



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EDUARDO BENEDETTI PARISOTTO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO  
BRUTO E SUPERCRÍTICO DE *Cordia verbenacea***

**Florianópolis/SC  
2011**

**EDUARDO BENEDETTI PARISOTTO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO  
BRUTO E SUPERCRTICO DE *Cordia verbenacea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa

**Florianópolis / SC  
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P232a Parisotto, Eduardo Benedetti  
Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e  
supercrítico de Cordia verbenacea [tese] / Eduardo Benedetti  
Parisotto ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa. -  
Florianópolis, SC, 2010.

96 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Plantas medicinais. 3. Celulas mortas. 4.  
erva baleeira - Avaliação - Uso terapeutico. I. Pedrosa,  
Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

*Nunca deixe que lhe digam  
que não vale a pena acreditar  
no sonho que se tem,  
Ou que seus planos nunca vão dar certo,  
Ou que você nunca vai ser alguém...  
...Confie em si mesmo.  
Quem acredita sempre alcança.*

*Renato Russo*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a maior das oportunidades: a vida.

À minha família que mesmo distante fisicamente sempre estiveram e estarão junto comigo.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa, o agradecimento especial pela confiança que me foi depositada e inesgotável paciência, compreensão e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, meu orientador de iniciação científica, o qual me inseriu no mundo da pesquisa e sempre manteve abertas as portas de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver meus trabalhos.

Aos meus colegas de laboratório Duda, Kaká, Tânia, Maicon, Aline, Ana Cláudia, Carla, Nádia, Mirelle e João pelos momentos de alegrias, angústias e apuros, além de terem me ajudado muito na realização desse trabalho. Ainda vamos rir muito de tudo isso.

Fer!! Imagina se eu iria esquecer de você. Entramos como concorrentes e sairemos como grandes amigos. Não tenho palavras para agradecer a tua companhia, coleguismo e competência. O meu muito obrigado especial.

Aos meus amigos da pizza e imagem em ação das quartas-feiras à noite, Gustavo, Dú, Gaúcho e Manolo, das quais me ausentei nos últimos tempos! Estou retornando!

À Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira e sua doutoranda Eliane Zandonai Michielin do Departamento de Engenharia Química e Alimentos da UFSC as quais foram responsáveis pela preparação dos extratos para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. Claus Tröger Pich da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e sua aluna Fernanda Zanette Silveira que nos auxiliaram na metodologia da atividade nucleásica.

À aluna Ângela Rosso que me auxiliou no ensaio de proliferação.

Ao Dr Julian Verrax, que nos auxiliou na metodologia do Western blotting.

À Profa. Dr.<sup>a</sup> Rosa Ribeiro do Vale Nicolau do Departamento de

Farmacologia que gentilmente permitiu o uso de equipamentos em seu laboratório

À Profa. Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo e Maria Claudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas que também nos cederam o uso de equipamentos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, que gentilmente permitiu o uso de equipamentos de seu laboratório.

À Profa. Dr<sup>a</sup> Regina Vasconcellos Antonio, que também sempre abriu as portas de seu laboratório para a realização de experimentos.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Ariane Zamoner deste departamento que me supervisionou no meu estágio de docência. Obrigado pela atenção e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC que sempre incentiva seus alunos na busca da excelência.

Aos animais que contribuíram com este trabalho. O meu mais profundo respeito.

Ao CNPq que apostou nesse projeto.

A todos que de qualquer forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

*Dedico este trabalho a meus pais e  
irmão que sempre me incentivaram e  
nunca deixaram que eu desistisse dos  
meus sonhos.  
A vocês, minha eterna gratidão.*

## RESUMO

O câncer está entre as causas mais frequentes de morte no mundo. É considerado um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo a segunda causa de morte no Brasil e no mundo, superado somente pelas doenças do sistema cardiovascular. Apesar disso até o momento não existe uma terapia efetiva para o tratamento de todos os tipos de câncer além de que a maioria dos quimioterápicos em uso apresentam elevada toxicidade. Esforços vêm sendo dirigidos no sentido de desenvolver fármacos antitumorais tão ou mais eficazes do que os quimioterápicos já disponíveis, porém com menor toxicidade e potencial para desenvolver resistência terapêutica. Muitos dos medicamentos utilizados atualmente resultaram da purificação de produtos naturais, principalmente vegetais. Neste contexto, o presente projeto objetivou avaliar o potencial antitumoral de *Cordia verbenacea* planta medicinal brasileira, vulgarmente conhecida como erva baleeira que é popularmente utilizada em Santa Catarina para tratamento de tumores e inflamações. Para se atingir tal objetivo foram realizados experimentos para avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa *in vitro* e antitumoral *in vivo*. Para tanto, realizou-se os ensaios de viabilidade celular (MTT) em células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e MCF-7, proliferação celular (incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina) e capacidade pró-apoptótica (Brometo de etídio/Laranja de acridina (BE/LA)) em células TAE. Além disso, verificou-se o possível efeito dos extratos sobre o DNA plasmidial (atividade nucleásica) assim como a capacidade protetora do extrato sobre o DNA (com a geração de espécies reativas de oxigênio com Fe-EDTA). Foi avaliada a expressão da COX-2 através de *Western blot* em células MCF-7. A determinação da atividade antitumoral *in vivo* foi realizada em camundongos Balb/c inoculados com o TAE e tratados com extrato bruto (EB) e supercrítico (ESC) nas concentrações de 37,5; 75 e 150 mg/Kg. Nos ensaios do MTT e incorporação de timidina triaciada os resultados demonstraram que o EB e ESC reduziram de maneira significativa a viabilidade e proliferação celular. A coloração com BE/LA revelou que o provável tipo de morte celular induzida pelos tratamentos trata-se de apoptose, uma vez que a grande maioria das células adquiriram uma coloração laranja-avermelhada, característica de células apoptóticas. Os extratos mostraram-se ineficazes no teste de ativação nucleásica. O ESC foi capaz de reduzir significativamente a expressão da COX-2 em células MCF-7. Os ensaios *in vivo* demonstram que tanto EB quanto ESC apresentaram efeitos antitumorais, sendo os melhores resultados observados para a dose de 150 mg/Kg. O tratamento com os extratos também causou importante inibição do crescimento tumoral nos camundongos, principalmente o ESC. EB e ESC elevaram a proporção de células inviáveis/viáveis em mais de duas vezes quando comparado ao controle negativo. EB e ESC aumentaram o tempo médio de sobrevivência e a concentração de GSH. De acordo com os resultados podemos concluir que ESC apresentou atividade antitumoral mais potente que o extrato

bruto. Os resultados obtidos foram favoráveis à validação da utilidade de *C. verbenacea* como potencial agente antitumoral. Além disso, foi considerado que o método de extração supercrítica pode aprimorar a atividade antitumoral de *C. verbenacea*, como demonstrado com os resultados apresentados acima, uma vez que estes efeitos provavelmente se devam à presença de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno presente nos extratos, especialmente no extrato supercrítico. Também a partir dos resultados obtidos podemos supor que um possível mecanismo de ação antitumoral dos extratos possa ser a redução da expressão da COX-2, o que poderia levar a um bloqueio da sobrevivência celular e indução da apoptose.

**Palavras-chave:** *Cordia verbenacea*; Atividade antitumoral; Antiproliferativo; Apoptose; Tumor ascítico de Ehrlich; COX-2; Extração supercrítica.

## ABSTRACT

Cancer is among the most frequent causes of death worldwide, being the second death cause in Brazil and in the world, exceeded only by diseases of the cardiac system. Nevertheless, until now there is no effective therapy for the treatment of all type of cancer while most chemotherapeutic agents in use are highly toxic. Efforts are being directed towards developing anticancer drugs more effective than the chemotherapy drugs already available, but possessing less toxicity and potential to develop resistance to treatment. Many drugs used today resulted from the purification of natural products, especially plants. In this context, this project aimed to evaluate the antitumor potential of the Brazilian medicinal plant *Cordia verbenacea*, commonly known as grass whaling, wich that is popularly used in Santa Catarina for the treatment of tumors and inflammation. Experiments were performed to evaluate the cytotoxic and antiproliferative activity *in vitro* and *in vivo* antitumor. Tests of cell viability (MTT) in cells of Ehrlich ascites tumor (EAT) and MCF-7 cell proliferation (incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine) and of pro-poptóica (ethidium bromide / Orange acridine (BE / LA)) in cells TAE. Moreover, the possible effect of the extracts on plasmid DNA (nuclease activity) and the protective ability of the extract on the DNA (with the generation of reactive oxygen species with Fe-EDTA) was avaliated. The expression of COX-2 was verified through *Wertern blot* in MCF-7 cells. The determination of antitumor activity *in vivo* was performed in Balb /C mice inoculated with Ehrlich ascites carcinoma (EAC) and treated with crude (CE) and supercritical extracts (SFE) at concentrations of 37.5, 75 and 150 mg / kg. Assays of MTT and incorporation of thymidine showed that SFE and CE significantly reduced viability and cell proliferation. Staining with EB / LA revealed that the most probable type of cell death induced by treatments is apoptosis, since the majority of cells acquired a reddish-orange colour, characteristic of apoptotic cells. The extracts showed to be ineffective in testing nuclease activation. SFE was able to significantly reduce the expression of COX-2 in MCF-7 cells. *In vivo* test revealed that both SFE and CE showed antitumor effects, and the best results obtained was a dose of 150 mg / kg. Treatment with extracts also caused a significant inhibition of tumor growth especially SFE. SFE and CE increased more than twice the proportion of viable/cells viable compared to negative control. SFE and CE increased the mean survival time and GSH concentration. According to the results is possible to conclude that SFE has a more potent antitumor activity than the crude extract. The results were favorable to the validation of the usefulness of *C. verbenacea* as a potential antitumor agent. Furthermore, the method of supercritical extraction can enhance the antitumor activity of *C. verbenacea*, as demonstrated by the results reported above, since these effects may be due to the presence of  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene present in the extracts, especially in the supercritical extract. It is possible to assume that a possible mechanism of antitumor action of the extracts could be the inhibition of COX-2, which could

lead to a blockage of cell survival and induction of apoptosis.

**Keywords:** *Cordia verbenácea*; Antitumor activity; Antiproliferative; Apoptosis; Ehrlich ascitic tumor; COX-2; Supercritical extract.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esquema simplificado da regulação do ciclo celular. ....	23
<b>Figura 2</b> - Visualização simplificada do mecanismo de morte celular por apoptose mediado pelas vias das caspases. ....	25
<b>Figura 3</b> - Esquema geral do possível mecanismo carcinogênico envolvendo o processo inflamatório através do metabolismo do ácido araquidônico.....	28
<b>Figura 4</b> - Imagem de <i>C. verbenacea</i> (“erva baleeira”): (A) Inflorescência, (B)Frutos, (C) Arbusto. ....	31
<b>Figura 5</b> - Estrutura química do $\alpha$ -humleno e $\beta$ -cariofileno identificados e já isolados nos de <i>C. verbenacea</i> . ....	32
<b>Figura 6</b> - Diagrama esquemático do equipamento de ESC. ....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
<b>Figura 7</b> - Esquema simplificado das formas apresentadas pelo DNA plasmidial. ....	43
<b>Figura 8</b> - Efeito do tratamento com os extratos de <i>C. verbenacea</i> nas diferentes doses testadas (48 horas de incubação) sobre a viabilidade das células do carcinoma de Ehrlich. ....	50
<b>Figura 9</b> - Efeito do tratamento com os extratos de <i>C. verbenacea</i> nas diferentes doses testadas (48 horas de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. ....	51
<b>Figura 10</b> - Efeito do tratamento do extrato bruto (EB) e extrato supercrítico (ESC) de <i>C. verbenacea</i> (300 $\mu$ g/ml, 48 h de incubação) sobre a incorporação de [ $^3$ H] timidina em células de TAE. ....	52
<b>Figura 11</b> - Porcentagem de células viáveis e inviáveis (apoptóticas) em células de carcinoma de Ehrlich após tratamento com extrato bruto e supercrítico. ....	52
<b>Figura 12</b> - Morfologia das células do carcinoma de Ehrlich coradas com uma mistura de Brometo de Etídio/Acridina laranja e observadas após 48 horas de incubação com extrato bruto (C) e supercrítico (D). ....	53
<b>Figura 13</b> - Efeito do extrato bruto <i>C.verbenacea</i> (0-150 $\mu$ g/ml) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C. ....	54
<b>Figura 14</b> - Efeito do extrato supercrítico <i>C.verbenacea</i> (0-150 $\mu$ g/ml) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C.....	54

<b>Figura 15</b> - Efeito do extrato bruto (EB) de <i>C. verbenacea</i> (0-150,0 g/L) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial.....	55
<b>Figura 16</b> - Efeito protetor do extrato supercrítico (ESC) de <i>C. verbenacea</i> (0-150,0 g/L) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial.....	56
<b>Figura 17</b> - Expressão de COX-2 em células MCF-7 tratadas com veículo de dissolução dos extratos (CN), extrato bruto (EB) e extrato supercrítico (ESC) em dose de 150 µg/mL de extratos.....	57
<b>Figura 18</b> - Efeito do tratamento do extrato bruto e supercrítico de <i>C. verbenacea</i> na inibição do crescimento tumoral em camundongos inoculados com TAE. ....	59
<b>Figura 19</b> - Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em amostras de líquido ascítico de camundongos portadores de TAE.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Taxas brutas para o ano de 2010 de incidência de casos de câncer, em homens e mulheres, segunda a região no Brasil.....	21
<b>Tabela 2</b> - Porcentagem da área de picos obtidas através do cromatograma para $\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno nos extratos analisados .....	49
<b>Tabela 3</b> - Valores das $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos do efeito citotóxico do extrato bruto e supercrítico (através do ensaio do MTT), sob células do TAE e MCF-7.....	51
<b>Tabela 4</b> - Efeito antitumoral dos extratos bruto e supercrítico de <i>C. verbenacea</i> em camundongos inoculados com TAE. ....	58
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros morfofisiológicos de camundongos tratados com extratos bruto e supercrítico de <i>C. verbenacea</i> inoculados com TAE. ....	58

## LISTA DE SIGLAS

APAF 1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma XL</i>
BCL-XS	<i>B-cell lymphoma XS</i>
BE	Brometo de Etídio
BE/LA	Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina
CdK	Quinase dependente de ciclina
CDKI	Quinase dependente de ciclina I
CE	<i>Crude extract</i>
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
COX-1	Cicloogigenase-1
COX-2	Ciclooxygenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
DR	Death receptor
EB	Extrato bruto de <i>C. verbenacea</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
ESC	Extrato supercrítico
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
F-I	Forma superenovelada
F-II	Forma circular aberta
F-III	Forma linear
FLIP	<i>FADD-like interleukin-1<math>\beta</math> converting enzyme-like protease inhibitory protein</i>

HEPES	Ácido n-2-hidroxietilpiperazina-n'-2'-etanossulfônico
i.p.	Via intraperitoneal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Laranja de Acridina
mA	Miliamperes
MDR	Multidrug resistance
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5- difeniltetrazolil
NFk-β	Fator Nuclear k-β
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAL	Percentual do aumento de longevidade
PBS	Tampão salina fosfato
PGE-2	Prostaglandina E2
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFE	<i>Supercritical fluid extraction</i>
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TCA	Ácido Tricloroacético
TMS	Tempo Médio de Sobrevida
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 CÂNCER .....	19
1.1.1 Aspectos Gerais .....	19
1.1.2 Epidemiologia .....	20
1.1.3 Ciclo celular e Câncer .....	21
1.2 APOPTOSE .....	23
1.3 QUIMIOTERAPIA .....	25
1.1.5 Câncer e GSH .....	26
1.3 CÂNCER E INFLAMAÇÃO .....	27
1.4 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE) .....	29
1.5 PLANTAS COMO FONTES DE MEDICAMENTOS .....	29
1.6 CORDIA VERBENACEA .....	30
1.7 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 REAGENTES E LINHAGENS TUMORAIS .....	37
3.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>CORDIA</i> <i>VERBENACEA</i> .....	37
3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	37
3.3.1 Extração convencional .....	37
3.3.2 Extração supercrítica .....	38
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS .....	38
3.5 CULTURA DAS CÉLULAS DE CARCINOMA DE EHRLICH .....	38
3.6 CULTURA DAS CÉLULAS MCF-7 .....	39
3.7 CAMUNDONGOS BALB/C ISOGÊNICOS .....	39
3.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT) .....	39
3.9 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DA [ <sup>3</sup> H]TIMIDINA .....	41
3.10 ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓICA: COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR BROMETO DE ETÍDIO/ LARANJA DE ACRINIDINA .....	41
3.11 ATIVIDADE NUCLEÁSICA .....	42
3.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2 EM CÉLULAS MCF-7 .....	44
3.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i> .....	45
3.13.1 Avaliações Cronomorfológicas .....	46
3.13.2 Dosagem de GSH .....	47

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS .....	49
4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT) .....	49
4.3 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DA [H3]TIMIDINA .....	51
4.4 ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA: COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR BROMETO DE ETÍDEO/LARANJA DE ACRIDINA .....	52
4.5 ATIVIDADE NUCLEÁSICA .....	53
4.6 EXPRESSÃO DA COX-2 EM CÉLULAS MCF-7 .....	56
4.7 EFEITO ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i> .....	57
4.6 DOSAGEM DE GSH.....	59
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

### *1.1.1 Aspectos Gerais*

Câncer é a denominação comum para todos os tumores malignos. Apesar das origens antigas desse termo serem relativamente incertas, provavelmente deriva do termo em latim caranguejo, presumidamente porque o câncer “agarra-se de uma maneira obstinada a qualquer parte do que se apodera, como um caranguejo” (KUMAR,V., ABBAS, A., FAUSTO, N., 2004).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, os quais podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Porém a definição bioquímica para esta doença é uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (MOFFAT et al., 2000).

