

Nádia Cristina Falcão Bucker

**EFEITO ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO DE *BIDENS PILOSA*
LINNÉ E *CASEARIA SYLVESTRIS* SWARTZ**

Florianópolis

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Nádia Cristina Falcão Bucker

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Nádia Cristina Falcão Bucker

**EFEITO ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO DE *BIDENS PILOSA* E
*CASEARIA SYLVESTRIS***

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 14 de julho de 2012.

Prof.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.^a

Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Rozangela C. Pedrosa, Dr.^a

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Danilo Wilhelm Filho, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Fátima Regina Mena Barreto Silva, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais, Newton e Noélia, pelo amor incondicional, confiança, incentivo, investimento, ensinamentos, apoio e dedicação. Pelas pessoas exemplares que sempre foram. Por terem formado as bases da pessoa que sou.

À minha irmã amada Nívea, pelo carinho, amor e por toda admiração. Ao Alex, pelo carinho.

Ao Augusto (Bê), namorado, noivo, marido e proeza, pela compreensão e paciência, pelo apoio e confiança, mas também pela exigência, que me faz ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-se feito constantemente presente em minha vida.

Aos meus pais, Newton e Noélia, pela contribuição na formação do meu caráter, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e dedicação da vida toda.

A minha irmã Nívea e querido Alex, pelo amor, amizade, companhia e apoio durante a realização desse trabalho.

Ao meu marido, Augusto, pelo amor, paciência, compreensão e incentivo durante toda esta trajetória.

Aos queridos Adelino e Sirley, pelo incentivo e companheirismo nos momentos delicados.

A querida Iris pela atenção aos meus sonhos, incentivo e carinho.

A minha orientadora Rozangela Curi Pedrosa, por me receber de braços abertos, confiar em mim e por compartilhar com muita sabedoria o seu saber. Pela amizade, incentivo e dedicação. Meu infinito apreço.

A Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira, pela confiança e orientação.

A Patrícia Benelli, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Dias, pela amizade, carinho, prontidão e significativo aprendizado científico.

A equipe do Instituto de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, coordenada pela Profa. Dra. Maria Helena Rossi, que prepararam os extratos utilizados em nosso estudo.

A equipe da Prof^a. Dr^a. Vanilde Citadini Zanette (UNESC) pela disposição.

Ao Professor Claus Pich, pelo auxílio referente aos testes de atividade nucleásica.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX):

Eduardo Benedetti Parisotto, Fabiana Ourique, João Francisco Gomes Correia, Karina Bettega Felipe, Maicon Kviecinski, Mirelle Sifroni Farias, Tânia Fischer Günter, Tatiane Cardozo, Valdelucia Grinevicius e Viviane Polli, pela convivência, amizade, discussões, apuros e momentos agradáveis que passamos.

Vocês são a minha família postíça. Juntos vivemos momentos de muita alegria e momentos tensos.

Esse trabalho é nosso, sem vocês não chegaria até aqui; agradeço profundamente cada um de vocês, que me ensinaram e me ajudaram nessa caminhada.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano.

Aos que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que me ajudaram de alguma maneira para a conquista de mais um sonho.

A todos vocês, fica a minha eterna gratidão.

RESUMO

Efeito Antitumoral e Antiangiogênico de Extratos Bruto e Supercrítico de *Bidens pilosa* e *Casearia sylvestris*

O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como as que utilizam as plantas medicinais, tem despertado grande interesse no tratamento do câncer, pois as terapêuticas tradicionais não são capazes de regredir totalmente a evolução da doença e/ou apresentam elevada toxicidade. *B. pilosa* e *C. sylvestris*, plantas medicinais que possuem vários usos populares no Brasil e outros países americanos, têm sido indicadas para o tratamento de tumores. Neste estudo a extração supercrítica (ESC) foi o método de escolha, por seu bom fracionamento presentes na matriz vegetal. Assim sendo, o presente trabalho se propôs avaliar as atividades citotóxica, antiproliferativa, antitumoral, nucleásica, antiangiogênica e pró-apoptótica dos extratos bruto e supercrítico de *B. pilosa* e *C. sylvestris* em diferentes condições de extração utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Para se atingir tal objetivo, foram realizados experimentos para avaliar primeiramente a atividade citotóxica (MTT) *in vitro* com extrato bruto (EB) (0-500 µg/mL) e nos extratos na extração supercrítica (ESC) 250bar/40°C (0-100 µg/mL), e a atividade antiproliferativa através do ensaio clonogênico (100 e 200 µg/mL) dos extratos de *B. pilosa*. Os resultados obtidos no MTT e ensaio clonogênico mostraram que os EB e ESC 250 bar/40°C de *B. pilosa* foram ineficazes em reduzir a viabilidade celular e antiproliferativa em células MCF-7 e T-24. A partir dos resultados obtidos com *B. pilosa* descritos acima, foram realizados os ensaios de viabilidade celular (MTT) em células MCF-7 (5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL) e T-24 (1; 2,5; 5; 7,7 e 10 µg/mL) com as diversas condições de ESC de *C. sylvestris*. Já o EB de *C. sylvestris* foi realizado em células MCF-7, em concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL e em T-24 nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL. Além disso, foi avaliado o efeito dos extratos (EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300bar/40°C) sobre o DNA plasmidial através da atividade nucleásica. A atividade antitumoral *in vivo* foi realizada em

camundongos Balb/C inoculados com o TAE e tratados com EB de *C. sylvestris* e ESC (EtOH5% 300 bar/40°C e EtOac5% 300bar/40°C) de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg e através da atividade antiangiogênica em ovos fertilizados de *Gallus domesticus*, através do ensaio da membrana corioalantóica (MCA), nas mesmas concentrações de 1, 5 e 10 mg/kg/dia. Também foi avaliada a capacidade pró-poptótica, através do ensaio de anexina V por citometria de fluxo em células TAE retiradas dos camundongos após o tratamento com os extratos supercríticos EtOH 5% 300bar/40°C de 0,1 mg/kg/dia, EtOac5% 300bar/40°C de 0,1mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C de 1 mg/kg/dia, que elevaram o percentual de células apoptóticas e necróticas de *C. sylvestris*. Os resultados demonstraram que os extratos supercríticos (EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300bar/40°C) de *C. Sylvestris* reduziram de maneira significativa a viabilidade de células MCF-7 e T-24. Em relação à avaliação da atividade nucleásica com o extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C, se observou que houve dano direto ao DNA, sendo que o mesmo foi dose-dependente. Os ensaios *in vivo* demonstraram que os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300bar/40°C apresentaram atividades antitumorais consideráveis. O tratamento com os extratos causaram importante inibição do crescimento tumoral nos camundongos, principalmente o extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C (0,1 mg/kg/dia), causando também aumento do percentual médio de longevidade (PAL). O ensaio da anexina V revelou que a morte celular induzida pelos extratos supercríticos foi do tipo apoptose (EtOH 0,1 mg/kg/dia e EtOac 0,1 mg/kg/dia) e necrose (EtOac 1 mg/kg/dia). A atividade antiangiogênica dos EtOH5% 300bar/40°C e EtOAc5% 300bar/40°C (1, 5 e 10 mg/kg/dia) mostrou que os extratos foram capazes de reduzir de forma significativa o percentual de vasos sanguíneos em torno do embrião, sendo este efeito inversamente proporcional às concentrações.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*, *Bidens pilosa*, citotoxicidade, apoptose, efeito antitumoral, efeito antiangiogênico, extração supercrítica.

ABSTRACT

Anti-tumor and Anti-angiogenic Effect of Supercritical Extracts from *Bidens pilosa* Linné and *Casearia sylvestris* Swartz

The development of new therapies, such as therapies using medicinal plants, has aroused great interest in cancer treatment, because the available therapies are not able to completely regress the disease progression and/or presents high toxicity. *B. pilosa* and *C. sylvestris*, medicinal plants that possess multiple popular uses in Brazil and other American countries, has been indicated for tumor treatment. In this study, the supercritical extraction (ESC) was the choice method for its superior performance in isolation of chemical compounds. Therefore, this study aimed to assess the cytotoxic, antiproliferative, antitumor, nucleasic, antiangiogenic and apoptotic activity of supercritical extract of *B. pilosa* and *C. sylvestris* at different extraction conditions using experimental models *in vitro* and *in vivo*. To achieve this goal, experiments were performed previously to evaluate the cytotoxic activity (MTT) *in vitro* with EB (0-500 µg/mL) and supercritical extract 250bar/40 °C (0-100 µg/mL), and antiproliferative activity via the clonogenic assay of *B. pilosa* extracts. The results obtained from MTT and clonogenic assay demonstrated that the *B. pilosa* EB and supercritical extract 250bar/40°C were ineffective in reducing cell viability and antiproliferative in MCF-7 cells and T-24. Considering the results obtained with *B. pilosa* described above, assays were performed in cell viability (MTT) in MCF-7 cells (5, 10, 20, 40 and 80 µg/mL) and T-24 (1; 2.5; 5; 7.7 and 10 µg/ml) with ESC conditions with *C. sylvestris*. The EBC was performed on MCF-7 cells at concentrations of 62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/mL and T-24 in concentrations 10, 25, 50, 75 and 100 µg/ mL. Furthermore, the effect of extracts (EtOH5% 300bar/40°C and EtOac5% 300bar/40 °C) on plasmid DNA through the nuclease activity was also evaluated. The *in vivo* antitumor activity was performed in Balb/C mice inoculated with TAE treated with EBC and supercritical extract (EtOH5% 300bar/40°C and EtOac5% 300bar/40°C) of *C. sylvestris* at concentrations of 0.1, 1 and 10 mg/Kg and through the

antiangiogenic activity of *Gallus domesticus* eggs fertilized by the chorioallantoic membrane assay (CAM) at the same concentrations of 1, 5 and 10 mg/kg/day. The pro-apoptotic ability was also evaluated by annexin V essay using flow cytometry in TAE cells taken from mice after treatment with the supercritical extract EtOH5% 300bar/40°C of 0.1 mg/kg/day, EtOac5% 300bar/40°C of 0.1 mg/kg/day and EtOac 1mg/kg/day of 1 mg/kg/day that increased the apoptotic and necrotic cells percentage of *C. sylvestris*. The results demonstrated that the supercritical extract (EtOH5% 300bar/40°C and EtOac5% 300bar/40°C) of *C. Sylvestris* significantly reduced the viability of MCF-7 and T-24 cells. Regarding the nuclease activity assessment with the supercritical extract EtOH5% 300bar/40°C, there was a direct dose-dependent damage on DNA. *In vivo* assays demonstrated that supercritical extract EtOH5% 300bar/40°C and EtOac5% 300bar/40°C showed considerable antitumor activity. The treatment with the extracts caused significant inhibition of tumor growth in mice, mainly the supercritical extract EtOH5% 300bar/40°C (0.1 mg/kg/day), also causing increase in the average percentage of longevity (PAL). The annexin V essay revealed that the induced cell death by extracts was apoptosis type (EtOH5% 300bar/40°C 0.1 mg/kg/day and EtOac5% 300bar/40°C 0.1 mg/kg/day) and also necrosis type (EtOac5% 300bar/40°C 1mg/kg/day). The antiangiogenic activity of the EtOH5% 300bar/40°C and EtOac5% 300bar/40°C (1, 5 and 10 mg/kg/day) demonstrated that the extracts were able to reduce significantly the percentage of blood vessels around the embryo being this effect inversely proportional to their concentrations.

Keywords: *Casearia sylvestris*, *Bidens pilosa*, cytotoxicity, apoptotic and antitumor effect, antiangiogenic effect, supercritical extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação simplificada das principais vias envolvidas na sinalização para a apoptose.....	33
Figura 2 - Modos de formação de vasos	36
Figura 3 - Bases moleculares do brotamento de vasos.....	37
Figura 4 - Visão simplificada de alguns passos da angiogênese tumoral.....	39
Figura 5 - <i>Bidens pilosa</i> Linné.....	44
Figura 6 - Aspectos gerais de <i>C. sylvestris</i> Swart.....	46
Figura 7 - Estrutura química e estrutura geral das casearinas.....	47
Figura 8 - Estrutura química das casearvestrinas.....	48
Figura 9 - Estrutura química dos derivados do ácido.....	49
Figura 10 - Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas.....	57
Figura 11 - Esquema de corte da molécula de DNA Plasmidial.....	59
Figura 12 - Imagem típica de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos.....	59
Figura 13 - Efeito citotóxico dos extratos EB (A) e ESC 250Bar/40°C (B) de <i>B. pilosa</i> nas diferentes concentrações testadas (0-500 µg/mL e 0-100 µg/mL para EB e ESC, respectivamente) (24 horas de incubação) na viabilidade das células T-24.....	66

- Figura 14 - Efeito do tratamento com os extratos EB e ESC 250Bar/40°C de *B. pilosa* nas concentrações de 100-200 µg/mL (24 horas de incubação) na formação de colônia de células T-24.....67
- Figura 15 - Efeito dos tratamentos com os diferentes extratos de *C. sylvestris* nas diferentes doses testadas (após 24 h) na viabilidade da linhagem T-24.....69
- Figura 16 - Efeito do tratamento com o extrato EB de *C. sylvestris* nas concentrações de 100-200 µg/mL na formação de colônia de células T-24.....70
- Figura 17 - Efeito do extrato bruto e supercríticos de *C. sylvestris* na DNA plasmidial. Representa a triagem dos extratos (EB – extrato bruto; EtOH - EtOH5% 300bar/40°C; EtOac - EtOac5% 300 bar/40°C; CP: Eco RI) nas concentrações de 1 e 10 mg/mL.....71
- Figura 18 - Representa as diferentes concentrações de EtOH5% 300bar/40°C testadas.....72
- Figura 19 - Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com EB de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.....75
- Figura 20 - Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.....75
- Figura 21 - Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com extrato supercrítico EtOac5% 300bar/40°C de *C. sylvestris* nas

concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.....76

Figura 22 - Apoptose *in vivo* induzida pelo tratamento de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich com os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia, EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C 1 mg/kg/dia.....77

Figura 23 - Atividade antiangiogênica apresentada pelo EB (A), EtOH5% 300bar/40°C (C) e EtOac5% 300 bar/40°C (E) e imagens representativa dos mesmos (B), (D) e (F), respectivamente.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.....	28
Tabela 2 - Valores das CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos do efeito citotóxico dos extratos bruto e supercrítico de <i>C. Sylvestris</i> sobre células MCF-7.....	68
Tabela 3 - Resultados dos parâmetros cronofomofisiológicos de camundongos (n=6) previamente inoculados com TAE e tratados com Doxorubicina (Controle Positivo, CP), Controle Negativo (CN) e extrato bruto de <i>C. sylvestris</i> (EB).....	73
Tabela 4 - Resultados dos parâmetros cronofomofisiológicos de camundongos (n=6) previamente inoculados com TAE e tratados com Doxorubicina (Controle Positivo, CP), Controle Negativo (CN) e extrato supercritico EtOH5%/300 bar/40°C (EtOH) de <i>C. Sylvestris</i>	73
Tabela 5 - Resultados dos parâmetros cronofomofisiológicos de camundongos (n=6) previamente inoculados com TAE e tratados com Doxorubicina (Controle Positivo, CP), Controle Negativo (CN) e extrato supercritico.....	74
Tabela 6 - Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidos após o tratamento com os extratos supercríticos administrados em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPF	-	Agarose de Baixo Ponto de Fusão
APFN	-	Agarose de Ponto de Fusão Normal
CI ₅₀	-	Concentração Inibitória 50%
DISC	-	Death-Inducing Signalling Complex
DOXO	-	Doxorrubicina
EBB	-	Extrato Bruto de <i>B. pilosa</i>
EBC	-	Extrato Bruto de <i>C. sylvestris</i>
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMC	-	Ensaio da Membrane Córioalantóide
F-1	-	Forma Superenovelada
F-2	-	Forma Circular Aberta
F-3	-	Forma Linear
FADD	-	Fas-Associated Death Domain Protein
FCEV	-	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
GLG	-	Glicosaminoglicanas
i.p.	-	Via Intraperitoneal
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
MGDE	-	Metil Galato-3,5-Dimetil Éter
MPT	-	Mitochondrial permeability transition
MTT	-	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolil
PAL	-	Percentual do Aumento de Longevidade
PKA	-	Proteína Cinase A
PKB	-	Proteína Cinase B
RMC	-	Receptor de Morte Celular
RMD	-	Resistente à Multidrogras
RPMI	-	Meio Roswell Park Memorial Institute
TAE	-	Tumor Ascítico de Ehrlich
TFS	-	Tampão Fosfato de Salina
TMS	-	Tempo Médio de Sobrevida
R-FNT	-	Receptor do Fator de Necrose Tumoral p55
FNT- α	-	Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	27
1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER	27
1.3 RELAÇÃO ENTRE CICLO CELULAR, APOPTOSE E CÂNCER.....	30
1.4 ANGIOGÊNESE E CÂNCER	35
1.5 TERAPIA DO CÂNCER	40
1.6 PLANTAS MEDICINAIS.....	42
1.6.1 <i>Bidens pilosa</i> Linné.....	44
1.6.2 <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	46
1.7 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA.....	50
1.8 OBJETIVOS.....	53
1.8.1 Objetivo Geral	53
1.8.2 Objetivos Específicos	53
2. METODOLOGIA	54
2.1 COLETA DE <i>CASEARIA SYLVESTRIS</i> SWART E <i>BIDENS PILOSA</i> LINNEÉ.....	54
2.2 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>CASEARIA SYLVESTRIS</i> E <i>BIDENS PILOSA</i>	54
2.3 PREPARO DOS EXTRATOS SUPERCRTICOS DE <i>CASEARIA SYLVESTRIS</i> E <i>BIDENS PILOSA</i>	545
2.4 CULTURA DE CÉLULAS MCF-7 E T24	545
2.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	556
2.5.1 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio do MTT	56
2.5.2 Ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico.	58
2.6 AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA PLASMIDIAL.	58
2.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	60
2.7.1 Camundongos Balb/C isogênicos.	60
2.7.2 Avaliação da atividade antitumoral utilizando o modelo do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)	61
2.7.2.1 Protocolo experimental.	61
2.7.2.2 Avaliações Cronomorfológicas..	62
2.7.2.2.1 <i>Avaliação da Média de Sobrevida</i>	62
2.7.2.2.2 <i>Avaliação da Variação de Peso</i>	62

2.7.2.2.3	<i>Avaliação da Variação da Medida da Circunferência Abdominal</i>	62
2.7.3	Avaliação do tipo de morte celular induzida pelos tratamentos	63
2.7.4	Avaliação da atividade antiangiogênica utilizando o método da Membrana Corioalantóica Embrionária (CAM)	64
2.7.4.1	Ovos	64
2.7.5	Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM)	64
2.7.6	Análise Estatística	65
3.	RESULTADOS	65
3.1	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	65
3.1.1	Extratos de <i>Bidens pilosa</i> Linné	65
3.1.1.1	Avaliação da Atividade Citotóxica pelo ensaio do MTT	65
3.1.1.2	Atividade Antiproliferativa (ensaio clonogênico)	66
3.1.2	Extratos de <i>Casearia sylvestris</i>	67
3.1.2.1	Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio do MTT	67
3.1.2.2	Atividade Antiproliferativa (ensaio clonogênico)	69
3.1.3	Avaliação de dano ao DNA plasmidial	70
3.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	72
3.2.1	Avaliação da atividade antitumoral utilizando o modelo do tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	72
3.3	AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELOS TRATAMENTOS	76
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA	78
4.	DISCUSSÃO	81
5.	CONCLUSÕES	93
6.	PERSPECTIVAS	95
	REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, sendo considerado como maligno, pois as células tumorais podem invadir tecidos e órgãos, espalhando-se por outras regiões do corpo em um fenômeno denominado metástase (INCA, 2012). A divisão destas células é muito rápida e incontrolável, caracterizando a formação de neoplasias malignas (ALISSON, 2002). Tal proliferação celular anormal pode ocorrer tanto em tumores malignos quanto em benignos (NAKAGAWA & LOPES, 2000). Caracteristicamente, os tumores benignos são constituídos por massas celulares apresentando proliferação lenta e com características similares ao tecido normal, sendo que uma cápsula separa a massa neoplásica do tecido sadio.

