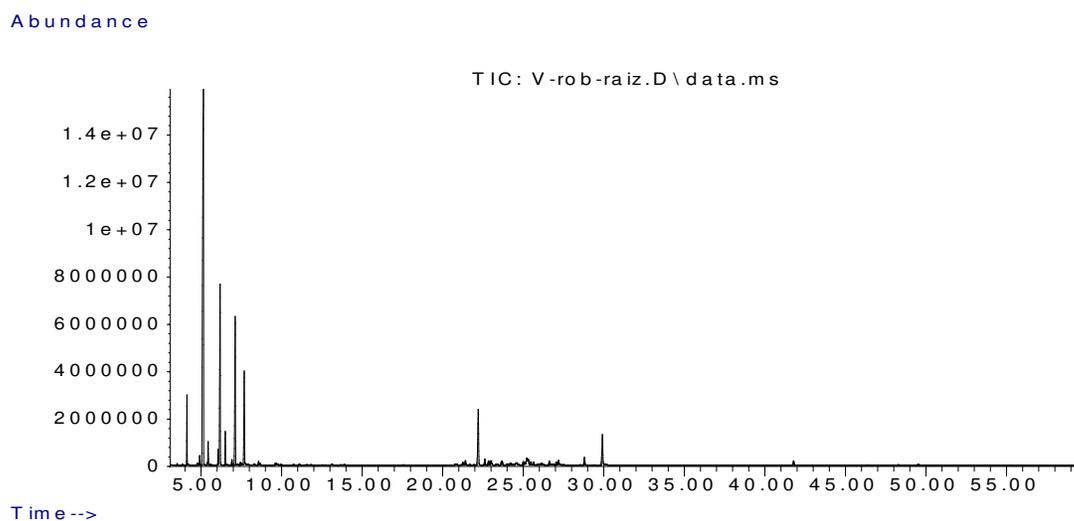
Anexo 1. Fluxograma de obtenção das amostras avaliadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* de *A. arenaria*.

2. CROMATOGRAMAS E FRAGMENTOGRAMAS OBTIDOS POR CG-EM

A coluna utilizada foi uma coluna capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) contendo 0,25 μm de espessura de filme, 30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro. As condições cromatográficas utilizadas para a análise do EC e frações da coluna clássica foram: Injeção split/splitless, Temperaturas: injetor= 250 °C, detetor= 300 °C, coluna= 110 °C, 5 °C.min⁻¹, 280 °C (26 min) e gás de arraste He 1,0 mL.min⁻¹; e para análise dos OE's e frações: Injeção split/splitless, Temperaturas: injetor= 220 °C, detetor= 280 °C, coluna= 60 °C, 3 °C.min⁻¹, 240 °C e gás de arraste He 1,0 mL.min⁻¹).

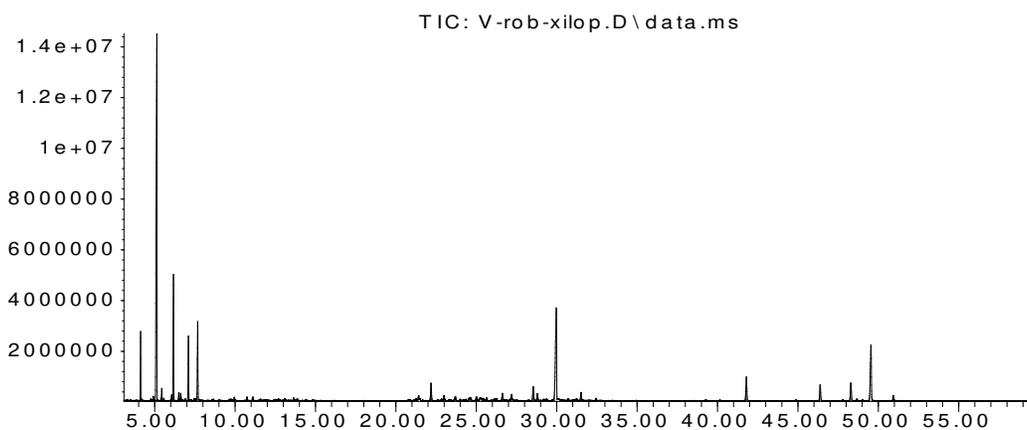


Anexo 2. Cromatograma do extrato clorofórmico (EC) de *A. arenaria*. Material vegetal coletado em 24/08/2009.



Anexo 3. Cromatograma do OE das raízes de *A. arenaria* (OER). Material vegetal coletado em 24/08/2009.

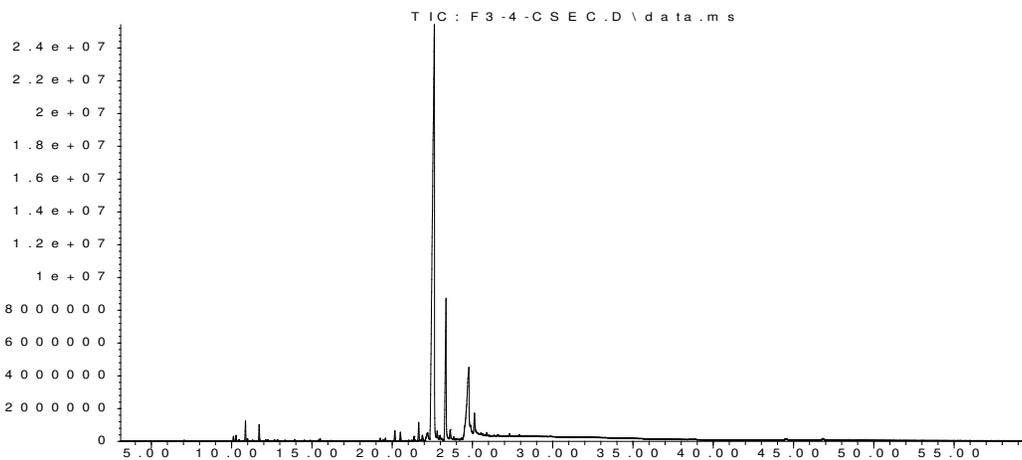
Abundance



Time-->

Anexo 4. Cromatograma do OE dos xilopódios de *A. arenaria* (OEX1). Material vegetal coletado em 24/08/2009.

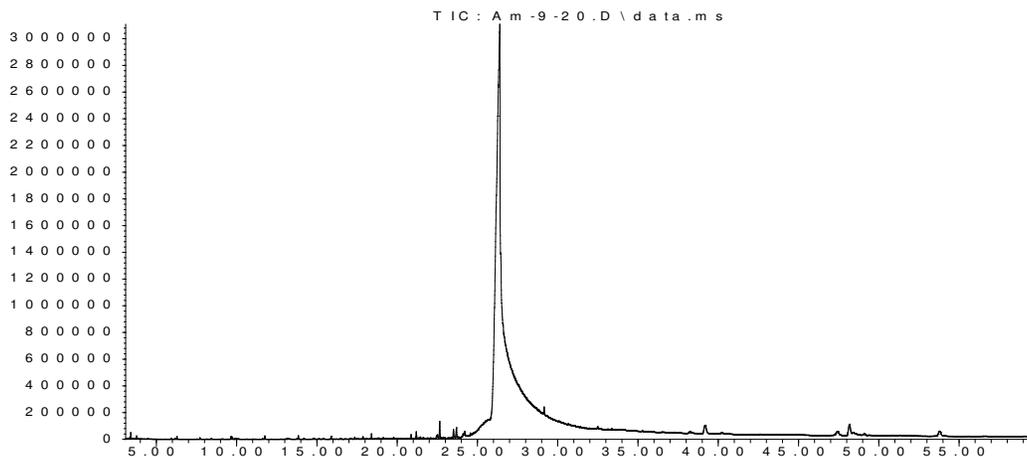
Abundance



Time-->

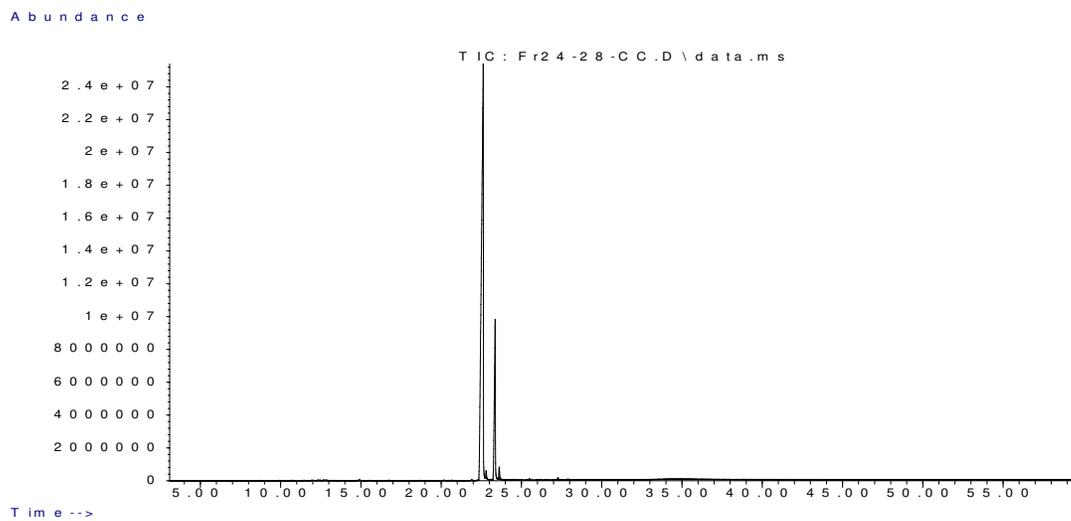
Anexo 5. Cromatograma da Fr 3,4 obtida dos fracionamentos do OEX1 e EC de *A. arenaria*.

Abundance

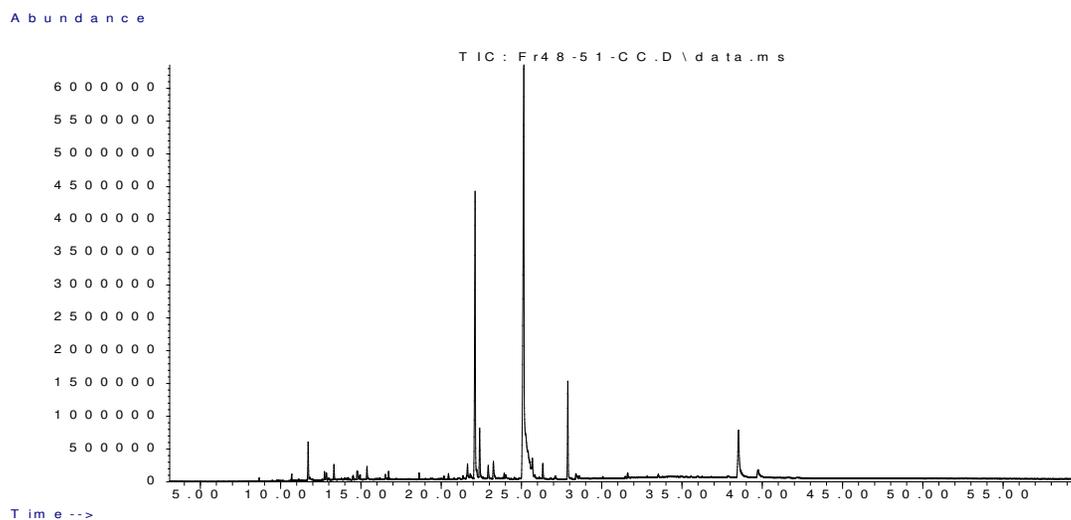


Time-->

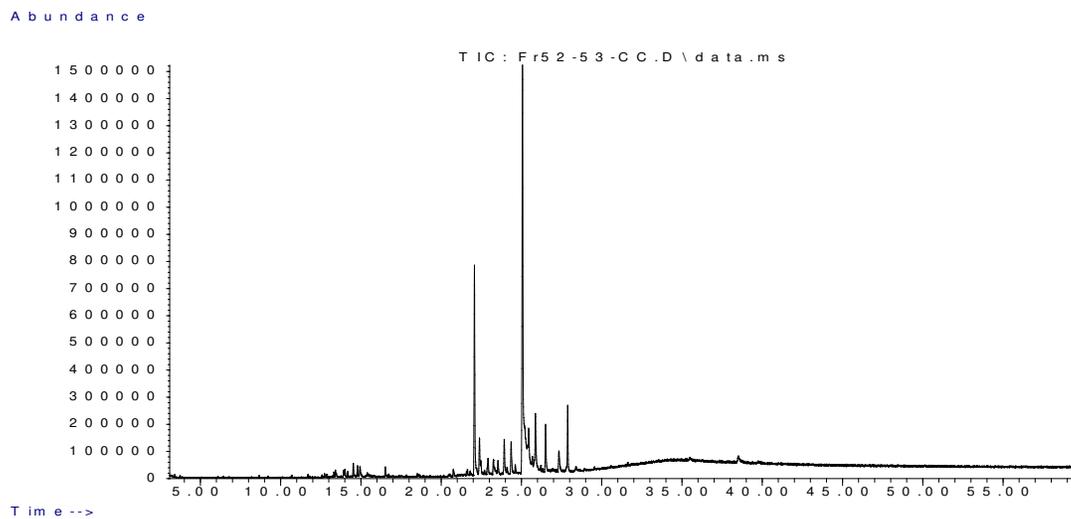
Anexo 6. Cromatograma da fração 9-20 da coluna clássica da Fr 3,4.



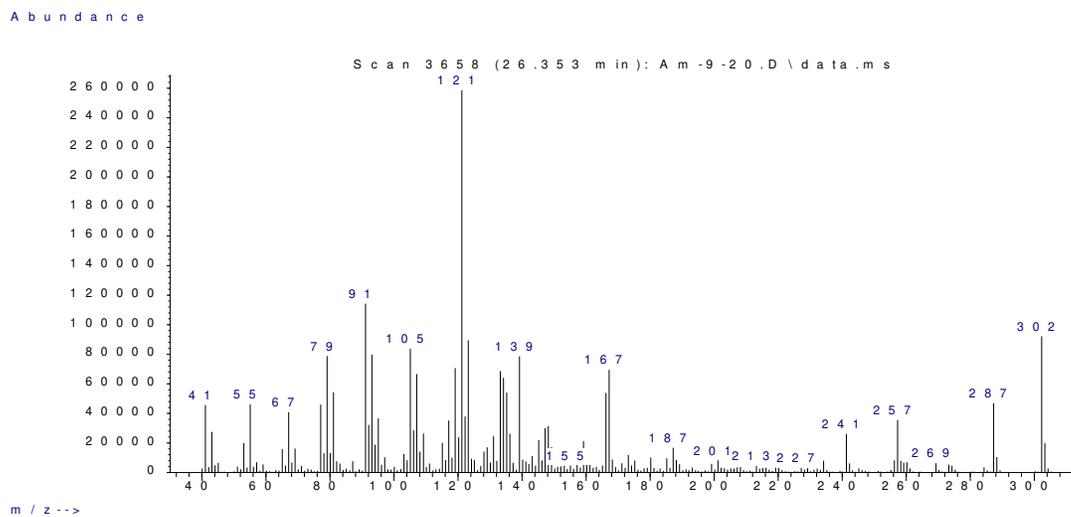
Anexo 7. Cromatograma da fração 24-28 da coluna clássica da Fr 3,4.



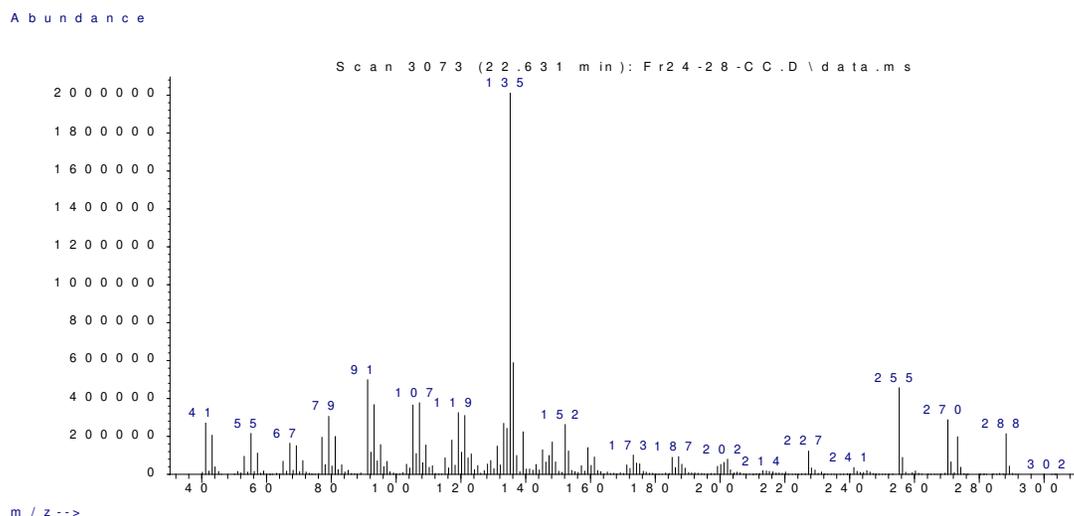
Anexo 8. Cromatograma da fração 48-51 da coluna clássica da Fr 3,4.