Quase todos os tumores benignos crescem como massas expansivas coesas que permanecem localizadas em seu sítio de origem e não têm a capacidade de se infiltrar, invadir ou metastizar para locais distantes, como os tumores malignos. As metástases são implantes tumorais separados do tumor primário. A metástase caracteriza de modo inequívoco um tumor como sendo maligno porque os tumores benignos não metastizam. A invasibilidade dos tumores possibilita sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, criando a oportunidade para uma disseminação. Com poucas exceções, todos os cânceres podem metastizar. Em geral, quanto mais agressivo, de crescimento mais rápido e maior o tumor primário, maior é a probabilidade de metástases (KUMAR,V., ABBAS, A., FAUSTO, N., 2004).

Múltiplos fatores incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e a exposição à carcinógenos ambientais estão relacionados à incidência, distribuição geográfica e comportamento de certos tipos específicos de câncer (BRASIL, 2002). Evidências apontam que as influências de fatores externos ambientais são as principais causas de sua ocorrência, tais influências atuam determinando direta ou indiretamente modificações centradas no material genético das células,

resultando no câncer. Por exemplo, muitos cânceres de pulmão ocorrem devido à carcinogênese química, provocada pelo tabaco (COHN, ROTH, 1996). Altas doses de radiação e benzeno são conhecidas por causar leucemia (RUBIN, FARBER, 1994). O consumo de álcool predispõe ao câncer do trato digestivo e do trato respiratório, a cirrose alcoólica pode levar ao câncer hepático (WARD, 2002). São raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese (INCA, 2005). Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam história familiar para esta doença. Alguns tipos do câncer de mama, estômago e intestino, parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum (INCA, 2005). Determinados grupos étnicos parecem estar protegidos de certos tipos de câncer, como por exemplo, a leucemia linfocítica é rara em orientais e o sarcoma de Ewing é muito raro em negros (INCA, 2005).

### ***1.1.2 Epidemiologia***

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo ainda importante causa de morte no Brasil e no mundo, desde 2003. As neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA 2010). Estimativas prevêem que o número de casos deverá aumentar para 12,0 milhões até 2030 (WHO, 2010). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), revelaram para os anos de 2008 e 2009, a ocorrência de cerca de 466.730 casos novos da doença. Estimativas, para o ano de 2010 apontaram para uma ocorrência de aproximadamente 489 mil novos casos de câncer (Tabela 1) (INCA, 2010).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Já em homens o tipo mais freqüente é o câncer de próstata. Em termos de valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de câncer (INCA, 2010).

**Tabela 1** - Taxas brutas para o ano de 2010 de incidência de casos de câncer, em homens e mulheres, segunda a região no Brasil.

<b>Brasil Consolidado</b>		
	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>
Norte	8.930	10.190
Nordeste	40.530	48.820
Centro-Oeste	14.960	15.380
Sudeste	52.090	50.390
Sul	119.730	128.250
<b>Total por sexo</b>	<b>236.040</b>	<b>253.030</b>
<b>Brasil</b>		<b>489.270</b>

Fonte: Adaptado de INCA (2010).

### **1.1.3 Ciclo celular e Câncer**

A maioria das células eucarióticas passam por uma série ordenada de eventos que constituem o ciclo celular, o qual as células duplicam (replicam) seu DNA e, posteriormente, entram em divisão (mitose). As células neo-formadas podem continuar a se dividir, ou sair do ciclo celular, entrando nos estado quiescência. A regulação do ciclo celular é crítica para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares (LODISH et al., 2002).

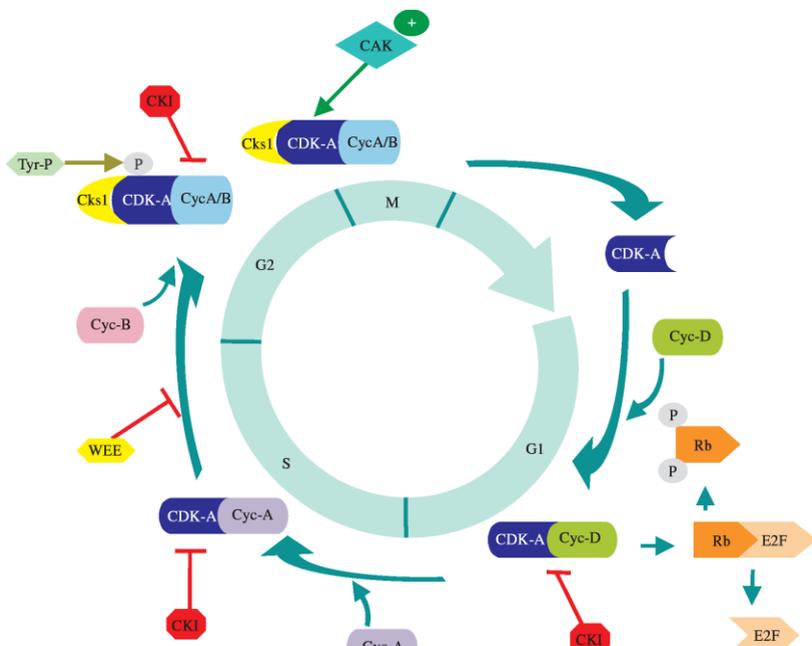
Segundo a oncologia molecular, o câncer é o resultado final de um acúmulo de alterações genéticas, algumas das quais podem ser adquiridas e outras herdadas. Os genes que são alterados são aqueles envolvidos nos processos celulares normais e fundamentais, como regulação do ciclo celular, a sinalização, e a diferenciação (PELÚZIO et al., 2006). Estes genes mutados podem ser divididos em três grupos: oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais.

Oncogenes trata-se de genes cuja presença e/ou hiperatividade podem predispor ao desenvolvimento de câncer. Codificam proteínas que estimulam excessivamente a proliferação celular (AUDIC, HARTLEY, 2004). O oncogene c-myc tem sido apontado como peça central no processo tumorigênico em diversos cânceres humanos. A proteína codificada pelo gene c-myc em geral atua inativando os supressores tumorais, embora algumas vias associada a esta proteína não tenham sido totalmente elucidadas. A atividade do c-myc em células normais é regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e

componentes da matriz extracelular. Células diferenciadas normalmente expressam baixos níveis de c-myc (FARIA, RABENHORST, 2005)

Proto-oncogenes tratam-se de uma família de genes normais que codificam as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular normal. Por fim, genes supressores tumorais, tratam-se de genes que codificam proteínas que inibem o crescimento de células tumorais (DE VITA, HELMAN, ROSENBERG, 1998; WOLF; RAMIREZ, 2001). O principal e mais estudado gene supressor tumoral trata-se do p53 (denominado “guardião do genoma”, o qual codifica um fator de transcrição protéico que se acumula quando ocorre dano ao DNA ativando a transcrição de vários genes, um dos quais codifica a proteína p21. A proteína p21 inativa complexos de ciclinas/CDKs, impedindo, assim, a fosforilação das proteínas Rb (a qual em células quiescentes encontra-se hipofosforilada), com conseqüente interrupção do ciclo no ponto de controle 1, permitindo assim a ocorrência do reparo do DNA. Caso o reparo não seja bem-sucedido, o gene p53 desencadeia um processo de morte celular programada chamada apoptose. Sendo assim, anormalidades na expressão do p53 estão associadas ao desenvolvimento de tumores malignos (RANG et al., 2004; OSBORNE, 2004).

O controle do ciclo celular, denominado de *checkpoint* (ponto de controle), representa um mecanismo de vigilância cujo papel principal é o de evitar o acúmulo de erros genéticos durante as divisões celulares, dessa forma protegendo a integridade genômica das células (BARTEK et al., 1999). Para garantir a fidelidade da duplicação, os *checkpoints* desempenham algumas tarefas: induzem um retardo no ciclo celular; ajudam a ativar o reparo do DNA; bloqueiam o ciclo celular até que o reparo seja feito com sucesso e reiniciam a progressão do ciclo (Figura 1). Os principais componentes desse sistema de controle consistem em duas famílias de proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs fosforilam diversas proteínas ativando umas e inibindo outras para coordenar suas atividades. Cada CDK é inativa até que se ligue a uma ciclina, e esta ligação faz com que a CDK passe a fosforilar as proteínas (mais especificamente nos resíduos de serina e treonina) necessárias para determinada etapa do ciclo celular (RANG et al, 2003). A atividade das CDKs é também regulada pelos *checkpoints*, sendo assim mutações ou falhas nos mecanismos desse controle do ciclo celular podem implicar na desregulação da atividade das CDKs, aumentando a probabilidade de desenvolvimento transformações malignas (MALUMBRES; BARBACID, 2009).



**Figura 1** - Esquema simplificado da regulação do ciclo celular.

Fonte: Andrietta et al, (2001).

## 1.2 APOPTOSE

Em 1964, foi proposto o termo de “morte celular programada” para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de diversos tecidos maduros, na resposta inflamatória e na eliminação de células após o dano celular por agentes genotóxicos (GRIVICICH et al., 2007). A apoptose pode ser desencadeada por estímulos externos através de receptores de superfície (ditos receptores de morte) ou por estímulos internos de estresse intracelular ou nas vias metabólicas. Essas vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, as quais exercem papel central no processo de morte celular (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997).

O processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de

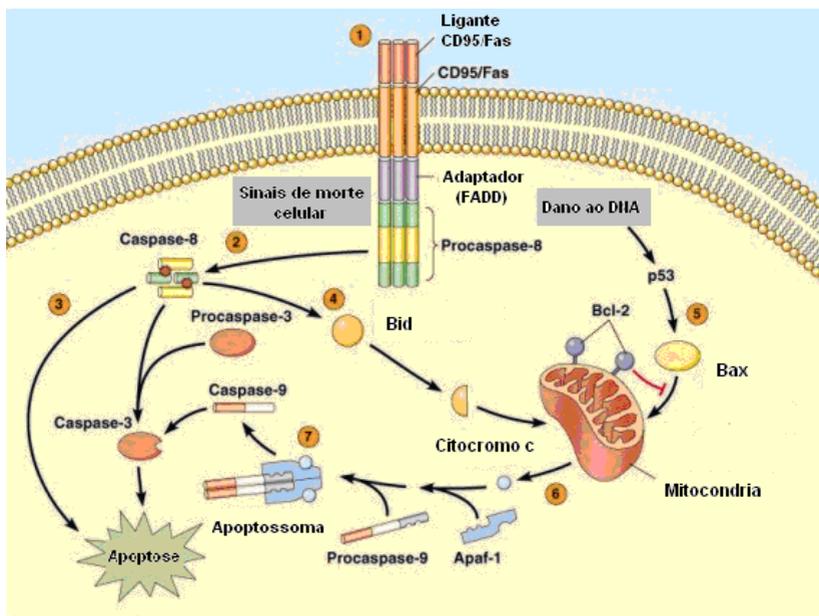
ativação, na qual as caspases se tornam cataliticamente ativas, e uma fase de execução, na qual as enzimas atuam provocando a morte celular.

As caspases podem desencadear o processo apoptótico por duas vias: via extrínseca (via receptor) ou via intrínseca (via mitocondrial) (Figura 2). A via extrínseca pode ser ativada por receptores de morte (DR= *Death receptor*) que contém um domínio citoplasmático, envolvido nas interações proteína-proteína, chamado de domínio de morte (os receptores mais conhecidos são CD95 e Fas). Quando o receptor de morte é conectado com seu ligante, é ativado e se liga a proteína adaptadora, a qual também contém um domínio de morte, chamado de FAAD (*Fas-associated death domain*). Uma vez ligado ao receptor de morte, a proteína adaptadora se liga a uma forma inativa da caspase-8, ativando-a. A caspase-8 ativada desencadeia uma cascata de ativação (através de clivagem) de outras caspases, as quais são chamadas caspases efetoras, como a caspase-3. Essa via da apoptose pode ser inibida por uma proteína chamada FLIP, a qual se liga a pró-caspase 8 mas não consegue clivar nem ativar a enzima pois não tem atividade catalítica.

Já a via mitocondrial resulta do aumento da permeabilidade mitocondrial e da liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, sem a participação dos receptores de morte (RANG et al., 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004). Uma dessas proteínas liberadas pela mitocôndria é a citocromo c, a qual se liga a uma proteína chamada Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) e esse complexo ativa a caspase-9. O resultado final é a ativação da cascata das caspases culminando com uma via comum as duas vias, ou seja, ativação da caspase-3. Uma vez ativada, a caspase-3 induz a clivagem de ligações peptídicas em substratos importantes tais como: proteína quinase, proteína do citoesqueleto, proteínas relacionadas com o reparo do DNA, subunidades inibitórias de endonucleases. Estes eventos que finalmente levam à destruição das funções celulares vitais, acarretando consequentemente ao aparecimento das modificações morfológicas características nas células em processo apoptótico, tais como: contração do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos (SHIOZAKI, SHI, 2004; KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2004; CONTRACT, 2009).

Fatores de crescimento e outros sinais de sobrevivência estimulam a produção de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, um dos mais importantes reguladores da via intrínseca. Essa família inclui membros pró-apoptóticos (BAX, BAK, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, BIM,

HRK) e antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1). Os membros anti-apoptóticos atuam como repressores da apoptose, bloqueando a liberação de citocromo c, enquanto os membros pró-apoptóticos atuam como promotores (GHOBRIAL et al., 2005).



**Figura 2** - Visualização simplificada do mecanismo de morte celular por apoptose mediado pelas vias das caspases.

Fonte: Adaptado de Hohenegger, (2010).

### 1.3 QUIMIOTERAPIA

A quimioterapia é o método de que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada antineoplásica (INCA, 2010)

Com o aparecimento da terapia antineoplásica ocorreu como consequência a disponibilidade de estratégias terapêuticas para pacientes com malignidades e muitos tipos de tumores sólidos avançados. Essas inovações confirmaram que a quimioterapia promove efetivamente a cura do câncer além de promover a integração da quimioterapia junto às cirurgias e radioterapias nos estágios iniciais da doença (DE VITA,

HELLMAN, ROSENBERG, 2005).

Existem vários fármacos já consagrados na terapia do câncer, porém nenhuma das estratégias terapêuticas atuais são capazes de regredir completamente as manifestações dessa patologia (JENDIROBA, 2002). Além disso, os tratamentos atuais têm como principal obstáculo o desenvolvimento de resistência celular aos fármacos (MDR= *multidrug resistance* ou resistência multifármaco), o qual se caracteriza pela capacidade das células neoplásicas de desenvolverem resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos, estruturalmente e funcionalmente não relacionados (GOODMAN; GILMAN, 2001; ALMEIDA et al., 2005).

O câncer é uma família de doenças e cada tipo de câncer apresenta evolução clínica particular, sendo assim, terapia diferenciada (GORCZYCA; GONG; ARDELT, 1999).

Os principais alvos moleculares dos vários fármacos utilizados na quimioterapia do câncer atualmente incluem: os antimetabólitos, os quais inibem a síntese de purinas (ex: metotrexato, tioguanina); agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxauréia, fluoruracila); agentes que modificam o DNA por alquilação (cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, doxorubicina, daunorubicina); agentes inibidores da síntese de RNA ou proteínas (ex: actinomicina D, vincristina) (Rang et al., 2003; RICHARDSON et al., 2000). Dentre esses grupos, os antibióticos antineoplásicos estão entre os mais importantes agentes utilizados na quimioterapia do câncer, incluindo aqui os membros das famílias da antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácido aureólico (ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001). Entre aqueles clinicamente mais utilizados, encontram-se os derivados da daunomicina, particularmente doxorubicina/ idarrubicina e mitomicina C (CRAGG; NEWMAN, 1999). A grande maioria desses antibióticos utilizados exerce sua atividade antineoplásica por inibição da topoisomerase II, grupo de enzimas que catalisam o relaxamento da super-hélice do DNA em seu processo de replicação e síntese de novo (BURDEN; OSHEROFF, 1998).

### **1.1.5 Câncer e GSH**

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER, ALMEIDA, 2008). Este

tiol não protéico é abundante nas células dos mamíferos e em organismos aeróbios, podendo ser encontrado em vários tecidos, compartimentos celulares e sub-celulares (WILHELM FILHO et al., 2000). Protege o dano oxidativo por meio de diferentes mecanismos: reagindo com EROs, restaurando moléculas lesadas, cedendo-lhes hidrogênio, estabilizando a estrutura das membranas, pela eliminação de peróxidos formados, mantendo o grupo tióis das proteínas em sua forma reduzida (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

Várias condições de estresse oxidativo podem ser responsáveis pela depleção dos níveis de GSH, incluindo a radiação UV, toxinas, a inflamação entre outros (MALDONADO, 2008). Além disto, estudos revelam a relação da GSH com a resistência de certos tipos de tumores a agentes quimioterápicos bem como a resistência a terapia com radiação (JADRAV et al., 1998).

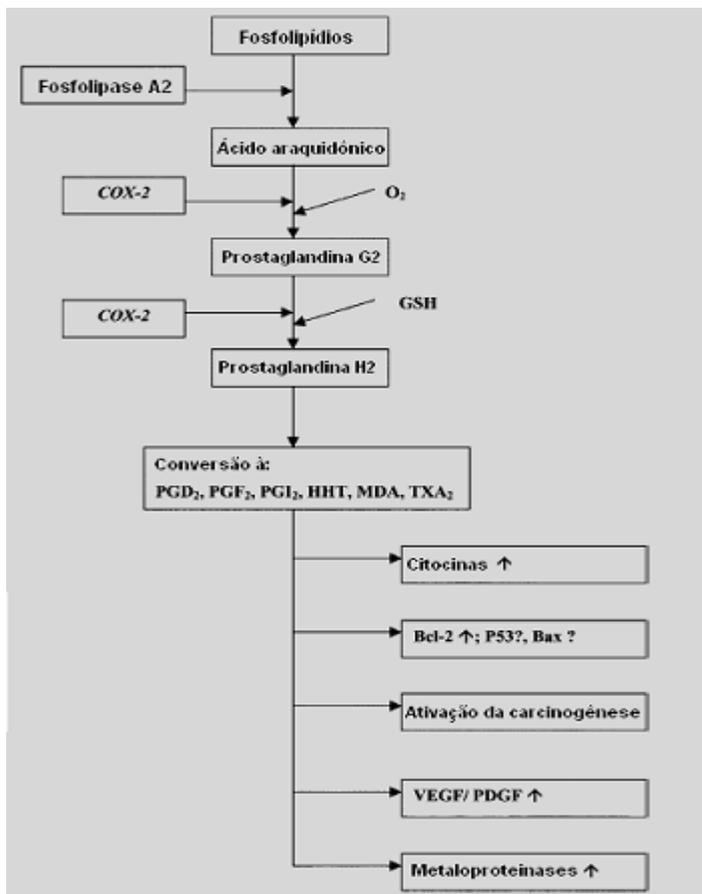
### 1.3 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Em 1863, Virchow propôs que o câncer se desenvolve em locais de inflamação crônica, e desde então as relações potenciais entre câncer e inflamação foram estudadas. Isto pode ser exemplificado pela observação do maior risco de desenvolvimento do câncer nos pacientes afetados por diversas doenças crônicas inflamatórias do aparelho gastrointestinal, como por exemplo, gastrite pelo *Helicobacter pylori* e hepatite viral (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004).