Apesar de Hipócrates (460 – 377 a.C.) ter utilizado o termo grego *karkinos* (caranguejo) para diferenciar tumores malignos de tumores benignos, o câncer como patologia já era estudado séculos antes. Um dos primeiros registros descritivos de tumores de mama foram encontrados em um papiro egípcio datado entre o período de 3.000 a 1.500 a.C.

O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de tumores, como as terapias que utilizam as plantas medicinais tem despertado grande interesse para terapia do câncer, pois as atualmente disponíveis não são capazes de regredir totalmente a evolução da patologia e/ou apresentam elevada toxicidade. As espécies *Casearia sylvestris* e *Bidens pilosa*, plantas medicinais que possuem vários usos populares no Brasil e outros países americanos, têm sido indicadas para o tratamento de tumores. Nesse contexto, o presente trabalho propôs a avaliar as atividades citotóxica, antiproliferativa, pró-apoptótica, antiangiogênica e antitumoral, dos extratos bruto e supercríticos de *Casearia sylvestris* e *Bidens pilosa*, utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Estudos do INCA estimaram para o biênio 2008-2009 a ocorrência de 466.730 novos casos de câncer no Brasil, sendo que entre os homens houve maior incidência de câncer de próstata e de pulmão, enquanto que entre as mulheres predominaram o câncer de mama e de colo de útero. Estas tendências também foram verificadas a nível internacional apontando, desta forma, o câncer como um problema de saúde pública tanto ao nível nacional quanto internacional (INCA, 2012).

Em relação às últimas décadas, é importante resaltar que o câncer ganhou uma grande dimensão, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, se espera 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2012).

Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária (Tabela 1).

1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER

Independentemente da causa, o câncer pode ser considerado como uma doença celular onde existem alterações nos mecanismos referentes ao controle da proliferação e diferenciação das células, bem como no controle dos processos associados com a morte celular (MOFFAT et al., 2000). Desta forma, o câncer surge quando uma célula, por diversas razões, perde o controle sobre o ciclo, ou seja, sobre o processo de proliferação, diferenciação e morte, passando a se dividir descontroladamente (BERTRAM, 2001). Tal perda do controle do ciclo celular pode ser causada por alteração da expressão de genes devida a alguma mutação ocorrida no DNA, o que determina o aparecimento da neoplasia (DUESBERG & RASNICK, 2000).

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Neoplasia Primária	Estimativa de Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60,18	62,54	15,66	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52,68	52,50	18,16	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17,54	17,49	5,05	21,72
Traqueia e Pulmão	17,21	17,90	4,520	21,85	10,11	10,08	3,06	13,31
Cólon e Reto	14,18	14,75	4,860	23,24	15,96	15,94	5,85	25,27
Estômago	12,67	13,20	3,200	15,34	7,42	7,42	2,17	9,47
Cavidade Oral	9,99	10,41	2,760	13,34	4,18	4,18	1,13	4,92
Laringe	6,11	6,31	1,540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6,21	6,49	1,900	9,28	2,69	2,71	880	3,72
Esôfago	7,77	8,10	1,500	7,26	2,65	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6,19	6,17	2,22	9,53
Linfoma não Hodgkin	5,19	5,40	1,560	7,66	4,450	4,44	1,56	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10,59	10,59	3,49	14,97
Sistema Nervoso Central	4,82	5,02	1,190	5,82	4,45	4,46	1,20	5,23
Leucemias	4,57	4,76	1,180	5,81	3,94	3,94	1,18	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4,52	4,53	1,70	7,39
Pele Melanoma	3,17	3,29	810	4,05	3,06	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43,12	44,80	11,10	53,33	38,72	38,61	10,32	44,50

Considera-se mutação como uma mudança na estrutura linear do DNA que inclui diversas modificações genéticas como no caso de substituições de aminoácidos; deleção ou inserção de nucleotídeos; desbalanço cromossomal ou instabilidade resultando em amplificação, expressão em níveis elevados ou expressão inapropriada de um gene particular; perda de um gene ou a fusão com outro gene como resultado de ruptura cromossomal; rearranjo estrutural, resultando em proteínas quiméricas com função alterada e modificações epigenéticas no DNA, dentre as quais a mais importante é a metilação de citosina em ilhas CpG (BERTRAM, 2001; SOTO & SONNENSCHNEIN, 2004).

Admite-se que o câncer resulta de mutações (herdadas ou adquiridas ao longo da vida) em genes que controlam o crescimento celular e, principalmente, que a evolução desta doença depende da ativação ou desativação de oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais, tornando então clara a importância do estudo das consequências de tais ativações/desativações (WOLF & RAMIREZ, 2001; AUDIC & HARTLEY, 2004). Oncogenes são aqueles genes cuja presença e/ou hiperatividade podem predispor ao desenvolvimento de câncer, uma vez que codificam proteínas que estimulam excessivamente a proliferação celular (AUDIC & HARTLEY, 2004). Proto-oncogenes são os genes que codificam as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular normal e que se tornaram oncogenes após sofrerem mutação. Por fim, os genes supressores tumorais são aqueles que, quando ativos, inibem o crescimento de células tumorais e que podem ser inativados por mutações (BERTRAM, 2001; WOLF & RAMIREZ, 2001).

Alguns estudos indicam que a ativação de proto-oncogenes em oncogenes, pode levar à superexpressão de diversas proteínas e receptores responsáveis pelo crescimento, diferenciação e proliferação de células tumorais. Por exemplo, receptores de fatores de crescimento, que frequentemente estimulam a atividade da tirosina cinase em seus domínios citoplasmáticos que estão superexpressos em muitos tipos de câncer (RAK et al., 1995). Outro exemplo, particularmente importante, se refere à expressão da proteína Ras, constituinte da cascata mitogênica SOS-Ras-Raf-MAPK. Esta se encontra mutada em 25% dos tumores humanos e pode iniciar um fluxo de sinais mitogênicos no interior das

células, sem necessitar da ativação prévia de receptores sensíveis a fatores de crescimento (MEDEMA & BOS, 1993).

Nas células com DNA danificado, quando o gene supressor tumoral p53 está ativado, ocorre a expressão da proteína supressora de tumores p53 que induzem a parada do ciclo celular e sinaliza para a ativação da apoptose nestas células (FENG et al., 2007). No entanto, um dano extenso ao DNA pode causar a inativação deste gene supressor tumoral, particularmente o gene p53, levando à perda do controle da parada do ciclo celular, ocorrendo conseqüentemente, a perda do estímulo para a apoptose levando conseqüentemente ao crescimento do tumor (GHOBRIAL et al., 2005). Muitos tumores malignos como o de mama, pulmão, cólon retal, ovário e próstata, são associados com a inibição da apoptose, especialmente devido à mutação do gene p53 (EISINGER et al., 1998; GRETARSDOTTIR et al., 1998).

É importante ressaltar que o dano ao DNA por si não é um evento mutagênico, pois existem mecanismos de correção destes danos. Durante a proliferação celular, quando ocorre a replicação do DNA, podem ocorrer danos a esta molécula e, no caso da ausência da correção de tais danos, estes são convertidos em alteração genética que pode ser, então, transmitida através da divisão clonal de células portadoras destas alterações (BERTRAM, 2001).

Por fim, do ponto de vista bioquímico, o câncer é considerado uma doença celular caracterizada por um desequilíbrio entre ciclo celular e apoptose, que resulta em perda progressiva dos processos de diferenciação, proliferação e morte, culminando em uma divisão celular descontrolada e no surgimento de tumores (MOFFAT et al., 2000; BERTRAM, 2001).

1.3 RELAÇÃO ENTRE CICLO CELULAR, APOPTOSE E CÂNCER

Se o ciclo celular for o regulador fundamental para os processos de proliferação e crescimento celular, então a regulação do ciclo celular deve ter um papel crucial na formação de tumores malignos, bem como no desenvolvimento de resistência celular à quimioterapia, uma vez que perturbações no ciclo celular são descritas na carcinogênese (SCHWARTZ et al., 2005).

As células normalmente apresentam variações no conteúdo total de DNA durante as distintas fases do ciclo de vida que englobam desde a fase quiescente (G0), a fase de síntese de DNA (S) até a fase de divisão celular (M), que são separadas por intervalos de duração variável (G1 e G2) e, finalmente, a fase de morte celular por apoptose, onde ocorre a fragmentação do DNA (SCHWARTZ et al., 2005). No entanto, nos casos onde o dano ao DNA é extenso, o processo de apoptose pode ser danificado, levando conseqüentemente, à proliferação descontrolada e à instalação do câncer (HENGARTNER, 2000). Ou seja, o câncer está diretamente relacionado à ocorrência de mutações em genes que controlam o ciclo celular e a apoptose, sendo que alguns reguladores do ciclo celular participam de ambos os processos.

Caracterizada por Kerr e colaboradores (1972), a apoptose é reconhecida morfológicamente como um fenômeno de morte celular programada que ocorre individualmente, onde a morte de uma célula não leva à morte das células vizinhas. Tal processo ocorre tanto em organismos unicelulares (protozoários, bactérias, fungos, etc.) quanto na espécie humana (EVAN & LITTLEWOOD, 1998). Em humanos, a apoptose ocorre em situações fisiológicas (colapso endometrial durante a menstruação, deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese) e patológicas (doenças neurodegenerativas, lesões secundárias após isquemia, osteoporose, entre outras), constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual (ISRAELS & ISRAELS, 1999).

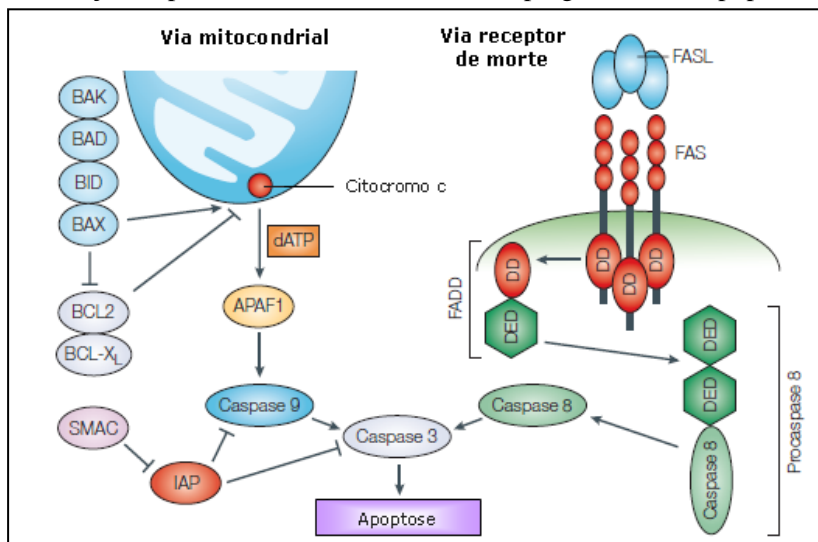
O processo apoptótico é caracterizado por inúmeras alterações morfológicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA (via ativação de endonucleases) e a formação dos corpos apoptóticos, com preservação da membrana plasmática e, conseqüentemente, conservação do conteúdo citoplasmático (ZIMMERMANN et al., 2001; EDINGER & THOMPSON, 2004). Os corpos apoptóticos são reconhecidos e removidos por células fagocíticas, sem que ocorra resposta inflamatória em torno da célula morta (CONTRAN et al., 1996; EDINGER & THOMPSON, 2004). Se não ocorrer fagocitose dos corpos apoptóticos, haverá então necrose secundária (EDINGER & THOMPSON, 2004).

Em geral a apoptose é desencadeada pela ativação de membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases, denominadas caspases. Sob a forma de zimogênios solúveis, as caspases ocorrem no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997).

Existem duas vias principais que levam à ativação das caspases (Figura 1): a via extrínseca ou citoplasmática, e a via intrínseca ou mitocondrial (GHOBRIAL et al., 2005). Na via extrínseca, a apoptose é induzida pela ativação de receptores presentes na superfície externa da membrana celular, chamados receptores de morte (DR: death receptor), cuja família é composta pelas moléculas Fas/CD95, TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Tais receptores, quando ativados, recrutam proteínas adaptadoras, como por exemplo, a proteína adaptadora associada ao Fas, que possui um domínio de morte (FADD; Fas-Associated Death Domain protein). Essas proteínas adaptadoras se unem às pró-caspase 8 ou à 10, formando o complexo sinalizador iniciador da apoptose (DISC; Death-Inducing Signalling Complex). O resultado deste evento é uma ativação em cascata das caspases, onde as caspases iniciadoras (8 ou 10) causam a ativação das caspases executoras (normalmente a caspase 3), culminando nas alterações morfológicas e bioquímicas características de apoptose (GHOBRIAL et al., 2005; BLAISE et al., 2005).

Sabe-se que a via intrínseca é ativada pela ação de diferentes sinais intracelulares e extracelulares, tais como as vias ativadas por agentes capazes de causar danos ao DNA (radiação ultravioleta, substâncias mutagênicas e agentes quimioterápicos), por baixa concentração de nutrientes, por ausência de fatores de crescimento celular e por níveis elevados de espécies reativas de oxigênio. Tais estímulos podem gerar sinais de estresse, que são detectados pela mitocôndria, levando a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol da célula. Em seguida, o citocromo c se liga a Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), desencadeando a ativação da cascata de caspases e, conseqüentemente, da apoptose (ADJEI, 2005; IGNEY & KRAMMER, 2002).

Figura 1 - Representação simplificada das principais vias envolvidas na sinalização para a morte celular programada (apoptose).



O processo de autodestruição da célula por apoptose é altamente regulado, sendo tal regulação exercida em diferentes níveis. As FLIPS (FADD-like interleukin-1b converting enzyme-like protease inhibitory protein) são proteínas que interferem no início da apoptose, diretamente a nível de receptor DR (KRUEGER et al., 2001; IGNEY & KRAMMER, 2002). Essas proteínas foram identificadas em células humanas e, estruturalmente, são semelhantes à pró-caspase 8, permitindo a associação a uma proteína adaptadora e consequente formação do complexo iniciador da apoptose DISC, porém inibindo a ativação da caspase 8 iniciadora (IGNEY & KRAMMER, 2002). Outros reguladores da apoptose, se trata dos membros da família Bcl-2, os quais estão envolvidos no controle da via intrínseca. Essa família de proteínas contém membros que exercem funções opostas, pois algumas proteínas protegem a célula da morte, por atuarem como proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1), e outras conduzem a célula à morte, por atuarem como proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) (GREEN & REED, 1998; BORNER, 2003). Desta forma, os membros dessa família são capazes de integrar sinais de sobrevivência ou

morte celular gerados nos meios intra e extracelulares em função da supressão ou promoção de mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial através do controle da liberação do citocromo c para o citosol (GREEN & REED, 1998; BORNER, 2003).

Outro elemento regulador da apoptose, que também atua no controle da via intrínseca, trata-se da proteína supressora de tumor p53. A ativação dessa proteína acarreta aumento da expressão de Bax, o qual por sua vez, estimula a liberação do citocromo c mitocondrial e consequente morte celular por apoptose (GREEN & REED, 1998).

Como mencionado anteriormente, o processo carcinogênico pode ser considerado como um desequilíbrio entre a proliferação e apoptose, onde está predominando a proliferação celular (HENGARTNER, 2000). A relação entre o ciclo celular e a apoptose ocorre por diferentes genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKB, família Bcl-2 (Bax, Bid), NF-kB, CDK, ciclinas e CKI, uma vez que, após a ativação desses genes, tais proteínas podem induzir a proliferação, a parada do ciclo ou a morte celular (VERMEULEN et al., 2003). No câncer, um ou mais destes genes podem estar mutados, impedindo dessa forma, a morte celular por apoptose. Dentre estes genes se destaca o gene Bcl-2, um gene que se encontra superexpresso em vários tipos de cânceres e que induz a produção da proteína Bcl-2, a qual atua como bloqueadora do processo apoptótico por se associar ao Bax, impedindo a formação do homodímero Bax-Bax (poro mitocondrial) e a liberação do citocromo c (CORY & ADAMS, 2002; GOGVADZE et al., 2009). Este gene e o p53 são os mais frequentemente mutados sendo que, em média, 50% dos tumores apresentam estas mutações (REED, 1998; COLMAN et al., 2000).

A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear que funciona como um fator de transcrição, estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose, estando elevada em diversos tumores. Tal proteína favorece a proliferação celular ao ativar a transcrição de genes que atuam no controle da progressão do ciclo celular e na inibição da transcrição de genes envolvidos na parada do ciclo celular. Além de exercer um papel na progressão do ciclo celular, a proteína c-Myc também apresenta um papel-chave na regulação do processo apoptótico.

Estudos demonstram que tanto a superexpressão quanto a diminuição da expressão de c-Myc, podem levar à morte celular (COLMAN et al., 2000; CONZEN et al., 2000).

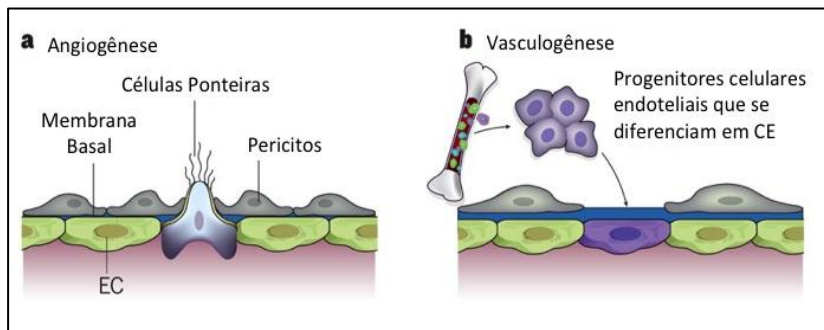
Os eventos moleculares envolvidos na apoptose induzida por c-Myc não estão bem esclarecidos. Em geral, essa proteína induz a apoptose em decorrência da privação de fatores de sobrevivência celular. Nessa condição, a proteína atua ativando a transcrição de Bax pró-apoptótica que leva à liberação do citocromo c da mitocôndria ativando a via intrínseca (REYNOLDS et al., 1994).