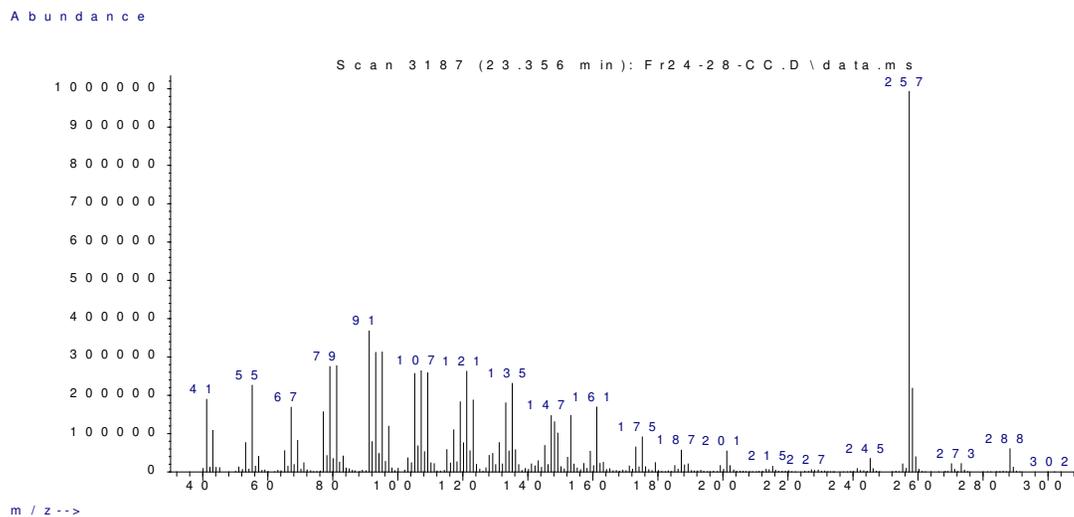
Anexo 9. Cromatograma da fração 52-53 da coluna clássica da Fr 3,4.



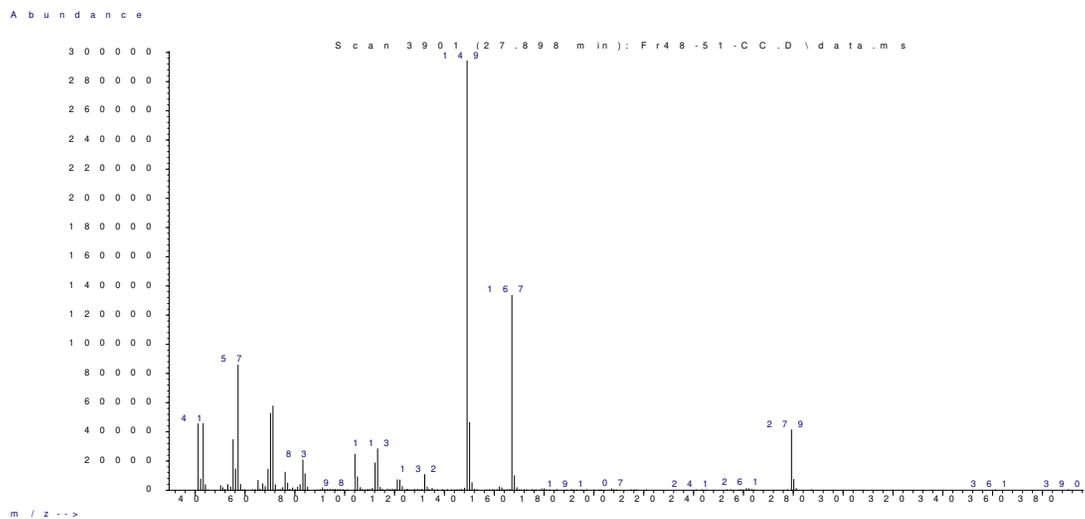
Anexo 10. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 26,36 min, da Fr 9-20 CC.



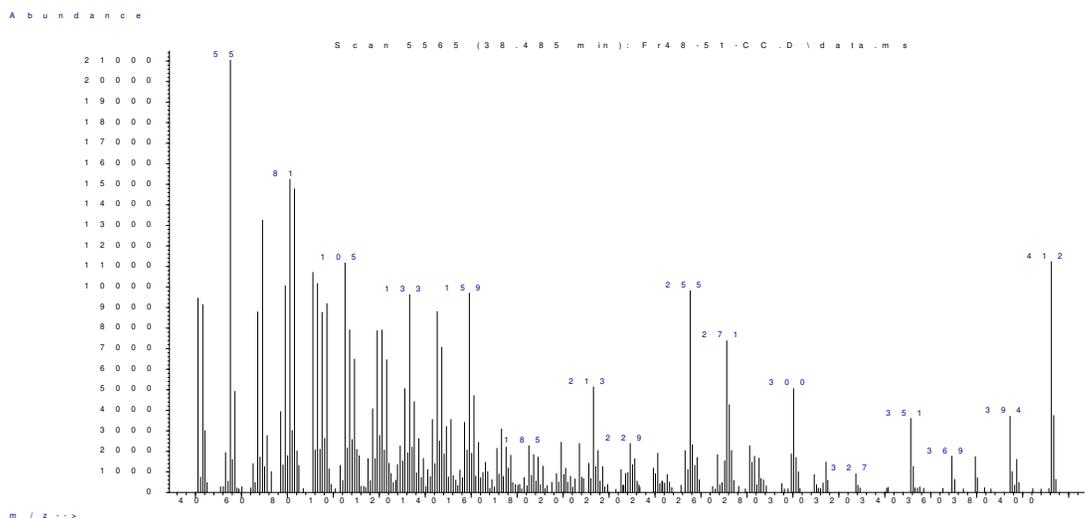
Anexo 11. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 22,63 min, da Fr 24-28 CC.



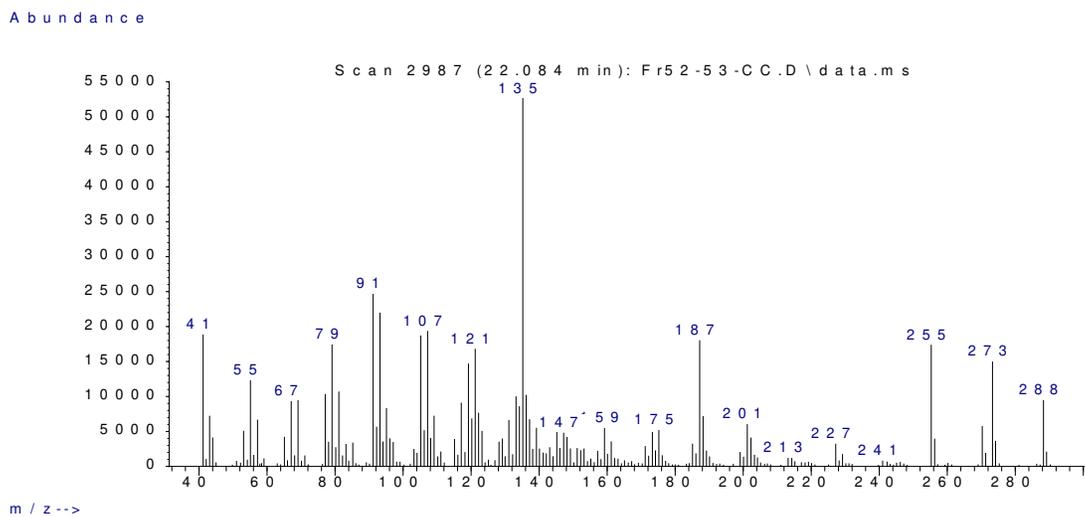
Anexo 12. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 23,36 min, da Fr 24-28 CC.



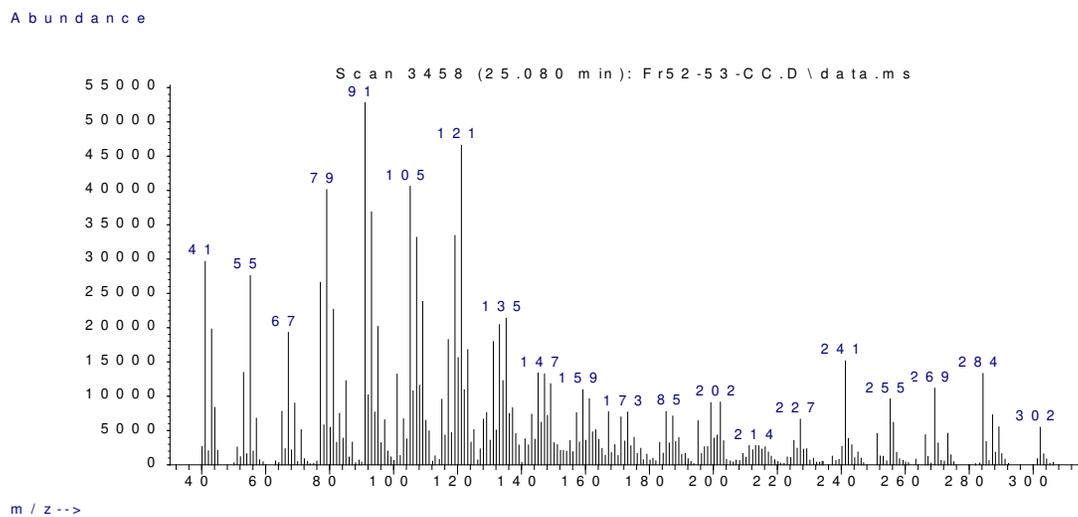
Anexo 13. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 27,89 min, da Fr 48-51 CC.



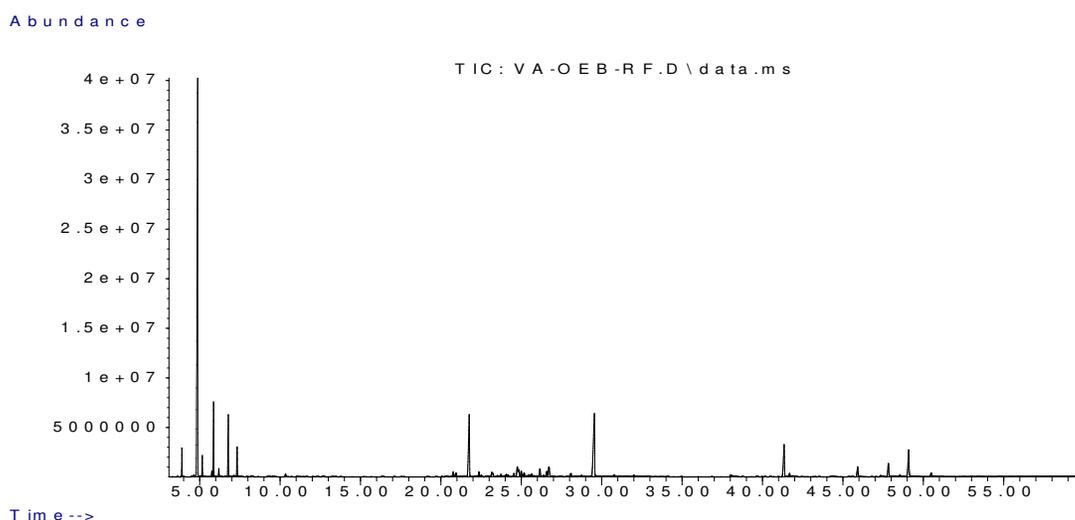
Anexo 14. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 38,52 min, da Fr 48-51 CC.



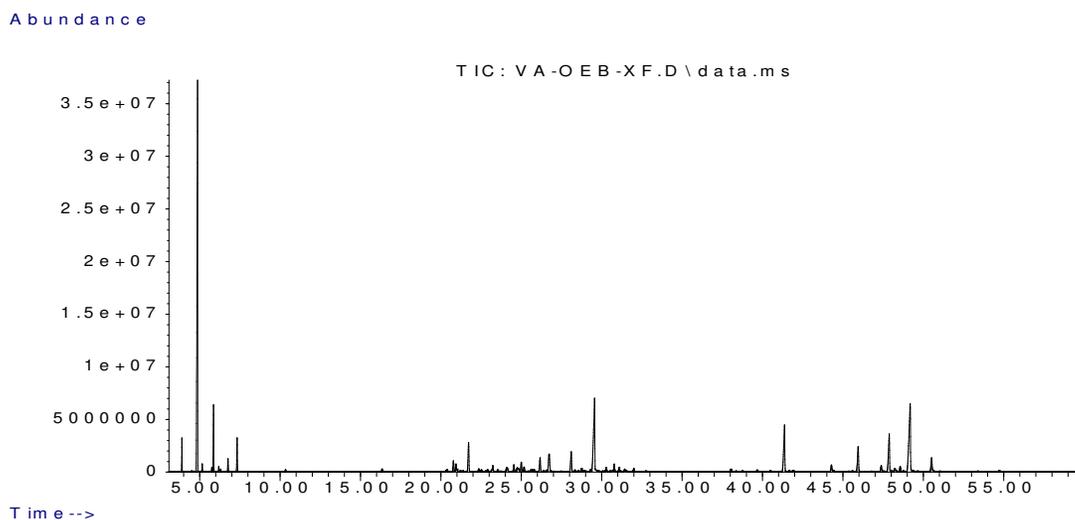
Anexo 15. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 22,08 min, da Fr 52-53 CC.



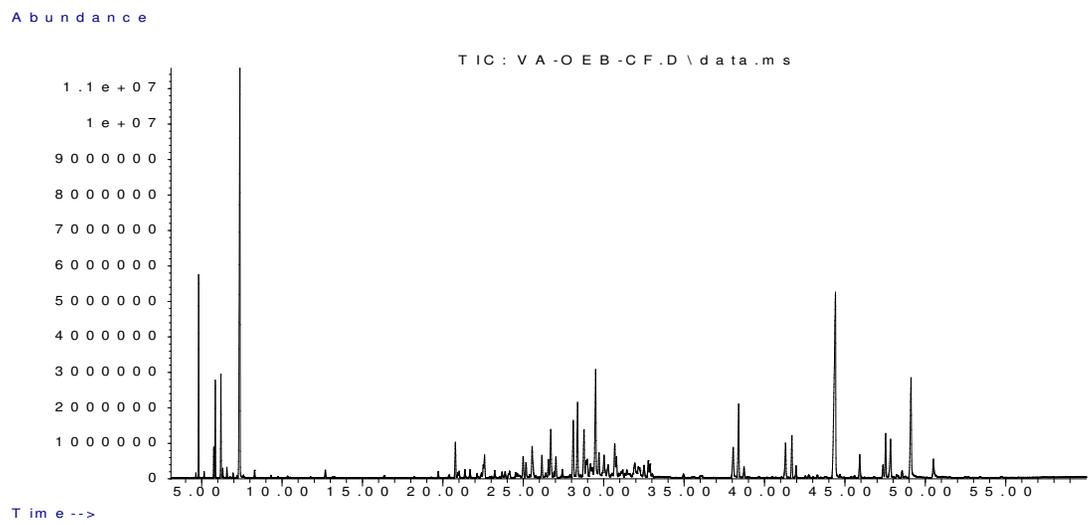
Anexo 16. Fragmentograma do composto com tempo de retenção 25,15 min, da Fr 52-53 CC.



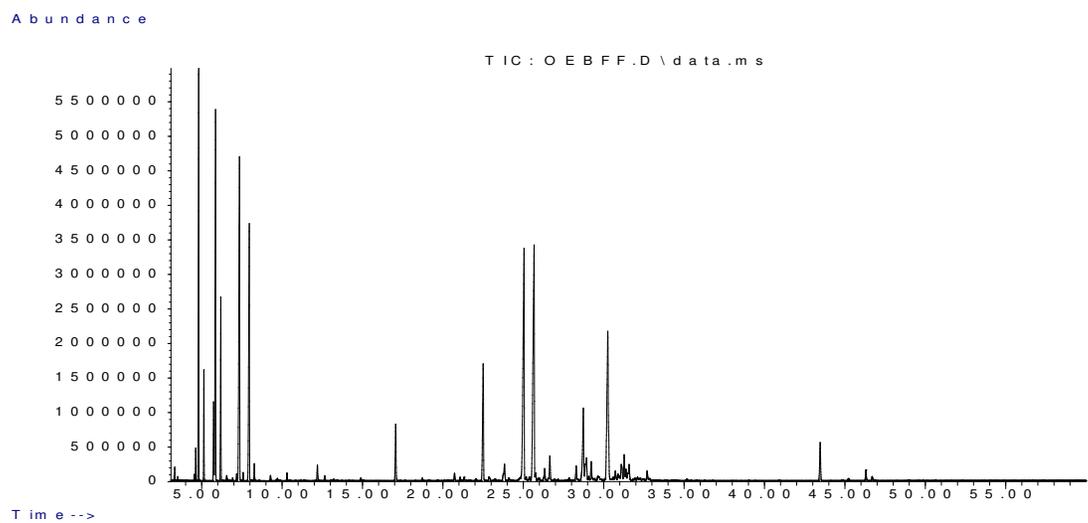
Anexo 17. Cromatograma do OE das raízes de *A. arenaria* (R). Data de coleta 14/01/2011.