Por outro lado, estudos epidemiológicos demonstram que antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) diminuem o risco de câncer pela inibição da COX-2. A elevada expressão da COX-2 em células tumorais tem efeitos como alteração das células de adesão da matriz extracelular, desregulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e resistência da indução à apoptose (SUBHASHINI, 2005). Recentes estudos demonstram uma possível correlação entre a superexpressão da COX-2 e a perda da regulação da apoptose em resposta à superexpressão desta enzima (SUBHASHINI, 2005).

A correlação entre a inflamação e carcinogênese ocorre da seguinte maneira: fosfolipídios de membrana são convertidos em ácido araquidônico pela enzima fosfolipase. A COX-2 converte este em prostaglandinas e tromboxanos. Estes mediadores da inflamação formados podem ativar a carcinogênese uma vez que aumentam a expressão de Bcl-2 (uma das proteínas antiapoptóticas), VEGF (mediador que exerce papel chave na angiogênese) e metaloproteinases

(também associadas ao processo de vascularização do tecido tumoral) (DEMPKE et al., 2001; WARIS, SIDDIQUI, 2005). Além disso, a elevação da produção de Prostaglandina E2 (PGE2) reduz a morte celular e pode regular positivamente a proliferação de células tumoral (LIM et al., 2001; DEMPKÉ et al., 2001) (Figura 3).



**Figura 3** - Esquema geral do possível mecanismo carcinogênico envolvendo o processo inflamatório através do metabolismo do ácido araquidônico.

**Fonte:** Adaptado de Dempke et al, (2001).

Sendo assim a alta expressão da COX-2, a qual é ativada pelo fator de transcrição NFκB, sinaliza para a sobrevivência celular (resistência à apoptose), produção de mediadores inflamatórios e

proliferação celular (expressão de ciclinas) (WARIS, SIDDIQUI, 2005).

Em termos de avanços moleculares da oncologia, tem sido centrado interesse nessa modulação da atividade e expressão da COX-2. O potencial dos inibidores de COX-2 em induzir a apoptose, inibir a angiogênese e o crescimento tumoral têm sido descrito por muitos trabalhos, sendo, portanto importante alvo molecular para novas terapias antitumorais. (KOKOGLU et al., 1998; SHONO et al., 2001; LIM et al., 2002).

#### **1.4 TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich (TAE)**

O TAE é um carcinoma que foi desenvolvido para a forma ascítica por Loewenthal e Jahn em 1932. Este carcinoma surgiu a partir de uma das várias linhagens do carcinoma de Ehrlich que se origina de tumores epiteliais espontâneos, provavelmente originários das glândulas mamárias (GUPTA et al., 2004). Ele cresce de maneira rápida e apresenta um comportamento agressivo. Tem sido amplamente citado na literatura, na investigação de propriedades antitumorais de vários novos agentes bioativos (AJITH; JANARDHANAN, 2003; KANENO et al., 2004; MELLO et al., 2004). O crescimento progressivo do tumor de Ehrlich é caracterizado por profundas alterações na resposta imune e pelos altos níveis de consumo de glutamina (LOBO et al., 2000) o qual tem sido associado com alterações metabólicas e fenotípicas, levando a uma diminuição da imunocompetência, tornando vulnerável o sistema de defesa do hospedeiro (SEGURA et al., 1997; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003).

#### **1.5 PLANTAS COMO FONTES DE MEDICAMENTOS**

Por milhares de anos as plantas foram utilizadas como medicamentos. Inicialmente sob forma bruta, esta espécie de medicamentos como tinturas, chás, cataplasmas, pós e outras formulações a base de ervas eram aplicadas para cada doença em particular através do histórico oral. A descoberta de medicamentos provenientes de plantas levou ao isolamento de fármacos como cocaína, codeína, digitoxina, além da morfina, sendo que alguns continuam em uso até os dias de hoje (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% dos fármacos em uso clínico no mundo, além disso, nos últimos quarenta

anos, pelo menos uma dúzia de fármacos potentes foi derivada de plantas (exemplos disto são a vincristina e vimblastina, derivados dos alcalóides da vinca), sendo que aproximadamente 1/3 de todos os fármacos aprovados pela Food Drugs Administration (FDA) utilizados na medicina convencional tem sua origem de plantas (BREMER, 2005). O maior problema para a utilização terapêutica dos fitomedicamentos, no tratamento convencional das diversas doenças é a falta de dados científicos que comprovem sua eficácia e a segurança. Apesar de preferência das grandes indústrias farmacêuticas pelo desenvolvimento de medicamentos sintéticos, nas últimas décadas observa-se um grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (CALIXTO et al., 2003).

As florestas tropicais constituem um vasto reservatório de espécies de plantas com potencial terapêutico, pois fornecem compostos químicos com valor inestimável, os quais servem como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos (GURIB-FAKIM, 2006). O Brasil é reconhecido pela exuberância e variedade de plantas tropicais, sendo algumas amplamente utilizadas na medicina popular (SUFFREDINI et al., 2004). Embora já existam estudos fitoquímicos e farmacológicos a respeito de muitas plantas medicinais utilizadas pela população brasileira, a maioria delas carece de estudos científicos detalhados, que suportem suas aplicações terapêuticas (YUNES, 2002). Nas últimas décadas, devido a seus resultados promissores, os estudos químico-farmacológicos sobre a atividade biológica de extratos de produtos naturais têm ganhado destaque no cenário científico, a despeito dos altos custos com pesquisa e elaboração de medicamentos sintéticos (SIMÕES et al., 2001).

A busca por agentes antitumorais a partir de fontes vegetais começou em 1950 com a descoberta dos alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina). Com isso, o United State National Cancer Institute (NCI) deu início a um amplo programa de coleta de plantas em 1960. Isso levou a descoberta de muitos quimioterápicos com atividade citotóxica, incluindo taxanos e camptocinas (CRAGG; NEWMAN, 2005).

## 1.6 *CORDIA VERBENACEA*

Segundo os registros existentes, a *Cordia verbenacea* foi catalogada cientificamente em 1845, mas existe certa contradição sobre as datas, pois em 1819, foi realizada a identificação de uma planta chamada *Cordia curassavica*, porém recentemente algumas

classificações consideraram as duas plantas como uma única espécie (RAMOS et al., 2005).

Conhecida popularmente como erva baleeira ou salicina, *Cordia verbenacea*, também referida como *Cordia salicina* D.C, *Cordia curassavica*, *Cordia cylindristachia*, *Lithocardium fresenii*, *Lithocardium salicinum* e *Lithocardium verbaceum*, costuma ser utilizada popularmente no tratamento de tumores e úlceras, sendo ainda utilizada como antirreumática e hemostática (ARREBOLA et al., 2004; FERNANDES, 2007). O extrato hidroalcoólico de *C. verbenacea* tem sido usado pelo povo brasileiro como cicatrizante e antiinflamatório (SERTIE et al., 1988).

As espécies do gênero *Cordia* (Boraginaceae) são encontradas em áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália e América do Sul, sendo que no Brasil é encontrada na faixa litorânea (preferencialmente 500 a 1000 metros da costa marítima) da região da Amazônia até o Rio Grande do Sul. Esta planta apresenta um caráter arbóreo arbustivo (Figura 4) comum nas formações sobre dunas e nos campos arenosos medindo no máximo 3 metros (BAYEUX, 2002).

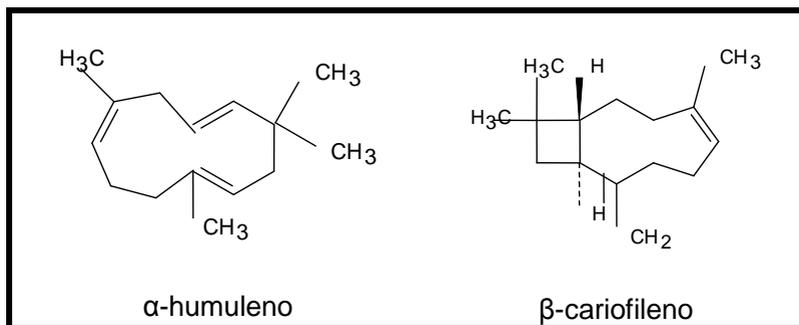


**Figura 4** - Imagem de *C. verbenacea* (“erva baleeira”): (A) Inflorescência, (B)Frutos, (C) Arbusto.

**Fonte:** Aché: [www.ache.com.br/PressRoom/Images.aspx](http://www.ache.com.br/PressRoom/Images.aspx).

Estudos fitoquímicos de plantas pertencentes a este gênero mostraram como importantes constituintes flavonóides, saponinas, triterpenos glicosilados, alcalóides, xantinas, fenóis, agliconas esteroidais, dentre outros (ROLDÃO, 2008). Esta planta, já foi investigada e um componente ativo, mostrou efeito antiinflamatório, o qual foi isolado e identificado como um flavonóide, sendo nomeado artemetina (SÉRTIE et al., 1990).

Estudos realizados por Ticli e colaboradores em 2005 relatam a presença do ácido rosmarínico, que está associado ao efeito preventivo do edema causado pelo veneno de ofídios por inibição da fosfolipase A<sub>2</sub>, assim como efeitos antioxidantes e antidepressivos (TAKEDA et al., 2002). Também já foram avaliados os efeitos do ácido rosmarínico sobre ação HIV e agregação plaquetária (KIM et al., 1999; ZOU; XU; TIAN, 1993). A presença de triterpenóides no extrato da planta também tem sido associado a atividade anti-úlceras estomacal. Mas foram dois sesquiterpenos,  $\alpha$ -humuleno e o  $\beta$ -cariofileno, isolados do óleo essencial dessa planta que apresentaram importante efeito antiinflamatório, os quais inibiram significativamente a expressão da COX-2 e óxido nítrico (FERNANDES et al., 2007). O  $\alpha$ -humuleno e o  $\beta$ -cariofileno possuem fórmula estrutural C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>, e sua estrutura molecular é apresentada na Figura 5.



**Figura 5** - Estrutura química do  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno identificados e já isolados nos de *C. verbenacea*.

O reconhecimento do valor das plantas medicinais, como recursos clínico, farmacêutico e econômico, tem incentivado diversos países a promover pesquisas tanto na validação do uso popular destas, quanto na produção de Fitoterápicos. Santa Catarina, um estado dono de uma grande biodiversidade associada à sociodiversidade étnica e cultural, detém valioso conhecimento tradicional associado ao uso de

plantas medicinais, portanto tem o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas que resultem em tecnologias e terapêuticas apropriadas.

O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. Por outro lado, identificar e validar um alvo molecular (biomolécula alvo) é o primeiro passo na saga que é descobrir um novo fármaco.

Em 2005 o laboratório Aché em parceria com pesquisadores da UFSC lançou no mercado o primeiro medicamento desenvolvido totalmente no Brasil, o Acheflan®. Este fitofármaco, a base de extratos de *C. verbenacea*, mostrou ser um potente antiinflamatório cujo principal mecanismo de ação é a inibição da ciclooxigenase (COX-1 e 2), enzima chave nas vias de sinalização do processo inflamatório. Por outro lado, vários estudos demonstram que antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) diminuem o risco de câncer pela inibição da COX-2. Além disto, observou-se uma elevada expressão da COX-2 em células tumorais.

Dentro deste contexto a proposta do presente estudo foi através de ferramentas bioquímicas e de biologia molecular estudar o potencial de diferentes extratos de *C. verbenacea* como agentes antitumorais.

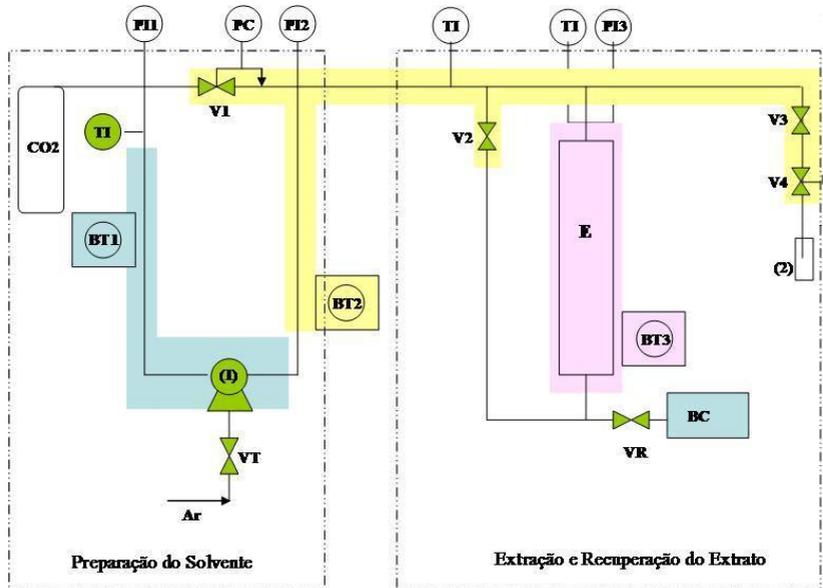
## 1.7 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

As técnicas para a extração de componentes ativos de substratos naturais evoluíram consideravelmente nos últimos anos. Os primeiros processos de extração foram de digestão de flores e condimentos em óleos e gorduras e de ervas e partes de plantas em água e vinho (KERROLA, 1995).

Atualmente, existem varias técnicas de extração de compostos de plantas, dentre elas as mais empregadas são representadas pelos processos convencionais os quais envolvem o arraste a vapor e extração com solventes orgânicos. Estas operações possivelmente são responsáveis pela degradação térmica de componentes termolábeis presentes na matéria-prima e pela contaminação do extrato com resíduos de solventes, normalmente empregado em grandes quantidades. A extração supercrítica (ESC) se destaca por representar uma tecnologia que minimiza danos ao meio ambiente e que vem se desenvolvendo

continuamente nas últimas décadas (MACHMUDAH et al., 2006; CASAS et al., 2007).

A extração supercrítica emprega gases densos como solventes de extração, em operações de alta pressão. Um fluido submetido à alta pressão e temperatura acima de seu ponto crítico torna-se supercrítico. Sendo assim, várias propriedades desses fluidos são alteradas sob essas condições. A densidade do fluido supercrítico é similar a dos líquidos, sua viscosidade assemelha-se a dos gases e sua capacidade de difusão é intermediária entre os dois estados. Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si. Devido a sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem se difundir facilmente através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações. O solvente supercrítico mais utilizado em processos de ESC é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o qual apresenta natureza apolar e conseqüentemente dissolve preferencialmente compostos apolares (PEREIRA, 2010). A Figura 6 representa um diagrama esquemático do processo de ESC.



Nota: onde E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas da entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro de  $\text{CO}_2$  com 99,9 % de pureza; PI2: Manômetro de controle da bomba; PI3: Manômetro de controle do extrator; TI: Controladores de temperatura.

**Figura 6** - Diagrama esquemático do equipamento de ESC.

Fonte: Maul, Wasicki e Bacchi, (1996).

Em datas mais recentes, atividades de desenvolvimento comercial e de pesquisas na área farmacêutica, envolvendo a extração de fluidos supercríticos têm continuado a crescer. Como exemplos comerciais, incluem-se a descafeinização do café, extração da nicotina do tabaco e a obtenção comercial dos carotenóides da cenoura. A extração de matérias-primas de plantas medicinais utilizando este método de extração tem sido muito empregada, uma excelente descrição da possibilidade de concentrar e isolar compostos utilizando-se dessa tecnologia foi descrita por Blogue, onde em óleos essenciais de plantas os extratos obtidos por gás carbônico supercríticos foram mais representativos do que em óleos essenciais originais, sendo que alguns constituintes como  $\beta$ -cariofileno, bisabolol e 1-alfa-pireno já foram isolados e/ou concentrados (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996; MICHIELIN, 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial antitumoral do extrato bruto e supercrítico (rico em  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno) de *C. verbenacea*, através de ensaios bioquímicos e biológicos *in vitro* e *in vivo*. Investigar também possíveis mecanismos de ação estudando os efeitos destes compostos sobre a apoptose.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da capacidade citotóxica do extrato bruto e supercrítico de *C. verbenacea* sobre as linhagens celulares MCF-7 e de tumor ascítico de Ehrlich;
- Avaliação da capacidade antiproliferativa do extrato bruto e supercrítico de *C. verbenacea* sobre células de tumor ascítico de Ehrlich
- Avaliação da atividade pró-apoptótica *in vitro* do extrato bruto e supercrítico de *C. verbenacea* sobre células de tumor ascítico de Ehrlich.
- Avaliação da atividade nucleásica do extrato bruto e supercrítico.
- Avaliação da expressão da COX-2 avaliando assim seu provável mecanismo pró-apoptótico.
- Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do extrato bruto e frações de *C. verbenacea* em camundongos Balb/C inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich;

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 REAGENTES E LINHAGENS TUMORAIS**

O meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, o meio DEMEM, a penicilina, a estreptomicina e o soro bovino fetal foram adquiridos da Cultilab. A linhagem celular tumor ascítico de Ehrlich foi adquirida junto a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). A linhagem celular MCF-7 foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. O TCA, DTNB, a timidina tricida foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

### **3.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS FOLHAS DE *CORDIA VERBENACEA***

As folhas de *C. verbenacea* destinadas ao estudo, foram coletadas na Praia de Ibiraquera, no município de Imbituba – SC, sendo sua autenticidade avaliada pela Dr<sup>a</sup> Ana Zanin do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina e a excicata foi depositada no Herbário FLOR sob o número 34672 (UFSC, Florianópolis, Brasil).