Finalmente, seria importante também ressaltar que uma parte considerável da morte celular induzida por quimioterápicos citotóxicos, utilizados na terapêutica do câncer, poderia ser atribuída ao estresse oxidativo gerado através da formação de espécies reativas de oxigênio, que determinam a ativação da via de sinalização de morte por apoptose (NAKAGAWA et al., 2002; TSANG et al., 2003).

1.4 ANGIOGÊNESE E CÂNCER

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes pelo processo de vasculogênese (Figura 2. a e b) (CARMELIET & JAIN, 2011). O processo da angiogênese ocorre inicialmente durante o período embrionário, mas também em indivíduos adultos de forma altamente regulada durante os processos fisiológicos. No organismo adulto, os vasos são quiescentes e raramente formam novos ramos, porém, esta formação vascular fisiológica aparece nos processos de cicatrização de lesões e regeneração endometrial, nos casos de menstruação e na ovulação (CARMELIET, 2000; SWIFT & WEINSTEIN, 2006). A principal função fisiológica da angiogênese é o crescimento, manutenção e maturação dos tecidos normais (LICHTENBERG et al., 1997; FOLKMAN & SHING, 1992).

Figura 2 - Modos de formação de vasos sanguíneos em tecidos normais e em tumores. (a) por brotamento, ou seja, angiogênese; (b) e pelo recrutamento de células derivadas da medula óssea e/ou de células progenitoras endoteliais (CPEs) da parede vascular que se diferenciam em células endoteliais (CEs).



O processo de angiogênese é dividido em quatro etapas: 1) iniciando com a degradação da matriz extracelular adjacente (Figura 3-a); 2) seguida da migração celular (Figura 3-b); 3) proliferação (Figura 3-c) e 4) reorganização e maturação das células endoteliais para formar o tubo capilar (Figura 3-d).

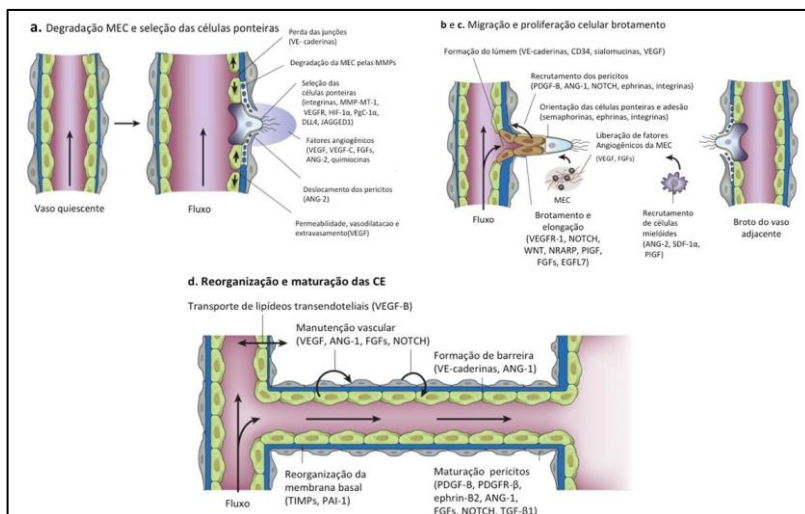
O processo de angiogênese, propriamente dito, inicia-se com um ganho de volume nas células endoteliais que foram recrutadas, via sinalização, e que formarão os brotos capilares. Iniciado o estímulo, a célula endotelial perde as junções celulares (via VE-caderinas) e inicia a síntese e secreção de enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases (MMPs), sendo então denominadas e conhecidas por células ponteiiras ou “tips” (via estímulo de VEGFR-2, DLL4, JAGGED1, NRP1, integrinas, HIF-1 α , MT1-MMP, PGC-1 α) (EIKEN & ADAMS, 2010) As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas que tem por função a degradação da matriz extracelular do tecido adjacente. São considerados reguladores essenciais durante várias fases do processo angiogênicos, incluindo a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, a mobilização e ativação de fatores de

crescimento e da produção de fragmentos com atividade pró- ou anti-angiogênico. Além disto, o papel das MMPs na migração e invasão pode influenciar a proliferação de células endoteliais e sobrevivência, modificando o equilíbrio entre as moléculas angiogênicas (VEGF, VEGF-B, FGFs, ANG-2 e quimiocinas) e anti-angiogênicas. Desta forma, a migração das células endoteliais é conseguida em direção ao gradiente de concentração da fonte do estímulo angiogênico (EIKEN & ADAMS, 2010; EBLE & NILAND, 2009). Simultaneamente à migração das células endoteliais, acontece o processo de proliferação (Figura 3. b e c). Ocorre o alinhamento das células com auxílio da expressão de moléculas adesivas (semaforinas, efrinas e integrinas), liberação de fatores angiogênicos da MEC (via VEGF e FGFs) e recrutamento de células mielóides (via ANG-2, SDF-1 alfa e PIGF), com conseqüente formação de corpos vacuolares dentro delas, culminando na formação dos tubos capilares.

Essas células, agora em brotamento, são capazes de deposição (via TIMPs, PAI-1) de uma nova MEC que contribui de forma significativa para a reorganização (via VE-caderinas e ANG-1) e manutenção da morfogênese vascular (via VEGF, ANG-1, FGFs, NOTCH) (SAWAMIPHAK et al., 2010; WANG et al., 2010) (Figura 3-d). Nos vasos em formação, os pericitos (estimulados via ANG-2) são raros. Elas são células semelhantes às musculares lisas, que envolvem os capilares endoteliais, conferindo sustentação e capacidade mecânica, ou seja, sua presença está intimamente ligada à maturação dos vasos recém-sintetizados. O processo é concluído com o estabelecimento de um novo ramo funcional, com fluxo sanguíneo contínuo (Figura 3-d).

Figura 3 - Bases moleculares do brotamento de vasos: os passos sucessivos de brotamento de vasos sanguíneos são mostrados, com moléculas chave envolvidas em cada passo do processo, sempre denotadas em parênteses. (a) após estímulo inicial com fatores angiogênicos, o vaso quiescente sofre dilatação e as CE ponteadas são selecionadas para garantir a formação do ramo. A formação da CE ponteira requer degradação da MB, descolamento dos pericitos e afrouxamento das junções de CE. A permeabilidade aumentada permite

o extravasamento de proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina) para deposição da MEC provisória; além de proteases, que permitem a migração e o remodelamento da matriz intersticial pré-existente. Somente a MB entre as CE e pericitos está representado por questões didáticas. (b) e (c) CE ponteiiras navegam em resposta aos estímulos de semaforinas e efrinas e aderem à MEC (via integrinas), para migração. As células do broto, logo atrás das CE ponteiiras, proliferam, se alongam e formam o lúmen celular, que através da fusão dos mesmos, origina um neovaso perfundido. Os pericitos são atraídos para dar suporte e nova MEC começam a se compor, tornando o vaso estável. Células mielóides também são recrutadas, quando associadas a tumores, produzem fatores pró-angiogênicos juntamente com a MEC. (d) após a fusão dos ramos vizinhos, a perfusão é estabelecida e a quietude é restabelecida. (CARMELIET & JAIN, 2011).

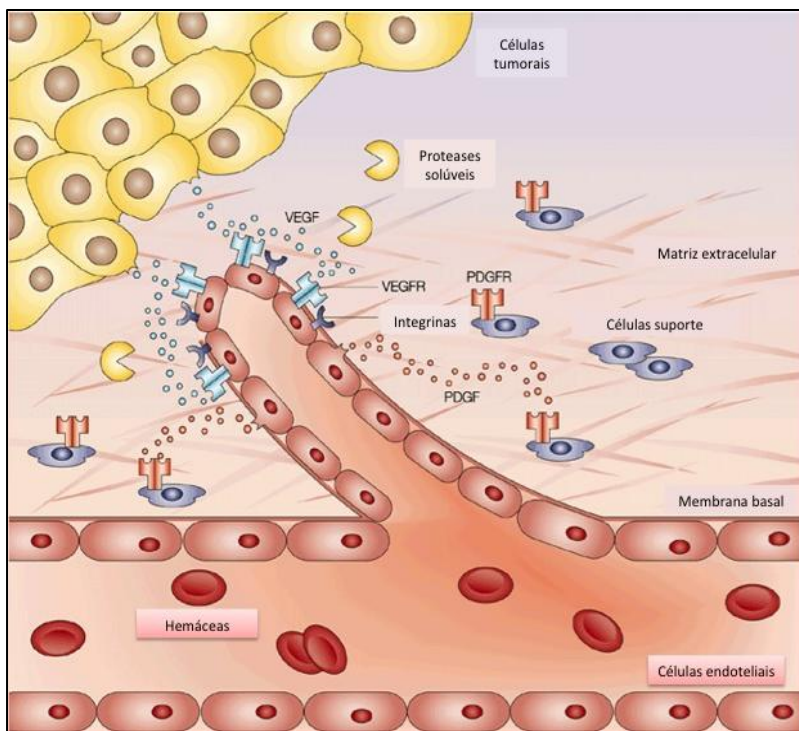


A angiogênese faz-se presente além de eventos fisiológicos, em eventos patológicos, onde a neovascularização tem um papel fundamental, como no caso da artrite reumatóide, psoríase, retinopatia diabética e no crescimento de tumores benignos e malignos (Figura 4).

O papel proeminente da angiogênese na biologia do câncer foi primeiramente descrita por FOLKMAN (1971), que postulou e

descreveu o fenômeno da “dormência tumoral” na ausência de neovascularização. Atualmente, reconhece-se que a angiogênese não é apenas essencial para o crescimento do tumor, mas está também implicada na progressão inicial do mesmo, bem como no crescimento de micro-metástases latentes em lesões metastáticas clinicamente detectáveis.

Figura 4 - Visão simplificada de alguns passos da angiogênese tumoral.



Durante o crescimento do tumor, a angiogênese é induzida por uma variedade de estímulos, como VEGF, FGFs, integrinas dentre outros. Entretanto, a rápida proliferação celular do tecido em crescimento, leva a uma condição de hipóxia, uma vez que ocorre um aumento na demanda de oxigênio. Sendo este oxigênio limitado em função do tamanho do tecido, a hipóxia surge como um importante

ativador do crescimento de vasos sanguíneos via fator-1 α (HIF-1 α) e HIF-1 (Prager et al., 2009).

A etapa final na progressão de um tumor é a metástase. E a neovascularização de um tumor primário em crescimento aumenta a possibilidade de que células cancerosas invadam a corrente circulatória. Essa capacidade de invasão facilita a metástase em outros órgãos, com conseqüente aumento na mortalidade do paciente. Portanto, em neoplasias, a angiogênese é considerada responsável pelo crescimento e metástase da mesma (CARMELIET & JAIN, 2011; ADAMS & ALITALO, 2007).

As células tumorais liberam fatores pró-angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que se difundem para os tecidos circundantes e se ligam aos receptores nas células endoteliais dos vasos pré-existentes, levando à sua ativação. Tais interações entre as células endoteliais e células tumorais leva à secreção e ativação de várias enzimas proteolíticas, tais como metaloproteínases de matriz (MMPs), que degradam a membrana basal e a matriz extracelular. A degradação permite ativação de células endoteliais - que são estimuladas a proliferar (via fatores de crescimento) e a migrar para o tumor. Moléculas de integrinas específicas ajudam a estimular o brotamento do vaso sanguíneo em direção ao tumor. As células endoteliais depositam uma nova membrana basal e fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que atrai células de suporte para estabilização do novo vaso (PDGFR, receptor de PDGF; VEGFR, receptor de VEGF).

1.5 TERAPIA DO CÂNCER

Com relação ao tratamento do câncer, as principais abordagens terapêuticas realizadas na atualidade são: a excisão cirúrgica, a radioterapia ou a quimioterapia; associadas ou não, destacando-se a quimioterapia por se tratar de uma abordagem sistêmica que permite o tratamento de tumores que apresentam desenvolvimento de micrometástases disseminadas (AJITH & JANARDHANAN, 2002).

Vale ressaltar que o sucesso do tratamento está intimamente relacionado à sensibilidade das células neoplásicas quando expostas aos

fármacos, destacando que estas células apresentam intensa atividade proliferativa que, em geral, as tornam mais suscetíveis do que as células normais quiescentes. Ainda que possam existir pequenas diferenças de sensibilidade entre estes tipos celulares, no entanto, o problema mais comum refere-se à elevada toxicidade dos antitumorais atuais (RUSTIGI & PODOLSKY, 1996).

Entre os fármacos mais empregados na quimioterapia se destacam os antimetabólitos capazes de promover a inibição da biossíntese de purinas (ex: mercaptopurina, tioguanina) ou de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxiuréia, fluoruracila); aqueles capazes de atuar diretamente alquilando o DNA (ex: cisplatina) ou de interagirem com as enzimas que participam da transcrição e da replicação do DNA como a topoisomerase II (ex: bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, etoposídeo) assim como agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina) (RICHARDSON, 2000). Destaque especial deve ser atribuído aos antibióticos antitumorais, considerados como os mais importantes agentes quimioterápicos atuais, sendo exemplos desta classe as antraciclinas (daunorrubicina e doxorrubicina), bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácido aureólico (ROCHA et al., 2001).

Apesar de existirem vários fármacos empregados no tratamento do câncer, as abordagens terapêuticas adotadas atualmente apresentam falhas que dificultam ou impedem a completa remissão dos distintos tipos de câncer. Isto deve-se ao fato de que muitos desses agentes quimioterápicos são responsáveis por vários efeitos adversos, elevada toxicidade, inespecificidade e desenvolvimento de acentuada resistência à quimioterapia em células tumorais (MDR= multidrug resistance), restando ao clínico a adoção de terapias de associação de dois ou mais fármacos (JENDIROBA et al., 2002).

Desta forma, quando se considera o tratamento do câncer, na realização de pesquisas para a obtenção de novos compostos ou associação de compostos bioativos isolados de plantas ou sintéticos que sejam capazes de substituir os fármacos disponíveis com vantagens relacionadas à eficácia, a segurança e qualidade de vida do paciente, são desejáveis.

1.6 PLANTAS MEDICINAIS

Os constituintes naturais de origem vegetal levaram à descoberta de muitos fármacos antitumorais, antibacterianos, antivirais e imunossuppressores utilizados atualmente na clínica médica. Muitas vezes, estes princípios ativos servem como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Simultaneamente, também levam à identificação de novas vias bioquímicas envolvidas no processo da doença (KHEMRAJ BAIRWA, 2010).

Planta medicinal é conceitualmente descrita como sendo o vegetal total ou partes dele, que contém moléculas cuja empregabilidade se faz útil para fins terapêuticos. Tais moléculas e/ou precursores delas são amplamente utilizadas como medicamentos na medicina alternativa, fitoterapia e alopatia (AMOROZO, 2002; Organización Mundial de la SALUD, 2002).

O território brasileiro abrange a maior diversidade de espécies de plantas do mundo. Entretanto, menos do que 10% dessas espécies foram avaliadas no que diz respeito às características biológicas e menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhado (LUNA et al., 2005; FERREIRA et al., 2011).

A utilização de plantas medicinais para terapia de diversas doenças tem crescido significativamente nas últimas décadas o que demonstra a grande aceitação pela população e pela comunidade médica como recurso terapêutico alternativo à alopatia. Por outro lado, o crescimento da fitoterapia traz à tona um grande interesse científico para validação do uso popular, comprovação da eficácia e segurança destas plantas (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2001). Além disto, inúmeras plantas medicinais carecem de maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica propriedades citotóxicas de muitas delas (CALIXTO, 2005).

Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos produzidos em nível mundial são derivados diretos de plantas. Além disto, compostos primeiramente identificados e presentes nas plantas utilizadas na medicina popular constituem a base dos princípios ativos de muitos medicamentos utilizados na clínica moderna. Neste sentido, se estima que, para o caso dos medicamentos antitumorais, cerca de 70% deles

sejam derivados diretos ou indiretos de plantas (KVICINSKI et al., 2011; PARISOTTO et al., 2012;). Como exemplos importantes, se pode citar o caso do fármaco digoxina extraído de espécies de *Digitalis*; da quinina e quinidina, obtidas de espécies do gênero *Cinchona*; da atropina e escopolamina, isoladas de *Atropa belladonna*; da morfina e da codeína presentes em *Papaver somniferum* (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2001; FELLOWS, 1992).

Uma série de metabólitos secundários de plantas são estudados visando aplicações clínicas no tratamento de neoplasias malignas (NEWMAN et al., 2003; BUTLER, 2004). Assim, a partir de *Catharantus roseus* (Apocynaceae) (*Vinca*) foram isoladas vincristina e vimblastina (alcalóides); de espécies do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae) foram obtidos derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) foi isolado o paclitaxel (Taxol[®]) além de taxanos isolados de outras espécies do gênero *Taxus*; de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) foram obtidos derivados semi-sintéticos da camptotecina altamente eficaz no tratamento de câncer de pâncreas e cólon. (SRINIVASTA et al., 2005; DE MESQUITA et al., 2009).

Muitos metabólitos primeiramente identificados e isolados de plantas, hoje podem ser obtidos com vantagens, sejam elas em termos de custo financeiros, ou para a natureza, e também em termos rendimento. Alguns deles se encontram ainda em fase de desenvolvimento, como é possível citar o caso da juglona, um pigmento quinóide primeiramente isolado das nozeiras do gênero *Juglans sp.* A juglona demonstrou resultados promissores em ensaios *in vitro* em termos de citotoxicidade sobre um painel de células tumorais humanas (BONIFAZI et al., 2010; MONTENEGRO et al., 2010), efeito antiproliferativo e inibidor da motilidade celular, sendo potencialmente útil para o tratamento dos casos metastáticos (KVICINSKI et al., 2012). Além disso, a juglona tem atividade antitumoral *in vivo* e sensibilidade contra o melanoma resistente à quimioterapia/radioterapia, B16F1, em camundongos C57BL/6J (AITHAL et al., 2012).

Para a seleção de uma espécie vegetal cujas atividades biológicas devem ser estudadas, algumas abordagens podem ser levadas em conta

como, por exemplo, a etnobotânica, etnofarmacológica, entre outras. A etnofarmacológica se baseia em associar informações de cunho popular sobre a flora nacional com estudos realizados em laboratórios especializados (ELIZABETSKY, 1987).