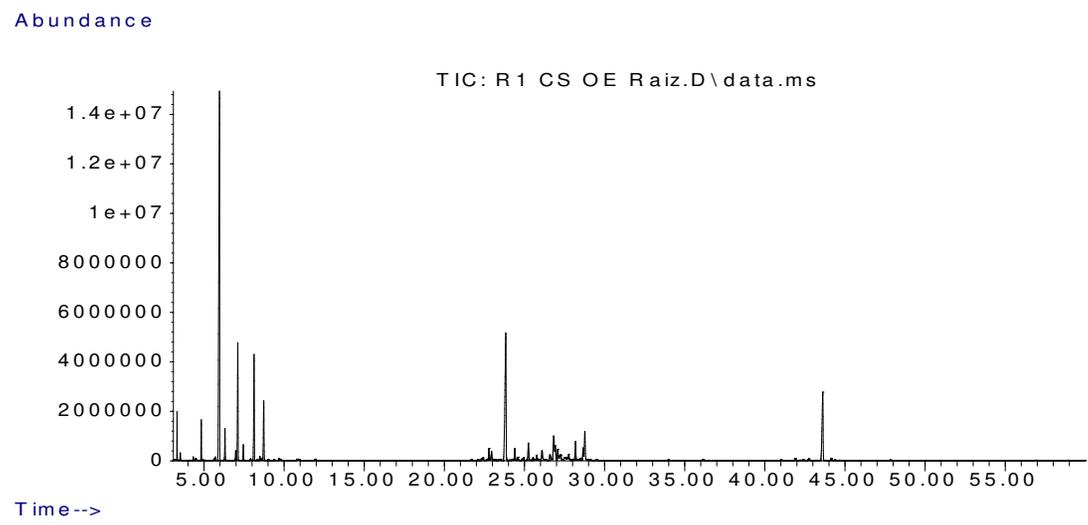
Anexo 18. Cromatograma do OE dos xilopódios de *A. arenaria* (X). Data de coleta 14/01/2011.



Anexo 19. Cromatograma do OE dos caules de *A. arenaria* (C). Data de coleta 14/01/2011.

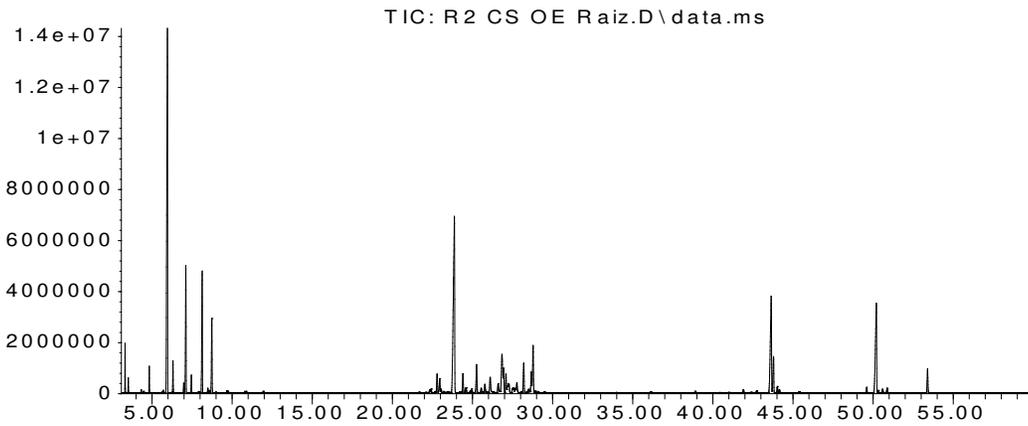


Anexo 20. Cromatograma do OE das folhas de *A. arenaria* (F). Data de coleta 14/01/2011.



Anexo 21. Cromatograma da Fração R1 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.

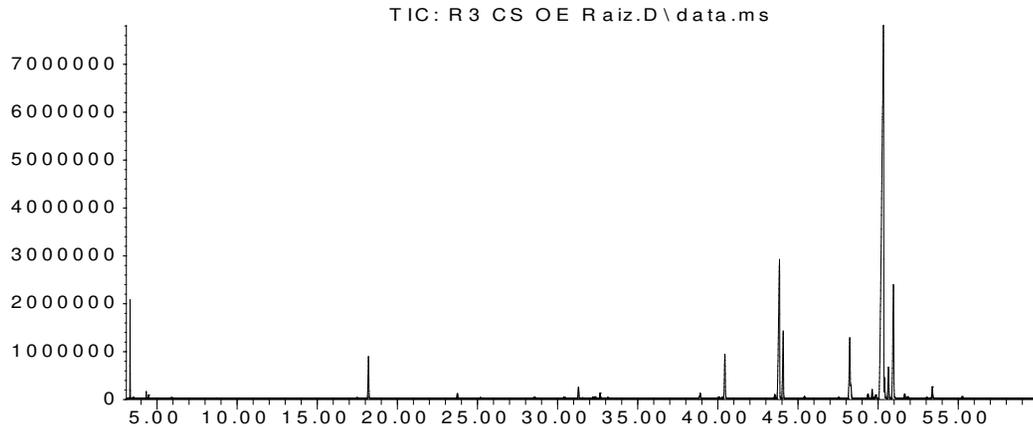
Abundance



Time-->

Anexo 22. Cromatograma da Fração R2 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.

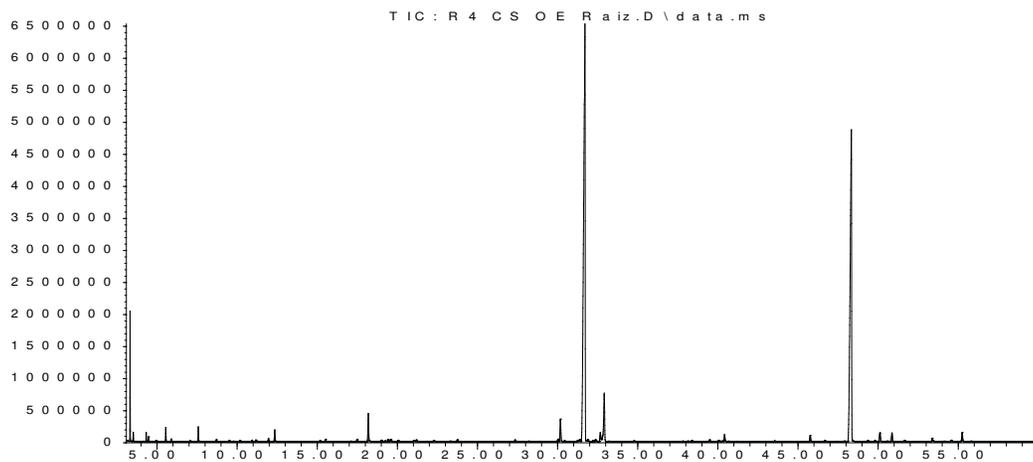
Abundance



Time-->

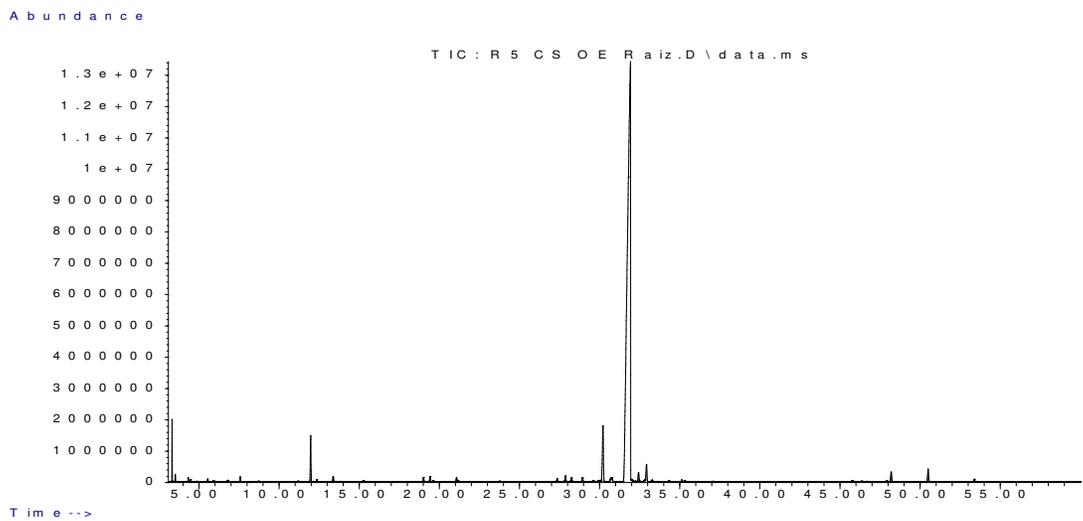
Anexo 23. Cromatograma da Fração R3 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.

Abundance

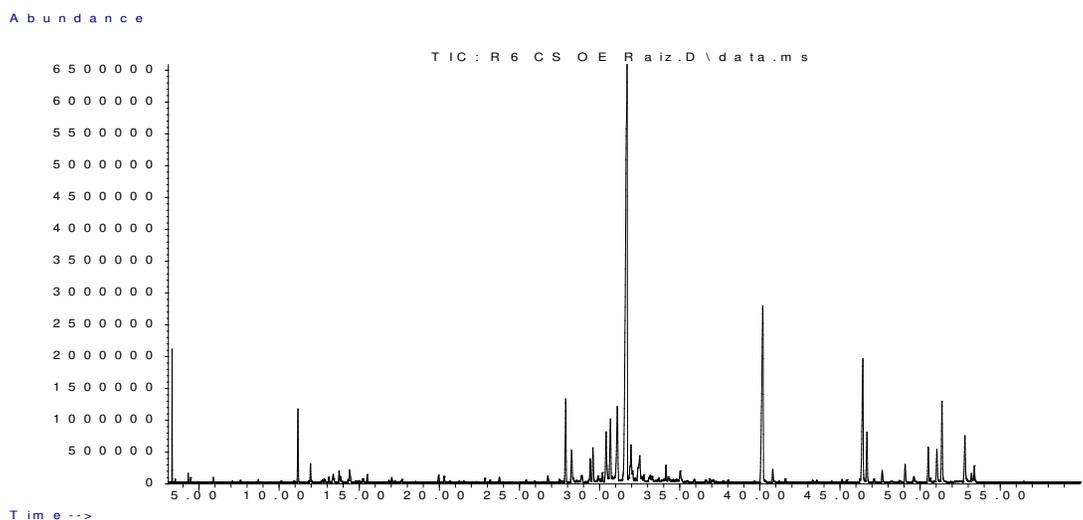


Time-->

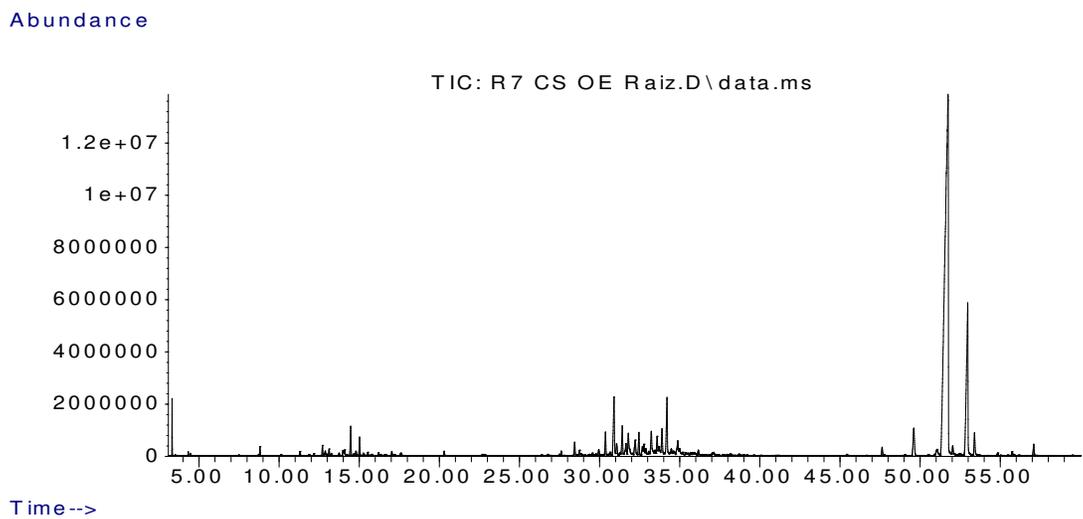
Anexo 24. Cromatograma da Fração R4 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.



Anexo 25. Cromatograma da Fração R5 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.

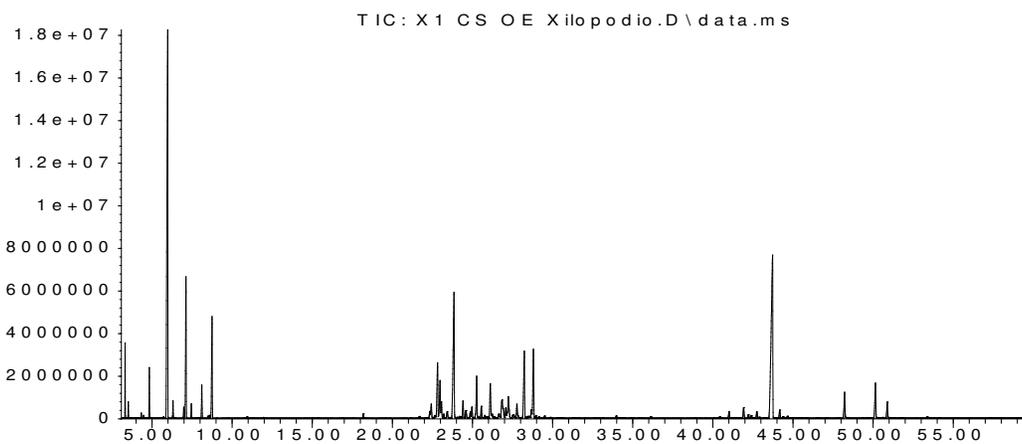


Anexo 26. Cromatograma da Fração R6 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.



Anexo 27. Cromatograma da Fração R7 do fracionamento do OE das raízes de *A. arenaria*.

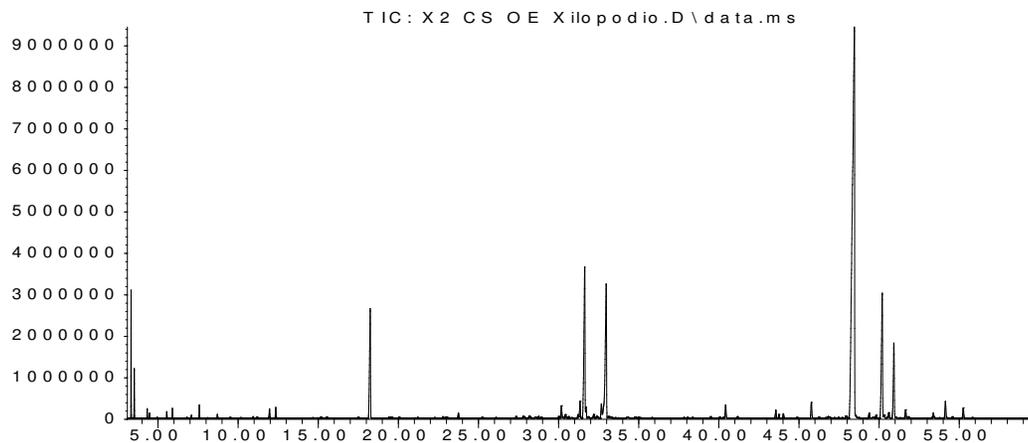
Abundance



Time-->

Anexo 28. Cromatograma da Fração X1 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.

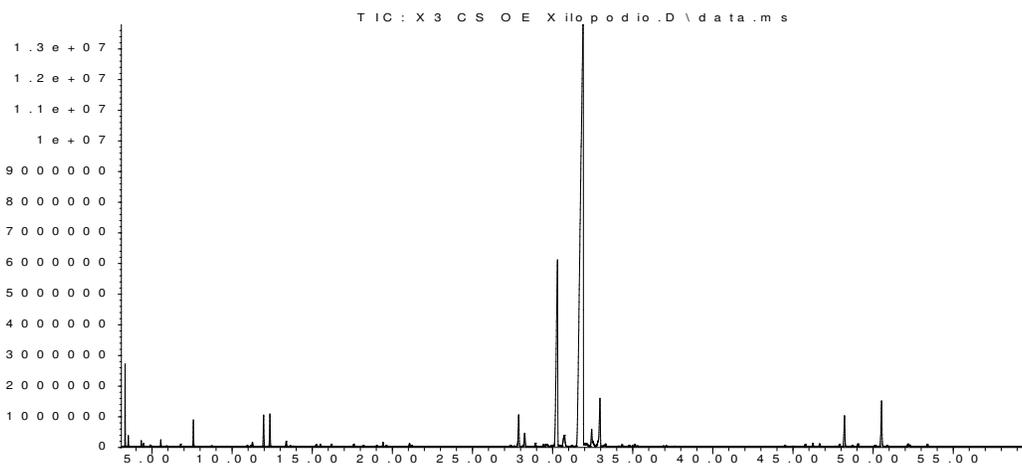
Abundance



Time-->

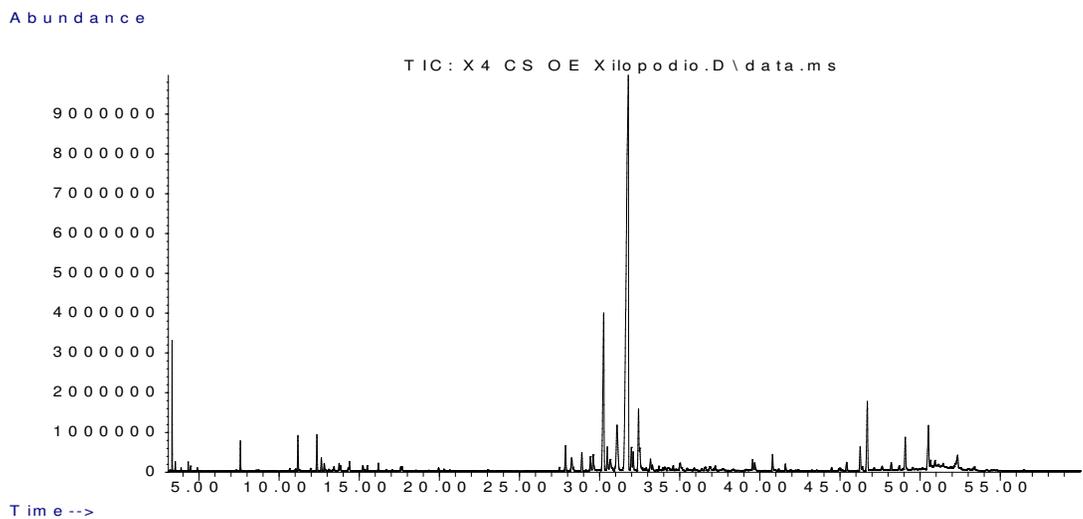
Anexo 29. Cromatograma da Fração X2 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.