O extrato bruto e supercrítico, produzidos a partir desta planta, foram preparados e gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Salvador Ferreira do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos desta universidade.

### **3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS**

A matéria prima composta das folhas foi lavada e seca em estufa a 45°C por 14 horas. O material seco, com umidade de 10,5±0,4 w/w, foi triturado em liquidificador doméstico (Black & Decker, SP, Brasil) e as partículas foram classificadas com peneiras. O material foi armazenado a -10°C antes da extração. (MICHIELIN et al., 2009).

#### **3.3.1 Extração convencional**

A extração com solvente orgânico foi empregada para obtenção

do extrato bruto de erva baleeira. O método consistiu em uma maceração a frio de partículas evitando assim a degradação térmica. A extração foi realizada com 100 g de material seco colocado em etanol, durante cinco dias. O extrato resultante foi evaporado em pressão reduzida, para obter um extrato bruto definido como extrato etanólico (etanol-99% de pureza) (MICHIELIN et al., 2009).

### **3.3.2 Extração supercrítica**

A técnica de extração supercrítica utilizada foi descrita por Michielin et al, 2009. Foi utilizado um equipamento que contém um reservatório pressurizado, um banho termostático (Microquímica - MQBTZ99-20, SC, Brasil), enquanto o fluxo de solvente foi ajustado e controlado por válvulas de alta pressão, reguladores e manômetros. A condição de extração para o ensaio com CO<sub>2</sub> foi de 300 bar e 50°C, na taxa de fluxo constante de 0,30±0,03 g/k/h. Foi utilizado no processo 99,9% de CO<sub>2</sub> entregue em uma pressão de 60 bar. O procedimento experimental consistiu na utilização de 20 g de partículas do solo para formar o eixo fixo para a extração de alta pressão. As amostras foram coletadas em tempo de 4 horas de extração e pesados em uma balança analítica (MICHIELIN et al., 2009).

## **3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS**

Os componentes presentes nos extratos de *C. verbenacea*, foram identificados e quantificados por Cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massa no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A identificação das substâncias majoritárias foi realizada por comparação do espectro de massa da substância com os dados do sistema GC-MS (Standart Reference Data Series do National Institute of Standard and Technology – NIST 2000 MS Library) (MICHIELIN et al., 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de área dos picos.

## **3.5 CULTURA DAS CÉLULAS DE CARCINOMA DE EHRLICH**

Depois de isoladas de camundongos Balb/C isogênicos, as células do carcinoma de Ehrlich foram cultivadas em meio RPMI suplementado

com soro fetal bovino (10%), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100mg/mL) e NaHCO<sub>3</sub>. As células foram mantidas em densidade de  $1-2 \times 10^6$  células/mL e em condições ideais de temperatura, atmosfera e umidade (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100%, respectivamente) (KVIECINSKI et al., 2008)

### 3.6 CULTURA DAS CÉLULAS MCF-7

As células MCF-7 provenientes do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro foram cultivadas em meio DEMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100mg/mL) e NaHCO<sub>3</sub>. As células foram mantidas em densidade de  $1-2 \times 10^6$  células/mL e em condições ideais de temperatura, atmosfera e umidade (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100%, respectivamente) (DEJEANS, et al., 2010).

### 3.7 CAMUNDONGOS BALB/C ISOGÊNICOS

A atividade antitumoral *in vivo* foi realizada utilizando camundongos Balb/c isogênicos (*Mus musculus*), machos (com peso de  $20 \pm 2$  g), com aproximadamente 60 dias de vida, obtidos através de reprodução controlada pelo Biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental- LABIOEX. Os animais foram pesados e divididos em grupos de 12 animais e mantidos em gaiolas plásticas sob condições ideais controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , aproximadamente 60% umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

Antes de se iniciar a execução do protocolo experimental, o projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob protocolo PP00501.

### 3.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

A citotoxicidade dos extratos bruto e supercrítico da *C. verbenacea* foi avaliada utilizando o ensaio do MTT proposto por Carmichael em 1985, onde o MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil), um sal de coloração amarela, é reduzido a

formazan (coloração púrpura) pelo metabolismo mitocondrial. Desta forma, o MTT atua como um indicador da função mitocondrial e, conseqüentemente, da viabilidade celular (FRESHNEY, 1999). As células do carcinoma de Ehrlich, descritas acima, foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas em estufa em ambiente controlado (temperatura de 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>). 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro meio contendo os extratos bruto e supercrítico nas concentrações de 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500 e 1000µg/mL (para células TAE) e 62,5; 125,0; 250,0; 500 e 1000µg/mL (para células MCF-7) (KVICINSKI et al., 2008) e incubado novamente por 48 horas. Após esse período de exposição as diferentes concentrações dos extratos, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado ao meio de cultura o MTT (1mg/mL), seguido de 4 horas de incubação. O MTT excedente foi retirado e em seguida adicionou-se DMSO (PA) para completa solubilização dos cristais de formazan produzidos durante a incubação. Como controle negativo (CN) foram mantidas as células em 8 replicatas nas mesmas condições descritas acima, porém tratadas apenas com o veículo de dissolução desses extratos (DMSO 1%). O DMSO (PA) foi utilizado como branco para descartar qualquer interferência de cor.

As placas foram analisadas espectrofotometricamente utilizando um leitor de placas (540nm), determinando a viabilidade celular. (MOSMANN, 1983).

Os experimentos foram realizados em triplicatas (3 experimentos individuais) em 3 dias diferentes, sendo que para cada concentração testada foram realizadas 8 replicatas. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Uma vez calculada a viabilidade celular das diferentes concentrações dos extratos, obteve-se uma curva concentração x viabilidade a partir da qual foram calculados os valores da CI<sub>50</sub> (concentração inibitória 50%) por regressão linear e expressos em média ± desvio padrão. Consideraram-se os valores dos controles negativo como 100% de viabilidade celular sem a presença dos extratos testados.

### 3.9 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DA [<sup>3</sup>H]TIMIDINA

Avaliação do efeito antiproliferativo foi realizado através do ensaio da incorporação da [<sup>3</sup>H] Timidina. A timidina é um nucleosídeo do ácido desoxirribonucléico (DNA) formado pela base nitrogenada, timina, ligada a uma pentose (desoxirribose) através da ligação β-N-glicosídica (TENGG et al., 2006). Como a replicação do DNA depende da síntese e disponibilidade de timidina, a utilização de timidina radioativa ([<sup>3</sup>H]-Timidina), permite monitorar o DNA genômico. Desta forma, a mensuração de [<sup>3</sup>H]-timidina incorporada ao DNA, tem sido amplamente usada como marcador de proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2001).

Células do carcinoma de Ehrlich em uma densidade de  $5 \times 10^6$  células/mL foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas em estufa em ambiente controlado. Decorridas 24 horas de incubação, o meio foi retirado e um novo meio contendo os extratos bruto ou supercrítico e [<sup>3</sup>H] Timidina em uma concentração de 1 μCi/mL foi adicionado e incubadas por 48 horas. Após este período, transferiram-se as células para microtubos e as mesmas foram lavadas com 250 mL de ácido tricloroacético (TCA 10%). Posteriormente ocorreu a fixação com solução de éter:etanol (1:3) e as células foram mantidas a temperatura ambiente por 2 horas. Transcorrido esse período, foi adicionado 250 μL de hidróxido de sódio (0,2 N). A radioatividade de timidina incorporada foi verificada utilizando um cintilador e os valores expressos em percentual de incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina. (MOTA SIQUEIRA, 2009). Todos os resultados obtidos foram normalizados por mg de proteína pelo método de Bradford o qual baseia-se na adição de etanol, ácido fosfórico e Azul Brilhante de Coomassie G250 à solução contendo proteínas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998).

### 3.10 ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA: COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRINIDINA

O método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, tendo como base a revelação de alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas através

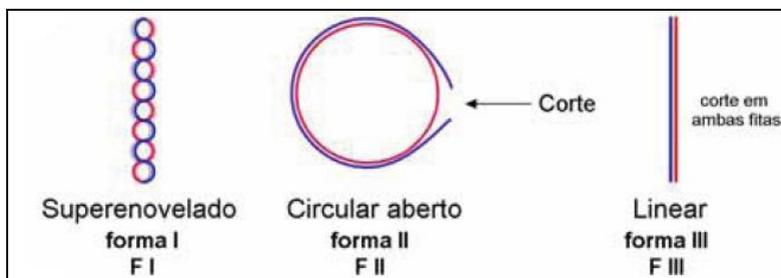
da fluorescência (McGAHON *et al.*, 1995).

Células do carcinoma de Ehrlich a uma densidade de  $5 \times 10^6$  células/mL foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa em ambiente controlado. O meio foi removido e substituído por outro meio contendo os extratos bruto e supercrítico (em uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ) (KVIECINSKI *et al.*, 2008). Posteriormente, as células foram transferidas para um tubo do tipo eppendorf e centrifugadas por 10 min a rotação de 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25  $\mu\text{L}$  de PBS. Uma solução de 1  $\mu\text{L}$  da solução corante (1:1) de BE (100  $\mu\text{g/mL}$ )/LA (100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada para ressuspender as células em cada tubo e uma alíquota dessas células foi utilizada para efetuar a leitura em lâmina/lamínula em microscópio de fluorescência. Uma solução de DMSO 1% (veículo de diluição dos extratos) foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o antineoplásico de referência doxorubicina 0,2  $\mu\text{g/mL}$  (GENG, ZENG, WANG, 2003)

Para cada amostra foram contadas 300 células, as quais foram fotografadas para registro visual. Os resultados foram expressos em percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas, sendo que foram realizados 3 experimentos independentes em dias diferentes e em triplicatas.

### 3.11 ATIVIDADE NUCLEÁSICA

Além de sua forma normal superenovelada (FI) o DNA plasmidial pode assumir a forma circular aberta (FII) e a forma linear (FIII). Quebras na dupla hélice fazem com que a forma superenovelada transforme-se em forma circular aberta através de quebras simples e forma linear através de quebra da dupla fita (Figura 7). As três formas do DNA plasmidial possuem velocidades de migração eletroforética diferentes, apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese (SREDDHARA & COWAN, 2001).



**Figura 7** - Esquema simplificado das formas apresentadas pelo DNA plasmidial.

Fonte: Adaptado de Berg, Tymoczko e Stryer, (2004).

Com o intuito de verificar se os extratos analisados apresentavam a capacidade de atingir diretamente o DNA plasmidial seguiu-se o seguinte protocolo: após extraídos de bactérias *E. coli*, precipitados e feita a análise da pureza desses plasmídios foram feitas incubações contendo 600 ng de DNA plasmidial em microtubos e 5 µl de tampão HEPES (pH 7,4), durante 16 horas, à 50°C, contendo 10 µL dos extratos nas concentrações de 37,5; 75,0 e 150,0 µg/mL (concentrações estas correspondentes às concentrações aplicadas no estudo *in vivo* deste trabalho). Decorrido o período de incubação, foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose. Em seguida, a revelação do gel foi realizada utilizando brometo de etídio o qual permitiu a visualização das bandas e conseqüentemente o perfil de quebra do DNA plasmidial (intacta ou superenovelada, como quebra simples ou circular aberta e como quebra dupla ou linear, FI, FII, FIII, respectivamente) induzida pelos extratos. Utilizando o programa Labworks Software v 4.0 (UPV inc.), foi feita a quantificação das bandas e assim, o conteúdo das três formas adotadas pelo DNA plasmidial após a corrida eletroforética (SCARPELLINI *et al*, 2003). A intensidade de DNA superenovelado foi corrigida por um fator de 1,47 como um resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio (SREEDHARA; COWAN, 2001). Como controle negativo, foi utilizado acetnitrila 1%, uma vez que o DMSO (veículo de dissolução dos extratos utilizado nas demais avaliações deste estudo) não era indicado para os testes referente à atividade nucleásica pois o mesmo faz “scavenger” de espécies reativas de oxigênio, causando interferência na avaliação da atividade protetora dos extratos.

Para avaliar a atividade protetora do DNA plasmidial contra ataque oxidativo, procedeu-se da mesma maneira descrita para avaliação do potencial indutor de dano, com a diferença de que na incubação

(durante 2 horas). Foram adicionados aos microtubulos o DNA, tampão, extrato e 10  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo Fe (EDTA) (20  $\mu\text{M}$ ), a qual através da indução do peróxido de hidrogênio, uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), promove cortes no DNA de maneira oxidativa. Neste experimento, foi utilizado como controle positivo DNA, tampão e solução Fe (EDTA) (20  $\mu\text{M}$ ) (SCARPELLINI et al, 2003). Os valores obtidos foram expressos em percentual da forma de quebra adotada pelo DNA plasmidial.

Todos os experimentos referentes à atividade nucleásica foram realizados no Laboratório do Prof. Dr. Claus Tröger Pich, na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

### **3.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2 EM CÉLULAS MCF-7**

Células MCF-7 foram cultivadas seguindo o protocolo descrito anteriormente. Em seguida as mesmas foram adicionadas a placas de 6 poços e encubadas em estufa em ambiente controlado (temperatura 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>). Após 24 horas de incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro meio contendo os extratos bruto e supercrítico, ambos nas concentrações de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extrato. Como controle negativo (CN) foram mantidas as células nas mesmas condições descritas acima, porém tratadas apenas como veículo de dissolução dos extratos (DMSO 1%).

O lisado das células foi feito adicionando 400  $\mu\text{L}$  de tampão RIPPÁ fórmula de Pierce e coquetel de inibidores de proteases em cada poço. Em seguida fez-se “scratching” e o lisado foi centrifugado em tubos do tipo eppendorf. Com o sobrenadante foi feito a dosagem de proteínas pelo método de Bradford e acrescentado tampão Lemli e fervido a 100° C por 5 minutos.

Após dosagem de proteínas, foi aplicado 35  $\mu\text{g}$  de proteínas cautelosamente nos “poços” formados no gel de acrilamida e bisacrilamida 3,75% (1,25mL de tampão Tris-HCL com pH 6,8, 50 $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 25  $\mu\text{L}$  de APS 30% e 5  $\mu\text{L}$  de Temed, totalizando 5mL de solução. ) da seguinte maneira: em triplicata foram aplicadas as células tratadas com veículo dos extratos (CN), células tratadas com extrato bruto e células tratadas com extrato supercrítico. No outro “poço” foram aplicados 5  $\mu\text{L}$  de padrão de peso molecular, o que permitiu a determinação do tamanho das proteínas separadas na eletroforese e também possibilitou o monitoramento do progresso da corrida eletroforética (SDS-PAGE). O gel de separação escolhido foi de 10% de

acrilamida e bisacrilamida (2,62 mL de água destilada, 3,0mL de acrilamida e bisacrilamida, 1,81mL de tampão Tris-HCL com pH 8,8, 75µL de SDS 10%, 25,5µL de APS 30% e 4,25 µL de Temed, totalizando 7,5mL de solução). A corrida eletroforética foi realizada em 130 V por 1 hora e 15 minutos em meio tampão Glicina, pH 8,3 e acompanhada pela visualização do padrão de peso molecular. A membrana de PVDF foi tratada em metanol (PA) por 15 segundos e posteriormente foi feita a montagem do “sanduíche” da seguinte forma: três pedaços de papel blotting um sobre o outro; sobre este sistema foi adicionada a membrana de nitrocelulose; em seguida o gel foi colocado (após a corrida eletroforética) sobre a membrana; e sobre o gel novamente três pedaços de papel blotting. Cada etapa do preparo do “sanduíche” foi realizada com cautela retirando-se eventuais bolhas e mantendo-se o sistema úmido com aplicação de algumas gotas de tampão. A eletrotransferência foi realizada em tampão de transferência (100mL de tampão Tris 50 mM, 200 mL de metanol e 700 mL de água) por 2 horas em 60V.

Depois de transferidas as proteínas para a membrana de PVDF foi feito o bloqueio da membrana incubando a mesma em leite desnatado 5% durante 1 hora. Em seguida incubou-se a membrana em anticorpo anti-COX2 a uma diluição 3:1000 (anticorpo primário) *overnight*. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com T-TBS e a membrana foi incubada com anticorpo secundário (conjugado HRP) em uma diluição 1:1000 por 1 hora. Após três novas lavagens com T-TBS foi adicionado o peróxido de hidrogênio e luminol à membrana. A revelação foi realizada em lâmina de raio X utilizando revelador de raio X. A quantificação da densidade óptica das bandas foi realizada utilizando o programa ImageJ 1.44.

### 3.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

Foram utilizados camundongos Balb/C isogênicos divididos em cinco diferentes grupos experimentais (composto de 12 animais cada grupo):

Grupo I (controle normal): animais tratados com DMSO 10% (veículo), porém sem inoculação de TAE.

Grupo II (Controle negativo): animais tratados também com DMSO 10% após inoculação de TAE.

Grupo III (Controle Positivo): animais tratados com doxorrubicina após inoculação do TAE.

Grupo IV (Tratado com extrato bruto): animais tratados com 3 diferentes doses de extrato bruto.

Grupo V (Tratado com extrato supercrítico): animais tratados com 3 diferentes doses de extrato supercrítico.

Uma suspensão de células do tumor ascítico de Erich - TAE ( $5 \times 10^6$ ) foi inoculada por via intraperitoneal (i.p.) nos animais em condições assépticas. O dia da inoculação do tumor foi considerado tempo zero (0). Após 24 horas, iniciou-se o tratamento dos animais, administrando-se doses dos extratos (37,5 mg/kg, 75,0 mg/kg e 150 mg/kg), doxorrubicina (1,2 mg/kg), durante nove dias consecutivos. Os animais do grupo I e II receberam 50  $\mu$ L de uma solução de DMSO a 10% (veículo) diariamente durante o mesmo período de tratamento.

No décimo dia, seis animais de cada grupo (aleatoriamente) foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado o líquido ascítico para a realização das análises. Os animais restantes de cada grupo foram mantidos pelo período de 30 dias para a avaliação da sobrevida em comparação ao grupo controle do tumor (grupo controle negativo).