Desta forma, o presente trabalho iniciou a partir da avaliação de levantamentos etnofarmacológicos, que indicaram *Bidens pilosa* Linné e *Casearia sylvestris* Swartz por suas propriedades antitumorais na medicina popular. Além disso, alguns estudos tem confirmado a presença de constituintes promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (SANTOS et al., 2011; KVIECINSKI et al., 2008).

1.6.1 *Bidens pilosa* Linné

B. pilosa (Figura 5) pode ser considerada uma erva daninha tropical amplamente presente nas regiões tropicais e subtropicais. Esta planta foi originalmente encontrada na América tropical e, mais tarde introduzida na região do Pacífico e em partes da Ásia. A planta inteira ou partes são utilizadas na medicina popular, como um ingrediente de chás para o uso anti-inflamatório, antisséptico, hepatoprotetor, redução da pressão arterial e hipoglicemiantes (DIMO et al., 2002; CHIEN et al., 2009; SUZIGAN et al., 2009; SHINJI-NAKAMA et al., 2011).

Figura 5 - *Bidens pilosa* Linné



Esta planta pertence à família das Asteráceas e possui vários nomes populares, dependendo de onde é encontrada. No Brasil, é mais conhecida como Picão-preto ou Erva-picão (CORRÊA, 1984). É uma planta anual, de caule ereto e quadrangular, que pode atingir até 150 cm de altura. Em determinados locais é considerada uma erva daninha pois pode invadir plantações.

Existem relatos antigos sobre o uso popular de *B. pilosa* por índios da Amazônia, povos caribenhos, cubanos e pela medicina chinesa, para o tratamento de uma série de doenças, incluindo tumores, malária e doenças do fígado (KVICINSKI et al., 2011). Sabe-se que *B. pilosa* possui muitos constituintes fitoquímicos. Além do mais, estudos laboratoriais do seu extrato bruto hidroetanólico, e mais particularmente, a fração clorofórmica, demonstraram atividade inibitória para o líquido ascítico de tumor de Ehrlich *in vitro* e em camundongos (YUAN et al., 2008; KVICINSKI et al., 2008).

Alvarez e colaboradores (1996), demonstraram em estudos sobre *B. pilosa* que a planta apresenta uma ampla composição fitoquímica. Os componentes majoritários encontrados no vegetal são sesquiterpenos, flavonóides, carbonatos, hidroclorados, proteínas, ésteres e óleos essenciais, além de fenils e outros poliacetilenos. Cada classe de compostos, segundo GEISSBERGER & SEQUIN (1991), pode ser racionalizada para o uso na medicina tradicional no tratamento de feridas, como antiinflamatório, e ainda contra bactérias de infecções do trato gastrointestinal. Os compostos conhecidos por sua ação antimicrobiana estão compreendidos entre os fenileptatrienos, o ácido linoleico e linólico; já aqueles com ação antiinflamatória conhecidas são os compostos flavonólicos, a friedelina e friedelana-3 β -ol. Somando-se a estas ações bem estabelecidas, se tem a classe de compostos dos poliacetilenos, que por sua natureza, são considerados compostos citotóxicos. Um exemplo desta classe seriam os sesquiterpenos. Evidências demonstraram que estes compostos podem funcionar como citotóxicos para algumas linhagens tumorais sendo, portanto, responsáveis pelo potencial antitumoral do extrato bruto hidroetanólico de *B. pilosa* e da fração clorofórmica (YUAN et al., 2008; BRANDÃO et al., 1997).

1.6.2 *Casearia sylvestris* Swartz

A *C. sylvestris* (Figura 6) pertencente à família Salicaceae (ex-Flacourtiaceae), constituída por 89 gêneros e com 1300 espécies ocupando regiões tropicais e temperadas ao redor do mundo, distribuindo-se pela América Central e do Sul. (TORRES & YAMAMOTO 1986; FERREIRA et al., 2011). Esta planta é comumente disseminada nas Américas, sendo encontrado em Cuba, Porto Rico, México, Brasil, Bolívia, Peru e Argentina (FERREIRA et al., 2011). No Brasil, é distribuída praticamente ao longo de toda extensão do território do Amazonas até o estado Rio Grande do Sul (FERREIRA et al., 2011; HACK et al. 2005). O gênero *Casearia* apresenta mais de 1000 espécies das quais 70 espécies encontram-se distribuídas no território brasileiro (MOSADDIK et al., 2004; ABSY & SCAVONE, 1973).

Figura 6 - Aspectos gerais de *C. sylvestris* Swart. (A) Árvore; (B) Inflorescência; (C) Frutos; (D) ramos com folhas.

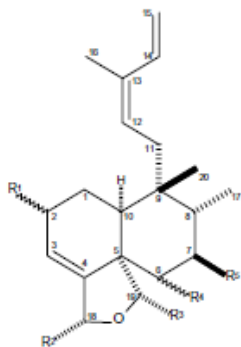


A *C. sylvestris* apresenta porte arbóreo (4-6 metros) com diâmetro do tronco entre 20-30 centímetros, apresenta folhas (6-12 cm de comprimento, por 3-5 cm de altura) um tanto assimétricas, persistentes, glabras ou ásperas, pecioladas, lanceoladas, serreadas,

alternas, brilhantes na face superior e dotadas de glândulas visíveis por transparência em todo o limbo. Possui inflorescências com flores pequenas e numerosas, de coloração esverdeada, actinomorfas, diclamídeas e hipóginas. Os frutos são cápsulas, com sementes envolvidas por arilo vermelho (SCAVONE et al., 1979; LORENZI, 1992).

A espécie *C. sylvestris* é conhecida popularmente no Brasil como guaçatonga, termo tupi-guarani, sugerindo o uso da planta por comunidades indígenas brasileiras. Também é denominada popularmente guaçatunga, vaçatonga, café-bravo, café-do-diabo, porangaba, cafeeiro-do-mato, cafezinho-do-mato, herva-de-lagarto, pau-de-lagarto, língua-de-giú (BASILE et al., 1990).

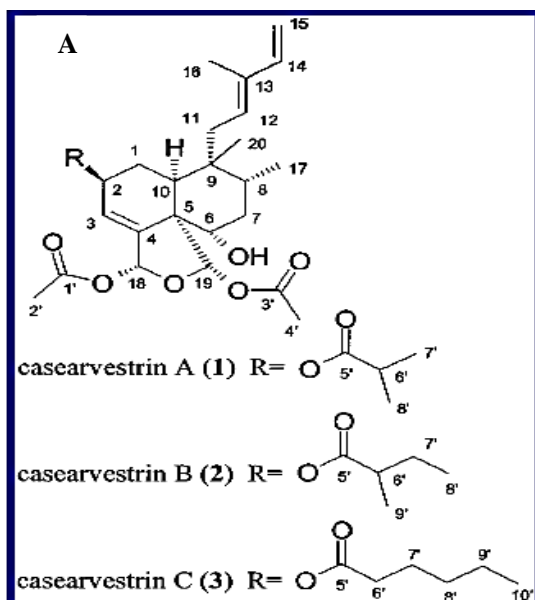
Figura 7 - Estrutura química de casearinas. Estrutura geral das casearinas e respectivos substituintes das casearinas A-X. A figura mostra ainda a citotoxicidade representada pelos respectivos IC_{50} de cada composto em células de hamster - 79.



Diterpenes	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ (µM)
Casearin A	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	1.0
Casearin B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	8.5
Casearin C	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.77
Casearin D	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	1.8
Casearin E	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	4.7
Casearin F	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	2.9
Casearin G	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.17
Casearin H	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.37
Casearin I	OH (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.51
Casearin J	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	1.1
Casearin K	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.52
Casearin L	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH	1.6
Casearin M	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH	1.8
Casearin N	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	5.9
Casearin O	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	6.0
Casearin P	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	7.8
Casearin Q	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	4.3
Casearin R	-O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	5.4
Casearin S	OCH ₃ (α)	-O	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin V	OH (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H	-

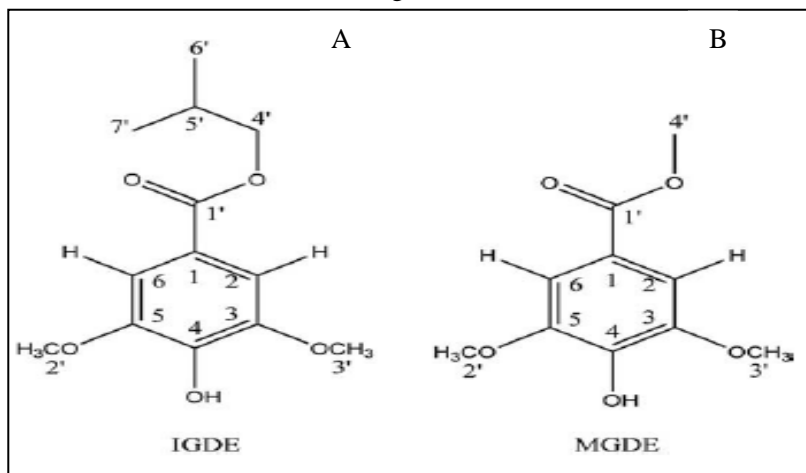
Em estudos fitoquímicos foi constatada a presença de substâncias de interesse como cumarinas (TALAPATRA et al., 1983), flavonóides (JUNGLES et al., 1985) e em especial diterpenos, entre os quais destacam-se os clerodânicos (MORITA et al., 1991; HUNTER et al., 1997). Os diterpenos clerodânicos isolados das folhas de *C. sylvestris* são também conhecidos como casearinas, tendo sido identificados em 20 tipos diferentes (MORITA et al., 1991) (Figura 7). Ressalta-se que a atividade citotóxica das casearinas sobre microrganismos e linhagens celulares tumorais indica o seu potencial uso como agente antitumoral (DE CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al., 1999). Ainda que estudos mais detalhados sejam necessários para a elucidação de mecanismos de ação dos componentes isolados ou de extratos de *C. sylvestris*, este vegetal está incluído entre os fitoterápicos de interesse para tratamento de pacientes no Sistema Único de Saúde (ANVISA, 2011).

Figura 8 - Estrutura química das casearvestrinas. (A) Estrutura geral das casearvestrinas; (B) Respectiveis substituintes das casearvestrinas.



Outros diterpenos clerodânicos denominados como casearvestrinas foram isolados a partir de extrato metanólico de folhas de *C. sylvestris* (OBERLIES et al., 2002) (Figura 8), enquanto do extrato alcoólico de folhas foram isolados dois derivados do ácido gálico, o isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE) e o metil galato-3,5-dimetil éter (MGDE) (Figura 9), os quais demonstraram efeito antitumoral *in vivo* sobre o tumor ascítico de Ehrlich e o carcinoma de pulmão de Lewis (DA SILVA et al., 2009).

Figura 9 - Estrutura química dos derivados do ácido gálico isolados do extrato alcoólico obtido de folhas de *C. sylvestris*. (A) isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE); (B) metil galato-3,5- dimetil éter (MGDE).



Considerando a composição do óleo essencial presente nas folhas de *C. sylvestris*, destaca-se entre os compostos majoritários o biciclogermacreno (40,9%), com interessante atividade antitumoral, além dos sesquiterpenos β -cariofileno e δ -humuleno, com atividade citotóxica e anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007; DA SILVA et al., 2008a).

Entre as ações descritas para *C. sylvestris* na medicina popular, podem ser destacadas a atividade antisséptica, anestésica tópica local,

cicatrizante, antitérmica, antitumoral, anti-ulcerativa e antiofídica, além de ser empregada em condições como herpes, sífilis e síndromes diarreicas (ALONSO, 2004; ESTEVES, 2005).

A atividade citotóxica da planta sobre diversas linhagens tumorais (HT 29, Hela, A-579, V79, SF 295, HCT-8, MDA-MB 435, HL-60), respalda o uso popular da mesma como agente antitumoral (DE MESQUITA et al., 2009; DA SILVA et al., 2008b).

Por fim, outras importantes atividades biológicas de interesse foram reportadas para *C. sylvestris*, destacando o efeito antihiperlipêmico (SCHOENFELDER et al., 2008), a atividade anticolinesterásica (DA SILVA et al., 2006), e a atividade citotóxica sobre fungos tais como *Aspergillus niger* (OBERLIES et al., 2002), protozoários como *Leishmania donovani*, formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (MESQUITA et al., 2005) e sobre larvas do inseto *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006).

1.7 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

Tradicionalis métodos de extração, como aqueles que utilizam solventes orgânicos, ou a hidrodestilação e a destilação a vapor, são bastante utilizados na obtenção de substâncias biologicamente ativas originadas de matrizes vegetais. Entretanto, estas metodologias se apresentam com alguns pontos críticos para o processo, como uso de altas temperaturas e/ou o emprego de solventes orgânicos. As altas temperaturas acarretam prejuízo ao extrato, em virtude de modificações químicas e degradação de compostos termossensíveis, com a provável perda da atividade biológica. Já em relação aos solventes orgânicos, uma preocupação constante consiste nos prejuízos à saúde e ao meio ambiente (HAJIMIRSADEGUI, 2007; YEN-HUI; ZER-RAN, 2004).

Buscando alternativas de extração que não acarretassem nesta perda de funcionalidade e também que não trouxessem prejuízos à saúde do usuário, considerou-se outras metodologias para extração dos compostos de interesse. Desta forma, a extração supercrítica veio ao encontro às expectativas, uma vez que trabalhos anteriores (MICHIELIN et al., 2009; KITZBERGER et al., 2009), relataram sucesso na sua utilização. Esta tecnologia vem recebendo grande

atenção na comunidade científica, uma vez que é fundamental para as aspirações farmacêuticas. Seu papel é relevante no aumento da seletividade para isolar os compostos de interesse biológico de uma matriz e na manutenção das características químicas dos mesmos. Como resultado deste isolamento seletivo, por um aumento do grau de pureza, tem-se um aumento na atividade biológica do extrato resultante.

O aumento da demanda por compostos de origem natural, tais como antioxidantes e antimicrobianos, tem estimulado pesquisas relacionadas à extração de substâncias biologicamente ativas de diversos materiais. A técnica empregada na extração destes compostos de alto valor agregado é de fundamental importância para a definição da qualidade do produto. Neste sentido a extração supercrítica pode ser considerada um dos novos métodos de extração potencialmente útil na obtenção de compostos com atividade biológica a partir de matrizes naturais (DÍAZ-REINOSO, 2006; REVERCHON & DE MARCO, 2006).

A seletividade na extração supercrítica pode ser determinada pela escolha do fluido supercrítico, ou pelo ajuste de parâmetros, como temperatura e pressão, do processo dentro da região supercrítica, ou seja, controlando a densidade do solvente. A definição das condições de extração (temperatura e pressão) indica o poder de solvatação do solvente. Assim, quanto maior o poder de solvatação, maior a solubilidade de um determinado composto e maior o número de compostos solubilizáveis de uma mistura. Desta forma, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa. Em processos com solventes supercríticos, o grande potencial para a transferência de massa é determinado pela diferença no estado de equilíbrio (AGHEL et al., 2004; MUKHOPADHYAY, 2000).

A extração supercrítica possui vantagens sobre as técnicas convencionais de extração por ser um processo flexível, devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e seletividade do solvente; não utilizar solventes orgânicos poluentes e não necessitar da etapa de evaporação dos extratos para a eliminação do solvente. A degradação térmica e decomposição de compostos voláteis podem ser evitadas pelo emprego de baixas temperaturas e a ausência de luz e

oxigênio, os quais previnem reações de oxidação (DÍAZ-REINOSO, 2006; REVERCHON & DE MARCO, 2006).

Dentre as vantagens da extração supercrítica, podemos citar:

- a)* Os solventes empregados são gasosos à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, permitindo que após a extração, eles sejam facilmente eliminados dos extratos e recuperados; (MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005).
- b)* A maioria dos gases supercríticos utilizados é fisiologicamente seguro e inerte; (MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005).
- c)* As propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser variadas, tanto pelo ajuste da temperatura e da pressão, quanto pela introdução de agentes aditivos que mudem a polaridade dos gases, possibilitando extrações multifase e fracionamento do extrato nos compostos desejados; (MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005).
- d)* A separação de materiais é feita a baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando são extraídas substâncias naturais que são termicamente sensíveis; (MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005).
- e)* A força solvente é ajustada via compressão mecânica; (MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005).

Como desvantagens da extração supercrítica deve ser considerado:

- a)* Atualmente o processo ainda é de custo elevado devido ao custo dos equipamentos;
- b)* Compostos muito polares dificilmente são extraídos sem adição de um co-solvente modificador adequado (MELECCHI, 2005).

Diversos solventes orgânicos podem ser utilizados como co-solventes na extração supercrítica. Entretanto, o etanol é o solvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica (MICHIELIN, 2009).

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como proposta estudar comparativamente, através de ferramentas bioquímicas, o potencial de diferentes extratos de *B. pilosa* e *C. sylvestris* como agentes antitumorais e antiangiogênicos.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar comparativamente o potencial citotóxico, antitumoral e antiangiogênico de extratos bruto e supercríticos de *Bidens pilosa* Linné e *Casearia sylvestris* Swartz em diferentes condições de extração.

1.8.2 Objetivos Específicos

Para se atingir o objetivo geral apresentado são propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito de diferentes condições de pressão de extração e co-solventes na bioatividade de extratos bruto e supercríticos de *B. pilosa* e *C. sylvestris* bioativos;
2. Avaliar a capacidade citotóxica de extratos bruto e supercríticos de *B. pilosa* e *C. sylvestris* sobre as linhagens celulares T24 e MCF-7 através do ensaio do MTT;
3. Avaliar a atividade nucleásica dos extratos bruto e supercríticos de *B. pilosa* e *C. sylvestris*, através da realização do ensaio de avaliação de danos ao DNA plasmidial;
4. Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de extratos bruto e supercríticos de *B. pilosa* e *C. sylvestris* em camundongos Balb/C inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), através da observação dos parâmetros morfofisiológicos: variação da circunferência, variação do peso, percentual de aumento de longevidade e sobrevida;
5. Avaliar o tipo de morte celular (apoptose/necrose) induzidos pelos extratos bruto e supercríticos de *B. pilosa* e *C. sylvestris* por Citometria de Fluxo;

6. Avaliar a atividade antiangiogênica dos extratos bruto e supercríticos de *B. pilosa* e *C. sylvestris* pelo ensaio da membrana corioalantóica (CAM);

2. METODOLOGIA

2.1 COLETA DE *CASEARIA SYLVESTRIS* SWART E *BIDENS PILOSA* LINEÉ

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas na cidade de Criciúma, estado de Santa Catarina, sendo posteriormente identificadas pela professora Dra. Vanilde Citadini Zanette. A exsicata da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC (Criciúma-SC, Brasil).