Abundance

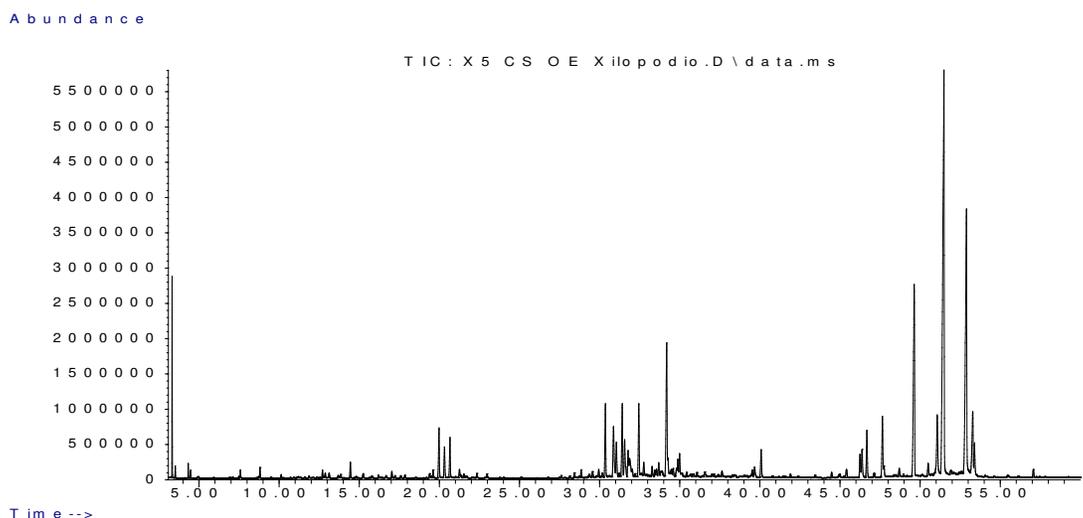


Time-->

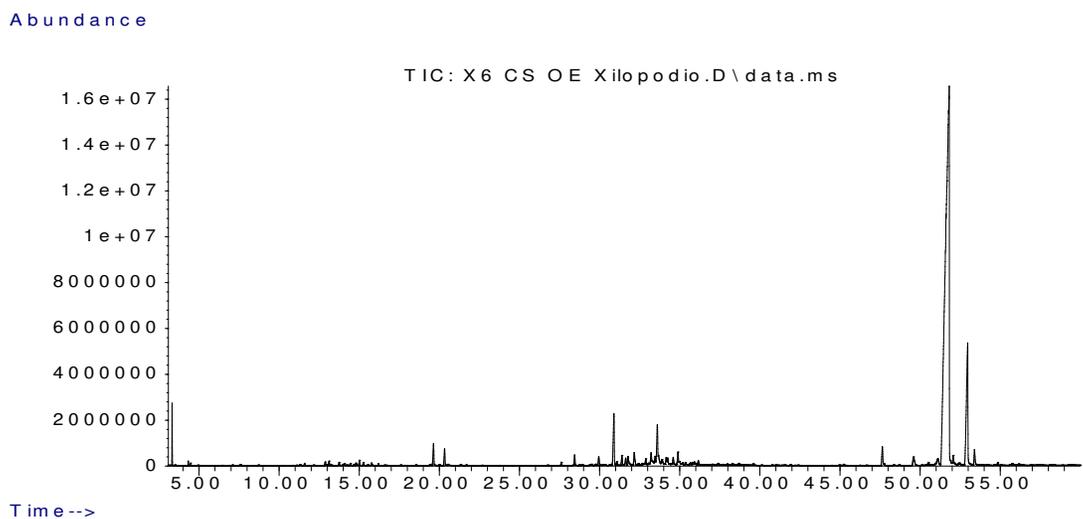
Anexo 30. Cromatograma da Fração X3 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.



Anexo 31. Cromatograma da Fração X4 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.

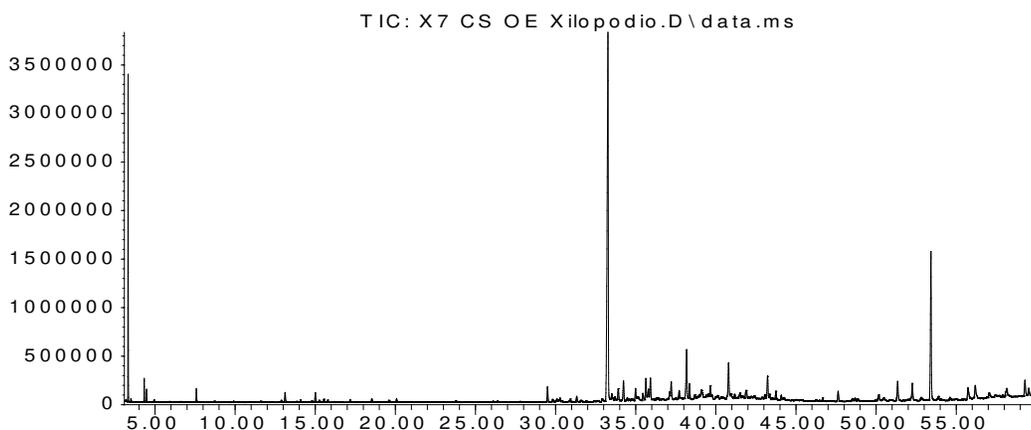


Anexo 32. Cromatograma da Fração X5 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.



Anexo 33. Cromatograma da Fração X6 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.

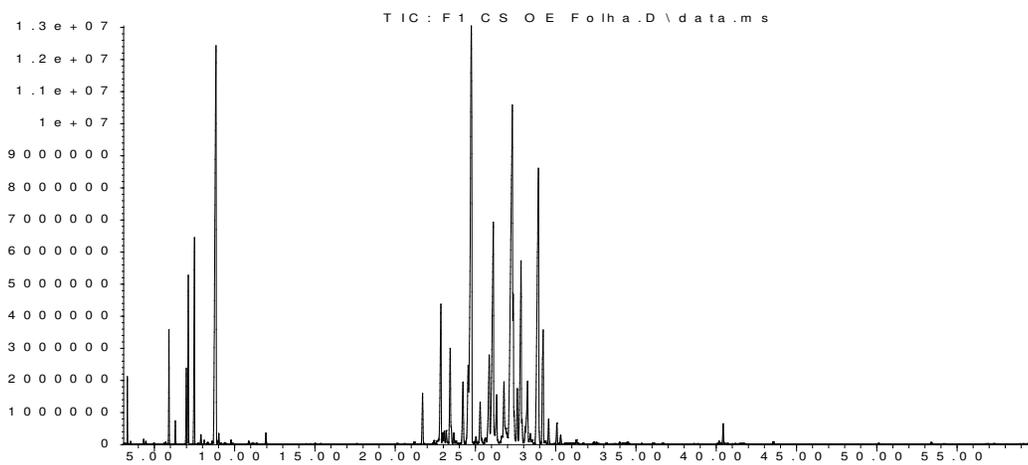
Abundance



Time-->

Anexo 34. Cromatograma da Fração X7 do fracionamento do OE dos xilopódios de *A. arenaria*.

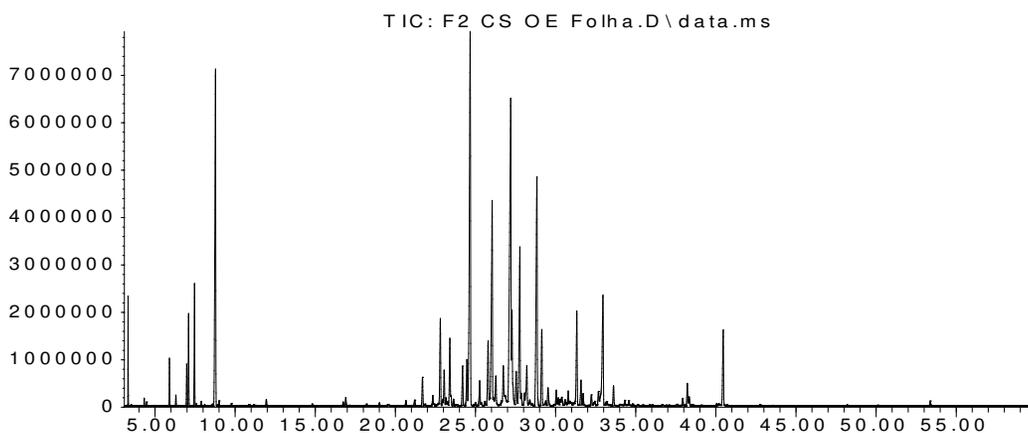
Abundance



Time-->

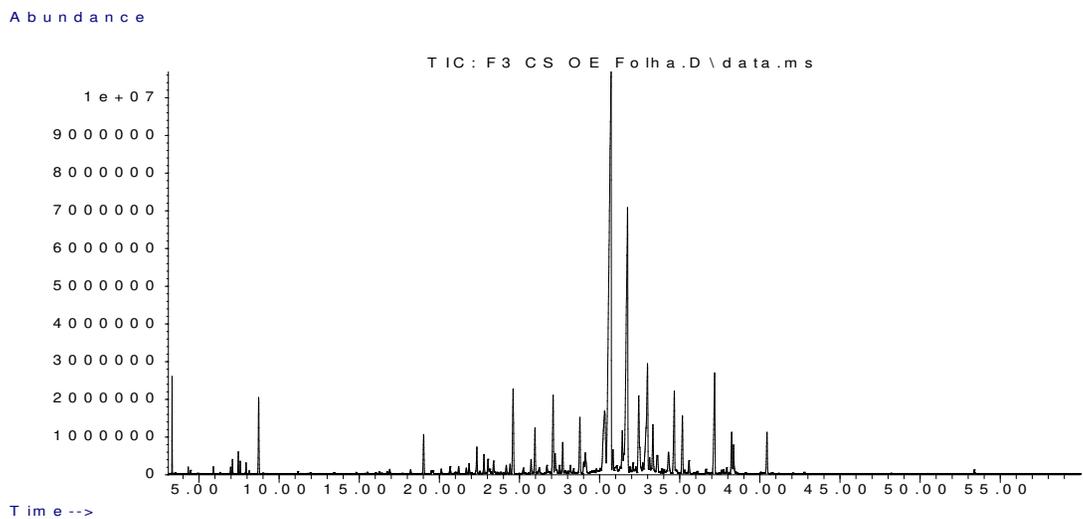
Anexo 35. Cromatograma da Fração F1 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.

Abundance

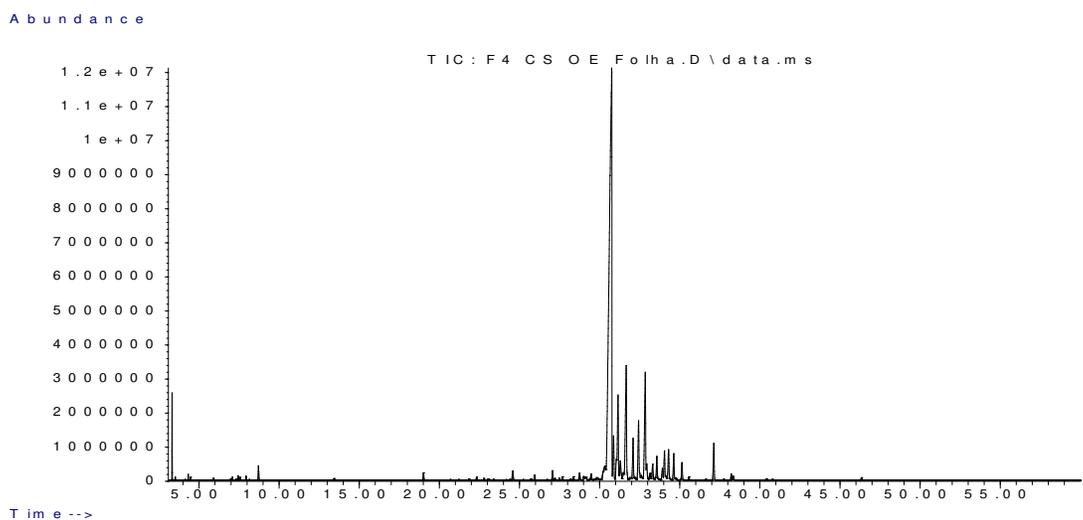


Time-->

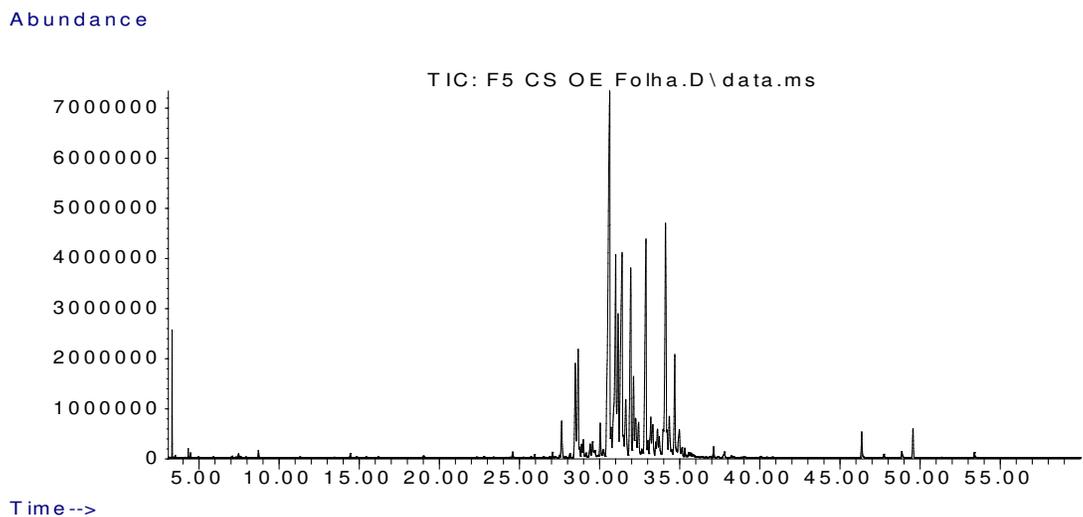
Anexo 36. Cromatograma da Fração F2 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.



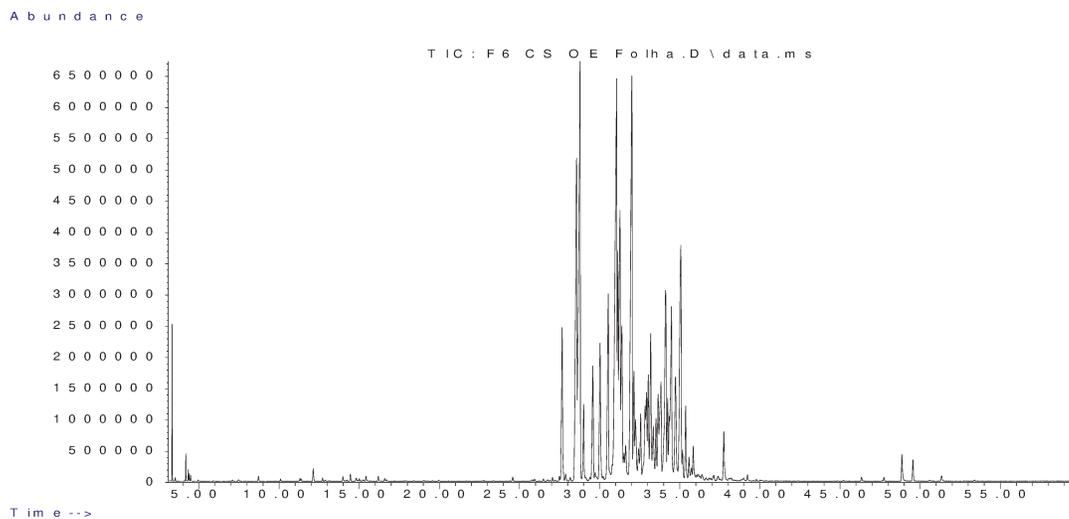
Anexo 37. Cromatograma da Fração F3 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.