### **3.13.1 Avaliações Cronomorfológicas**

#### *Avaliação da variação do peso*

Para avaliar a variação de peso dos camundongos, foi calculada a diferença, em gramas, entre o peso final (após os 9 dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (no dia da inoculação do tumor). Os resultados obtidos foram expressos em gramas (REBELLO, 2004).

#### *Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de tripan*

A viabilidade das células do TAE foi avaliada pela incorporação do azul de tripan, um corante que penetra nas células mortas cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno permitiu estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999). Para isso, o líquido ascítico foi retirado dos animais e uma alíquota de 10  $\mu$ L foi incorporada a uma solução contendo 890  $\mu$ L de salina e 100  $\mu$ L do corante azul de tripan (4%). A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer e os resultados expressos em proporção de células inviáveis/viáveis (STROBER, 1996).

### *Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas*

O volume ascítico total retirado de cada animal foi mensurado utilizando tubos falcon graduados e os volumes de células compactadas foram determinados após a centrifugação a 3000g por 5 minutos (REBELLO, 2004).

### *Tempo médio de Sobrevida (TMS) e percentual médio de longevidade (PAL)*

No decurso e posteriormente ao tratamento de 30 dias foi avaliada diariamente a sobrevida dos animais a partir do registro do número de morte em cada grupo e a sobrevida foi estimada em termos de tempo médio de sobrevida (TMS) (MAZUMDER et al., 1997): e percentual de aumento de longevidade (PAL) (QURESHI, 2001) pelas equações:

$$\text{TMS} = (\text{Dia da 1}^{\circ} \text{ morte} + \text{Dia da última morte}) / 2$$
$$\text{PAL} (\%) = [(\text{TMS do grupo tratado} / \text{TMS do grupo controle}) - 1] \times 100$$

### *Avaliação da inibição do crescimento tumoral*

Para se determinar a inibição do crescimento tumoral foi avaliada a variação da circunferência abdominal dos camundongos, a qual foi calculada a diferença, em centímetro, entre a medida final (após os 9 dias de tratamento) e a medida inicial (no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal dos animais. Os resultados obtidos foram expressos em centímetros (REBELLO, 2004). Após medida a variação da circunferência foi determinada a porcentagem de inibição do crescimento tumoral utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição do crescimento tumoral} (\%) = C_t \times 100 / C_{CN}$$

Onde:

$C_t$ : Variação da circunferência do grupo tratado

$C_{CN}$ : Variação da circunferência do controle negativo

### **3.13.2 Dosagem de GSH**

Amostras de líquido ascítico foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:5 (v/v), homogeneizadas e em seguida, centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos para a obtenção de extratos ácidos, nos quais,

foram imediatamente avaliadas as concentrações de pequenos tióis no sobrenadante (BEUTLER et al., 1963). 0,2 mL de DTNB (2,5 mM) foram adicionados nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 8,0 e 0,1 mL do sobrenadante do extrato ácido, permitindo assim, após cerca de 2 minutos de reação, a determinação do conteúdo do ânion tiolato (TNB) formado de cor amarela, mensurável espectrofotometricamente em 412 nm. As análises foram feitas em triplicatas e os valores expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . Depois de obtidas as concentrações de cada amostra, estas foram corrigidas com a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford.

### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos dados obtidos foi realizada através do teste *t-Student* e análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer, quando necessário. Para tal, utilizou-se o software GraphPad Prism 3.0 admitindo níveis de significância de no mínimo  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

A Tabela 2 apresenta a porcentagem de área dos picos obtidos de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno nos extratos analisados. Os dados obtidos mostram que o extrato supercrítico apresentou maior concentração de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno quando comparado com o extrato bruto, uma vez que o extrato bruto apresentou concentrações muito baixas as quais não foram possíveis detectar, sendo consideradas 0 as porcentagem dos picos nesse extrato.

**Tabela 2** - Porcentagem da área de picos obtidas através do cromatograma para  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno nos extratos analisados

<b>Porcentagem da área dos picos do cromatograma</b>		
<b>Componentes</b>	<b>EB</b>	<b>ESC</b>
$\alpha$ -humuleno	-	1,24
$\beta$ -cariofileno	-	2,68

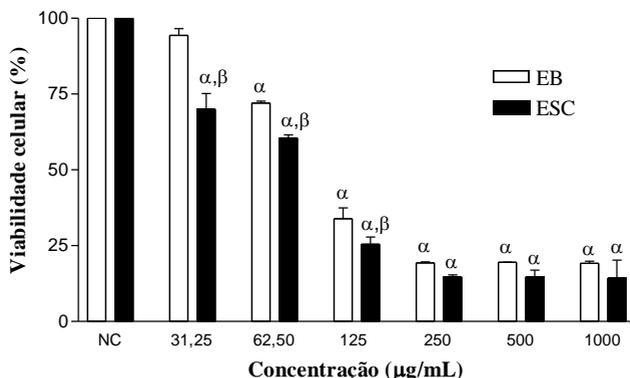
Fonte: Michielin et al., (2009).

Outros constituintes químicos importantes também foram detectados nos extratos, como cariofileno óxido, lupeol e artemetina (MICHIELIN et al., 2009).

### 4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

A avaliação da viabilidade celular em células de carcinoma de Ehrlich tratados com as diferentes concentrações de extrato bruto e supercrítico pelo ensaio do MTT mostrou significativa atividade citotóxica em todas as concentrações analisadas quando comparadas com o controle negativo (Figura 8).

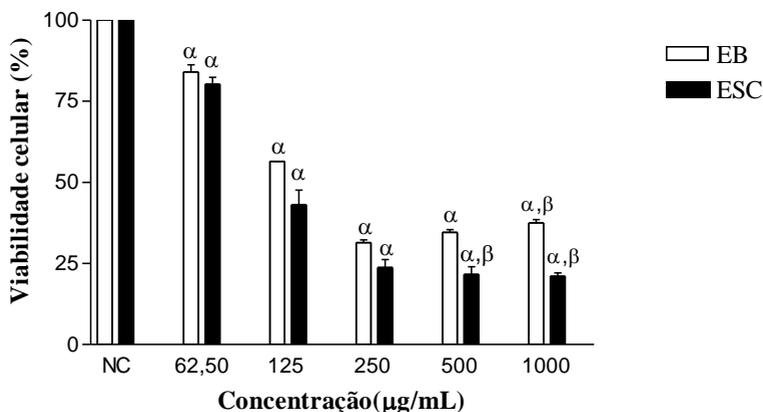
É importante notar que, o extrato supercrítico causou maior redução da viabilidade celular, quando comparado com o extrato bruto (Figura 8). Os valores das  $CI_{50}$  obtidos mostram claramente esse efeito (Tabela 3).



Nota: Os resultados foram expressos em média±desvio padrão. (α) representa diferença estatística significativa com relação ao controle negativo (CN) (β) representa diferença significativa entre os extratos,  $p < 0,001$ ,  $n=3$ .

**Figura 8** - Efeito do tratamento com os extratos de *C. verbenacea* nas diferentes doses testadas (48 horas de incubação) sobre a viabilidade das células do carcinoma de Ehrlich.

A avaliação da viabilidade celular em células MCF-7 tratadas com as diferentes concentrações de extrato bruto e supercrítico pelo ensaio do MTT também mostrou significativa atividade citotóxica em quase todas as concentrações analisadas quando comparadas com o controle negativo (Figura 9).



Nota: Os resultados foram expressos em média±desvio padrão. (α) representa diferença estatística significativa com relação ao controle negativo (CN). (β) representa diferença significativa entre os extratos,  $p < 0,001$ ,  $n=3$ .

**Figura 9** - Efeito do tratamento com os extratos de *C. verbenacea* nas diferentes doses testadas (48 horas de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7.

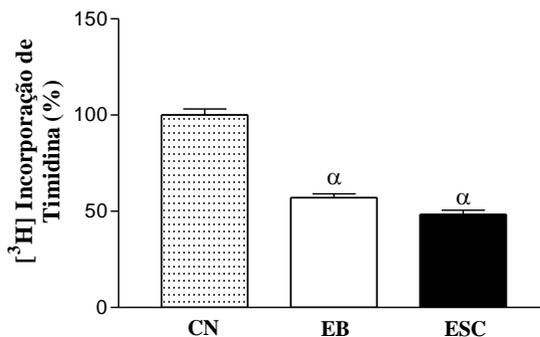
Em doses mais altas o ESC mostrou-se mais eficiente que o EB, porém em doses mais baixas não foi evidenciado diferença estatística entre os extratos analisados. Os valores das  $CI_{50}$  obtidos mostram esse efeito (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores das  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos do efeito citotóxico do extrato bruto e supercrítico (através do ensaio do MTT), sob células do TAE e MCF-7.

	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	EB	ESC
TAE	198,40	133,96
MCF-7	177,33	154,10

#### 4.3 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DA $[^3\text{H}]$ TIMIDINA

Na avaliação da proliferação celular, a incorporação de  $[^3\text{H}]$ Timidina ao DNA é uma técnica muito utilizada para medir os níveis de síntese tanto em células normais quanto em células tumorais. Neste ensaio, nas mesmas concentrações e tempo de incubação acima mencionado, ambos os extratos foram capazes de diminuir a incorporação de  $[^3\text{H}]$ Timidina em 42,91% e 51,63%, em comparação ao controle negativo (Figura 10).



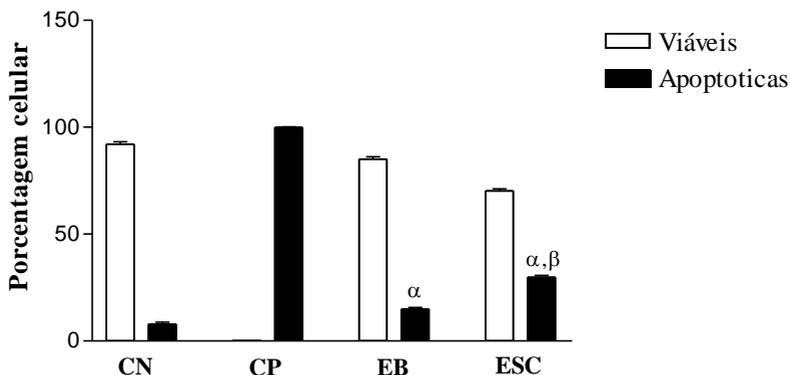
Nota: Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. ( $\alpha$ )  $p < 0,001$  representa diferença significativa em relação ao controle negativo (CN),  $n=3$ .

**Figura 10** - Efeito do tratamento do extrato bruto (EB) e extrato supercrítico (ESC) de *C. verbenacea* (300 µg/ML, 48 h de incubação) sobre a incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina em células de TAE.

Entretanto, os extratos não apresentaram diferença significativa entre si, apesar da fração supercrítica sugerir maior redução em comparação ao EB.

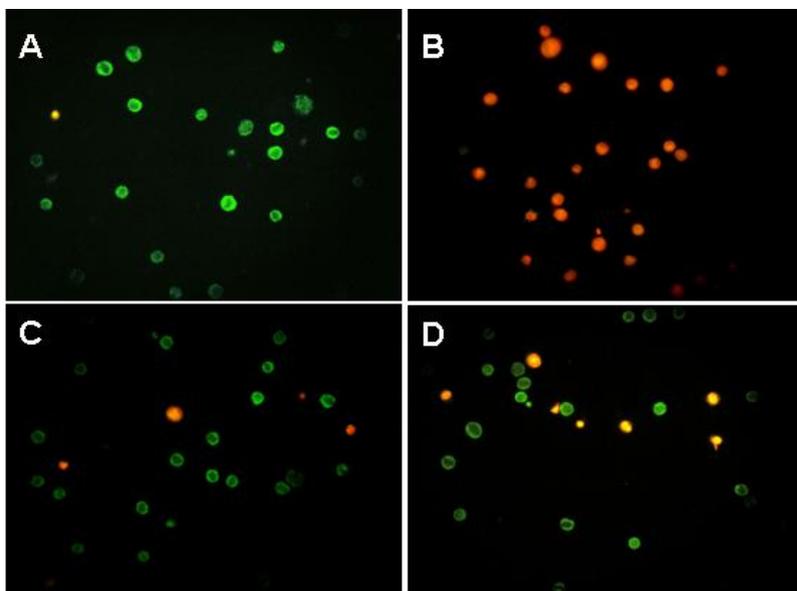
#### 4.4 ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA: COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA

A capacidade dos extratos de induzir a morte celular foi avaliada através do estudo da morfologia das células coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. Ambos os extratos mostraram capacidade de induzir apoptose em células tumorais, em comparação com o controle negativo (7,90% ± 1,64), especialmente o extrato supercrítico, que mostrou um aumento significativo (29,80% ± 1,49%) das células inviáveis (apoptose). Além disso, o extrato supercrítico apresentou maior eficiência pró-apoptótica, o qual mostrou um aumento de aproximadamente 15% de células apoptóticas, em comparação com extrato bruto (14,95% ± 1,29). Curiosamente, nenhum dos tratamentos, incluindo o controle negativo (veículo), observou-se a presença de células necróticas (Figura 11 e 12).



Nota: (<sup>α</sup>)  $p < 0,001$  representa diferença significativa em relação ao controle negativo (CN), (<sup>β</sup>)  $p < 0,001$  representa diferença significativa entre os extratos bruto e supercrítico de *C. verbenacea* (CN)  $n=3$ .

**Figura 11** - Porcentagem de células viáveis e inviáveis (apoptóticas) em células de carcinoma de Ehrlich após tratamento com extrato bruto e supercrítico.

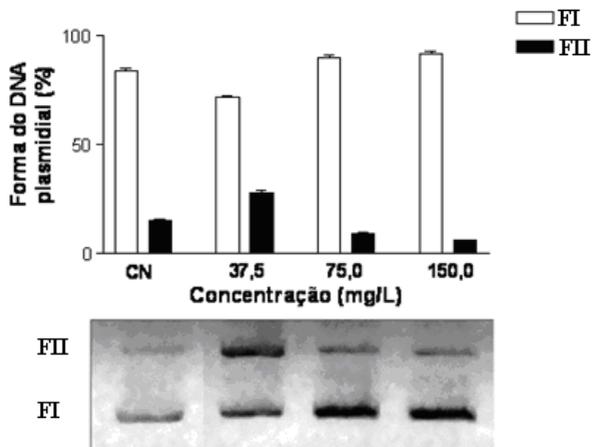


Nota: O controle negativo (A) e positivo (B) foram tratados apenas com veículo de diluição dos extratos e doxorrubicina, respectivamente. Aumento = 400X.

**Figura 12** - Morfologia das células do carcinoma de Ehrlich coradas com uma mistura de Brometo de Etídio/Acridina laranja e observadas após 48 horas de incubação com extrato bruto (C) e supercrítico (D).

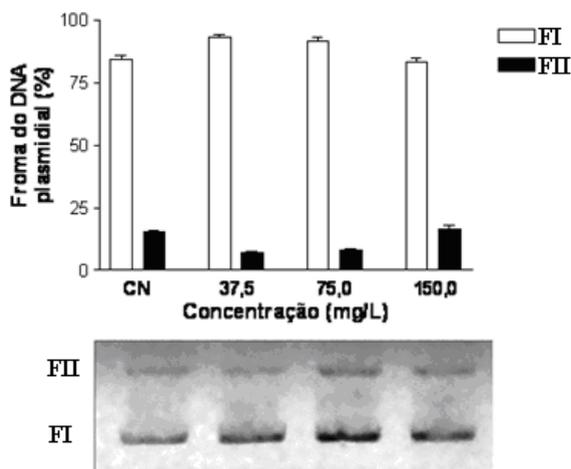
#### 4.5 ATIVIDADE NUCLEÁSICA

Os experimentos realizados com o DNA plasmidial para avaliar o efeito nucleásico do EB e ESC mostraram que ambos os extratos não possuem a capacidade a causar dano direto ao DNA, ou seja, não apresentaram efeito genotóxico, uma vez que seu perfil eletroforético mostrou-se normal, caracterizado pela forma superenovelada (Figura 13 e 14).



Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (DMSO 10%).

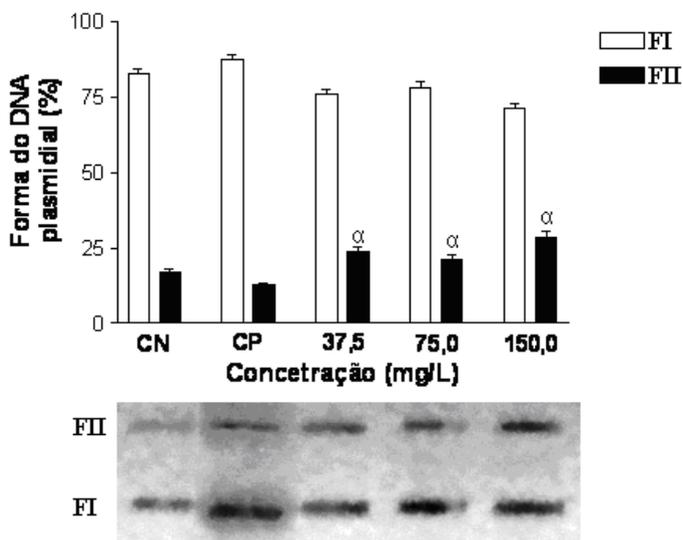
**Figura 13** - Efeito do extrato bruto *C. verbenacea* (0-150 $\mu$ g/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C.



Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (DMSO 10%).

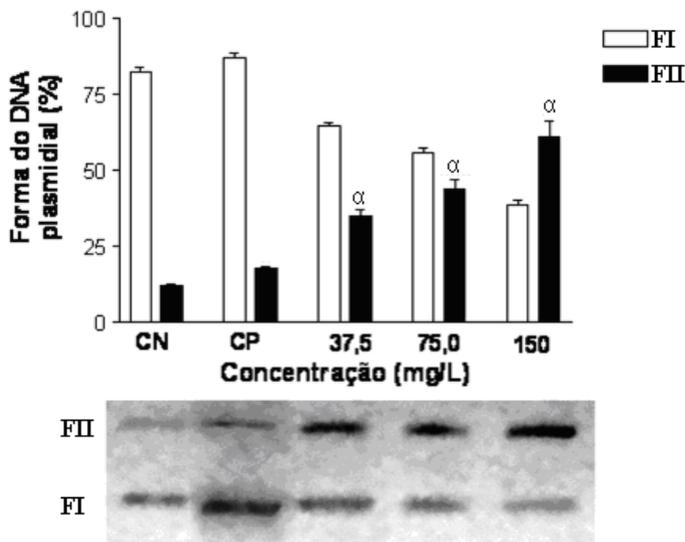
**Figura 14** - Efeito do extrato supercrítico *C. verbenacea* (0-150 $\mu$ g/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C.