As amostras das partes aéreas de *B. pilosa* foram coletadas na Reserva Florestal do Parque da Juréia (Mata Atlântica), no estado de São Paulo. A coleta e o tratamento das amostras foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Maria Helena Rossi do Instituto Biológico de São Paulo. A exsicata foi depositada no Herbário Eneida P. K. Fidalgo do Instituto Botânico de São Paulo, SP, Brasil.

2.2 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *CASEARIA SYLVESTRIS* SWART E *BIDENS PILOSA* LINEÉ

As folhas secas de *C. sylvestris* foram moídas e submetidas à maceração com etanol absoluto (P.A.), a frio, por um período de 3 a 4 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes consecutivas. Após, efetuou-se a evaporação do solvente sob pressão reduzida, obtendo-se um resíduo chamado de extrato bruto etanólico (EB).

As partes aéreas da espécie *B. pilosa* foram moídas, em seguida submetidas à maceração exaustiva em solução hidro-etanólica (6:4) a frio por 3 dias, 3 vezes consecutivas. O solvente foi filtrado e liofilizado para se obter um extrato bruto seco hidro-etanólico.

Os extratos brutos das plantas utilizados neste estudo foram produzidos e gentilmente cedidos pela Dra. Maria Helena Rossi, do Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais, do Centro de Sanidade Animal, do Instituto Biológico de São Paulo.

2.3 PREPARO DOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE *CASEARIA SYLVESTRIS* SWART E *BIDENS PILOSA* LINEÉ

A técnica de extração supercrítica utilizada foi descrita por MICHIELIN et al. (2009), tendo sido utilizado equipamento do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica - LATESC, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Este equipamento contém um reservatório pressurizado e um banho termostático (Microquímica - MQBTZ99-20, SC, Brasil), enquanto o fluxo de solvente pode ser ajustado e controlado por válvulas de alta pressão, reguladores e manômetros.

As condições de pressão e temperatura para extração no ensaio com CO₂ para *C. sylvestris* foram de: 150 bar/40°C, 250 bar/40°C, 250 bar/40°C/5%ETOH, 250 bar/40°C/5%EToAC, 300 bar/40°C, 300 bar/40°C/5%ETOH, 300 bar/40°C/5%EToAC, com um fluxo constante de 0,50 ±0,10 kg de CO₂/h. Foi utilizado no processo CO₂ com 99,9 % de pureza, entregue em uma pressão de 60 bar.

O procedimento experimental consistiu na utilização de 15 g de partículas do sólido (folhas secas de *C. sylvestris* e partes aéreas de *B. pilosa*), para formar o leito fixo para a extração sob alta pressão. As amostras foram coletadas em tempo de 3-5 horas de extração e pesadas em uma balança analítica.

2.4 CULTURA DE CÉLULAS MCF-7 E T24

Células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e T24 (carcinoma de bexiga) adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e NaHCO₃. As células foram mantidas em densidade de 1-2x10⁶ células/mL e em condições ideais de temperatura, atmosfera e umidade (37°C, 5% de CO₂ e 100%, respectivamente) (DEJEANS et al., 2010).

2.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

2.5.1 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio do MTT

A citotoxicidade dos extratos brutos e supercríticos da *C. sylvestris* e *B. pilosa* foi avaliada utilizando o ensaio do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil (MTT) proposto por Carmichael em 1985, onde o MTT, um sal de coloração amarela, é reduzido a formazan (coloração purpura) pelo metabolismo mitocondrial. Assim, o MTT atua como um indicador da função mitocondrial e, conseqüentemente, da viabilidade celular (FRESHNEY, 1999). As células MCF-7 e T24, 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 CO₂). Em seguida as células foram incubadas novamente com os diferentes extratos por 48 horas. Após esse período, 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 (P.A.) para completa solubilização dos cristais de formazan produzidos durante a incubação. Como controle negativo (CN) foram mantidas as células nas mesmas condições descritas acima, porém tratadas apenas com o veículo de dissolução desses extratos (DMSO 1%). O DMSO (P.A) foi utilizado como branco para descartar qualquer interferência de cor.

As placas foram analisadas espectrofotometricamente utilizando um leitor de placas (TECAN M200) em 540nm, determinando a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

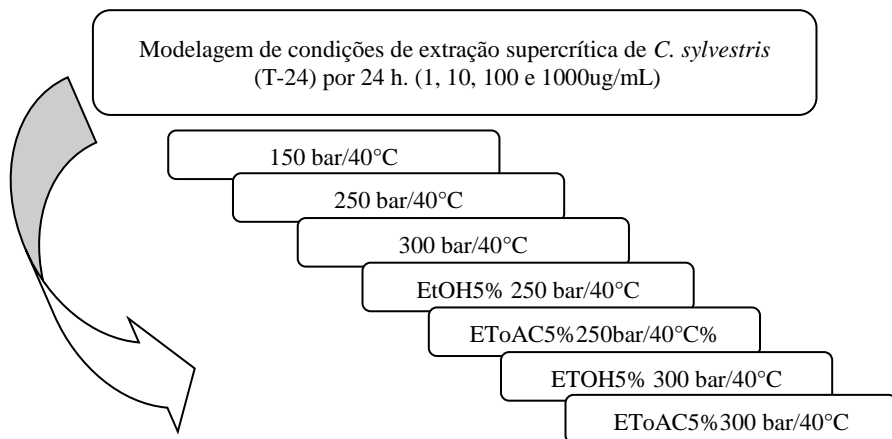
Os experimentos foram realizados em triplicatas (3 experimentos individuais) em 3 dias diferentes, sendo que para cada concentração testada foram realizadas 8 replicatas. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

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

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória 50%) foram calculados por regressão linear e expressos em Média \pm Desvio-padrão. Considerou-se os valores dos controles negativo como 100% de viabilidade celular sem a presença dos extratos testados.

Os ensaio de citotoxicidade foram realizados em todas as condições dos extratos supercrítico abaixo, nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 μ g/mL (24hs de incubação), em células MCF-7:

Em seguida, foram selecionados os melhores extratos supercríticos para avaliação da citotoxicidade em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 μ g/mL), por 24 h, os extratos brutos (EB) foram testados em concentração de (62,5; 125; 250; 500 e 1000 μ g/mL) em células MCF-7.



Os mesmos extratos foram selecionados para avaliação citotóxica sobre células T-24 em concentrações de 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 μ g/mL para os extratos supercríticos e EB de 10, 25, 50, 75 e 100 μ g/mL e incubados por 24h.

Ao final dos ensaios preliminares de citotoxicidade para *B. pilosa* e *C. Sylvestris*, obteve-se os seguintes resultados:

2.5.2 Ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico

Para a avaliação do potencial efeito citostático, foi empregado o ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico (AITHAL et al., 2012). Células T24 foram primeiramente incubadas por 24h para aderência (2 mL de meio de cultura) em placas de cultura de 6 poços, 500 células/poço. Transcorrido este período, o meio de cultura foi substituído por outro contendo os produtos-teste sob uma faixa pré-determinada de concentração, a incubação do controle negativo sendo feita somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (2 mL meio com DMSO 0,01%). Procedeu-se com nova incubação, feita primeiramente por 24h, posteriormente as células foram lavadas com PBS a 37°C (3x) e o meio novamente substituído por outro fresco para uma incubação por cerca de 8-10 dias, ou até ser observada a presença das colônias (compostas por pelo menos cerca de 50 células). O ensaio foi então finalizado, o meio retirado e as colônias coradas com uma solução de cristal violeta 0,2% para serem posteriormente visualizadas e quantificadas em contador de colônias, sendo os resultados expressos comparativamente ao controle negativo.

Considerando primeiramente os tratamentos realizados para o controle negativo, unidades formadoras de colônia (UFCs) com mais de 50 células, começaram a ser detectadas no oitavo dia de incubação, quando o ensaio foi interrompido e as UFCs quantificadas. Aos 8 dias de incubação, em média cerca de 32 ± 3 UFCs estavam presentes em poços tratados para o controle negativo. Agora considerando os tratamentos-teste, EB e ESC 300Bar/40°C *B. pilosa* e *C. sylvestris*, cada um foi testado sob duas concentrações 100 e 200 µg/mL (24h), da mesma forma que feito para o controle negativo, e na sequência, as células tratadas foram incubadas até o 8º dia quando as UFCs foram quantificadas.

2.6 AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA PLASMIDIAL

O DNA plasmidial pode “adotar” a forma circular aberta (F II) e a forma linear (F III), além de sua forma superenovelada (F I) normal, onde quebras na dupla hélice fazem com que a forma normal

(superenovelada) transforme-se em forma circular aberta (através de quebras simples) e/ou forma linear (através de quebra dupla de cadeia) (Figura 8). Estas três formas (FI, FII e FIII), possuem velocidades eletroforéticas distintas, que são representadas como bandas distintas em géis de eletroforese como demonstrado na Figura 9 (SREDDHARA & COWAN, 2001).

Figura 11 - Esquema de corte da molécula de DNA Plasmidial.

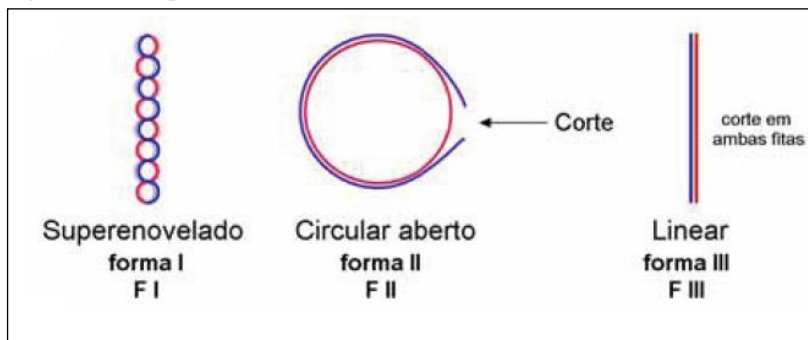
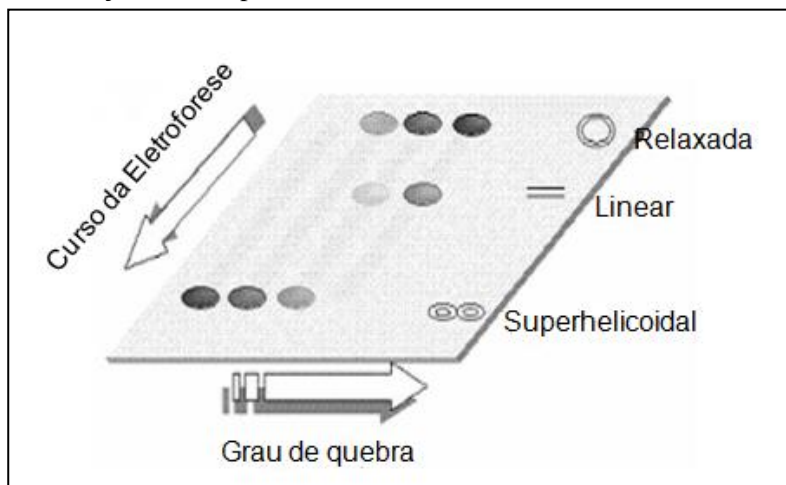


Figura 12 - Imagem típica de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos.



Inicialmente, foram realizados ensaios com extratos bruto (EB) e supercríticos de *C. sylvestris* (300 bar/40°C/5% ETOH, 300 bar/40°C/5% EToAc) nas concentrações de 1 e 10 mg/mL, com a finalidade de identificar o extrato que causaria a maior fragmentação ao DNA. A partir destes pré-testes, foi escolhido o extrato supercrítico 300 bar/40°C/5% ETOH para continuar os testes em diferentes concentrações.

A avaliação da atividade nucleásica dos extratos supercríticos de *C. sylvestris* foi realizada incubando em microtubos 5µl de uma solução de DNA plasmidial (600ng), 5 µl de tampão HEPES (pH 7,4) e 10 µl do extrato supercrítico 300 bar/40°C/5% ETOH nas concentrações de: 250 ug, 500 ug, 1 mg, 5 mg, 10 mg, durante 16 h, a 37°C. Após o período de incubação, corridas eletroforéticas em gel de agarose foram realizadas e, posteriormente, revelou-se o gel com brometo de etídio, que permitiu a visualização das bandas, que representam o perfil de quebra do DNA plasmidial (intacta ou supertorcida, com quebra simples ou circular aberta e com quebra dupla ou linear, FI, FII e FIII respectivamente) induzido pelos extratos supercríticos. Para quantificar as bandas e determinar as quantidades de cada forma adotadas pelo DNA plasmidial após a corrida eletroforética, foi utilizado o programa Labworks Software v 4.0 (UPV inc.). A intensidade de DNA supertorcido foi corrigida por um fator de 1,47 como um resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio (SREEDHARA & COWAN, 2001).

2.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

2.7.1 Camundongos Balb/C isogênicos

Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ±2g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos através de reprodução controlada pelo Biotério Setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental - LABIOEX

Os animais foram pesados, divididos em grupos de 12 e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12

h, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 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 numero PP00744.

2.7.2 Avaliação da atividade antitumoral utilizando o modelo do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

2.7.2.1 Protocolo experimental

Neste modelo experimental, foram utilizados camundongos Balb/C distribuídos em seis diferentes grupos experimentais (n = 12 por grupo experimental):

- I) controle normal (solução de DMSO a 10%);
- II) controle negativo (TAE + solução de DMSO a 10%);
- III) controle positivo (TAE + Doxorrubicina);
- IV) grupo tratado com EB(TAE + EB);
- V) grupo tratado com ESC 300 bar/ 40°C /5% ETOH (TAE+ ESC-ETOH);
- VI) grupo tratado com ESC 300 bar/ 40°C /5% EToAc (TAE + ESC-EToAc);

As concentrações utilizadas dos extratos bruto e supercrítico foram de 0,1; 1; 10 mg/Kg. Inoculou-se em todos os camundongos (com exceção do grupo controle negativo), 5×10^6 células tumorais no peritônio em condições assépticas. O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero (0). O tratamento dos animais iniciou-se 24 h após a inoculação das células tumorais, administrando-se por via intraperitoneal (i.p) 50 μL dos extratos testes ou doxorrubicina nas concentrações de 0,1 mg/kg, 1mg/Kg e 10 mg/kg, respectivamente, durante 9 dias consecutivos. Os animais do grupo I e II receberam 50 μL de uma solução de DMSO a 10% diariamente durante o mesmo período de tratamento.

Seis animais de cada grupo experimental foram mantidos pelo período de 30 dias, para a avaliação da sobrevivência em comparação ao

grupo controle do tumor (grupo controle negativo) enquanto os outros seis foram mortos após 9 dias de tratamento para avaliação dos parâmetros morfológicos.

2.7.2.2 Avaliações Cronomorfológicas

2.7.2.2.1 Avaliação da Média de Sobrevida

Para determinação da sobrevida (6 animais por grupo), os animais inoculados com o TAE e tratados ou não com os extratos de *C. sylvestris* ou doxorubicina, foram observados diariamente, durante o período de 30 dias.

A partir desse monitoramento foram feitos os registros da mortalidade diária, e posteriormente, calculada a taxa média de sobrevida (TMS) e a percentagem média de sobrevida (PMS), dadas pelas seguintes fórmulas:

$$\text{TMS} = (\text{Dia da 1}^\circ \text{ morte} + \text{Dia da última morte}) / 2$$

$$\text{PMS (\%)} = [(\text{TMS do grupo tratado} / \text{TMS do grupo controle}) - 1] \times 100 \text{ (QURESHI, 2001).}$$

2.7.2.2.2 Avaliação da Variação de Peso

Para avaliar a variação de peso dos camundongos, foi calculada a diferença entre o peso final (após os 9 dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (peso que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0). Os resultados obtidos foram expressos em gramas (REBELLO, 2004).

2.7.2.2.3 Avaliação da Variação da Medida da Circunferência Abdominal

Para se determinar a variação da circunferência abdominal dos camundongos, foi calculada a diferença entre a medida final (após os 9 dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência

abdominal dos animais. Os resultados obtidos foram expressos em centímetros (REBELLO, 2004).

O crescimento tumoral foi calculado conforme formula abaixo a partir da variação da circunferência abdominal (Δ) (em cm) medida antes e após o tratamento dos animais com os extratos testes e doxorubicina, permitindo também a determinação da porcentagem da inibição do crescimento tumoral (KVICINSKI et al., 2008; 2011):

$$\begin{aligned} & \text{CRESCIMENTO TUMORAL \%} \\ & = \frac{\Delta_{\text{CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL GRUPO TRATADO}}}{\Delta_{\text{CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL GRUPO CONTROLE NEGATIVO}}} \times 100 \end{aligned}$$

2.7.3 Avaliação do tipo de morte celular induzida pelos tratamentos

Para avaliação do tipo de morte celular induzido pelos extratos supercríticos de *C. sylvestris* em animais inoculados com o TAE, foi utilizado o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection da BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante, por citometria.

Para a realização deste ensaio foram utilizadas células do TAE, com densidade de 5×10^6 células. As mesmas foram retiradas de camundongos após o 9º dia de tratamento com os extratos supercríticos EtOH5%/300 bar/40°C 0,1 mg/kg/dia, EtOac5%/300 bar/40°C 0,1mg/kg/dia e EtOac5%/300 bar/40°C 1mg/kg/dia. Uma alíquota de células foi retirada, e foi feita contagem celular. Em seguida, uma segunda alíquota de 5×10^6 células foi utilizada para realização do ensaio citometria de fluxo. Essas células foram lavadas 2 vezes com PBS, ressuspensas em 200 μ L de tampão de ligação (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) previamente diluído na proporção 1:10 em água destilada. 100 μ L desta suspensão de células foram transferidos para o tubo de citometria. Posteriormente, foi adicionado 5 μ L de anexina V, seguido de incubação no escuro pelo tempo de 15 min. E por fim, foram adicionados 5 μ L de iodeto de propídeo e realizada a análise no citômetro de fluxo. A intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e do iodeto de propídeo foram mensuradas utilizando um filtro de excitação a 488 nm.

Para a calibração do citômetro FACS Calibur, foram utilizados três controles: controle normal (constituído por células não tratadas, afim de se descontar a autofluorescência emitida pelas mesmas), controle positivo para apoptose (constituído por células tratadas com doxorubicina na concentração de 1,5µg/mL) e controle positivo para necrose (constituído por células não tratadas, porém congeladas em freezer -80°C por 20 min. após a sua tripsinização). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Winmdi.

O tipo de morte celular induzido pelos tratamentos foi classificado da seguinte maneira: células marcadas apenas com anexina V foram consideradas em apoptose inicial; células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo foram consideradas em apoptose tardia; já células marcadas apenas com iodeto de propídeo foram consideradas necróticas. Os resultados foram expressos como percentual de células em apoptose inicial e tardia e em necrose.