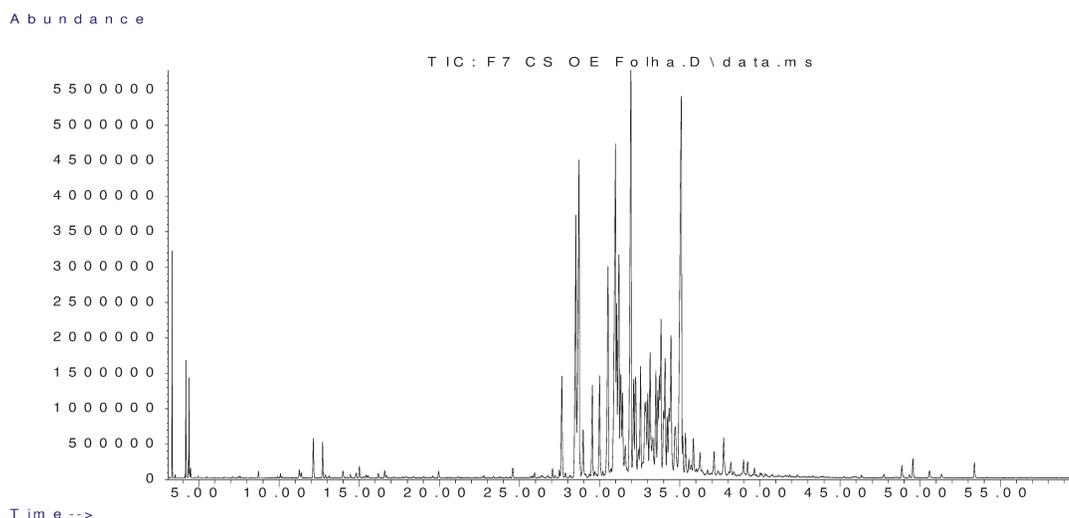
Anexo 38. Cromatograma da Fração F4 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.



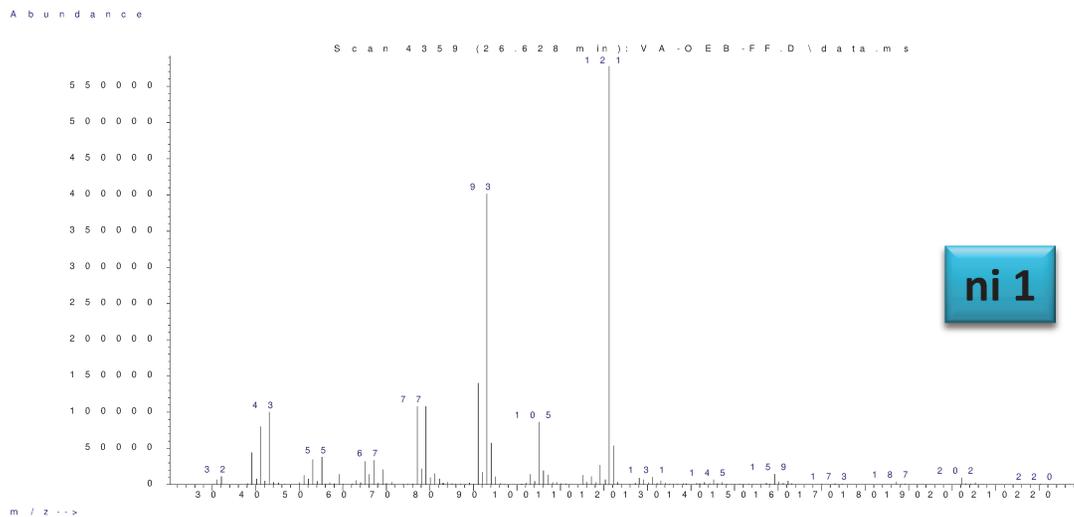
Anexo 39. Cromatograma da Fração F5 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.



Anexo 40. Cromatograma da Fração F6 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.

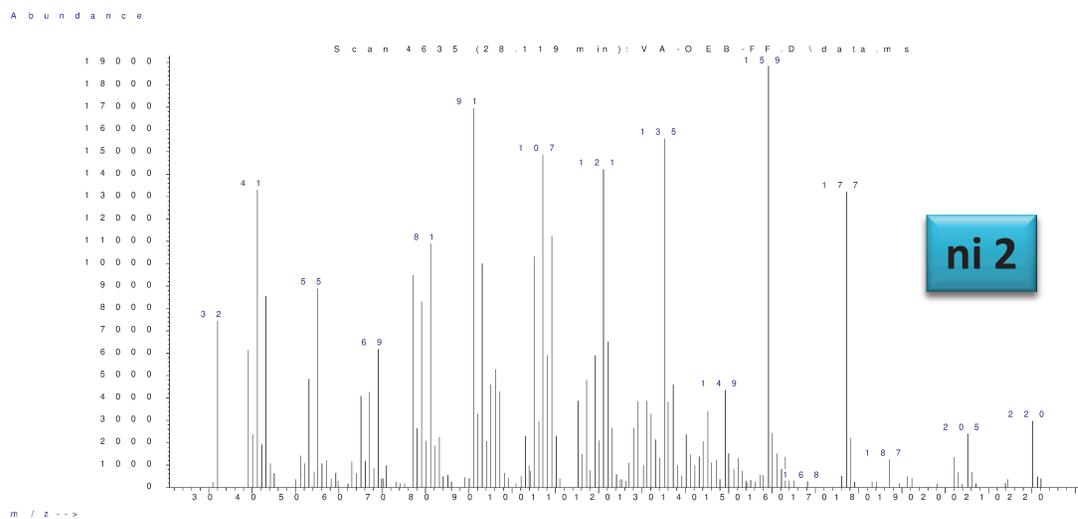


Anexo 41. Cromatograma da Fração F7 do fracionamento do OE das folhas de *A. arenaria*.



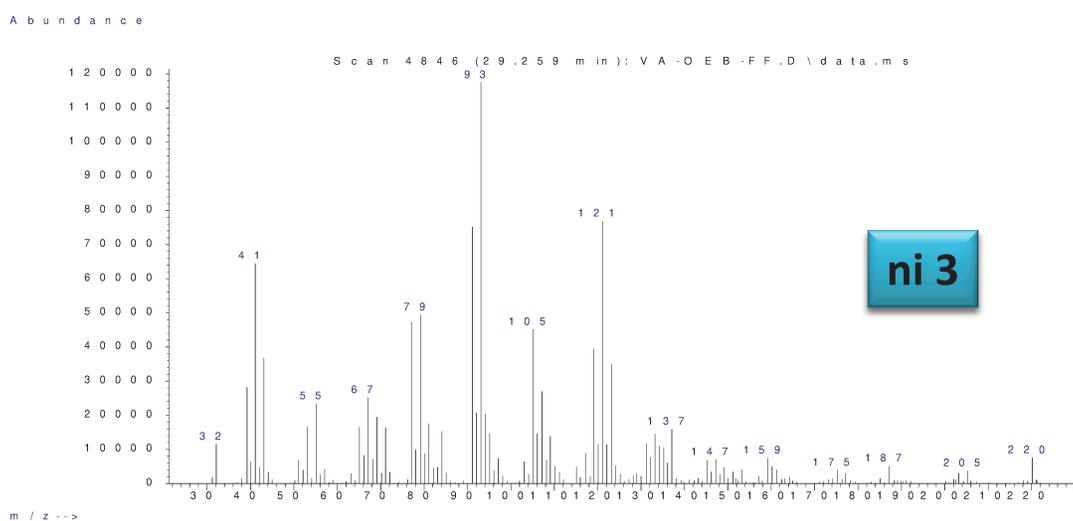
ni 1

Anexo 42: Fragmentograma do composto não identificado 1.



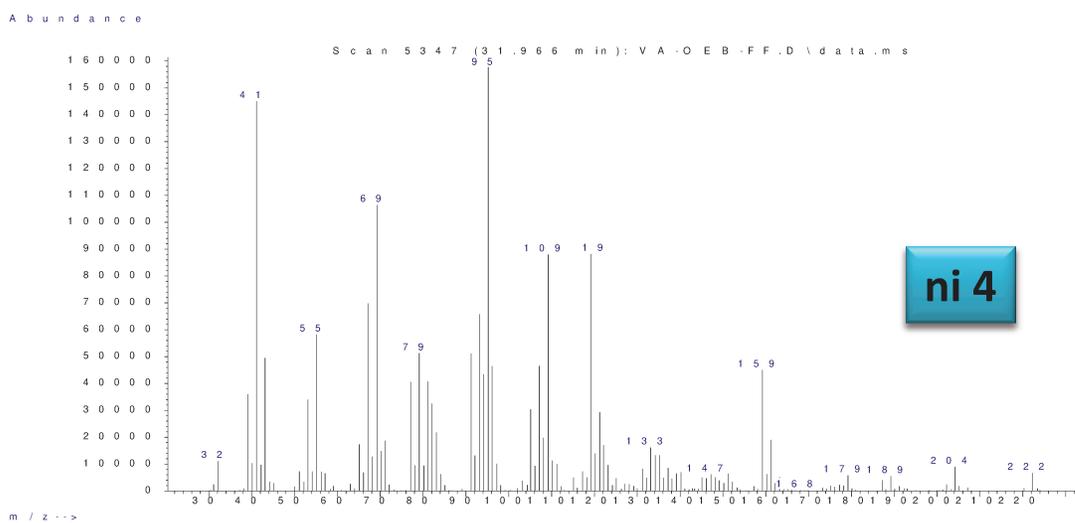
ni 2

Anexo 43: Fragmentograma do composto não identificado 2.



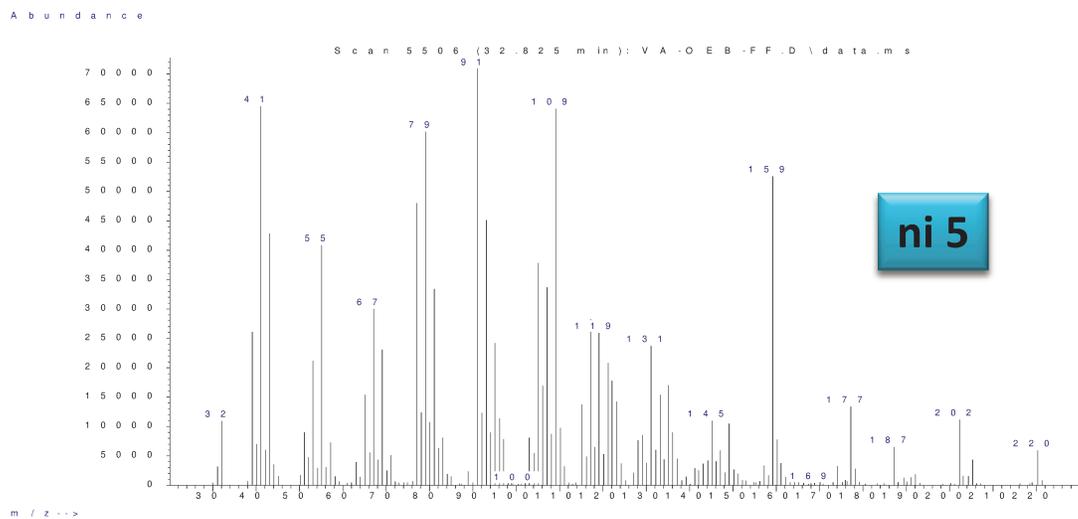
ni 3

Anexo 44: Fragmentograma do composto não identificado 3.

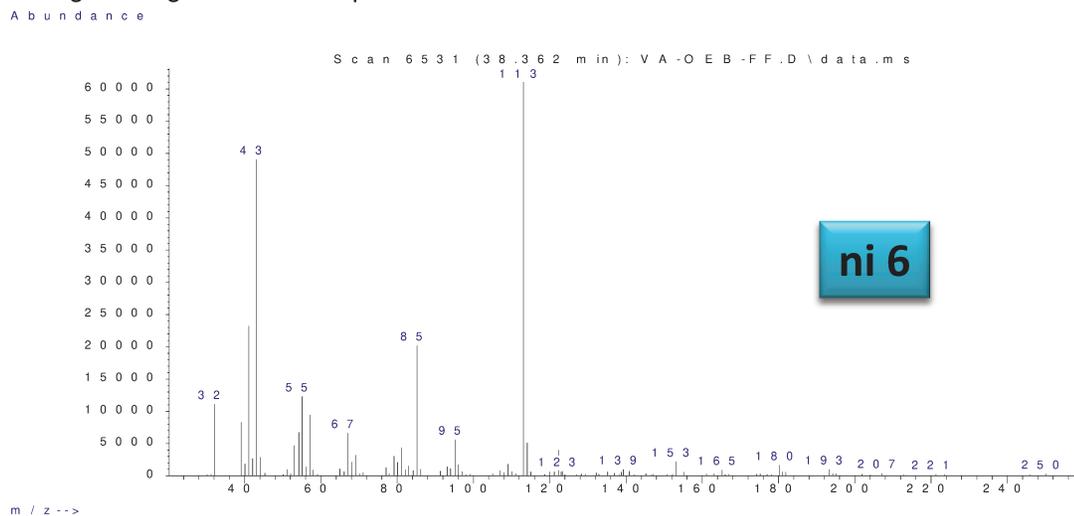


ni 4

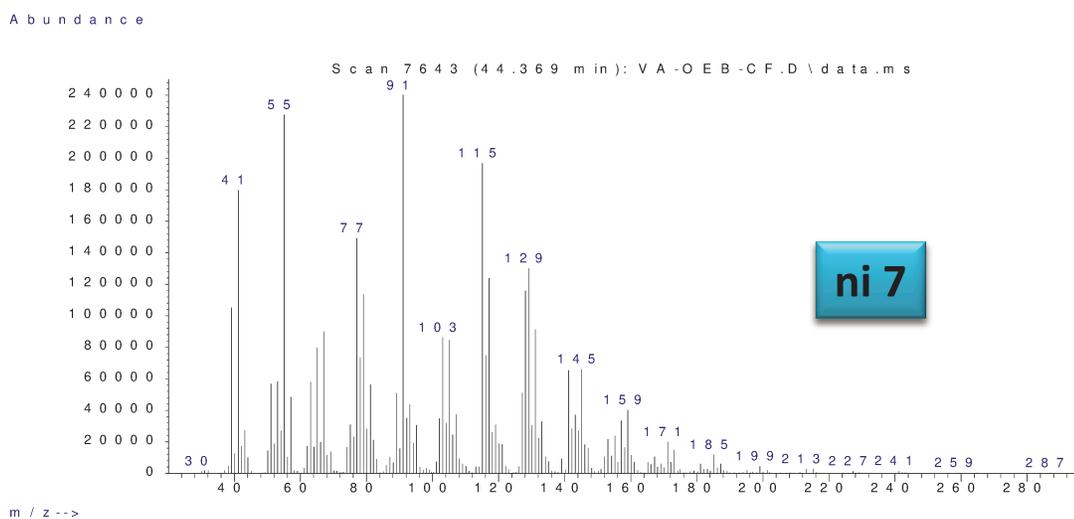
Anexo 45: Fragmentograma do composto não identificado 4.



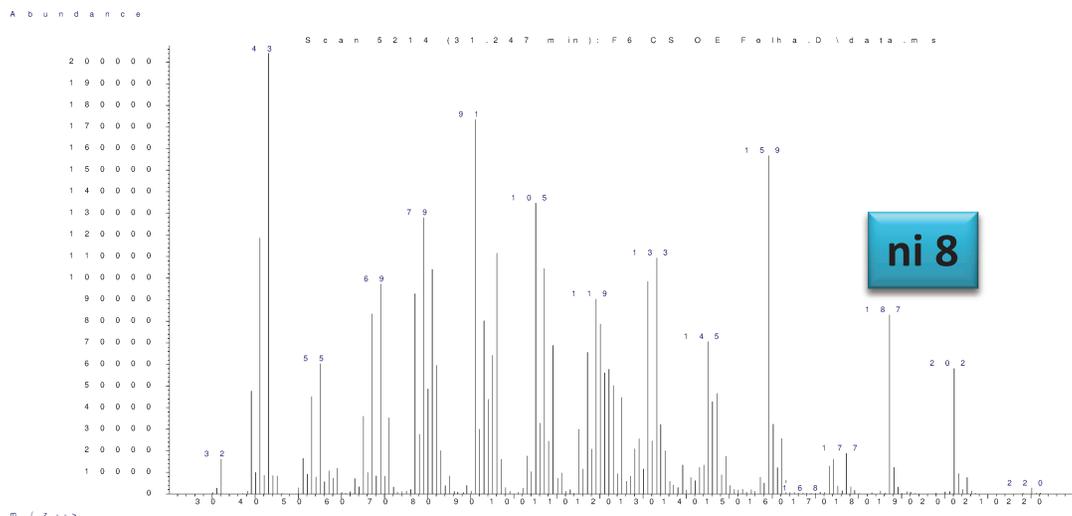
Anexo 46: Fragmentograma do composto não identificado 5.



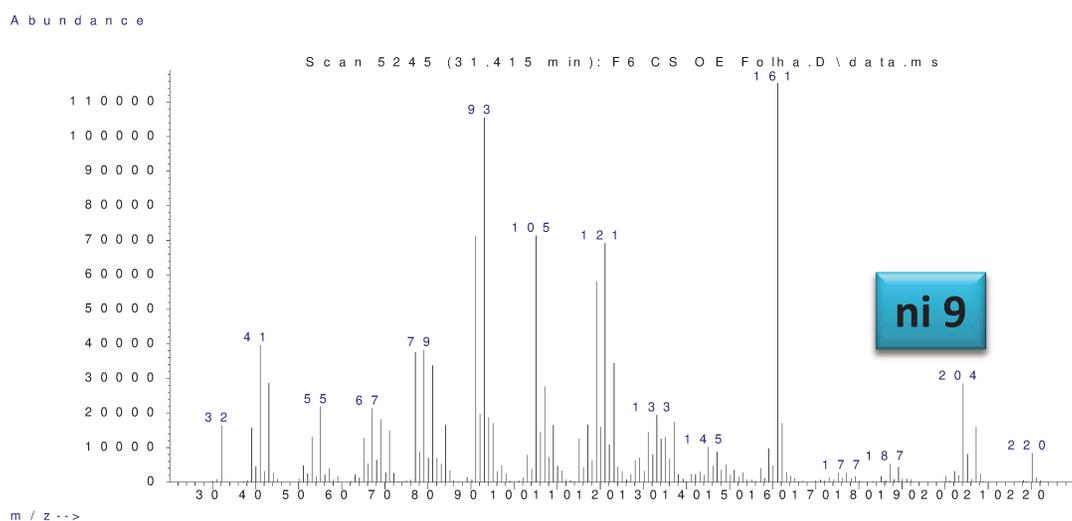
Anexo 47: Fragmentograma do composto não identificado 6.