Para avaliar o efeito protetor dos extratos perante o ataque oxidativo ao DNA plasmidial, foram realizados experimentos induzindo quebra oxidativa com Fe-EDTA. Os resultados obtidos mostraram que ambos os extratos, especialmente o extrato supercrítico, não apresentam a capacidade protetora, pelo contrário, propiciaram uma potencialização do efeito oxidativo sobre o DNA plasmidial (Figura 15 e 16).



Nota: Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CP= grupo controle positivo tratado com o veículo de diluição dos extratos (acetonitrila 10%) e uma solução constituída por Fe-EDTA (20 $\mu$ M). ( $\alpha$ ), representam diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle negativo; n=3.

**Figura 15** - Efeito do extrato bruto (EB) de *C. verbenacea* (0-150,0 g/L) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial.

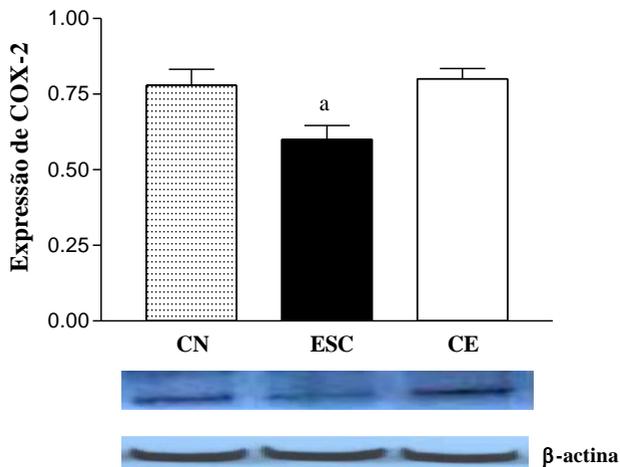


Nota: Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CP= grupo controle positivo tratado com o veículo de diluição dos extratos (acetonitrila 10%) e uma solução constituída por Fe-EDTA (20 $\mu$ M). (<sup>α</sup>) representa a diferença significativa ( $p < 0,001$ ), em relação ao controle negativo;  $n = 3$ .

**Figura 16** - Efeito protetor do extrato supercrítico (ESC) de *C. verbenacea* (0-150,0 g/L) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial.

#### 4.6 EXPRESSÃO DA COX-2 EM CÉLULAS MCF-7

Os resultados obtidos demonstraram que apenas o ESC foi capaz de diminuir a expressão da COX-2 em células MCF-7 quando comparadas como controle negativo (Figura 17). O EB não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo (CN).



**Figura 17** - Expressão de COX-2 em células MCF-7 tratadas com veículo de dissolução dos extratos (CN), extrato bruto (EB) e extrato supercrítico (ESC) em dose de 150  $\mu$ g/mL de extratos.

#### 4.7 EFEITO ANTITUMORAL *IN VIVO*

Ambos os extratos apresentaram efeito antitumoral nos camundongos inoculados com TAE (Tabela 4). Pode-se notar ainda, que o extrato supercrítico exibiu um melhor desempenho que o extrato bruto, principalmente na dose de 150,0 mg/kg, uma vez que nesta dose os animais tiveram maior TMS quando comparados com o controle negativo associado a um aumento de proporção de células inviáveis/viáveis. Com relação ao PAL, todas as doses testadas dos dois extratos apresentaram aumento nos valores deste parâmetro, mas foi também a dose de 150 m/kg do ESC que apresentou o melhor resultado.

Na Tabela 5 pode-se visualizar os parâmetros morfofisiológicos (variação do peso corporal, volume tumoral, volume de células compactadas e proporção de células compactadas por volume tumoral) apresentados pelos camundongos que foram inoculados com TAE. Observou-se menor aumento do peso corporal em quase todos os camundongos tratados com os extratos (exceto na dose de 37,5 mg/kg de EB) quando comparados com o CN. Com relação ao volume tumoral, volume de células compactadas e a proporção de células/tumor houve considerável diferença entre os camundongos tratados com os extratos e o controle negativo, ou seja, ambos os extratos apresentaram a

capacidade de reduzir o volume tumoral acompanhado de redução de células viáveis no tecido (Tabela 4 e 5)

**Tabela 4** - Efeito antitumoral dos extratos bruto e supercrítico de *C. verbenacea* em camundongos inoculados com TAE.

Parâmetro	Camundongos normais	CN	Extrato Bruto			Extrato Supercrítico		
			37,5	75,0	150,0	37,5	75,0	150,0
<b>Proporção de células inviáveis/viáveis</b>	-	0,009± 0,001	0,014± 0,002 <sup>a</sup>	0,020± 0,001 <sup>a</sup>	0,020± 0,006 <sup>a</sup>	0,018± 0,001 <sup>a</sup>	0,017± 0,002 <sup>a</sup>	0,022± 0,002 <sup>a</sup>
<b>TMS (dias)</b>	30	13,50	15,00	14,50	14,50	14,50	14,50	16,00
<b>PAL (%)</b>	100	0	11,10	7,40	7,40	7,40	7,40	23,07

Nota: Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n=6). (<sup>a</sup>) p < 0,001; (<sup>b</sup>) p<0,01 e (<sup>c</sup>) p < 0,05 indicam a diferença estatística em relação ao controle negativo.

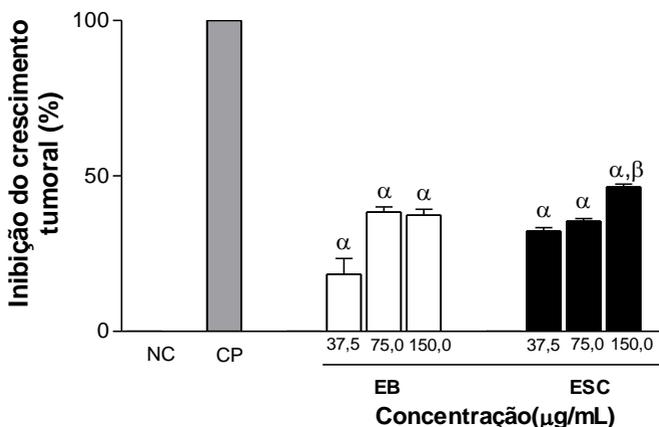
**Tabela 5** - Parâmetros morfofisiológicos de camundongos tratados com extratos bruto e supercrítico de *C. verbenacea* inoculados com TAE.

Parâmetro	Camundongos normais	Doxo	CN	Extrato Bruto			Extrato Supercrítico		
				37,5	75,0	150,0	37,5	75,0	150,0
<b>Aumento do peso corporal (g)</b>	1,08 ±0,99	2,02± 0,8	10,45 ±1,13	10,17 ±2,20	4,25 ±3,94	7,40 ±3,20	8,75 ±1,02	9,20 ±2,05	4,18 ±1,91 <sup>β</sup>
<b>Volume tumoral (mL)</b>	-		10,40 ±0,75	9,56 ±1,88	6,76 ±2,04	7,00 ±1,48	8,24 ±1,63	8,22 ±3,43	6,82 ±0,82 <sup>γ</sup>
<b>Volume de células compactadas (mL)</b>	-		3,25 ±1,70	3,20 ±0,27	1,80 ±0,47	1,90 ±0,42	2,40 ±0,40	2,70 ±1,56	2,60 ±0,28
<b>Proporção de células/volume tumoral</b>	-	30	0,312	0,335	0,268	0,271	0,296	0,328	0,391

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, n=6. (<sup>a</sup>), (<sup>b</sup>) e (<sup>γ</sup>), representam diferença significativa (p<0,001), (p<0,01) e (p<0,05) em relação ao controle negativo. Doxo= grupo controle positivo tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg).

Baseado nos resultados obtidos com os camundongos inoculados com TAE obteve-se o resultado do efeito dos extratos sobre a inibição

do crescimento tumoral das doses utilizadas nos experimentos. Conforme se pode observar na Figura 18, ambos os extratos e todas as doses testas foram capazes de inibir o crescimento do tumor nos animais. Interessantemente, verificou-se que a dose de 150,0 mg/kg foi a dose que mais inibiu o crescimento tumoral, sendo diferente estatisticamente também em relação às doses do extrato bruto.

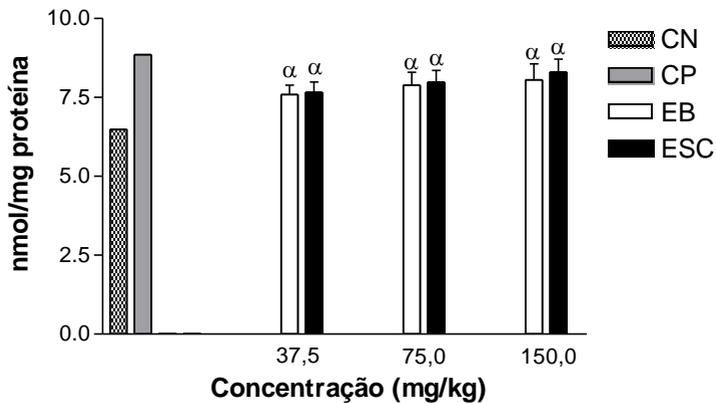


Nota: Cada barra representa a Média ± Desvio padrão em 3 diferentes experimentos. (α)  $p < 0,001$  indica a diferença estatística dos diferentes grupos em relação ao controle negativo (NC) e (β)  $p < 0,001$  indica a diferença estatística entre EB e ESC.

**Figura 18** - Efeito do tratamento do extrato bruto e supercrítico de *C. verbenacea* na inibição do crescimento tumoral em camundongos inoculados com TAE.

#### 4.6 DOSAGEM DE GSH

A dosagem de GSH nas amostras de líquido ascítico retirado dos camundongos tratados com os extratos EB e ESC mostraram um aumento de glutatona reduzida (GSH) quando comparados aos camundongos do grupo controle negativo. O grupo de animais tratados com doxorubicina (1,2 mg/kg) (controle positivo) apresentou os mesmos níveis de GSH. Sendo assim, o tratamento realizado com os extratos apresentou concentração de GSH próxima aos animais controle positivo (Figura 19).



Nota: tratados com EB e ESC (37,5; 75,0 e 150 mg/Kg), controle negativo (CN) tratado somente com o veículo (DMSO 10%) e controle positivo (CP) tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg). (<sup>α</sup>) indica a diferença estatística dos diferentes grupos em relação ao controle negativo (NC), n=6.

**Figura 19** - Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em amostras de líquido ascítico de camundongos portadores de TAE.

## 5 DISCUSSÃO

O emprego de plantas no tratamento do câncer ocorre a mais de 3.500 anos e vem sendo explorado até os dias de hoje. Especificamente na área da oncologia, as plantas medicinais em muito contribuíram para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, que hoje constituem agentes importantes no arsenal terapêutico (VIEIRA, 2008).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL, PINTO, VEIGA Jr, 2002).

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito citotóxico, antiproliferativo, nucleásico, pro-apoptótico e antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *C. verbenacea*.

Geralmente, a utilidade de um determinado composto ou mistura de compostos dos quais se suspeita possuir atividade antitumoral é julgada, primeiramente, através de ensaios de citotoxicidade *in vitro*. O interesse concentra-se em avaliar a capacidade destes compostos em inibir o crescimento e/ou induzir a morte das células tumorais *in vitro*. O ensaio do corante vital MTT é uma ferramenta útil para se avaliar o potencial citotóxico de compostos sob teste pois este método avalia a função celular em nível mitocondrial (MOSMMANN, 1983). Com relação aos resultados de citotoxicidade obtidos pelo método do MTT tanto com células TAE e MCF-7 verificou-se importante efeito citotóxico de ambos os extratos testados (Figura 5 e 6). Os dados da Tabela 2 indicam as  $CI_{50}$  dos extratos analisados sobre as duas linhagens celulares testadas. Neste caso, observou-se, que concentrações inferiores de ESC foram capazes de produzir o mesmo nível de inviabilidade celular que o EB em uma concentração superior. Sendo assim, a atividade do ESC foi considerada mais potente que a de EB. Um dos critérios mais aceitos na avaliação de citotoxicidade de um composto, é que para ser considerado biologicamente ativo deve apresentar a capacidade de induzir citotoxicidade com  $CI_{50}$  menor que 200  $\mu\text{g/mL}$  (SUFFINES E PEZZUTO, 1990). Este fato foi observado nos dois extratos testados, sendo que para cada linhagem celular, o extrato ESC foi considerado mais ativo, pois apresentou menor  $CI_{50}$  quando comparado com o EB. A maior eficiência do ESC provavelmente se deve

o fato da extração supercrítica concentrar determinados compostos (como o  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno). Fato este pode ser observado na Tabela 2, o qual se observou maior concentração desses compostos no ESC. Além disso, o ESC mostrou-se mais eficiente, uma vez que representa mais fielmente os componentes químicos das matérias-primas originais, além disso, este método de extração isola e/ou concentra princípios ativos naturais (MAUL, 1996)

Nossos resultados corroboram com estudos obtidos por Quispe-Condori et al. (2007), os quais verificaram efeito de redução no crescimento celular em diversas linhagens de células, incluindo MCF7, quando testados extratos supercrítico em diversas condições de extração de *C. verbenacea*. Este elevado potencial citotóxico da fração supercrítica possivelmente se deve a presença dos dois sesquiterpenos ( $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno) os quais possuem atividade antiinflamatória inibindo a expressão de COX-2 (FERNANDES et al., 2007). Este fato foi observado nesse estudo, uma vez que o ESC provocou significativa inibição da expressão dessa enzima em células MCF-7. Vários estudos já demonstraram clara correlação positiva entre a inibição da expressão da COX-2 e apoptose (WATSON, 1998; SMITH et al, 2000). Esses dois sesquiterpenos também exibiram capacidade citotóxica em células A-549, DLD-1, M4BEU, HeLa, Bel-7402 e CT-26 (LEGAULT et al.,2003; SYLVESTRE et al.,2005; HOU et al.,2006; SYLVESTRE et al.,2006). Outro estudo que vem ao encontro de nossos resultados é o de Tundis e colaboradores (2009) os quais observam importante efeito citotóxico de extratos de *Senecio stibianus Lacaita* (Asteraceae) contra células de adenocarcinoma renal, carcinoma de próstata hormônio-dependente, melanoma e células MCF-7, sendo que os dois compostos,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno foram identificados nesses extratos analisados. Outro estudo que não descarta a possibilidade do mecanismo antitumoral de compostos antiinflamatórios ser via inibição da expressão de COX-2 é o de Mota Siqueira e colaboradores em 2009, os quais obtiveram resultados significativos nos ensaios de citotoxicidade com células de melanoma murino (B16F10), testando um composto isolado de *Wilbrandia ebracteata*, a diidrocurcubitacina-B.

Com intuito de avaliar o potencial antiproliferativo dos extratos testados foi utilizado o método da timidina tritida o qual mensura a síntese de DNA da cultura celular analisada, sendo uma técnica altamente específica para se avaliar a proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2001). Os resultados obtidos mostraram um elevado potencial antiproliferativo dos extratos, uma vez que ambas as frações testadas

foram capazes de inibir a proliferação das células de TAE quando comparadas com células tratadas apenas com o veículo de dissolução dos extratos (controle negativo) (Figura 7). Apesar de não haver diferença estatística entre os extratos analisados, o ESC apresentou tendência de melhora na atividade antiproliferativa analisada, uma vez que o extrato bruto apresentou 42,91% e o ESC 51,63% de inibição da incorporação de timidina, quando comparados com o controle negativo.

Nossos resultados referentes aos ensaios de proliferação corroboram com dados obtidos por Silva e colaboradores (2007), os quais obtiveram efeito antiproliferativo do  $\beta$ -cariofileno isolado do óleo volátil de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam quando testados em cultura de células de tumor ascítico de Ehrlich. Alguns estudos reforçam o envolvimento de sesquiterpenos no efeito antiproliferativo, uma vez que estes trabalhos demonstraram que o  $\alpha$ -humuleno inibe a proliferação de células A-549, DLD-1 e LNCaP (LEGAULT et al., 2003; LOIZZO et al., 2007) e que o  $\beta$ -cariofileno exerce efeito antiproliferativo sobre células K562. O estudo feito por Mota Siqueira e colaboradores (2009), anteriormente citado nos ensaios de citotoxicidade, também obteve resultados antiproliferativos com as células B16F10 quando testada a diidrocurcubitacina-B, em ensaios de incorporação de timidina. Neste estudo, este composto apresentou a propriedade de parada do ciclo celular das células na fase G2. Outros dados relevantes que foram obtidos por nosso grupo de pesquisa e que corroboram com os dados obtidos nesse estudo e com outros dados da literatura, é o estudo de Felipe, 2010, o qual obteve resultados significativos de citotoxicidade e proliferação celular com tumor ascítico de Ehrlich *in vitro* com extratos provenientes de *Casearia sylvestris*, a qual através de estudos fitoquímicos revelou também a presença dos dois sesquiterpenos mencionados,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno.

Estudos feitos por Subhashini e colaboradores (2005) demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 (celecoxibe), induzem a morte de células por apoptose por inibição do NF $\kappa$ B em células K562. Outros trabalhos também mencionam os efeitos desses compostos sintéticos em linhagem de células hematopoiéticas como Jukrat, H60, U937 revelando efeito dose dependente sobre a inibição do crescimento celular com parada no ciclo celular na fase G0/G1. O mecanismo exato para os efeitos desses compostos antiinflamatórios, que inibem a expressão de COX-2 ainda permanece incerto, entretanto, Grösch e colaboradores (2001), demonstraram através de experimentos uma parada do ciclo celular na fase G0/G1 por redução da expressão de ciclina A, ciclina B1 e cinase dependente de ciclina-1 em linhagem de

células de câncer de colon, independentemente da expressão ou não de COX-2.