2.7.4 Avaliação da atividade antiangiogênica utilizando o método da membrana corioalantóica embrionária (CAM)

2.7.4.1 Ovos

Para a realização dos experimentos referentes à avaliação da atividade antiangiogênica, foram utilizados ovos de galinha (*Gallus domesticus*) fertilizados, adquiridos junto à empresa Tyson® do Brasil, localizada no município de São José, SC.

2.7.5 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM)

A avaliação da atividade antiangiogênica da *C. sylvestris* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por NGUYEN et al. (1994). Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de 37°C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo e assim, uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada afim de se evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Logo na sequência, outra janela, agora com cerca de 15 mm de diâmetro foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões. Estas janelas foram fechadas com auxílio de fita goma e fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72 h até a idade embrionária de 6 dias, quando um disco de metilcelulose (1,5%) embebido com os extratos bruto e supercríticos de *C. sylvestris* a ETOH5% 300 bar/40°C e 300 EToAc5% bar/40°C a serem testados (1; 5 e 10 µg/mL) foi implantado sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a fita goma preta. Assim, a incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de 8 dias, quando se realizou a análise da atividade antiangiogênica.

A fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados. Uma câmera fotográfica acoplada a um estereomicroscópio com aumento de 20x capturou imagens que foram enviadas para um microcomputador, onde cada imagem em triplicata foi utilizada para se realizar uma contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como Percentual de vasos ± Desvio-padrão.

2.7.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância ANOVA, complementada por Tukey-Kramer, e o teste de Barlett quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

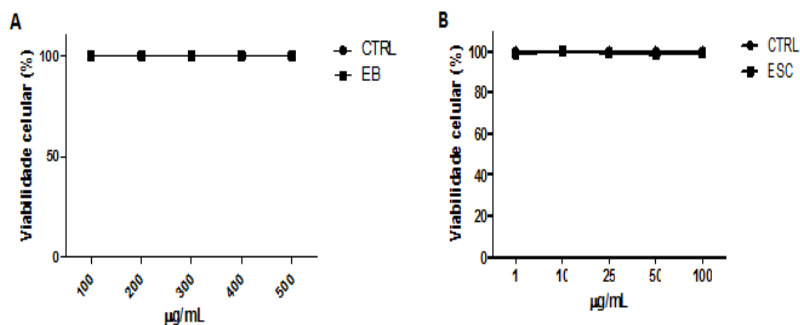
3.1.1 Extratos de *Bidens pilosa* Linné

3.1.1.1 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio do MTT

Os resultados obtidos mostraram que o EB de *B. pilosa* não apresentou citotoxicidade importante na faixa de concentrações testadas (0-500 $\mu\text{g/mL}$) para as células T-24 após 24h de incubação. Não houve diferença estatística significativa na viabilidade celular quando comparado aos tratamentos realizados com o controle negativo (Figura 1A)

O ESC 250bar/40°C de *B. pilosa* também não demonstrou citotoxicidade importante quando avaliado nas mesmas condições do EB (Linhagens T-24 após 24h incubação). Entretanto, por se tratar de uma extração supercrítica as concentrações avaliadas foram na faixa de 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Não houve diferença significativa na viabilidade celular dos tratamentos com ESC, quando comparado com o controle negativo (Figura 13B).

Figura 13 - Efeito citotóxico dos extratos EB (A) e ESC 250bar/40°C (B) de *B. pilosa* nas diferentes concentrações testadas (0-500 $\mu\text{g/mL}$ e 0-100 $\mu\text{g/mL}$ para EB e ESC, respectivamente) (24 h de incubação) sobre a viabilidade das células T-24.

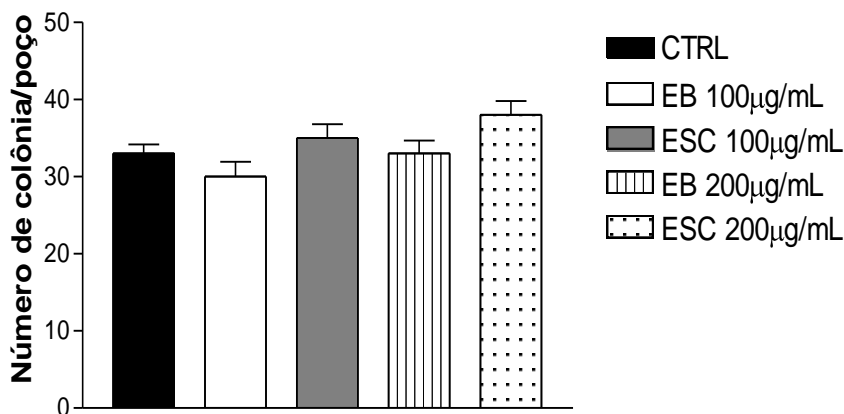


3.1.1.2 Atividade Antiproliferativa (ensaio clonogênico)

Os resultados do ensaio de formação de colônia mostram mais uma vez que os EB e ESC 250bar/40°C de *B. pilosa* não apresentaram resultados promissores, sendo que os tratamentos realizados com ambos os extratos sob as concentrações testadas (100-200 $\mu\text{g/mL}$), pois não mostraram

diferença no número de UFCs, quando comparado ao controle negativo (Figura 2).

Figura 14 - Efeito do tratamento com os extratos EB e ESC 250bar/40°C de *B. pilosa* nas concentrações de 100-200 µg/mL (24 h de incubação) sobre a formação de colônia de células T-24.



Tendo em vista os resultados negativos obtidos quanto aos tratamentos à base de EB e ESC 250bar/40°C *B. pilosa*, este estudo foi justificadamente interrompido. A partir desta fase, esta pesquisa seguiu com a avaliação somente do efeito dos extratos de *C. sylvestris*.

3.1.2 Extratos de *Casearia sylvestris*

3.1.2.1 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio do MTT

Os resultados obtidos com os tratamentos com EB e ESC de *C. sylvestris* mostraram importante redução na viabilidade celular para células MCF-7 (após 24h). Os valores das concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores calculados de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos a partir da determinação da citotoxicidade dos extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* sobre células MCF-7.

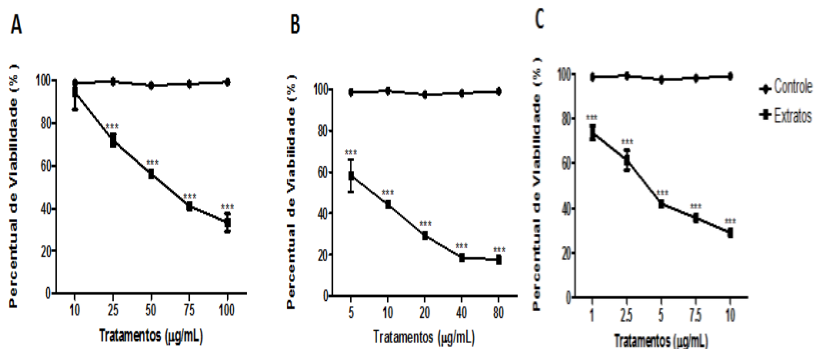
Extratos/Tratamento	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EB	$263,3 \pm 6,3$
ESC 40°C 150bar	$100,2 \pm 5,9$
ESC 40°C 200bar	$100,3 \pm 6,1$
ESC 40°C 250bar	$100,1 \pm 5,4$
EtOH5% 300 bar/40°C	$25,2 \pm 1,9$
EtOac5% 300 bar/40°C	$24,7 \pm 6,3$

A partir dos resultados apresentados acima pode-se afirmar a partir dos dados obtidos que os extratos supercríticos utilizando co-solventes (EtOH5% 300bar/40°C e EtOac 5%/300bar/40°C) apresentaram maior efeito citotóxico para as células MCF-7 em relação ao EB e àqueles sem co-solventes, uma vez que os mesmos apresentaram menores valores de CI_{50} .

Confirmando os resultados apresentados na tabela 2 a atividade citotóxica sobre a linhagem tumoral T-24, realizadas somente com os melhores extratos testados com células MCF-7, demonstraram que estes tratamentos foram mais eficientes ainda em reduzir a viabilidade das células T-24 (Figura 12). Os extratos que se mostraram mais eficazes foram ESC EtOac 5%/300bar/40°C com CI_{50} de $4,6 \mu\text{g/mL}$, seguido de ESC EtOH5% 300bar/40°C com CI_{50} de $9,5 \pm 2,1$ e EB com CI_{50} de $67,1 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$.

Com base nos dados de citotoxicidade apresentados em ambas as linhagens de células tumorais, pode-se afirmar que os ESC mostraram-se mais eficientes em relação ao EB em reduzir a viabilidade celular, uma vez que suas CI_{50} apresentaram valores menores, especialmente o ESC EtOac5% 300 bar/40°C.

Figura 15 - Os Efeito dos tratamentos com os diferentes extratos de *C. sylvestris* nas concentrações de 1 a 1000µg/mL (24 h de incubação) sobre a viabilidade das células T-24. (A) Representa as concentrações testadas do EB; (B) representa as concentrações testadas do EtOH5% 300 bar/40°C; (C) representa as concentrações testadas do EtOac5% 300



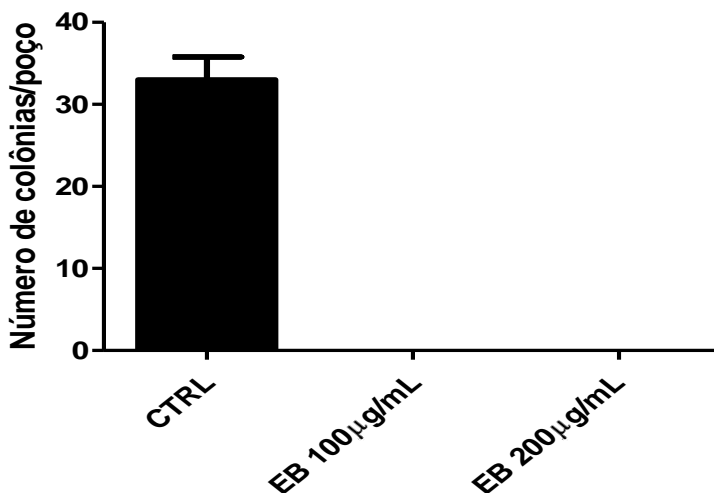
bar/40°C. (***) representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

3.1.2.2 Atividade Antiproliferativa (ensaio clonogênico)

Os resultados do ensaio clonogênico obtidos a partir dos tratamentos à base de EB de *C. sylvestris* indicam que nas concentrações de 100-200 µg/mL, EB induziu as células T-24 à morte clonogênica, ou seja, houve inibição significativa da capacidade de divisão, ou proliferação celular quando comparado ao controle negativo (Figura 16).

A avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato supercrítico de *C. sylvestris* não pode ser realizada por um problema de contaminação das culturas de células. Como é de conhecimento geral, o cultivo de linhagens celulares em laboratório é um processo relativamente delicado sujeito a vários “intempéries” e ameaças biológicas. Assim, durante esta avaliação, o Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX da UFSC foi vítima de contaminação bacteriana e fúngica seguidas, havendo perda da linhagem celular T-24, o que inviabilizou a realização prevista de ensaios clonogênicos com os extratos supercríticos de *C. sylvestris*.

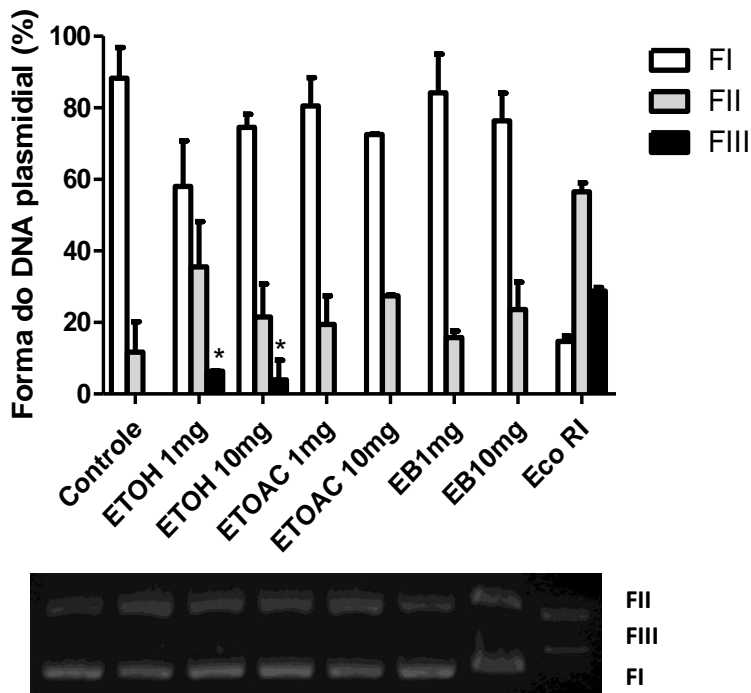
Figura 16 - Efeito do tratamento com o extrato EB de *C. sylvestris* nas concentrações de 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (24 h de incubação) sobre a formação de colônia de células T-24.



3.1.3 Avaliação do dano ao DNA plasmidial

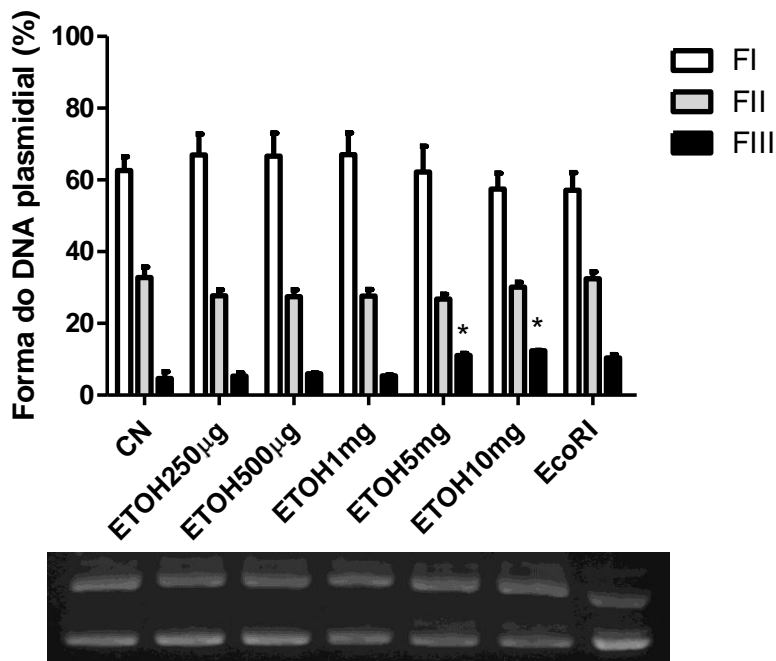
Primeiramente, foi avaliado o potencial indutor de danos direto ao DNA plasmidial dos extratos bruto e supercrítico (EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300 bar/40°C) de *C. sylvestris*, nas concentrações de 1 e 10 mg/mL. Conforme pode ser observado na Figura 4, todos os extratos foram capazes de induzir dano direto ao DNA. Entretanto, é importante ressaltar que o EtOH5% 300bar/40°C apresentou maior potencial de dano, uma vez que levou à detecção, tanto das formas FII, quanto FIII conforme ilustra a Figura 17.

Figura 17 - Efeito do extrato bruto e supercríticos de *C. sylvestris* sobre o DNA plasmidial. Representa a triagem dos extratos (EB – extrato bruto; EtOH - EtOH5% 300bar/40°C; EtOac - EtOac5% 300 bar/40°C; CP: Eco RI) nas concentrações de 1 e 10 mg/mL.



Uma vez que o extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C mostrou um efeito direto ao DNA plasmidial (FII e FIII) na menor concentração testada (1 mg/mL), foi avaliado o potencial indutor de danos direto ao DNA plasmidial em uma faixa menor de concentrações (250 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL) (Figura 18). Como foi possível observar, surpreendentemente o extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C de *C. sylvestris* promoveu quebra simples (FII) e dupla (FIII) do DNA plasmidial, mesmo na menor concentração testada (250 µg/mL) (Figura 18).

Figura 18 - Representa as diferentes concentrações de EtOH5% 300bar/40°C testadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. * ($p < 0,5$) representa a diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (CN).



3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

3.2.1 Avaliação da atividade antitumoral utilizando o modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

Os dados obtidos com os ensaios *in vivo* mostraram que o EB não causou regressão no peso corpóreo dos animais, quando comparados ao controle negativo (Tabela 3). Entretanto, é importante notar que o tratamento com a maior concentração de EB (10 mg/Kg/dia), proporcionou significativo aumento do percentual de longevidade (PAL) dos animais.

Tabela 3 - Resultados dos parâmetros cronoformofisiológicos de camundongos (n=6) previamente inoculados com TAE e tratados com Doxorubicina (Controle Positivo, CP), Controle Negativo (CN) e extrato bruto de *C. sylvestris* (EB).

Tratamentos (mg/kg/dia)	Varição de Peso Corporal (g)	TMS (dias)	PAL (%)
CP -1,2	2,20 ± 0,80	30	100
CN	8,84 ± 2,29	15,5	0
EB - 0,1	11,13 ± 1,32	15,5	0
EB - 1	9,77 ± 1,27	15,5	0
EB - 10	9,88 ± 1,70	18,5	17,7

Da mesma forma, o extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C (ESC-EtOH) também não mostrou redução no peso dos animais, apesar de proporcionar aumento do PAL nas doses de 1 e 10 mg/Kg/dia, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros cronoformofisiológicos de camundongos (n=6) previamente inoculados com TAE e tratados com Doxorubicina (Controle Positivo, CP), Controle Negativo (CN) e extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C (ESC-EtOH) de *C. sylvestris*.

Tratamentos (mg/kg/dia)	Varição de Peso Corporal (g)	TMS (dias)	PAL (%)
CP - 1,2	2,20 ± 0,80	30	100
CN	8,84 ± 2,29	15,5	0
ESC-EtOH - 0,1	8,26 ± 1,94	15,5	0
ESC-EtOH - 1	11,30 ± 0,55	23,5	52,7
ESC-EtOH - 10	8,05 ± 1,07	21	34,2

O extrato supercrítico EtOac5% 300bar/40°C também não foi capaz de alterar o peso dos animais, porém apresentou os maiores valores de PAL (58,06 e 71,61), nas concentrações de 1 mg/Kg/dia e 10 mg/Kg/dia, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados dos parâmetros cronofisiológicos de camundongos (n=6) previamente inoculados com TAE e tratados com Doxorubicina (Controle Positivo, CP), Controle Negativo (CN) e extrato supercrítico de *C. sylvestris*.

Tratamentos (mg/kg/dia)	Varição de Peso Corporal (g)	TMS (dias)	PAL (%)
CP -1,2	2,20 ± 0,80	30	100
CN	8,84 ± 2,29	15,5	0
ESC-EtOac 0,1	9,84 ± 1,78	15,5	0
ESC-EtOac 1	9,10 ± 0,51	24,5	58,1
ESC-EtOac 10	10,18 ± 1,05	28,5	71,6

Os resultados referentes à inibição do crescimento tumoral, promovida pela administração de EB, EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300bar/40°C da *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia, estão representados na Figuras 17, 18 e 19, as quais evidenciam que os extratos supercríticos inibiram o crescimento do tumor, corroborando os dados obtidos nas análises cronofisiológicas.