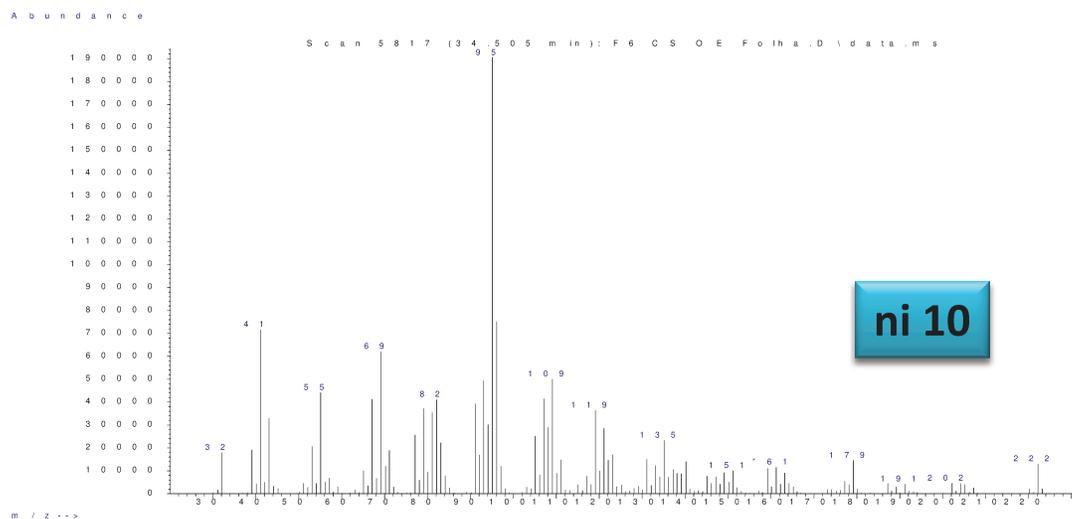
Anexo 48: Fragmentograma do composto não identificado 7.



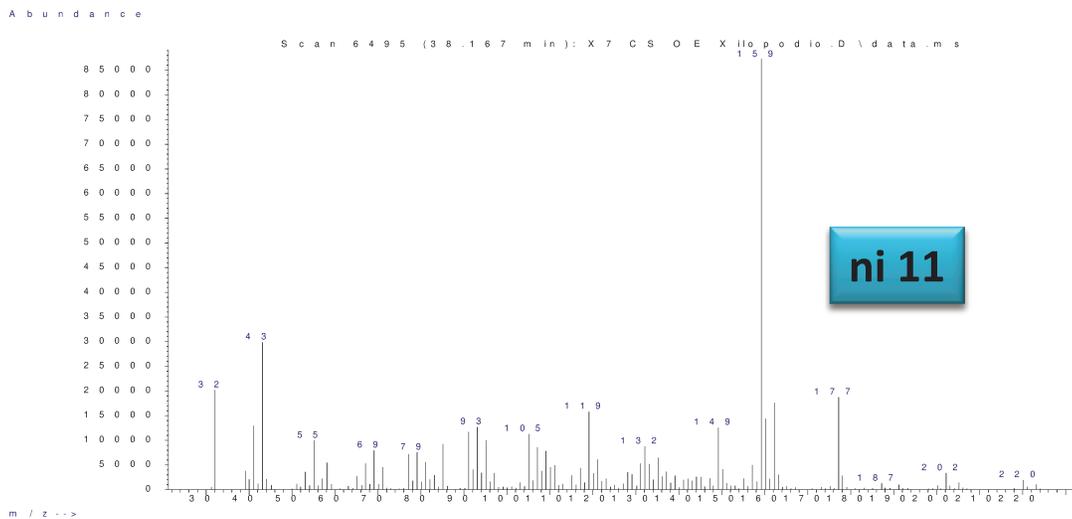
Anexo 49: Fragmentograma do composto não identificado 8.



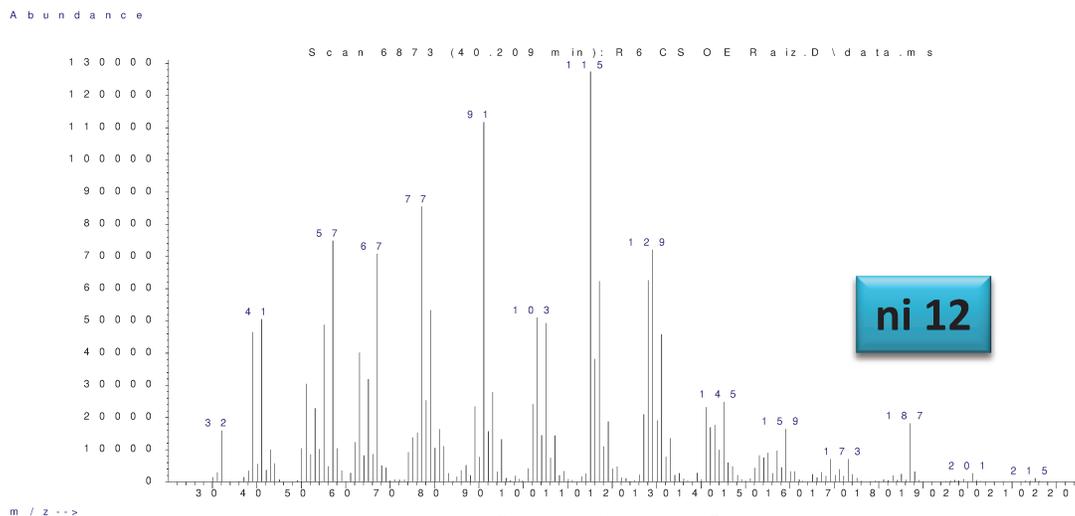
Anexo 50: Fragmentograma do composto não identificado 9.



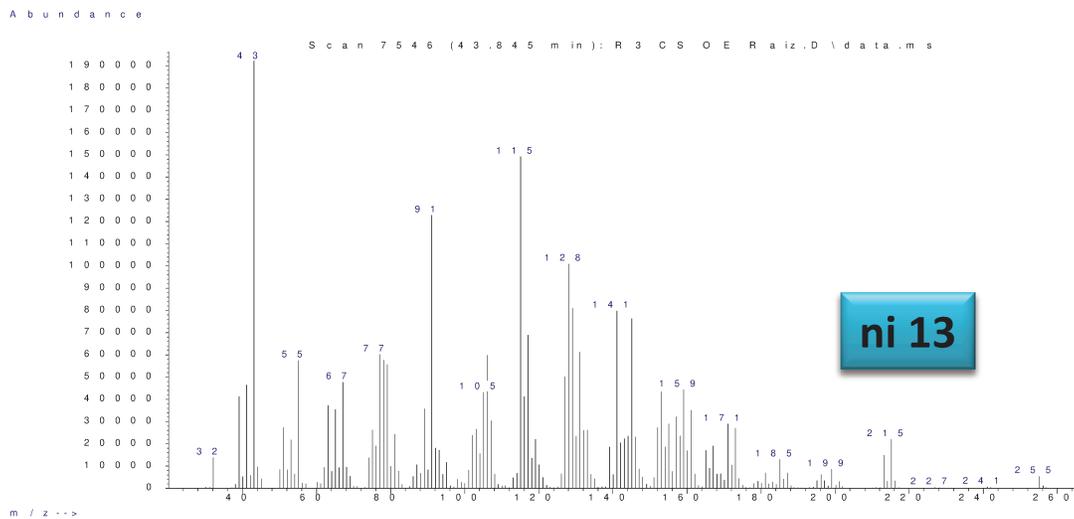
Anexo 51: Fragmentograma do composto não identificado 10.



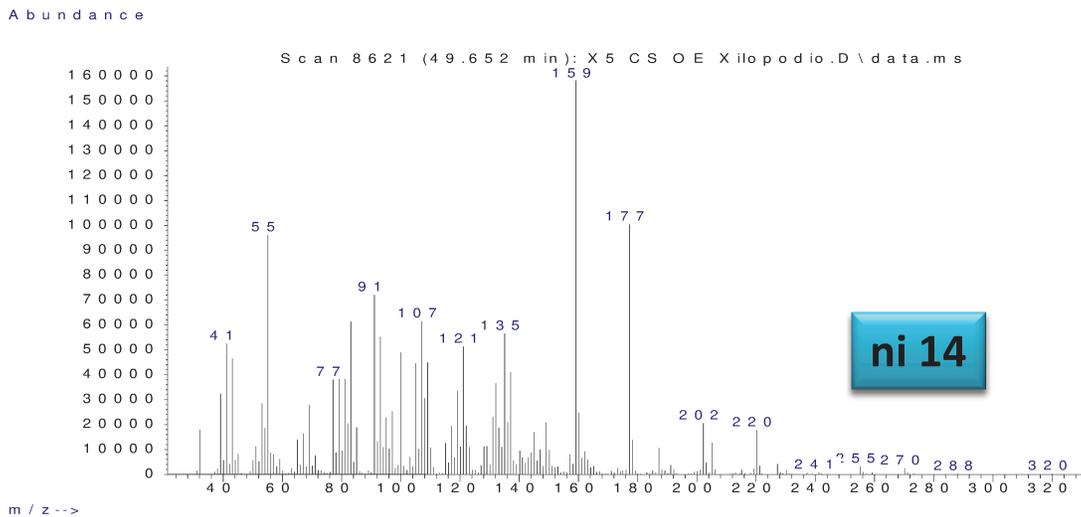
Anexo 52: Fragmentograma do composto não identificado 11.



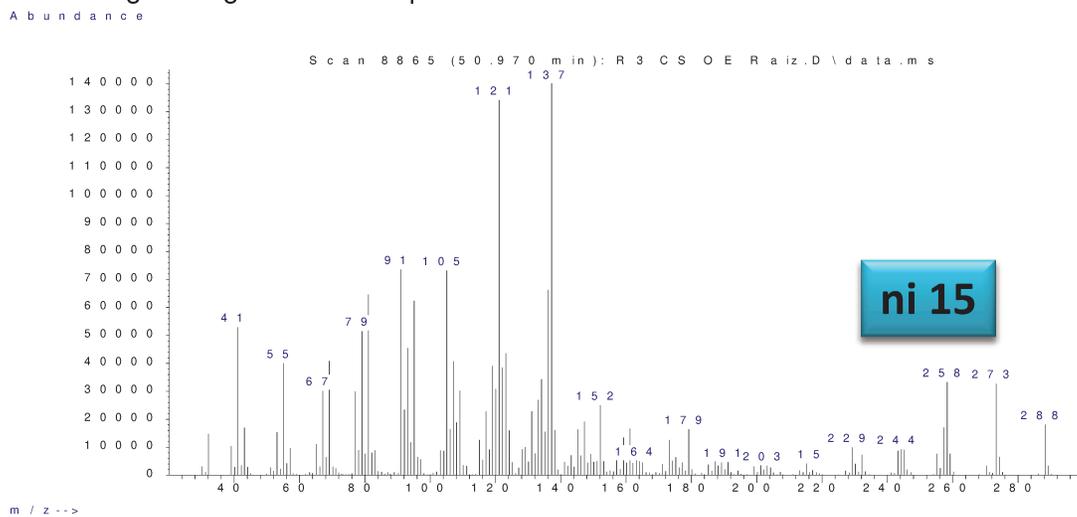
Anexo 53 Fragmentograma do composto não identificado 12.



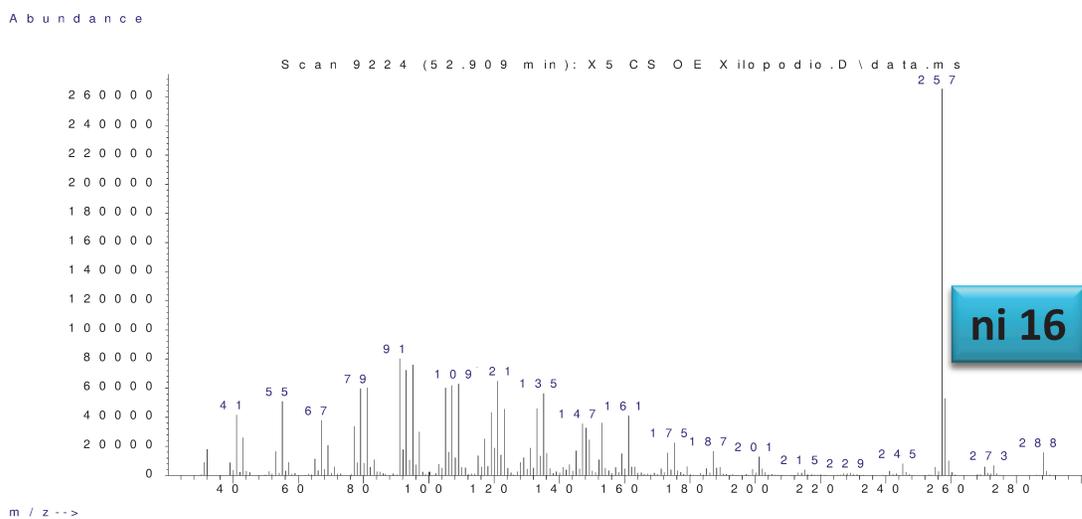
Anexo 54: Fragmentograma do composto não identificado 13.



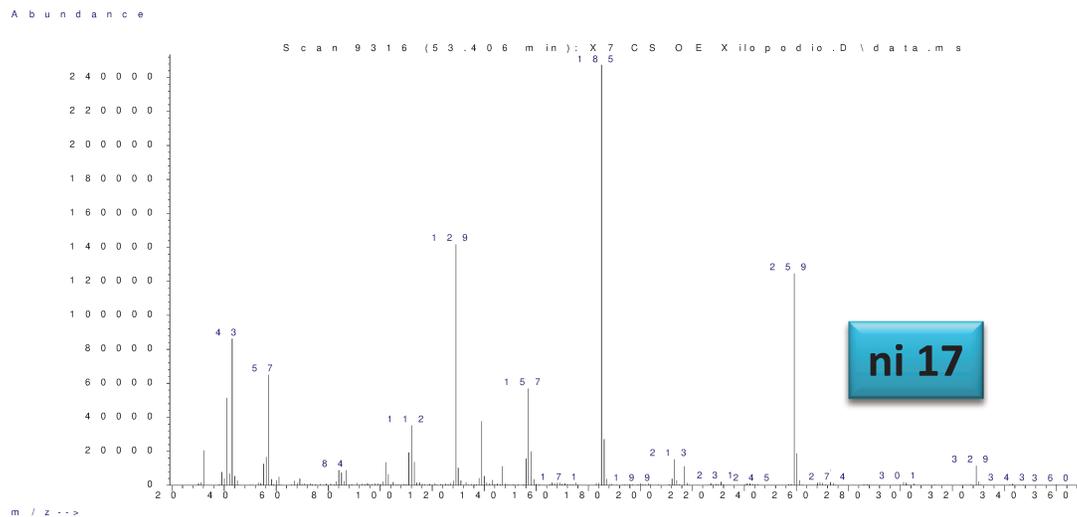
Anexo 55: Fragmentograma do composto não identificado 13.



Anexo 56: Fragmentograma do composto não identificado 15.



Anexo 57: Fragmentograma do composto não identificado 16.



Anexo 58: Fragmentograma do composto não identificado 17.