O estudo pró-apoptótico feito em células de TAE tratadas com os dois extratos (EB e ESC) mostrou clara indução apoptótica nas células testadas, uma vez que as células incubadas com estes extratos apresentaram um percentual de células apoptóticas maior que as células tratadas com o veículo de dissolução dos extratos. Também se notou uma maior atividade pró-apoptótica do ESC quando comparado com o EB (Figura 8).

Esses dados corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular, uma vez que novamente o ESC apresentou maior potencial pró-apoptótico, sendo que nesse extrato a presença de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno são maiores. Alguns estudos tem relacionado a presença de sesquiterpenos com a atividade pró-apoptótica, como por exemplo um estudo feito em células de melanoma humano (SK-MEL-28), onde o  $\beta$ -cariofileno isolado das folhas de *Ricinus communis* exerceu efeito pró-apoptótico (DARMANIN et al., 2009). Outro estudo que corrobora com nossos resultados é o de Bonaterra e colaboradores (2010) que demonstraram indução de apoptose por inibição da expressão do RNAm de COX-1 e COX-2 em células cancerígenas HT-29 tratadas com extrato da casca de salgueiro STW 33-I (*Salix alba*). Outro estudo que reforça a idéia do mecanismo antitumoral ser devido a presença dos compostos antiinflamatórios como  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno é o trabalho realizado por Vaish e colaboradores (2010) os quais demonstraram efeitos quimiopreventivos de AINEs atuando na formação do apoptossoma em câncer de colo-retal através de imunohistoquímica.

Por fim, relatos da literatura mostram que a atividade pró-apoptótica dos sesquiterpenos se deve a ativação da via extrínseca, onde esses compostos atuam promovendo um aumento da expressão do receptor TRAIL e assim como seu respectivo ligante (ISHIBASHI, OHTSUKI, 2008).

A doxorubicina se liga fortemente a dupla hélice, através da intercalação entre as bases púricas e pirimidínicas, interrompendo o prolongamento da cadeia de DNA e causando graves distorções cromossômicas. Estas distorções bloqueiam a síntese do novo RNA, do DNA ou ambos, provocando a ruptura das fitas de DNA impedindo a duplicação celular (BOLAND et al, 1997). Baseado nisso, foi realizado o teste da atividade nucleásica para verificar o possível efeito genotóxico que os extratos poderiam exercer de forma direta sobre o DNA.

Com relação à atividade nucleásica, os resultados obtidos mostraram que nenhum dos extratos foi capaz de causar dano direto ao DNA plasmidial, uma vez que o padrão eletroforético permaneceu normal em todas as concentrações analisadas em ambos os extratos, quando comparado com o veículo de dissolução desses extratos (controle negativo) (Figura 9 e 10). Dessa forma, sugere-se que o possível mecanismo citotóxico e antiproliferativo apresentados pelos extratos não envolva ataque direto ao DNA, diferentemente de muitos agentes citotóxicos como doxorrubicina e cisplatina (alquilantes). Apesar disso, muitos trabalhos realizados com plantas mencionam a capacidade de algumas espécies de causar dano direto ao DNA, como por exemplo, o de Biso e colaboradores (2010) os quais estudaram a genotoxicidade dos extratos de *Davilla nitida* e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). Estes autores verificaram a presença de genotoxicidade nessas espécies testadas, apresentando dupla quebra no DNA plasmidial, porém quando testado em células animais não foram capazes de induzir dano genômico.

O estresse oxidativo trata-se de um estímulo que pode induzir à apoptose provocado pela geração de intermediários oxidativos através da ação de alguns antineoplásicos. Uma enorme quantidade de dados suporta o papel do estresse oxidativo no desencadeamento de apoptose, sendo que as vias apoptóticas clássicas envolvem um acúmulo moderado de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANAZETTI; MELO, 2007). Utilizando o Fe-EDTA como fonte de geração de EROs avaliou-se a presença ou ausência de proteção dos extratos de *C.verbenacea* frente ao dano no DNA. Os dois extratos quando testados não foram capazes de proteger o DNA plasmidial.(Figura 11 e 12).

Conforme já referenciado anteriormente, o modelo experimental do tumor Ascítico de Ehrlich oferece oportunidades de estudo que possibilitam uma melhor compreensão da atividade biológica e mecanismos de ação de compostos com potencial antitumoral (HANSEN, KHANNA, 2004). Dessa forma, foram testados os mesmos extratos de *C. verbenacea* os quais apresentaram efeito citotóxico, antiproliferativo e pró-apoptótico *in vitro* para avaliar o efeito antitumoral *in vivo*.

Os dois extratos testados apresentaram importante efeito antitumoral nos camundongos inoculados com TAE (Tabela 3). O tratamento com o extrato bruto reduziu significativamente as células viáveis (através de aumento da proporção de células inviáveis/viáveis) além de proporcionar aumento do tempo médio de sobrevivência dos animais tratados com o extrato bruto quando comparados com o

controle negativo (camundongos tratados apenas com veículo de dissolução dos extratos). Mas foi o ESC que apresentou uma melhor eficiência em aumentar a proporção de células inviáveis/viáveis acompanhado de aumento do TMS dos animais, principalmente na maior dose testada (150mg/kg). Nas demais doses testadas causaram leve aumento no TMS (Tabela 3). Um dos critérios de confiança mais aceitos pela comunidade científica para julgar o valor de qualquer agente antitumoral é o aumento no tempo de sobrevivência dos animais (CLARKSON; BURCHENAL, 1965). Esses resultados corroboram com dados obtidos por Silva e colaboradores (2007) o qual obteve aumento no TMS em camundongos inoculados com TAE os quais foram tratados tanto com óleo volátil de *Zanthoxylum rhoifolium* quanto  $\beta$ -cariofileno isolado dessa planta. Um possível mecanismo explorado por estes autores seria a capacidade desses compostos de ativar célula natural killers (NK), uma vez que durante o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, verificaram baixa atividade das células NK, sendo que alguns estudos sugerem que as células NK contribuem para a resistência do crescimento tumoral neste modelo de tumor (GRYNBERG et al., 1999; JUSTO et al., 2003, VALADARES et al., 2003).

Considerando os resultados referentes à proporção de células inviáveis/viáveis os dados indicaram que EB e ESC apresentaram efeito antitumoral, causando um aumento expressivo de células inviáveis. A dose de 150mg/Kg aumentou mais de duas vezes a quantidade de células tumorais mortas (inviáveis) em relação às vivas (viáveis) quando comparados ao controle negativo. Neste caso, o efeito de ambos os extratos não se apresentou de maneira dose-dependente, pois o aumento exponencial na dose utilizada para os tratamentos não produziu um aumento equivalente de seus efeitos. A dose de 150 mg/Kg apresentou novamente melhor atividade, não havendo diferença estatística significativa quando realizado uma comparação entre os dados obtidos, quando o tratamento foi feito com EB ou ESC. É provável, que ESC na dose mais alta, por diminuir o volume de líquido ascítico nutricional e combater o tumor de forma mais eficaz, tenha também aumentado os marcadores de tempo de sobrevivência dos animais portadores tratados.

Kviecinski e colaboradores (2008) encontraram também um aumento na proporção de células inviáveis em cultura de TAE tratadas com extrato e frações de *Bidens pilosa*

Quanto aos parâmetros morfofisiológicos, o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) causou um rápido desenvolvimento de ascite tumoral. Esta ascite causou no animal portador um aumento exagerado de seu peso e de sua circunferência abdominal. O líquido ascítico é a fonte

nutricional direta para as células do tumor e a observação de um aumento rápido deste líquido acompanhado pelo crescimento do tumor (volume de células compactadas) pode ser usada como uma ferramenta para avaliar a requisição nutricional das células tumorais (PRASAD; GIRI, 1994).

A partir dos dados obtidos nos animais, pode-se sugerir que a dose máxima testada (150 mg/kg) apresentou atividade antitumoral considerável, quando os dados são comparados aos do controle negativo. Uma comparação entre os dados apresentados para EB e ESC, revela que mais uma vez, ESC foi considerado o extrato mais ativo. Ainda, verificou-se que na dose mínima testada (37,5mg/Kg), os extratos não apresentaram resultados que apontassem para uma atividade antitumoral. Os resultados sugerem maior eficácia nas doses testadas mais elevadas, uma vez que a inibição do crescimento tumoral mostrou clara atividade antitumoral nestas doses. Destaca-se que todas as doses testadas inibiram o crescimento tumoral (Figura 13), porém quando comparados os extratos entre si apenas a dose de 150 mg/kg apresentou diferença estatística.

Alguns autores têm relatado uma significativa redução nos níveis de GSH em animais implantados com tumor recebendo tratamento com fármacos antineoplásicos (SUZUKAKE; PETRO; VISTICA, 1982; RICHARDSON; SIEMANN 1992). Estes mesmos autores argumentam que, níveis elevados de GSH, seriam necessários para sobrevivência do tumor uma vez que este peptídeo tiólico regula a via de produção anaeróbica de ATP e que a queda na sua concentração poderia significar a morte das células tumorais. Porém outros autores defendem a hipótese de que o tratamento com antineoplásicos elevaria os níveis de GSH, uma vez que a célula tumoral detém alta concentração de GSH e que a redução tumoral proporcionaria elevação do consumo deste peptídeo no líquido ascítico. Este fato foi observado através de um estudo que monitorou os níveis ascíticos no tumor ascítico de Ehrlich o qual observou depleção de GSH em camundongos não tratados, mostrando o alto consumo tumoral deste tripeptídeo (ESTRELA et al, 1992). Duthie e colaboradores (1998) observaram que o metabolismo da GSH não é afetado em algumas linhagens de células tumorais, uma vez que estas células possuem baixa atividade de síntese de GSH. Nossos resultados mostram clara redução tumoral acompanhada de elevação dos níveis ascíticos de GSH quando comparados com o controle negativo. Os camundongos tratados com doxorubicina reforçam a segunda hipótese descrita acima, uma vez que os camundongos tratados com esse fármaco de referência também apresentaram elevação nos níveis de GSH (Figura 13).

Um possível mecanismo de ação antitumoral observada em nosso estudo seria a inibição da expressão da COX-2 pelo extrato supercrítico de *C. verbenacea*. Que levaria a uma sinalização negativa no sentido de bloqueio a sobrevivência celular (efeito antiproliferativo e indução da apoptose) da célula tumoral. Sugere-se ainda que a capacidade do ESC de inibir a expressão dessa enzima se deve a maior concentração de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno presente neste extrato.

Vários estudos já demonstraram o potencial antitumoral de compostos derivados de plantas através da inibição da COX-2 (CERELLA et al, 2010). Por exemplo, a curcumina, um polifenol presente em grandes quantidades em *Curcuma longa* apresenta importante propriedade antitumoral que foi associada a sua habilidade de suprimir a produção de prostaglandinas E2 e impedir a expressão da COX-2 (HUANG et al, 1991; Zhang, et al, 1999). Outro trabalho que corrobora com nosso estudo é o de Kundu e colaboradores (2004) feito com o resveratrol, um flavonóide isolado de uvas e vinhos (*Vitis vinifera* L), no qual este composto apresentou efeito quimiopreventivo utilizando modelo murino de estudo. O mecanismo de ação antineoplásico do resveratrol parece ser o mesmo da curcumina, uma vez que esses compostos parecem afetar a transcrição da COX-2.

A fisetina, um flavonóide muito encontrado em cebola, pepino, maçã e morango, mostrou-se eficiente em reduzir o nível de expressão da COX-2 em linhagens de células de cólon HT29, causando assim, significativo efeito antitumoral (SUH et al, 2009). Além disso, estudo realizado por Corona e colaboradores (2007) demonstrou que óleo de oliva (*Olea europaea*) inibiu o crescimento de células Caco-2. Essa inibição do crescimento celular foi acompanhada da redução transcricional da COX-2 e inibição da fosforilação das proteínas p38, MAPK e CREB. Por fim, outro estudo que vem ao encontro ao nosso é o de Lou e colaboradores (2010), os quais verificaram efeito indutor de apoptose do óleo de *Brucea javanica* em células tumorais T24 e este efeito foi regulado via ativação de caspase 3 e 9 e inibição de NFkB e COX-2.

Sendo assim, pode-se verificar que o ESC mostrou-se mais promissor como protótipo para atividade antitumoral, pois o mesmo apresentou maior efeito citotóxico e tendência de redução de proliferação celular nesse estudo. Apenas o ESC foi capaz de inibir a expressão da COX-2 confirmando o mecanismo farmacológico proposto no trabalho, uma que este extrato apresentou mais quantidade de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, ambos possíveis inibidores da COX-2. No modelo animal de Ehrlich, mais uma vez o ESC foi mais eficaz,

mostrando clara inibição de crescimento tumoral e aumentando consideravelmente o número de células inviáveis e o TMS dos animais. Tendo em vista estes resultados, poderia se especular que um dos possíveis mecanismo de ação do ESC se deve a capacidade dos sesquiterpenos descritos anteriormente, em inibir a COX-2 através da inibição do fator de transcrição NFkB, gerando sinais apoptóticos e antiproliferativos.

Nesse contexto, compostos naturais que inibem a COX-2 podem representar moléculas-alvo a serem exploradas para fins preventivos e terapêuticos, devido a sua toxicidade baixa ou nula (CERELLA et al, 2010). Por outro lado, a ESC surge como uma alternativa a fim de concentrar e melhorar processos de extração, uma vez que esta técnica de extração mostrou-se mais efetiva para fins de atividade biológica.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho nos permitem fazer as seguintes conclusões:

- ✓ O extrato bruto e supercrítico de *C. verbenacea* apresentaram atividade citotóxica para células MCF-7 e do carcinoma de Ehrlich. O extrato supercrítico apresentou maior citotoxicidade.
- ✓ Ambos os extratos apresentaram importante feito antiproliferativo em células do carcinoma de Ehrlich.
- ✓ O provável tipo de morte celular induzida pelos extratos seria predominantemente a apoptose.
- ✓ O mecanismo pelo qual os extratos exercem o efeito citotóxico, antiproliferativo e pró-apoptótico não se deveria à capacidade dos extratos exercerem dano direto ao DNA, porém os extratos não apresentaram capacidade de promover proteção contra ataque oxidativo promovido pelo Fe-EDTA plasmidial.
- ✓ Os extrato bruto e supercrítico possuem atividade antitumoral *in vivo*. Entretanto, o extrato supercrítico apresentou melhor atividade, fato este que reforçado através da inibição do crescimento tumoral.
- ✓ Um possível mecanismo de ação antitumoral dos extratos testados seria a inibição da COX-2, bloqueando a sobrevivência celular e induzindo a apoptose.
- ✓ Por fim, sugere-se que a atividade antitumoral dos extratos de *C. verbenacea* se deve a sua capacidade citotóxica, antiproliferativa e pro-apoptótica, sendo que estes efeitos provavelmente se devam a presença de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno presente nos extratos, especialmente no extrato supercrítico.

## 7 PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento desse estudo, abrem novas propostas de estudos que possam servir de complemento ou até mesmo de novos rumos a serem tomados a partir dos resultados obtidos, tais como:

- O efeito citotóxico deve ser avaliado sobre outras linhagens celulares, para caracterizar melhor o efeito e a seletividade dos compostos presentes nos extratos.
- Com relação ao efeito pró-apoptótico, deve-se investigar a expressão de marcadores de apoptose como p53, Bcl-2, citocromo c
- Outros estudos previstos é a utilização da citometria de fluxo e incorporação de anexina para melhor avaliar o efeito antiproliferativo e pró-apoptótico.
- Também avaliar outras condições de extração supercrítica para uma eventual melhora da atividade antitumoral dos extratos
- Outra proposta interessante seria o desenvolvimento de nanocápsulas de extratos supercrítico para um melhor efeito biológico dos extratos.
- Por fim, testar o efeito dos compostos  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno nos modelos de avaliação de atividade antitumoral apresentados no presente estudo para caracterizar especificamente o mecanismo de ação desses compostos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agents antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n.1, 2005.
- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.
- ANAZETTI, M.C; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.37-58, 2007.
- ABDRIETTA, M.H., ELOY, N.B.; HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.C.G. Identification OF SUGARCANE cDNAs encoding components of the cell cycle machinery. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 61-68, 2001.
- ARREBOLA, M R B et al. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L.(Boraginaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 14, n. , p.57-65, 2004.
- AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p.431-441, 2005
- BAYEUX, M.C.; FERNANDES, A.T.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Europa, v. 35, p.1229-1232, 2002.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, (2008). 1059 p.
- BISO, F.I.; RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; REIS, M.B.; BERNARDI,C.C.; MATTOS, J.C.P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.;

VILEGAS, W.; CÓLUS, I.M.S.; VARANDA, E.A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). **Mutation Research**, v. 702, n.1, p.92-99, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer: Uma proposta para integração ensino-serviço. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. 340p.

BONATERRA, G.A.; KELBER, O.; WEISER, D.; METZ, J.; KINSCHERF, R. *In vitro* anti-proliferative effects of the willow bark extract STW 33-I, **Arzneimittel-forschung**, v.60, n.6, p.330-335

BREMER, Juliane Selene. Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BOLAND, M.P.; FOSTER,S.J.; O'NEILL, L.A.J. Daunorubicin activates NFkB and induces kB-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and jurkat T lymphoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n.20, p.12952-12960, 1997.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciências e Cultura**, v.55 (3), 2003.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F.A.; MARTÍNEZ, E.L.O. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **Journal of supercritical fluids**, v. 41, p.43-49, 2007.

CERELLA, C.; SOBOLEWSKI, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: A promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy, **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1801-1815, 2010.

CLARKSON, B.D.; BURCHENAL, J.H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Prog.Clin.Cancer**,v.1, p.625-629,1965.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of

antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation.**, v. 17, p. 153-163, 1999

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 100, p.72-79, 2005.

CORONA, G.; DEIANA, M.; INCANI, A.; VAUZOUR, D.; DESSI, M.A.; SPENCER, J.P. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 362, p 606–611, 2007.