Figura 19 - Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com EB de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.

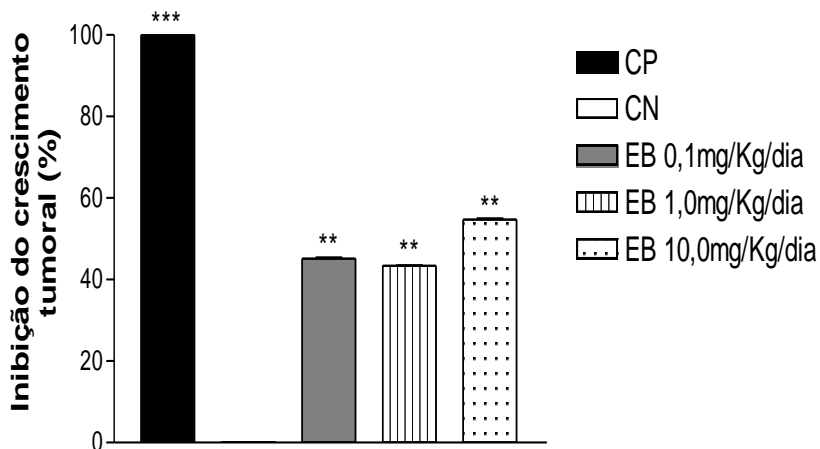


Figura 20 - Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.

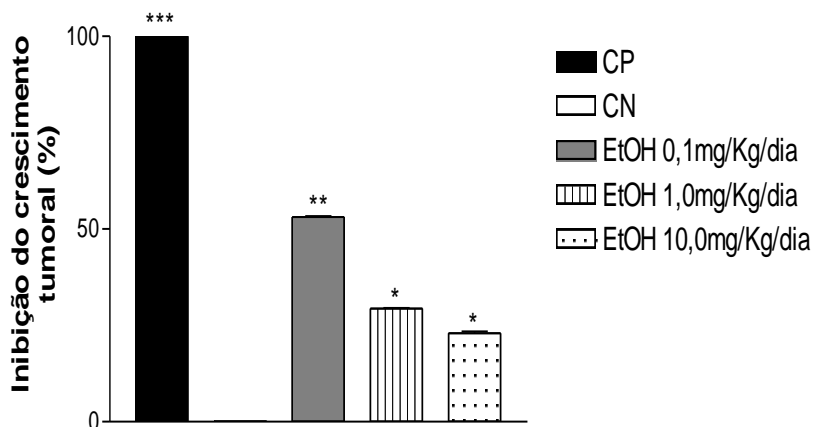
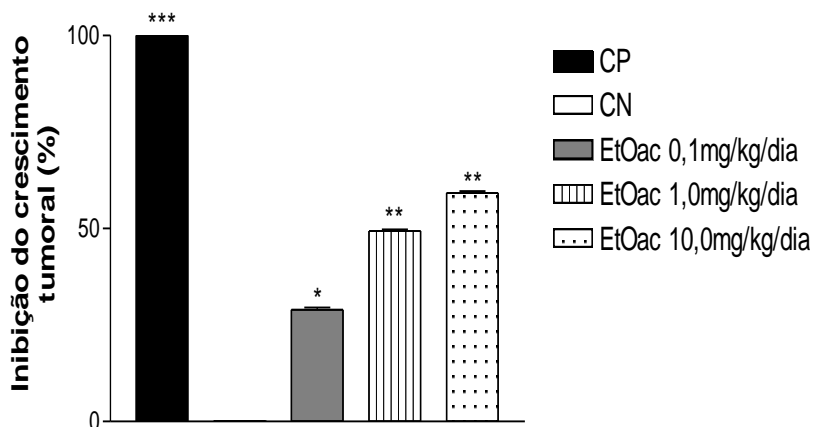


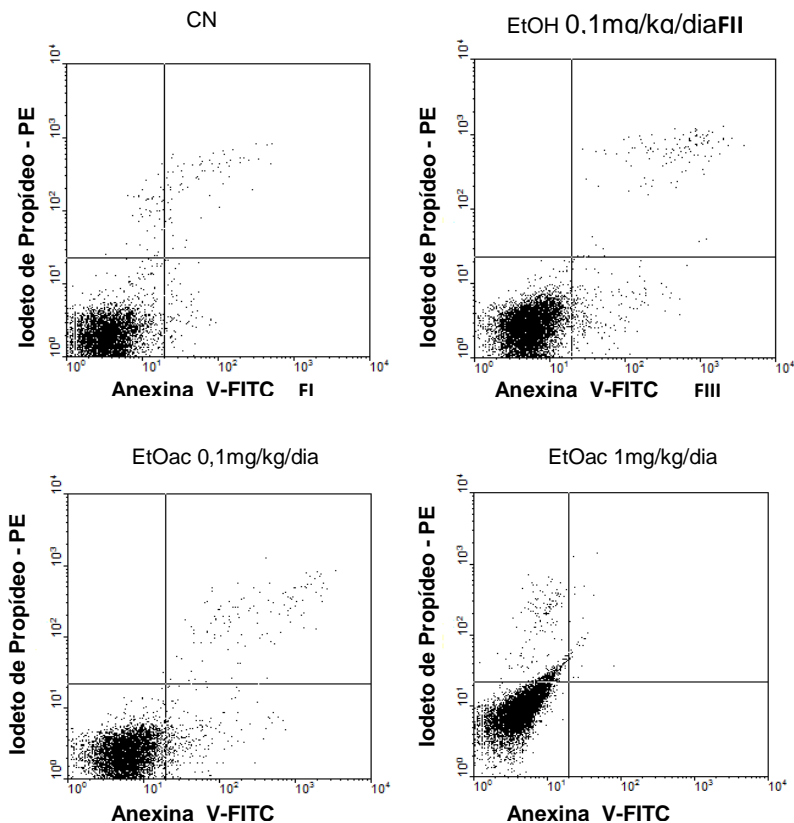
Figura 21 - Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com extrato supercrítico EtOac5% 300bar/40°C de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/kg/dia em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.



3.3 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELOS TRATAMENTOS

O tipo de morte celular induzida *in vivo* pelo tratamento dos animais inoculados com TAE, com extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C 0,1mg/kg/dia, EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C 1 mg/kg/dia está representado na Figura 22, bem como os percentuais de células viáveis, necróticas e apoptóticas calculados são apresentados na tabela 6.

Figura 22 - Apoptose *in vivo* induzida pelo tratamento de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich com os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia, EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C 1 mg/kg/dia.



Os dados obtidos revelaram que os tratamentos com os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia elevaram o percentual de células apoptóticas quando comparados ao grupo controle negativo, em torno de 2,15 e 2,7 vezes, respectivamente. Além disso, pode ser observado que dentre as células apoptóticas, os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C 0,1

mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia foram capazes de elevar o percentual de células em apoptose inicial em torno de 1,5 e 3,4 vezes em relação ao controle negativo, indicando o envolvimento da apoptose no efeito citotóxico e antitumoral no TAE induzidos por esses extratos na concentração de 0,1 mg/kg/dia. No entanto, quando o EtOac5% 300bar/40°C foi administrado na concentração de 1mg/kg/dia, foi observado que as células tumorais foram induzidas a morte celular por necrose também, sendo que houve um aumento de 5 vezes no percentual de células necróticas. A necrose pode ser resultado do acúmulo de alterações celulares geradas durante o processo apoptótico, culminando na perda da integridade da membrana plasmática.

Tabela 6 - Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidos após o tratamento com os extratos supercríticos administrados a camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE.

Tratamentos (mg/kg/dia)	Percentual de células viáveis (%)	Percentual de células necróticas (%)	Percentual de células apoptóticas (%)		Total de células Apoptóticas
			Apoptose Inicial	Apoptose Tardia	
CN	97,54	0,46	1,13	0,86	1,99
ESC-EtOH 0,1	95,70	0,01	2,85	1,43	4,28
ESC-EtOac 0,1	94,57	0,03	3,81	1,59	5,40
ESC-EtOac 1	94,23	5,48	0,01	0,28	0,29

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA

Para avaliar o efeito antiangiogênico dos extratos bruto e supercrítico (EtOH5% 300bar/40° e EtOac5% 300bar/40°C) de *C. sylvestris* foi realizado o ensaio da membrana corioalantóica (CAM).

Nos controles positivos, realizados com ácido retinóico, o número de capilares sanguíneos da membrana corioalantóica foi reduzido em 13%, comparativamente ao controle negativo. Esta inibição foi

considerada estatisticamente significativa em todos os extratos testados (Figura 23 A, C e E).

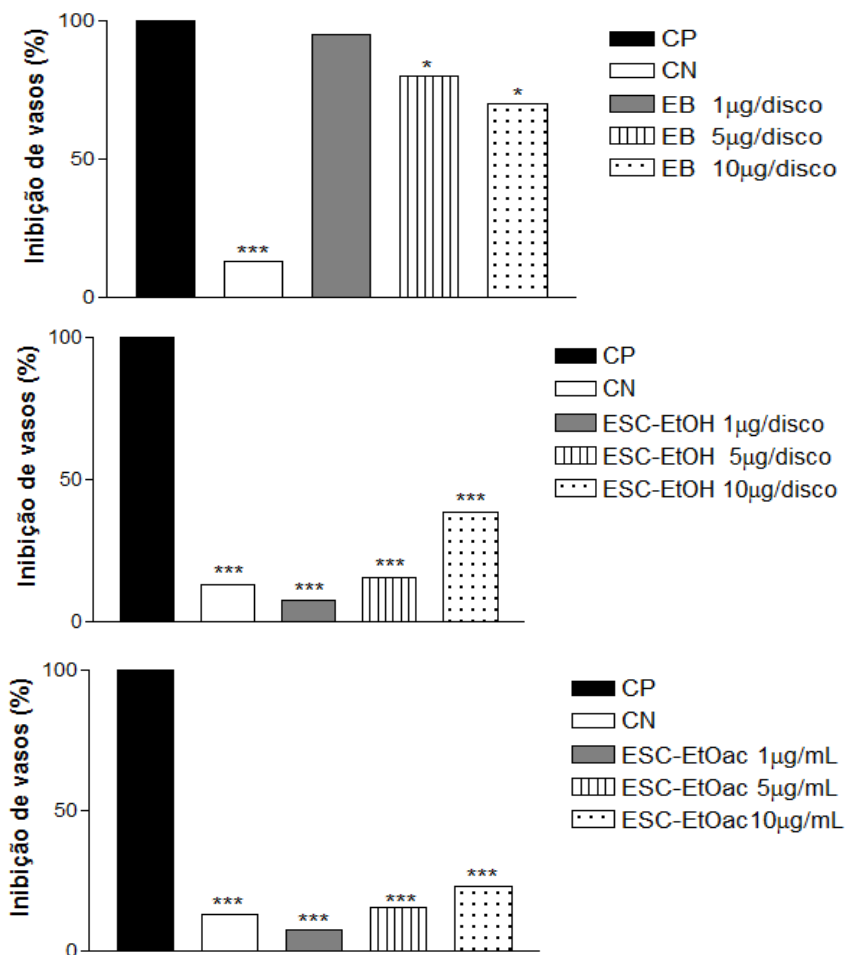
Os tratamentos realizados com EB, nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/disco, somente demonstraram algum efeito inibitório significativo nas duas maiores concentrações da angiogênese quando comparado ao controle negativo. Já comparando os efeitos das diferentes concentrações dos extratos supercríticos e EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300bar/40°C de *C. sylvestris*, observou-se um efeito inibitório bem mais significativo comparado ao grupo controle negativo (Figura 23 C e E).

Surpreendentemente, os valores encontrados para o extrato EtOH5% 300bar/40°C na concentração de 1,0 µg/disco foi de 92,31% de inibição, a de 5,0 µg/disco inibiu 84,60%, enquanto a concentração 10 µg/disco inibiu 61,54% da angiogênese (Figura 23 C). Portanto, os dados obtidos demonstraram que o aumento da concentração dos extratos supercríticos inibiu o efeito antiangiogênico.

Os tratamentos nas concentrações de 1,0; 5,0 e 10 µg/disco de EtOac5% 300 bar/40°C, mostraram efeito inibitório significativo na angiogênese, quando comparado ao controle positivo. Da mesma forma que no tratamento com o extrato EtOH5% 300bar/40°C, curiosamente os valores de inibição da angiogênese encontrados para a concentração de 1,0 concentração 10 µg/disco inibiu 76,90% da angiogênese, utilizando-se o extrato etanólico (Figura 23 E e F). Também neste caso o aumento da concentração do extrato supercrítico inibiu o efeito antiangiogênico.

Finalmente, somente os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C e EtOac 5%300bar/40°C, comparativamente, ao efeito promovido pelo extrato bruto, potencializaram o efeito angiointibitório na concentração de 1,0 mg/mL (Figura 23 A, C e E). No tratamento com EB, quanto maior a concentração testada, maior foi a inibição. Porém, nos demais extratos, a relação foi inversa, ou seja, quanto maior a concentração, menor a inibição da angiogênese.

Figura 23 - Atividade antiangiogênica apresentada pelo EB (A), EtOH5% 300bar/40°C (B) e EtOac5% 300 bar/40°C (C).



4. DISCUSSÃO

A citotoxicidade de extratos, compostos isolados ou associação de compostos pode ser determinada através de diversos critérios, e um dos mais aceitos, é a determinação do seu valor de CI_{50} . De acordo com SUFFINES & PEZZUTO (1990), um dos critérios mais aceitos na avaliação citotóxica frente a um composto ou mistura de compostos, é que, para ser considerado biologicamente ativo este deva apresentar a capacidade de induzir citotoxicidade com valores de CI_{50} inferiores a 200 $\mu\text{g/mL}$. Tomando este dado como parametro para classificação de citotoxicidade podemos inferir que os extratos bruto e supercritico de *B. pilosa* não apresentaram citotoxicidade importante para a linhagem tumoral T-24, uma vez que os ensaios de citotoxicidade pelo método do MTT indicaram que até as concentrações de 500 μg do EB e 100 μg do ESC, não apresentaram toxicidade celular (Figura 14). Nossos resultados corroboram os achados em KVICINSKI et al. (2011), uma vez que os resultados obtidos apontaram uma CI_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$ indicando, portanto, que os extratos de *B. pilosa* não são considerados biologicamente importantes, do ponto de atividade antitumoral.

Por outro lado, a citotoxicidade observada para *C. sylvestris* pelo ensaio do MTT para células MCF-7 e T-24 mostraram importante efeito citotóxico para todos os extratos testados com CI_{50} inferior a 30 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo efeito antitumoral promissor (Tabela 2 e Figura 14). Neste caso, observou-se, que concentrações inferiores dos extratos supercríticos EtOac5% 300bar/40°C e EtOH5% 300bar/40°C, foram capazes de produzir a mesma porcentagem de citotoxicidade que o EB em concentrações superiores. Sendo assim, os extratos supercríticos foram considerados mais eficazes que o EB com respeito ao *screening* para atividade antitumoral *in vitro*. Conforme comentado anteriormente, para um composto ser considerado bioativo, deve apresentar valor de CI_{50} menor que 200 $\mu\text{g/mL}$ (SUFFINES & PEZZUTO, 1990). Este fato foi observado nos extratos, sendo que para as duas linhagem celular testadas, o extrato supercrítico foi considerado mais ativo, pois apresentou menor CI_{50} quando comparado com o EB (MCF-7: EB, EtOH 5% 300bar/40°C e EtOac5% 300bar /40°C, CI_{50} de 263,3 \pm 6,3 ; 25,2 \pm 1,9 e 24,7 \pm 6,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (T-24: EB, EtOH 5%

300bar/40°C e EtOac5% 300bar /40°C, CI_{50} de $67,1\pm 2,9$; $9,5\pm 2,1$ e $4,6$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). A maior eficiência do extrato supercrítico provavelmente deve-se o fato deste tipo de extração concentrar determinados compostos como na planta em estudo possivelmente seriam o α -humuleno, β -cariofileno e diterpenos clerodânicos.

Nossos resultados corroboram os estudos realizados por FERREIRA et al. (2010), os quais verificaram efeito de redução no crescimento celular em diversas linhagens de células leucêmicas (HL-60, K-562 and CEM), quando testada a casearina X isolada de *C. sylvestris*. Além disso, já foram observados em outros estudos que diterpenos clerodânicos, como esta casearina X, são capazes de induzir citotoxicidade em várias linhagens de células tumorais humanas (SANTOS et al., 2010).

Além dos diterpenos clerodânicos também foi comprovada a atividade citotóxica de outros compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*, como sesquiterpenos (β -cariofileno e α -humuleno), que mostraram elevada citotoxicidade para células A-549, DLD-1, M4BEU, HeLa, Bel-7402 e CT-26 (LEGAULT et al., 2003; SYLVESTRE et al., 2005, 2006; HOU et al., 2006). Além disso, estudos realizados por TUNDIS et al. (2009), mostraram que o β -cariofileno e α -humuleno isolados de *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae), apresentaram importante citotoxicidade para as linhagens C32 e LNCaP.

Uma possível justificativa para a melhoria da eficiência da extração supercrítica em relação ao extrato com respeito a elevação da citotoxicidade é o fato de representar mais fielmente os componentes químicos das matérias-primas originais; além disso, o isolamento e/ou concentração dos compostos bioativos torna-se mais eficiente (MAUL, 1996). Assim, estudos recentes demonstraram que o método de extração supercrítica tem como característica selecionar importantes princípios ativos de espécies vegetais melhorando significativamente a atividade biológica de extratos de planta, levando também a significativa atividade citotóxica em linhagens tumorais (PARISOTTO et al., 2012, FELIPE, 2010).

Outro ensaio rotineiramente empregado nas pesquisas para avaliação preliminar do efeito antitumoral de extratos, compostos

isolados e associação de compostos, é o ensaio clonogênico ou de formação de colônias. Este é um ensaio *in vitro* de avaliação da proliferação celular baseado na capacidade das células semeadas em densidade de células isoladas originarem UFCs (Unidades Formadoras de Colonia). Em geral, é o método de primeira escolha para determinar a capacidade antiproliferativa de um possível agente citotóxico e citostático na avaliação da atividade antitumoral (FRANKEN et al., 2006). A detecção desta atividade é interessante, pois hoje em dia sabe-se que não somente as substâncias citotóxicas podem ser promissoras para o desenvolvimento de um medicamento antitumoral, mas, também compostos antiproliferativos, que a princípio podem ser citotóxicos indiretamente, uma vez que na verdade eles induzem as células a um estado de morte clonogênica, podendo até permanecer viáveis, mas perdem a sua capacidade de divisão.