3. ANÁLISES DE IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA CROMATOGRÁFIA EM COLUNA CLÁSSICA

File # 2 : ACIDO

Mode = 2 (Mid-IR)

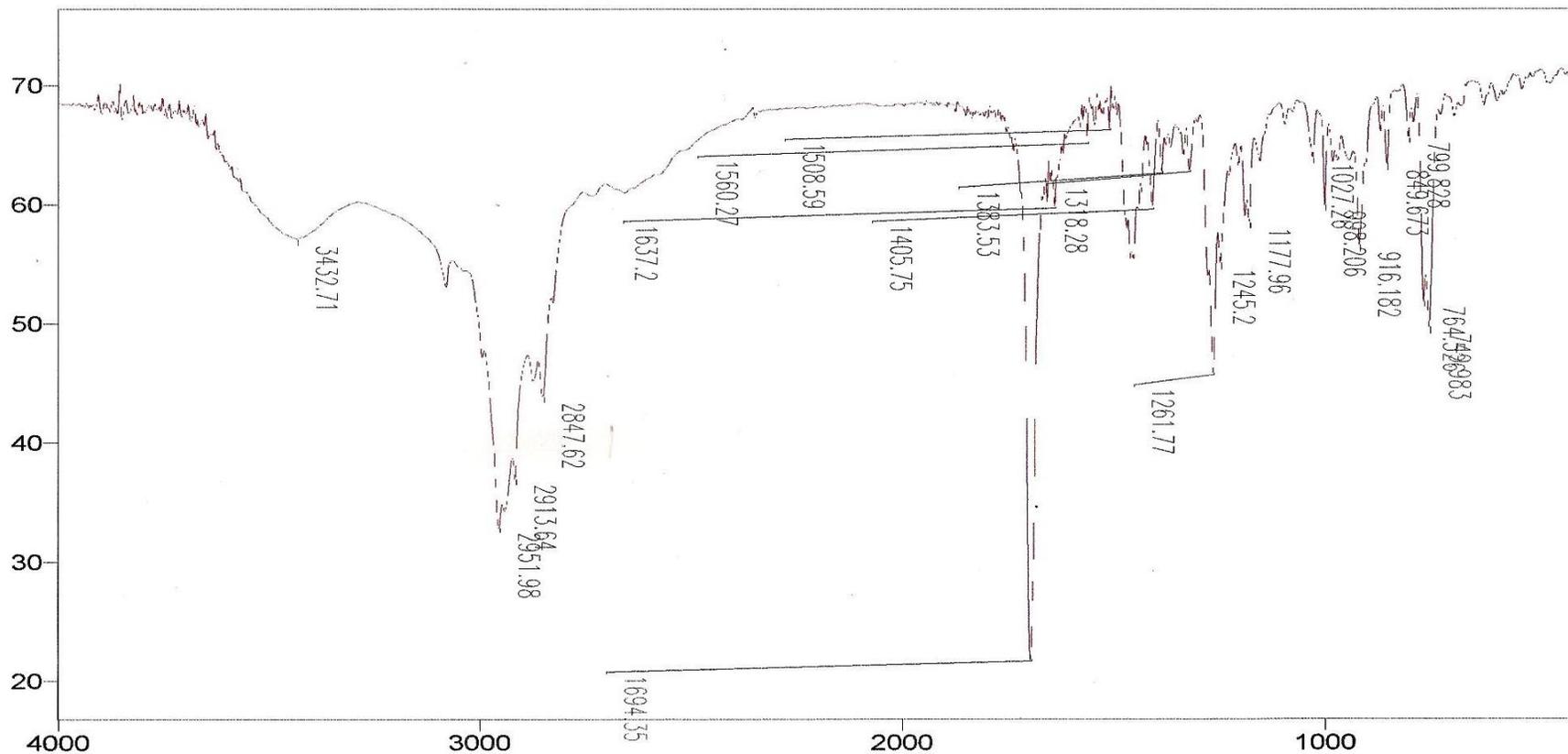
7/3/13 12:09 PM

Sample Description:

Scans = 32

Res = 4 cm⁻¹ 20 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Anexo 59: Espectro infravermelho do Ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (1).

File # 2 : ALCOOLF

Mode = 2 (Mid-IR)

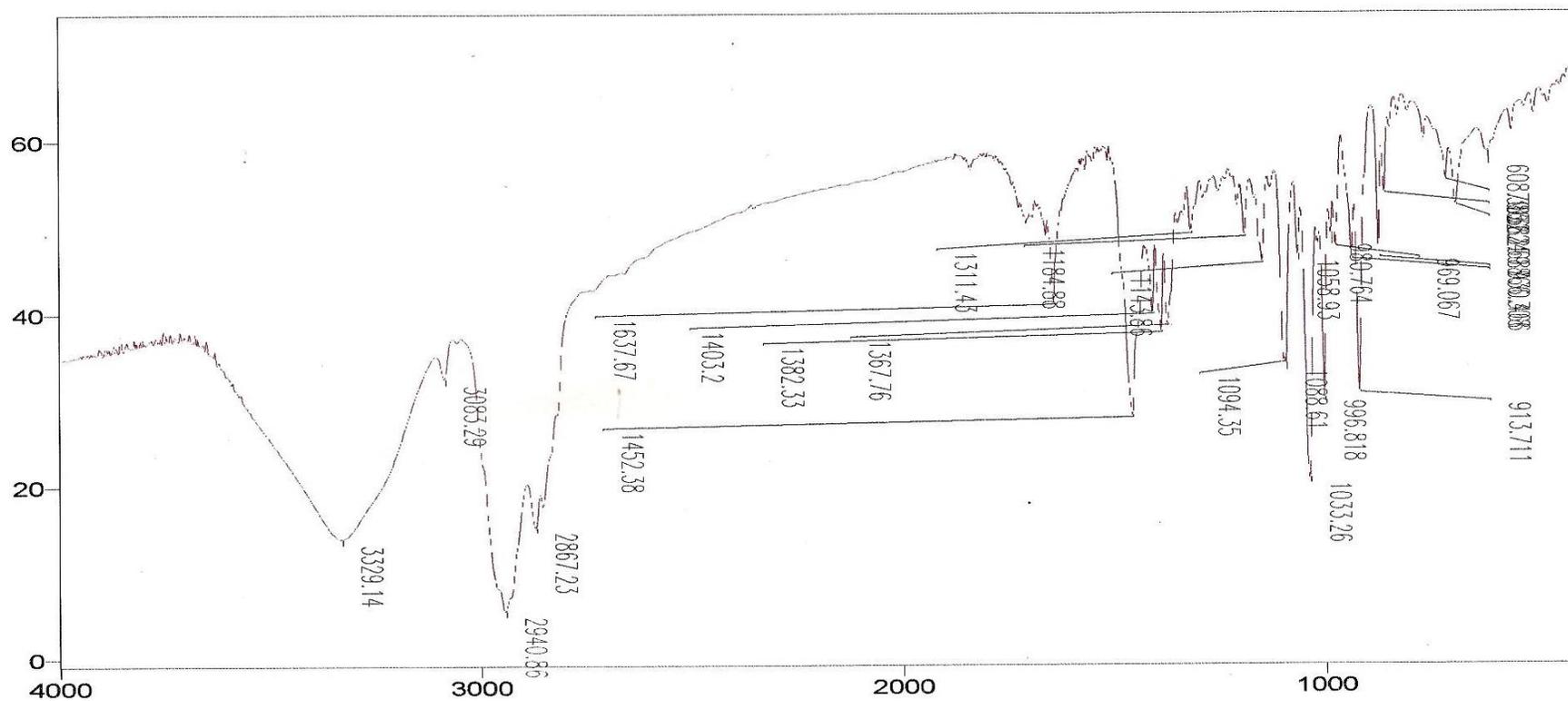
7/3/13 11:54 AM

Sample Description:

Scans = 32

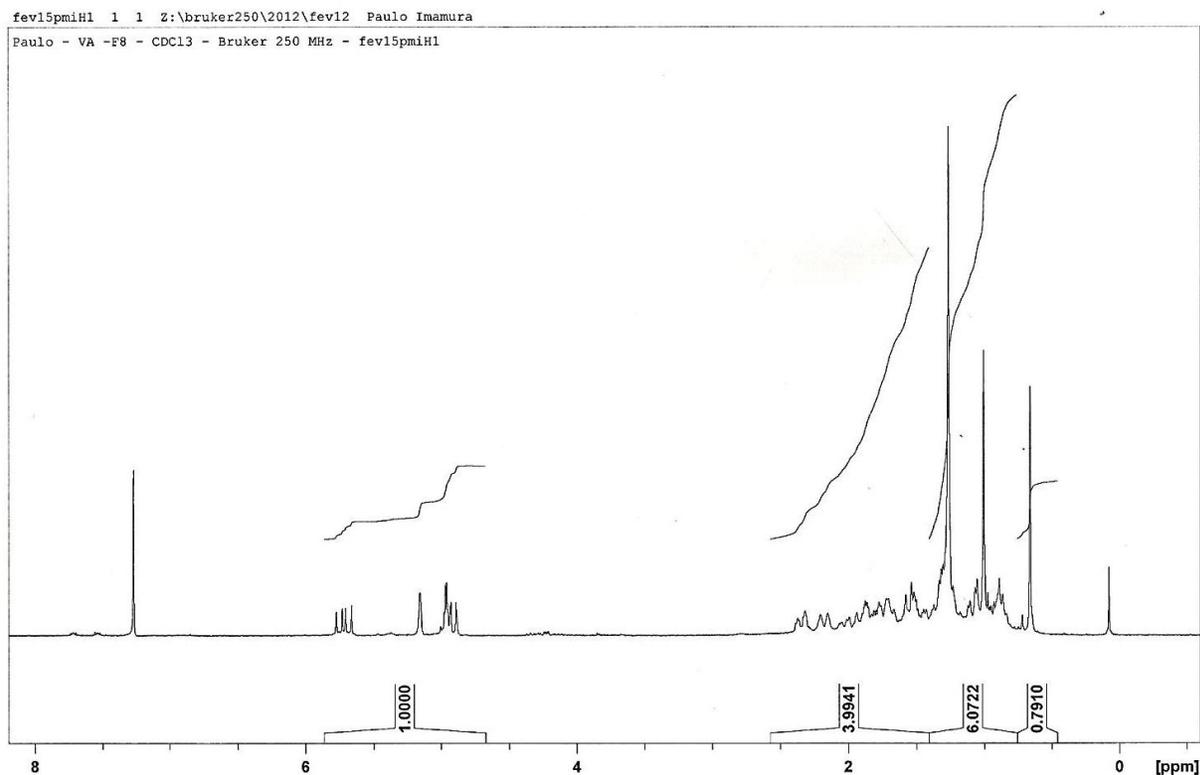
Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine

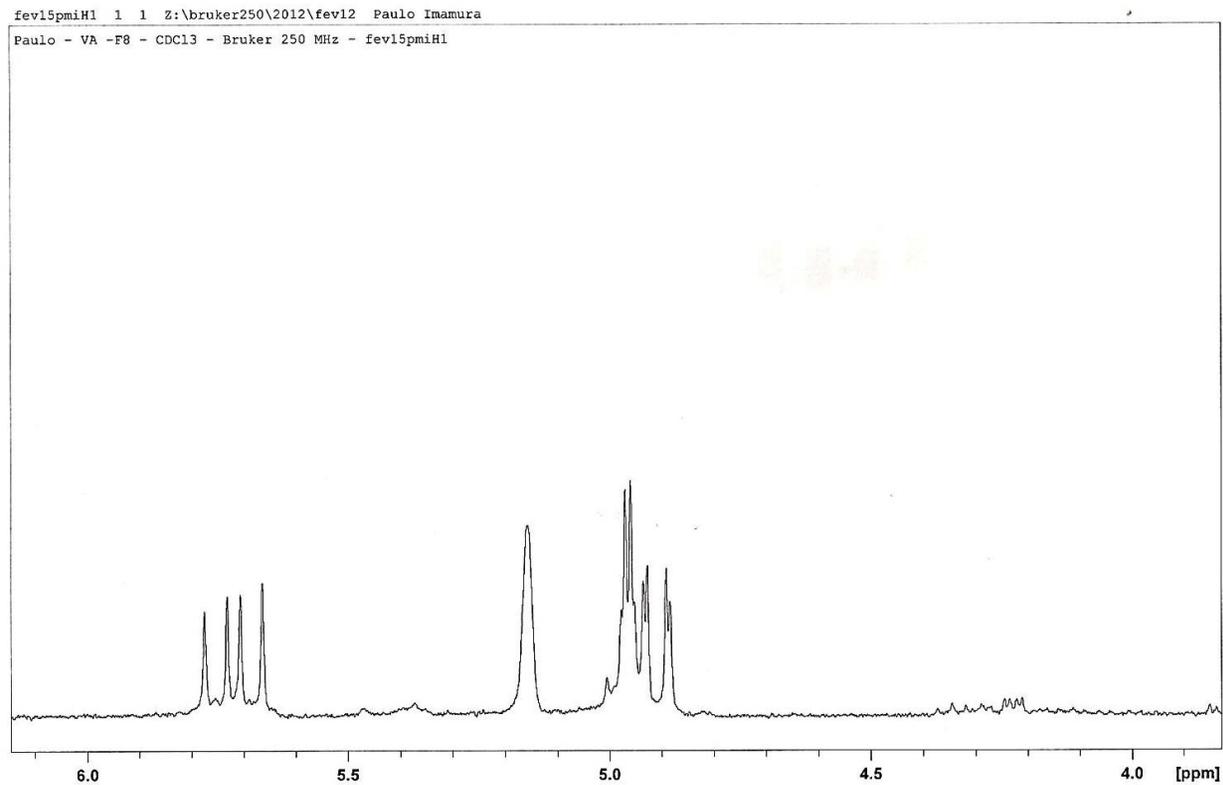


Transmittance / Wavenumber (cm-1)

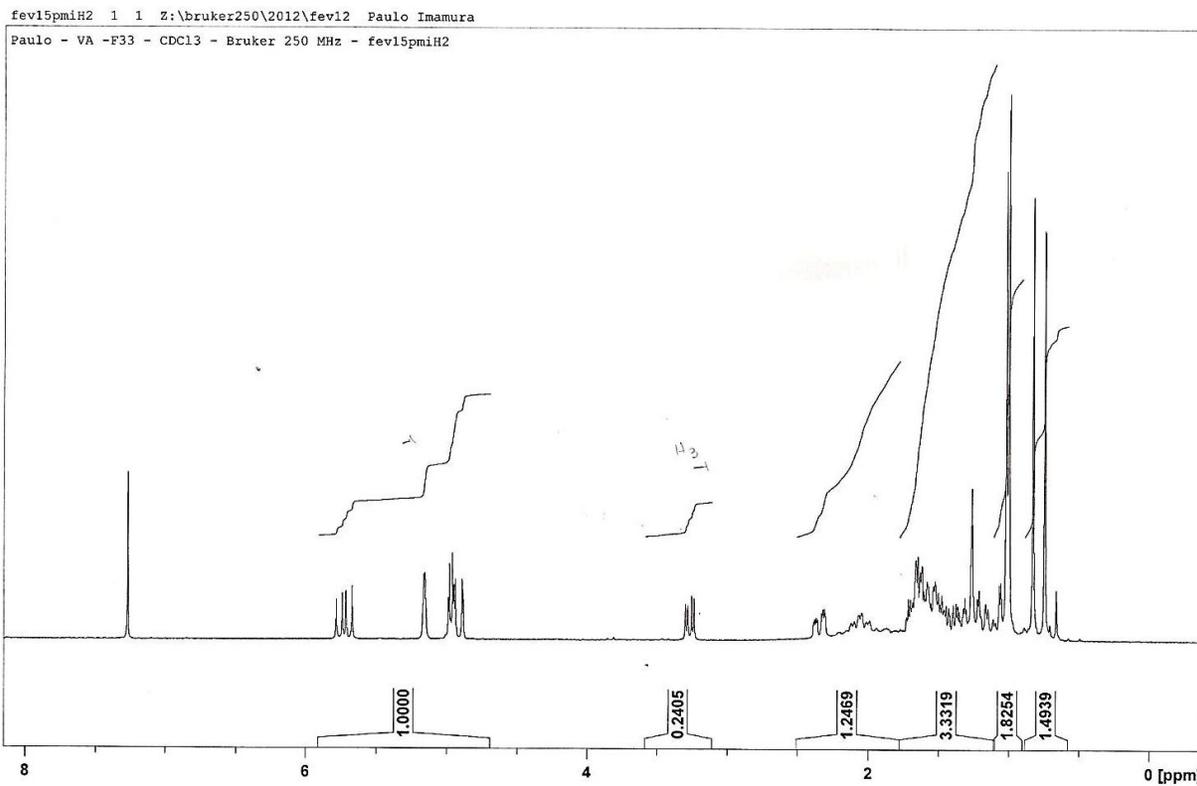
Anexo 60: Espectro infravermelho do Álcool *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol (3).



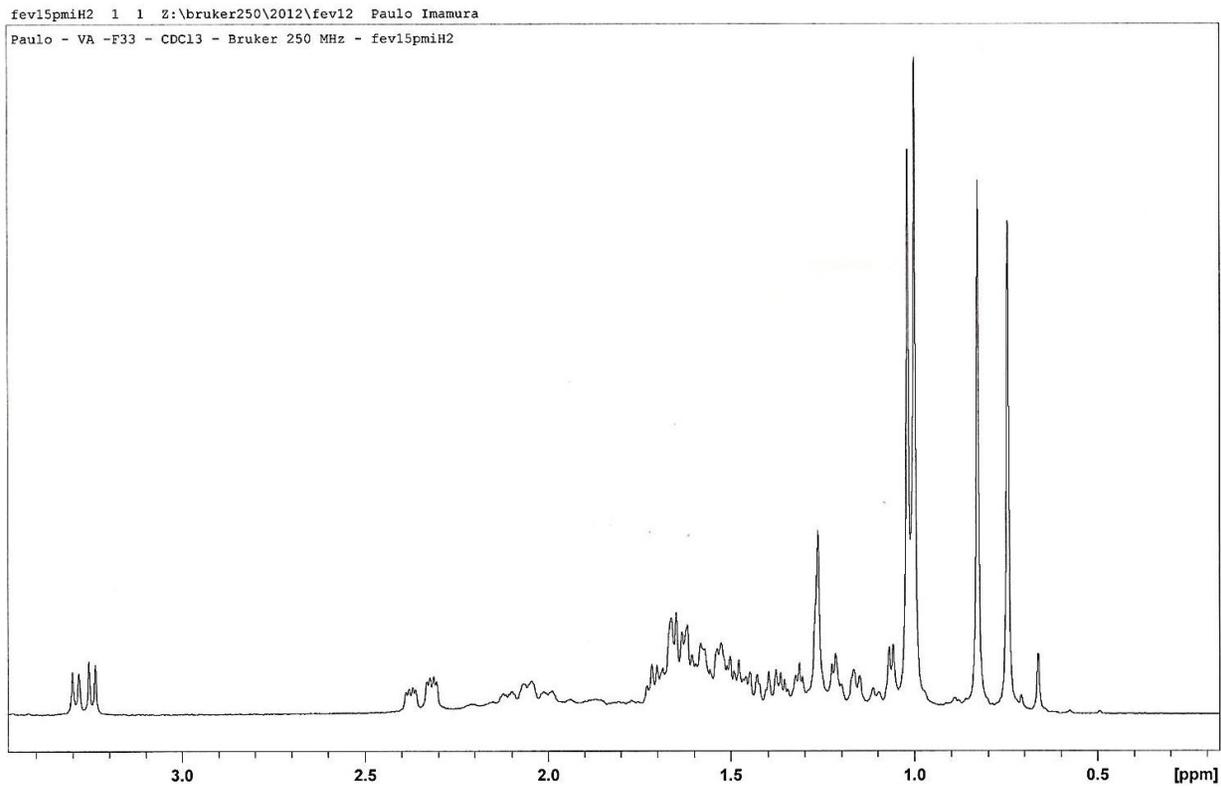
Anexo 61. Espectro de ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) da fração 8.