COHN, M. R.; ROTH, S. K. Biochemistry and disease: bridging basic science and clinical practice. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 587, 1996.

CONRACT, B. Genetic Control Programmed Cell Death During Animal Development. **Annual Review of Genetics**, v.43, p. 493-523, 2009.

DEMPKE, W.; RIE, C.; SCHMOLL, A.G.H. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?.**Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, n. 127, p 411-417, 2001.

DARMANIN, S.; WISMAYER, P.S.; CAMILLERI PODESTA, M.T.; MICALLEF, M.J.; BUHAGIAR, J.A. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. **Natural Product Research**, v.23, n. 6, p.561-571, 2009.

DE VITA, V.T; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Ed. 5th, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1998.

DE VITA, V.T; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Ed. 5th, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 2005.

FARIA, MHG.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene c-myc no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165-171, 2006.

FELIPE, B.K. Estudo do efeito antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*. 108 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FERNANDES, Elizabeth S et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal Of Pharmacology**, Londres, v. 569, n.3, p.228-236, 2007.

FRESHNEY, R. I. **Freshney's Culture of animal cell- a multimedia guide**. New York, 1999. CD-ROOM.

ESTRELA, J.M.; HERNANDEZ, R.; TERRADEZ, P.; ASENSI, M.; PUERTES, I.R.; VIÑA, J. Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumor cell. *Bioquimical Journal*, v. 286, p. 257-262, 1992.

GOODMAN & GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 2001.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 696-700, 2003.

GHOBRIL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **C.A: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 3, n. 55, p.178-194, 2005.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; ARDELT, B. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. **Cancer Research.**, v. 73, p. 3186-3192, 1999.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53. 335-343, 2007

GRÖSCH, S.; TEGEDER, I.; NIEDERBERGER, E.; BRÄUTIGAM, L.; GEISSLINGER, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. **The FASEB Journal**, v.15, n. 14, p. 2742-2744, 2001.

GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A., LIMA, J.E., PAMPLONA,

- S.S.R., PINTO, A.C., MACIEL, M.A. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, 687–689, 1999.
- GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M.L. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. **Journal Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 177-184, 2004
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, p1-93, 2006.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006.
- HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development, **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 858–880, 2004.
- HOHENEGGER, M. Muscle and tumor signaling. [https://.../mitarbeiter/ca\\_muskel\\_en.htm](https://.../mitarbeiter/ca_muskel_en.htm), acesso em 09/12/2010
- HOU, J., SUN, T.; HU, J.; CHEN, S.; CAI, X.; ZOU, G. Chemical composition , cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. **Food Chemistry**, v. 133, p. 355-358, 2006.
- HUANG, M.T.; LYSZ, T.; FERRARO, T.; ABIDI, T.F.; LASKIN, J.D.; CONNEY, A.H. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in Mouse epidermis. **Cancer Research**, v. 51, p. 813–819, 1991.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, n.5, p. 1170-1179, 2008.
- INCA – Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf> 2005>. Acesso em: 09 Janeiro 2005.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA), Ministério da Saúde (2009) Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA;

2009.

[http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=1](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1). Acessado em 20 de junho de 2010.

ISHIBASHI, M.; OHTSUKI, T. Studies on Search for Bioactive Natural Products Targeting TRAIL Signaling Leading to Tumor Cell Apoptosis. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 5, p.688 -714, 2008.

JADHAV, G.K.R.; BHANUMATHI, P.; UMA DEVI, P.; SEETHARAMAIAH, T., VIDYASAGAR, M.S., RAO, K.K.; HOSPET, C.S.; SOLOMON, J.G. Possible role of glutathione in predicting radiotherapy response of cervix câncer, **International Journal of Radiation Oncology , biology, physics**, v.44, n. 3, p.745, 1998.

JEGEANS, N.; TAGEDDINE, N.; BECK, R.; VERRAX, J.; TAPER, J.; GAILLY, P.; CALDERON, P.B. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v.79, n.9, p. 1221-1230, 2010.

JENDIROBA, D. B.; KLOSTERGAARD, J.; KEYHANI, A.; PAGLIARO, L.; FREIREICH, E.J. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dymethylsphingosine. **Leukemia Research**, v.26, p.301-310, 2002.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumour-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 25, p. 305-319, 2003.

KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUES, FILHO, E.; EIRA, A.F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 6, 2004.

KERROLA, K. Literature review: isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide, *Food Reviews International*, v. 11, p. 547-573, 1995.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURIE, A. H.; BRIT, J. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p.239-257, 1972.

KIM, H.K.; LEE, H.; SHIN, C.; HUH, H. HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa*. Archives of pharmacial research, v. 22, p. 520-523, 1999.

KOKOGLU,E.;TUTER,Y.;SANDIKCI,K.S.;YAZICI,Z.; ULAKOGLU, E.Z.; SONMEZ, H.; OZYURT, E. Prostaglandin E2 levels in human brain tumor tissues and arachidonic acid levels in the plasma membrane of human brain tumors. **Cancer Letters**, v. 132, p. 17-21, 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. ROBBINS, S.L., CONTRAN, R.S. **Pathology basis of disease**. 7ed. China:WB Saunders, 2004, 1552p.

KUNDU, J.K.; CHUN, K.S.; KIM, S.O.; SURH, Y.J. Resveratrol inhibits phorbol esterinduced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets. **Biofactors**, v. 21, p.33-39, 2004.

KVIECINSKI, M.R., FELIPE, K. B.; SCHOENFELDER,T.; WIESE, L.P.L.; ROSSI, M. H.; GONÇALEZ , E.; FELICIO, J. D.; FILHO, D. W., PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p. 69-75, 2008.

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, p.402-407, 2003.

LIM, J.W.; KIM, H.; KIM, KH. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. **Lab Invest**; v. 81: 349-360, 2001.

LOBO, C.; RUIZ-BELLITO, M.A.; ALEDO, J.C.; MÁRQUEZ, J.; NÚÑES DE CASTRO, I.; ALONSO, F.J. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. **Biochemical Journal**, v. 348, p. 257-261, 2000.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, D. **Biologia celular e molecular**. 4ª edição. Revinter Ltda. 2002.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A.M.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Research*, v. 27, p.3293–3299, 2007.

LOU, G.G.; YAO, H.P.; XIE, L.P. *Brucea javanica* oil induces apoptosis in T24 bladder cancer cells via upregulation of caspase-3, caspase-9, and inhibition of NF-kappaB and COX-2 expression, **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 3, n. 38, p. 613-624, 2010.

MACHMUDAH, S.; SULASWATTY, A.; SASAKI, M.; GOTO, M.; HIROSE, T. Supercritical CO2 extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p: 30-39, 2006.

MANDIC, A.S.; HANSON, J.; LINDER, STIG.; SHOSHAN, M.C. Cisplatin Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Nucleus-independent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9100-9106, 2003

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.; VEIGA Jr, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALDONADO, P.A. Avaliação do perfil oxidativo e da atividade de ectoenzimas em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical. 110fl. Tese (Doutorado). Universidade federal de Santa Maria, 2008.

MALUMBRES, M.; BARBACID, MARIANO. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**. v. 9. 153-166. 2009.

MAUL, A.A.; WASICKY, R.; BACCHI, E.M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n.2, p.185-200, 1996.

MAZUMDER, U.K.; GUPTA, M.; MAITI, S.; MUKHERJEE, M. Antitumor activity of Hygrophilaspinoso on Ehrlich ascites carcinoma

and sarcoma-180 induced mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, p. 473-477, 1997.

McGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y., MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Methods in Cell Biology**, v.46, p.153-185, 1995.

MELLO, P. S.; JUSTO, G.C.; DURÁN, N.; HAUN, M. Natural Killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47-54, 2004.

MICHIELIN, E.M.Z., SALVADOR, A.A., RIEHL, C.A.S., SMÂNIA JR., A., SMÂNIA, E.F.A., FERREIRA, S.R.S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v.100, 6615–6623. 2009

MOFFAT, J.; HASHIMOTO, M.; KOJIMA A.; KENNEDY, D.O.; MURAKAMI, A. KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; MATSUI-YUASA, I. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v.21, n. 12, p. 2151-2157, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.

MOTA SIQUEIRA, J.M.; GAZOLA, A.C.; FARIAS, M.F.; VOLKOV, L.; RIVARD, N.; DE BRUM-FERNANDES; A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both *in vitro* and *in vivo* models. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.64, p.529-538, 2009.

NICHOLSON, D.W.; THORBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. Trends in **Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p.299-306, 1997.

OLIVEIRA, C.C.F.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; MUELLER, A.H.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação *in vitro* do efeito anti-proliferativo das drogas BSA-1 e 32/26/2-B em linhagens cancerígenas de retinoblastoma Y79. **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v.1, p.1-9,

2001.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer : Potencial Diagnostic and therapeutic Applications. *The Oncologist*, v. 9, p. 361-377, 2004.

PELÚZIO, M.C.G.;VOLP, A.C.P. QUEIROZ,I.C.; BRITO, C.J.; MIRANDA, T.C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas - Conhecendo seu papel. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 3, n. 21, p.233-238, 2006.

PEREIRA, A. Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp*). 156 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PRASAD, S. B.; GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, p.155-162, 1994

QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, S.T.V.; SATO, D.N.;CARVALHO, J.E. Global yield of the Supercritical CO<sub>2</sub> extraction from *Cordia verbenacea* DC - Anticancer and antimycobacterial activities. **Pharmacognosy Magazine**, v.3, p. 39-46, 2007.

RENVOIZE, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biology and Toxicology*, v. 14, n. 2, p: 111- 20, 1998.

RAMOS, C.; BARROS, D.; GREGÓRIO, G.; TINÊO, M; BLUMM, V.F. *Cordia verbenacea*: planta contra inflamação. **Journal Phytomédica**. n. 1, 2005.

RAJESHKUMAR, N. V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G.; KUTTAN, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n.1, p. 17-22, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

- REBELLO, J. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas, 2004, 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina , Florianópolis, 2004.
- RICHARDSON, M. E.; SIEMANN, D.W. Thiol manipulation as a means of overcoming drug resistance in a novel cyclophosphamide induced resistant cell line. , **International Journal of Radiation Oncology , Biology, Physics**, v. 22, n. 4, p. 781-784, 1992.
- RICHARDSON, M. A.; SANDERS, T.; PALMER, J.L.; GREISINGER, A.; SINGLETARY, S.E. Complementary/alternative medicine use in comprehensive cancer center and the implications oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 2505-2514, 2000.
- ROCHA, B. A. ; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural product in anticancer therapy. **Pharmacology**, v. 1, p. 364-369, 2001.
- ROLDÃO, E.F.; WITACENIS, A.; SEITO, L.N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; STASI, L.C.D. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v: 119, n.1 p:94-98, 2008.
- RUBIN, E.; FARBER, J.L. Neoplasia In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. Pathology. 2. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.
- SCARPELLINI M.; NEVES A.; HÖRNER R.; BORTOLUZZI A. J.; SZPOGANICS B.; ZUCCO C.; NOME SILVA R. A.; DRAGO V.; MANGRICH A.S.; ORTIZ W. A.; PASSOS W. A.; DE OLIVEIRA M.C.; TERENCEZ H. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxyl cooper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42. n. 25, p. 8353-8365, 2003.
- SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUEZ, J.. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FETOHS Letters**, v.414, n. 1, p.1-6, 1997.
- SÉRTIE, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part 1. Anti-

inflammatory activity and toxicity of the crude extract and the leaves. *Plata Médica*, v. 1, p. 7-10, 1988.

SÉRTIE, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicite of artemetin. ***Planta Medica***, v.56, n.1, p. 36-40, 1990.

SHIOZAKI, E.N; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: Mechanisms from structural biology. ***Biochemical Sciences***, v.39, n.9, p.486-494, 2004.

SHONO, T.; TOFILON, P.J.; BRUNER, J.M.; OWOLABI, O.; LANG, FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. ***Cancer research***, v. 11, p. 4375-4381, 2001.

SMITH, M. L., HAWCROFT, G., HULL, M. A. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence the different mechanisms of action. ***European Journal of Cancer***, v. 36, p. 664-674, 2000.

SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.S.;YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. ***European Journal of Pharmacology***. v. 576, p.180-188, 2007.

SYLVESTRE, M.; LEGAULT, J.; DUFOUR, D., PICHETTE, A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myryca gale* L. ***Phytomedicine***, v. 12, n.4, p. 299-304, 2005.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A. ; NAGAU, F. ; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guardaloupe. ***Journal of Ethnopharmacology***. v.103, n.1 p.99-102, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. P.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. Famacognosia: da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis p. 21, 2001.

SREEDHARA, A. E COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal íons and complexes. ***Journal of Biological Inorganic Chemistry***, v. 6, n.4, p. 337 – 347, 2001.

- STROBER, W., 1996. **Common immunologic techniques: Trypan blue exclusion test of cell viability**. In: COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M., STROBER, W. (Eds.), *Current Protocols in Immunology*, vol.3. John Wiley, New York, A.3B.1-2.
- SUBHASHINI, J; MAHIPAL, S V K; REDDANNA, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, Europa, n. , p.31-43, 2005.
- SUFFREDINI, I B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal Medical And Biological Research**, v. 37, p.379-384, 2004.
- SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133,1990.
- SUH, Y.; AFAQ, F.; JOHNSON, J.J; MUKHTAR, H. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NFkappaB-signaling pathways. **Carcinogenesis**, v.30, p. 300-307, 2009.
- SUZUKAKE, K.; PETRO, B. J.; VISTICA, D.T. Reduction in glutathione content of L-PAM resistant L1210 cells confers drug sensitivity. **Biochemical Pharmacology**, v.31 n. 1, p.121-124, 1982.
- TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MIYAMOTO, J.; MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. *Psychopharmacology*, v. 164, p. 164-233, 2002.
- TENG, B.; WANG, S.; FU, Z. ; DANG, Y.; WU, Z.; LIU, L. Semiautomatic synthesis of 3'-Deoxy-3'-[18F]fluorothymidine using three precursors. **Applied Radiation and Isotopes**., v. 61, p. 187-193, 2006.
- TICLI, F. K., HEGE, L.I.S.; CAMBRAIA, R.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A .G.; FONTES, M.R.M.; STABELI, R.G.; GIGLIO, J.R.;

FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V.. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, Europa, v. 46 , p.318-327, 2005.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; BONESI,M.; MENICHINI, F.; DODARO, D.; PASSALACQUA, N.G.; STATTI, G.; MENICHINI, F. *In vitro* cytotoxic effects of *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae) on human cancer cell lines. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.23, n.18, p.1707-1718, 2009.

VAISH, V.; TANWAR, L.; KAUR, J.; SANYAL, S.N. Chemopreventive Effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Early Neoplasm of Experimental Colorectal Cancer: an Apoptosome Study. *Journal of gastrointestinal câncer*. IN PRINT, 2010.

VALADARES, M.C., KLEIN, S.I., GUARALDO, A.M.A., QUEIROZ, M.L.S. Enhancement of natural killer cell function by titanocenesin mice bearing Ehrlich ascites tumour. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, n. 2-3, p. 191–196, 2003.

VIEIRA, R.C.F. Estudo do uso de plantas medicinais e/ou produtos à base de plantas medicinais como tratamento complementar, por pacientes atendidos no Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON/SC. 176f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20622-20625, 2004.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WARIS, G. & SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cicloxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. **Journal of Virology**. v. 79, n. 15, p. 9725-9734, 2005.

WATSON, A.J. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2. **Histology Histopathology** v. 13, n. 2, p. 591-597, 1998.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; MARCON, J. L. et al. Comparative antioxidant defenses in vertebrates - Emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology** v. 7, p. 33-45, 2000.

WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Investigation**, v, 19, n. 6, p. 621-629, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) WHO programmes and projects: cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>. Acessado em 20 de junho de 2010.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental**. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. 1ª Ed. Chapecó: Argus, 2001, 523 p. WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagem e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG F.; ALTORKI; N.K.; MESTRE, J.R.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 20, :445-51, 1999.

ZOU, Z.W.; XU, L.N.; TIAN, J.Y. Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from *Salviae miltiorrhizae*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 28, p. 241-245, 1993.

## **ANEXOS**

- ✓ Artigo submetido para Bioresource Technology (ISSN 0960-8524), Fator de Impacto 4,253 (JCR 2009).

## Supercritical fluid extraction of *Cordia verbenacea* DC improves antitumor activity

Eduardo B. Parisotto<sup>1</sup>, Eliane M.Z. Michielin<sup>2</sup>, Fernanda Biscaro<sup>1</sup>, Karina Bettega Felipe<sup>1</sup>, Sandra R.S. Ferreira<sup>2</sup>, Rozangela C. Pedrosa<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Biochemistry Department - Federal University of Santa Catarina – UFSC- CEP 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Chemical Engineering and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina EAQ/UFSC.

\* Corresponding author: [roza@ccb.ufsc.br](mailto:roza@ccb.ufsc.br) (R.C. Pedrosa)

### ABSTRACT

The present study describes the antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. (Borraginaceae), a traditional medicinal plant that grows widely along the southeastern coast of Brazil. The extracts were obtained using Classical organic solvent extraction (COSE) with ethanol as solvent and the supercritical fluid extraction (SFE) using carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) at 300 bar, 50°C and solvent flow rate of 0.3 kg/h. Both extracts were screened against the Ehrlich carcinoma cell line by the MTT assay, an endpoint of cytotoxicity used in cell culture, and [<sup>3</sup>H] Thymidine DNA incorporation assay to investigate both cell proliferation and antitumor activity using male Balb/c isogenic mice inoculated with the Ehrlich Ascites carcinoma. The following parameters were analyzed: mean survival time (MST), body weight, abdominal circumference, tumor and packed cell volume and viable and nonviable tumor cell count of EAC-bearing mice. The treatment using the extract from SFE, compared with the COSE extract, decreased the tumor volume, the body weight and the packed cell volume. The SFE treatment also increased the MST while improved the relationship of non viable/viable cell count. Therefore, it was strongly detected the contribution of the high pressure extraction to enhance the cytotoxicity and the antitumor activity of extracts from *C. verbenacea*.

**Key-words:** *Cordia verbenacea*. Supercritical fluid extraction. Antitumor Activity.