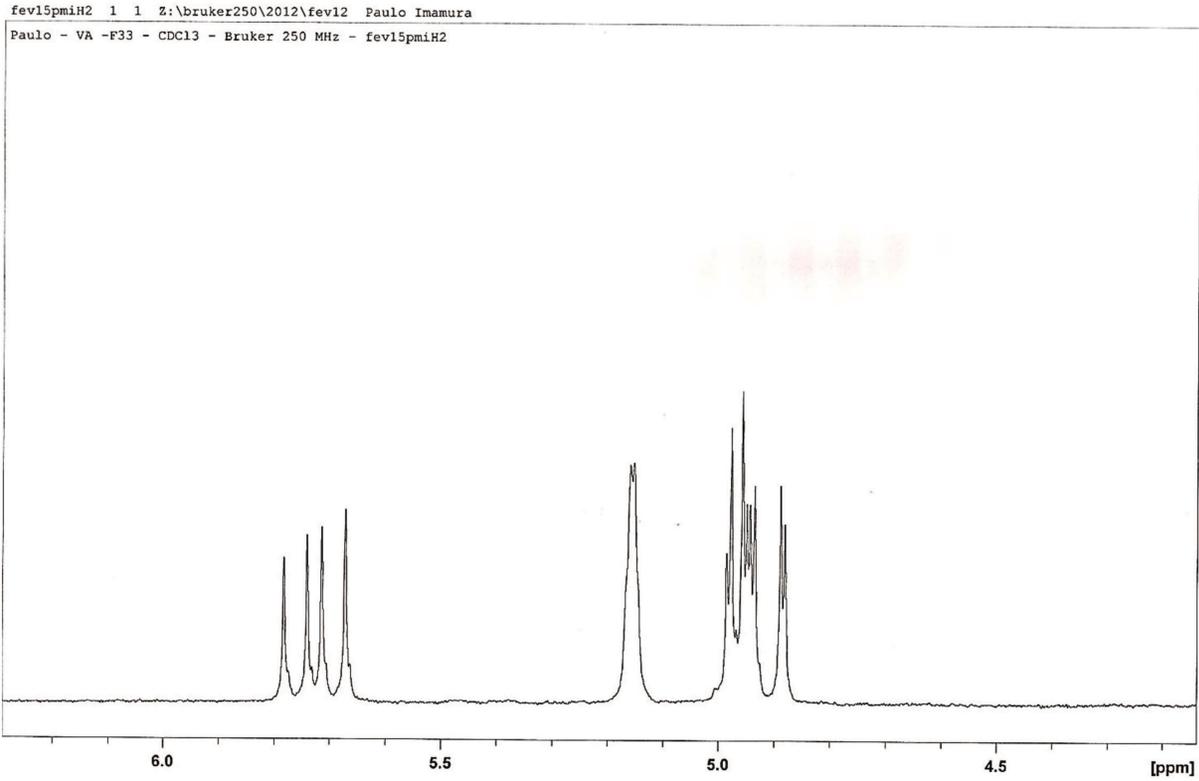
Anexo 62. Espectro expandido de ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) da fração 8.



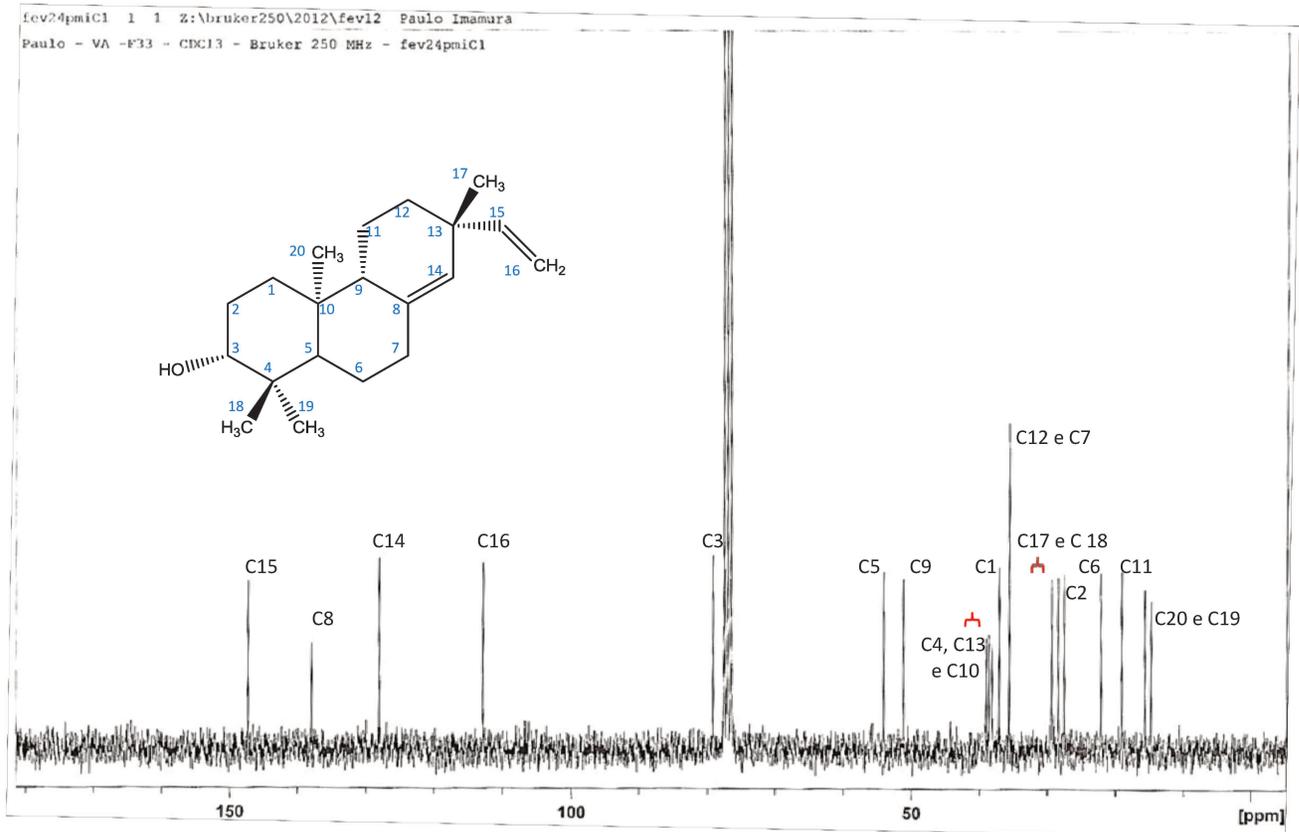
Anexo 63. Espectro ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) da fração 33.



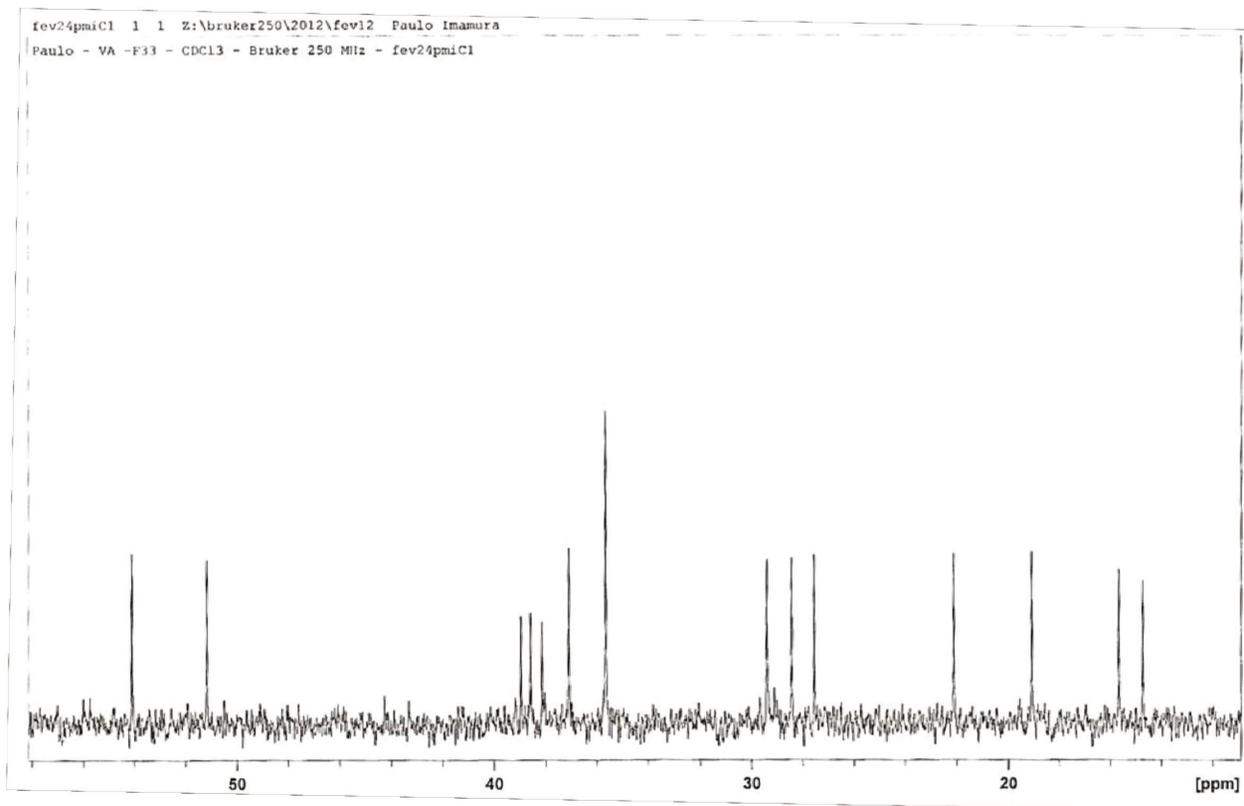
Anexo 64. Espectro expandido de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) da fração 33.



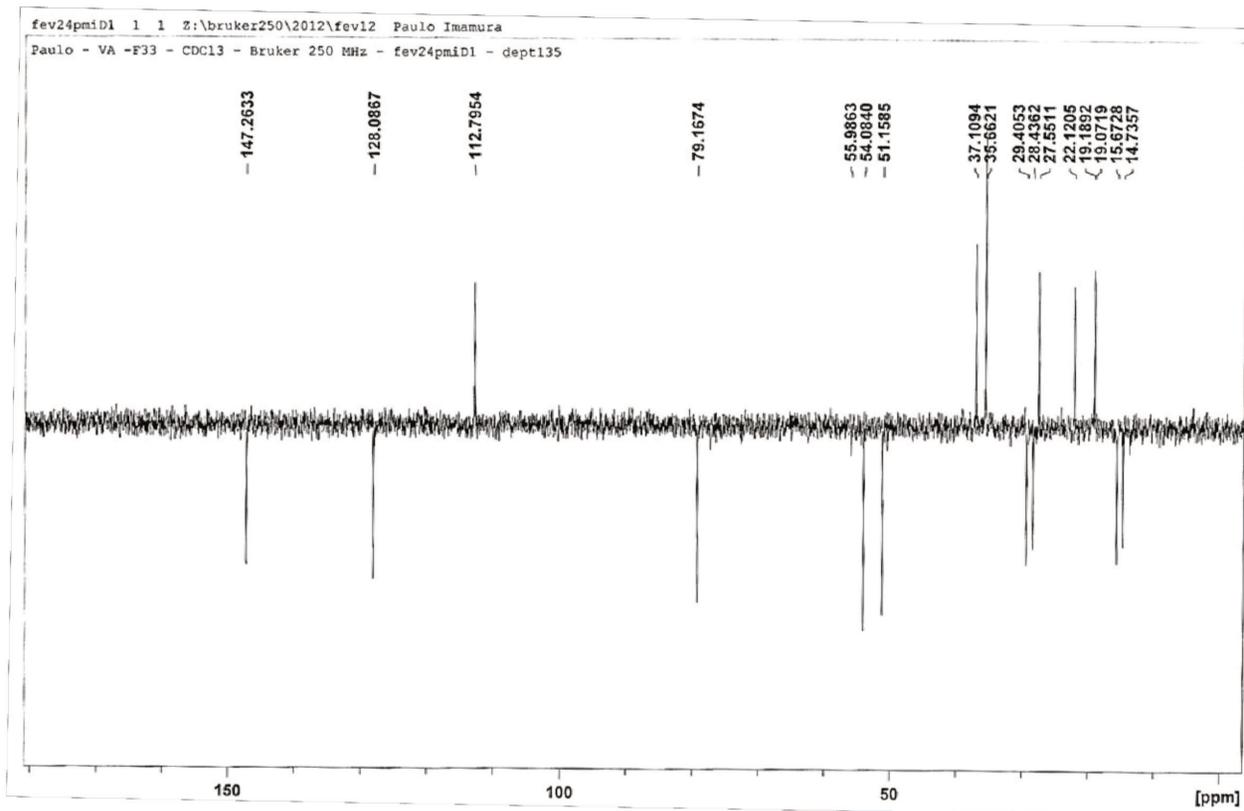
Anexo 65. Espectro expandido de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) da fração 33.



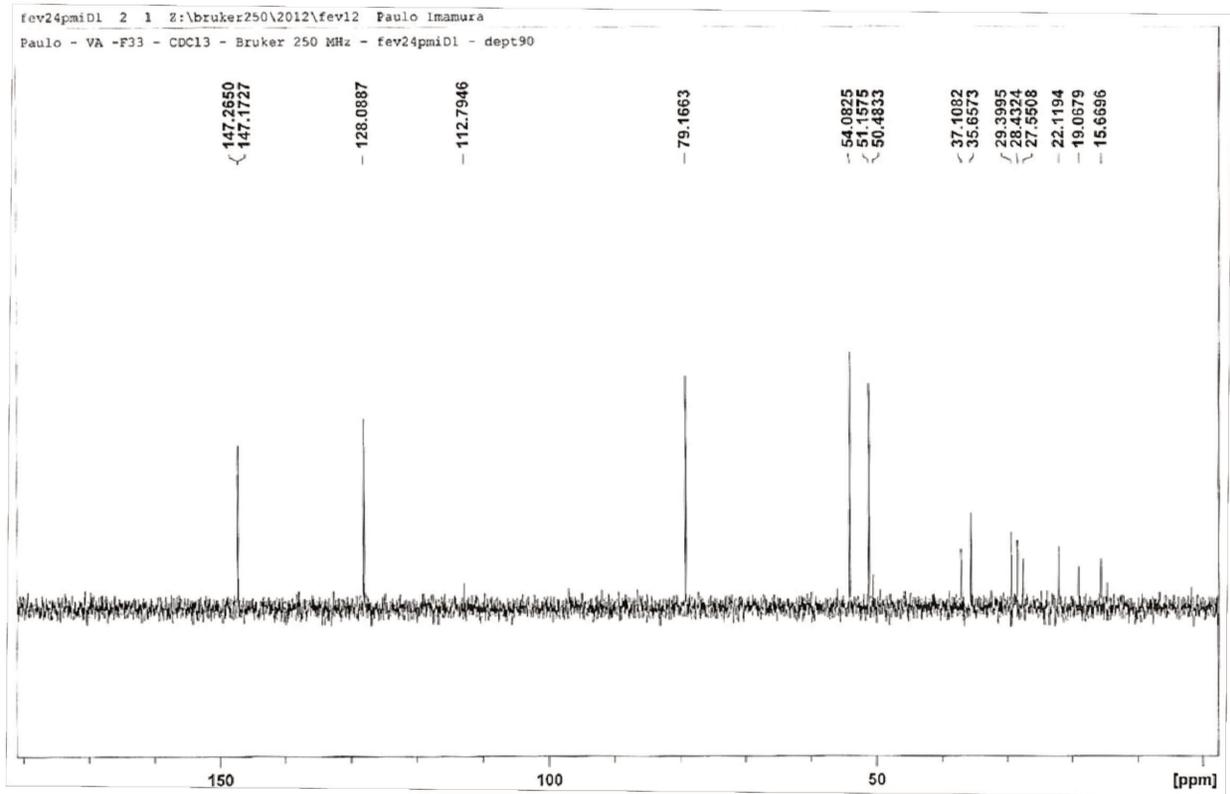
Anexo 66. Espectro de ^{13}C -RMN (62,5 MHz, CDCl_3) da fração 33.



Anexo 67. Espectro expandido de ^{13}C -RMN (62,5 MHz, CDCl_3) da fração 33.



Anexo 68. Espectro de ^{13}C -RMN (DEPT-135, 62,5 MHz, CDCl_3) da fração 33.



Anexo 69. Espectro de ^{13}C -RMN (DEPT-90, 62,5 MHz, CDCl_3) da fração 33.