Mais uma vez os resultados obtidos através do tratamento à base dos extratos bruto e supercrítico 250 Bar/40°C de *B. pilosa* (100 e 200 µg/mL) indicaram uma ineficácia para reduzir e/ou impedir a proliferação das células tumorais (Figura 14). Não foi detectada diferença estatística na contagem do número de UFCs, quando comparadas células tratadas por estes extratos com o controle negativo. Por outro lado, os resultados obtidos com o tratamento das células T-24 com de EB de *C. sylvestris* foi considerado bastante promissor, pois, mostrou que o extrato testado nas concentrações de 100 e 200 µg/mL impediu totalmente a proliferação das células tumorais, nem sendo possível detectar a formação de UFCs (Figura 15). Infelizmente, a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato supercrítico de *C. sylvestris* não foi possível de ser realizada por problemas de contaminação das culturas de células.

Objetivando investigar possíveis mecanismos envolvidos na atividade citotóxica e antiproliferativa promovida pelos extratos de *C. sylvestris*, foi avaliada a capacidade destes produtos causarem intercalação ao DNA, e para tal utilizou-se o teste de dano direto ao DNA plasmidial. A metodologia consiste numa avaliação direta da capacidade de ligação a ser estabelecida entre os produtos testes e a dupla hélice do DNA. Se houver ligação entre ambas ocorre a

intercalação entre as bases púricas e pirimidínicas, interrompendo o prolongamento da cadeia de DNA o que pode causar graves distorções cromossômicas. Como consequência, ocorre bloqueio da síntese do RNA, DNA ou ambos, provocando uma ruptura nas fitas de DNA bloqueando a duplicação celular e conseqüentemente levando à morte celular possivelmente por apoptose (BOLAND et al., 1997). Portanto, o teste da atividade nucleásica foi o método de escolha para verificar o possível efeito de fragmentação do DNA pelos extratos em estudo.

No presente estudo, observou-se que todos os extratos de *C. sylvestris* avaliados apresentaram, nas concentrações testadas, dano direto ao DNA. O dano foi possível de ser detectado através de uma alteração no perfil eletroforético normal do DNA, caracterizado pela conformação FII, porém, a forma alterada FIII somente fez-se presente no extrato EtOH5%/300 bar/40°C (Figuras 17 e 18). Diante dos resultados obtidos, sugere-se que o efeito citotóxico e antiproliferativo promovido por esses extratos possa ser devido à intercalação do DNA plasmidial por alguns compostos presentes nos extratos. Tendo em vista os vários relatos sobre os efeitos citotóxicos e citostáticos de diterpenos clerodânicos, α -humuleno, β -cariofileno e ácido gálico, presentes nos extratos supercríticos de *C. sylvestris* podemos especular que a interação direta com o DNA plasmidial possa se dever a estes compostos.

A maior parte das terapias antineoplásicas empregadas atualmente no tratamento do câncer, especialmente a radioterapia e certas classes de quimioterápicos, causam morte da célula por dano direto ao DNA, uma vez que esta biomolécula está envolvida na replicação, transcrição e regulação de genes. Estes agentes podem gerar quebras do DNA (fita única-FII ou dupla-FIII) através de reações de alquilações mono ou bi-funcionais. Após administração destas terapias, a resposta celular para as lesões geradas inicia-se através da detecção do dano e posteriormente disparo da biossinalização que conduz à parada do ciclo celular e reparo. Entretanto, nos casos de danos muito severos, as células dispõem de uma via apoptótica que induz a morte celular, sendo este o mecanismo pelo qual vários quimioterápicos de ação inespecífica atuam (BORNER, 2003). Os agentes antineoplásicos mais antigos e mais utilizados terapeuticamente são conhecidos como agentes

alquilantes e apresentam interação direta com o DNA (REY et al., 2009). Estes agentes antitumorais citados são conhecidos por apresentarem mecanismo de ação ciclo-celular não específico, sendo divididos em subclasses de acordo com o modo de interação com a molécula de DNA que podem ser: inibição da síntese de nucleotídeos (análogos das bases nitrogenadas), efeito direto ao DNA (alquilantes como cisplatina), ligantes que interagem na fenda menor do DNA (berenil), alteração no pareamento de bases (proflavina; acridina) e inibição da DNA-girase (doxorubicina) (ALMEIDA et al., 2005).

A cisplatina, um composto genotóxico, amplamente utilizado no tratamento de tumores, é o exemplo clássico de medicamento antitumoral, que tem como alvo a molécula de DNA. Ao ligar-se a esta molécula, o medicamento em questão é capaz de formar aductos cuja natureza afeta um determinado número de vias de sinalização, bloqueando a duplicação e a transcrição induzindo a morte celular por apoptose ou necrose (FUERTES et al., 2003).

A classe dos antibióticos antitumorais (antraciclina) representada pelo medicamento doxorubicina, aprovada para uso terapêutico em 1984 pela FDA (Food and Drug Administration), também apresenta efeito alquilante cujo mecanismo de ação é a formação de ligações interfilamentares com o DNA que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da enzima topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos do DNA (ALMEIDA et al., 2005).

Por outro lado, além do possível efeito de intercalação direta do DNA, já é bem estabelecido na literatura que os compostos casearinas, α -humuleno, β -cariofileno e ácido gálico, quando administrados em determinadas concentrações, possuem atividades antiinflamatória e antitumoral, por serem capazes de promover um ataque oxidativo às bases nitrogenadas do DNA. Este ataque oxidativo pode culminar na fragmentação do mesmo (YOSHINO et al., 2002; DA SILVA et al., 2008; FERREIRA et al., 2010). Cabe ressaltar que parte dos agentes antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica, induzem estresse oxidativo, resultando num dano ao DNA e demais estruturas críticas para sobrevivência celular, o que desencadeia apoptose nas células malignas (TSANG et al., 2003; FERREIRA et al., 2010).

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho nos permite supor que um dos possíveis alvos moleculares dos extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* seria o DNA, sendo que o efeito citotóxico e/ou citostáticos estariam associados, tanto à intercalação direta do DNA por alguns compostos presentes nestes extratos quanto pelo ataque oxidativo as bases puricas e pirimídicas do mesmo. Em ambos os casos ocorreria a fragmentação do DNA e, conseqüentemente, bio-sinalização para apoptose.

Finalmente, nossos resultados corroboram dados da literatura, os quais detectaram a presença de dois sesquiterpenos, o α -humuleno e β -cariofileno, na composição química de *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011), e indicam que estes apresentam importante capacidade de reduzir a viabilidade e proliferação celular sobre diversas linhagem de células cancerígenas, incluindo células TAE e MCF-7 *in vitro* (LEGAULT et al., 2003; PARISOTTO et al., 2012). Além disso, foi mostrado que a extração supercrítica foi capaz de concentrar esses compostos de extratos de plantas, aumentando a atividade biológica, quando comparado às extrações convencionais (MICHELIN et al., 2009). Por outro lado, existem outros estudos que contemplam a interface entre a presença de sesquiterpenos com a atividade antitumoral, como por exemplo, os resultados obtidos por SILVA et al. (2007), que mostraram aumento do PAL no modelo de estudo do TAE. O possível mecanismo sugerido seria a capacidade destes compostos de inibir a expressão da COX-2, levando à parada no ciclo celular (proliferação) e indução da apoptose (CERELLA et al., 2010).

De acordo com CLARKSON & BURCHENAL (1965), o melhor parâmetro para se avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de determinado agente é o aumento do percentual de longevidade (PAL). Sob este aspecto, o tratamento com a maior concentração de EB (10 mg/Kg/dia) da *C. sylvestris*, proporcionou aumento significativo do percentual de PAL dos animais (Tabela 3). Já o extrato supercrítico EtOH5% 300bar/40°C (ESC-EtOH) elevou o PAL, tanto na concentração de 1 quanto de 10 mg/Kg/dia, conforme mostra a Tabela 4. Mas, curiosamente, a concentração de 1 mg/Kg/dia foi mais efetiva em elevar o PAL que a de 10 mg/Kg/dia.

Porém, o extrato que mostrou maior impacto sobre o percentual de sobrevida dos animais foi o ESC-EtOac5% 300bar/40° C 10 mg/Kg, uma vez que elevou em 71,6% a longevidade do grupo tratado em relação ao controle negativo (Tabela 5). Esses resultados seriam justificados, a princípio, pelo fato de que o extrato supercrítico, em altas doses, teria maiores concentrações de substâncias com capacidade citotóxica e antiproliferativa (conforme mostrado nos ensaios *in vitro*). Como já citado anteriormente, a extração supercrítica concentra e representa mais fielmente os componentes químicos das matérias-primas originais (MAUL, 1996).

Considerando os resultados referentes à inibição do crescimento tumoral do EB de *C. sylvestris*, os valores sugerem maior eficácia nas maiores doses testadas (10 mg/kg/dia) (Figura 19), uma vez que a inibição do crescimento tumoral mostrou clara atividade antitumoral nestas doses, corroborando os demais resultados obtidos *in vivo* (aumento do PAL). Já os ESC mostraram-se mais eficientes em inibir o crescimento tumoral, sendo o EtOH5% 300 bar/40°C foi o mais potente, proporcionando maior inibição do crescimento tumoral nas menores doses (0,1 mg/kg/dia) (Figura 21). Curiosamente, o EtOac5% 300bar/40°C apresentou considerável atividade redutora do tumor em sua dose intermediária (1 mg/kg/dia) (Figura 21). KVIECINSKI et al. (2011) mostrou que o ESC em concentrações elevadas apresentou maiores efeitos na redução tumoral, quando comparado ao EB de *B. pilosa*, sendo compatíveis com os dados obtidos por nosso grupo de pesquisa.

É importante observar que, de maneira geral, a utilização de co-solventes na extração supercrítica das folhas da *C. sylvestris* levou a uma maior atividade citotóxica e citostática *in vitro* bem como antitumoral *in vivo*. Segundo DÍAZ-REINOSO et al. (2006), o uso de co-solventes na extração supercrítica é uma forma de melhorar a solubilidade dos compostos desejados e/ou elevar a seletividade da extração (pela mudança de polaridade do fluido supercrítico), aumentando o rendimento da extração.

Os co-solventes são solventes orgânicos que apresentam volatilidade intermediária entre o solvente supercrítico e o soluto a ser

extraído, sendo adicionados em pequenas quantidades para alterar as características da mistura co-solvente/solvente, tais como polaridade e interações específicas com o soluto (pontes de hidrogênio), podendo interagir com sítios ativos da matriz sólida e favorecer a difusão do CO₂ para extrair os compostos desejados, sem mudar de forma significativa a densidade e compressibilidade do solvente supercrítico original (MUKHOPADHYAY, 2000; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Diversos solventes orgânicos podem ser utilizados como co-solventes na extração supercrítica. Entretanto, o etanol é o solvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica (MICHIELIN, 2009). Entretanto, no presente estudo, tanto o co-solvente etanol quanto o acetato de etila mostraram-se adequados para extração dos compostos bioativos, uma vez que ambos os extratos apresentaram importante atividade citotóxica.

Ainda com o intuito de investigar os possíveis mecanismos de ação antitumoral dos extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C 0,1mg/kg/dia, EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia e EtOH5% 300bar/40°C 1,0 mg/kg/dia, foram realizados ensaios *in vivo* para caracterizar prioritariamente a morte celular por apoptose e, secundariamente, por necrose no modelo do TAE *in vivo* por citometria de fluxo (Figura 22). Estes ensaios revelaram que os animais tratados com o EtOH5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia e EtOac5% 300bar/40°C 0,1 mg/kg/dia apresentaram características típicas de apoptose. Já os animais inoculados com TAE tratados com EtOac5% 300 bar/40°C 1,0 mg/kg/dia, induziram a morte celular por necrose, sugerindo que o aumento da concentração do ESC poderiam promover uma rápida ativação de vias de apoptose seguido indução de necrose, que seria a consequência de uma intensa sinalização para morte celular (DENECKER et al., 2001).

FERREIRA et al. (2010) em um estudo com compostos diterpenos clerodânicos isolados da *C. sylvestris*, em especial as casearinas X, mostraram que células HL-60 tratadas com estes diterpenos em concentrações menores, apresentaram características celulares particulares como manutenção da integridade da membrana,

porém com externalização da fosfatidilserina e controle despolarização mitocondrial, todas características da apoptose. Com o aumento da concentração da casearina X, características de necrose, como a perda da integridade da membrana, perda dos mecanismos de controle da despolarização mitocondrial e alta ativação de caspase 3/7, foram observados. Estes dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo com extratos supercríticos das folhas de *C. sylvestris*, sugerindo-se que a regulação de processos celulares é dose-dependente e que, portanto, dependendo da concentração usada, podem ser influenciados e/ou alterados diferentes processos de morte celular.

Sabe-se que a via intrínseca da apoptose é ativada pela ação de diferentes sinais intracelulares e extracelulares, tais como as vias ativadas por agentes capazes de causar danos ao DNA (radiação ultravioleta, substâncias mutagênicas e agentes quimioterápicos), por baixa concentração de nutrientes, por ausência de fatores de crescimento celular e por níveis elevados de espécies reativas de oxigênio. Tais estímulos podem gerar sinais de estresse, que são detectados pela mitocôndria, levando a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol da célula. Em seguida, o citocromo c se liga a Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), desencadeando a ativação da cascata de caspases e, consequentemente, a apoptose (IGNEY & KRAMMER, 2002; ADJEI, 2005).

Como já comentado anteriormente, tanto as casearinas quanto os sesquiterpenos α -humuleno e β -cariofileno, já isolados da *C. sylvestris*, são capazes de gerar estresse oxidativo em determinadas concentrações, portanto seriam capazes de ativar as vias de apoptose.

Apesar de diversos agentes quimioterápicos levarem à morte de células neoplásicas através da indução de apoptose, este não é o único tipo de morte celular eficientemente capaz de destruir células malignas. A necrose, embora seja um mecanismo inespecífico, é tão eficaz quanto a apoptose na terapia do câncer, uma vez que favorece a ativação do sistema imune contra o tumor (KERR et al., 1994; IGNEY & KRAMMER, 2002; MASQUELIER et al., 2004). Além disso, nos casos onde as vias de apoptose estão deficientes ou ausentes (como observado

em alguns casos na carcinogênese), a necrose parece, por vezes, possibilitar uma forma alternativa de morte celular (SUN et al., 2006). No presente estudo com a *C. sylvestris*, foi possível observar que a morte por necrose esteve presente na maior concentração do extrato supercrítico EtOac5% 300 bar/40°C (1,0 mg/kg/dia).

Células apoptóticas e células necróticas diferenciam-se entre si em relação às suas características funcionais e morfológicas. A necrose é uma forma patológica de morte celular resultante de um insulto agudo à célula, tipificado pelo rompimento das membranas celular e nuclear, enquanto que a apoptose, considerada um evento fisiológico é caracterizada por uma autodigestão controlada da célula, onde a integridade da membrana celular é mantida. Neste processo são observadas ainda alterações características no núcleo celular, assim como diminuição da função mitocondrial (THOMPSON, 1995).

O desenvolvimento de metástase constitui a principal causa de mortalidade associada ao desenvolvimento do câncer, uma vez que está associada à resistência aos tratamentos convencionais do câncer (FIDLER, 2002). Dessa forma, a pesquisa acerca de fármacos e/ou terapias capazes de bloquear a metástase tumoral vem despertando grande interesse nos últimos anos (LEE et al., 2008).

Os agentes quimioterápicos mais utilizados atualmente são aqueles capazes de induzir a apoptose celular (DEBATIN, 1999). Neste contexto, os extratos supercríticos *C. sylvestris* apresentam-se como produtos promissores na terapia do câncer, considerando induzirem preferencialmente a apoptose que necrose (Tabela 6).

A perda do fino equilíbrio do processo de angiogênese tem sido implicada no crescimento de tumores e metástases, além da progressão de distúrbios como hemangiomas, psoríase e artrite reumatóide (CARMELIET, 2003). Neste contexto, o presente trabalho demonstrou que os extratos supercríticos de *C. sylvestris* inibem efetivamente a angiogênese, especialmente em concentrações menores (Figura 23).

Para o estudo da inibição angiogênica dos extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris*, utilizou-se o método da CAM, com embriões de *Gallus domesticus*. O objetivo foi analisar a atividade

inibitória dos extratos no desenvolvimento vascular, uma vez que estes apresentaram uma importante atividade citotóxica e antitumoral.

Diversas compostos sintéticos ou derivados de produtos naturais vem apresentando atividade antiangiogênica, como por exemplo, o resveratrol, os fitoestrógenos da soja e a cefarantina, e concomitante atividade antitumoral (HARIKUMAR et al., 2009; KANG et al., 2009; HARADA et al., 2009).

No presente estudo, os tratamentos com extratos supercrítico de *C. sylvestris* nas concentrações de 1,0; 5,0 e 10 µg/disco de EtOH5% 300bar/40°C e EtOac5% 300 bar/40°C apresentaram um importante efeito antiangiogênico (concentração de 1,0 µg/disco inibiu 76,90% e 92,30%, respectivamente), uma vez que foram capazes de reduzir o número de vasos, quando comparados ao controle negativo. Além disso, deve-se levar em consideração que tal efeito antiangiogênico ocorreu de maneira dose-dependente, uma vez que foi observada maior inibição de vasos, de acordo com a menor dose administrada (Figura 23 E e F).

Os extratos supercríticos EtOH5% 300bar/40°C e EtOac 5%300bar/40°C, comparativamente, ao efeito promovido pelo extrato bruto, potencializaram o efeito angiointibitório na concentração de 1 mg/mL (Figura 23 A, C e E). No tratamento com EB, quanto maior a concentração testada, maior foi a inibição. Porém, nos demais extratos a relação foi inversa, ou seja, quanto maior a concentração, menor a inibição da angiogênese. Estes dados sugerem que os ESC em concentrações elevadas teriam um efeito pró-angiogênico e também que se faz necessário a realização de ensaios em concentrações menores que 1 mg/mL, para se ajustar a faixa de concentração em que tais extratos teriam efeito antiangiogênico.

Alguns estudos determinaram que compostos moduladores da angiogênese, poderia atuar de formas diferenciadas nas etapas do processo, seja prevenindo o início da angiogênese, inibindo o crescimento de vasos sanguíneos recém-formados, e/ou inibindo diversas etapas da cascata de sinalização do processo. Estudos prévios com vários compostos, motraram efeito antiangiogênico quando os mesmos atuam prevenindo a iniciação da angiogênese, bem como

inibindo o crescimento de vasos sanguíneos recém-formados (LIU et al., 2006).

Dentro desse contexto, a atividade antiangiogênica apresentada pelos extratos supercríticos de *C. sylvestris* testados nesse estudo, poderia estar diretamente relacionada à presença de compostos químicos como os diterpenos, α -humuleno e β -cariofileno, todos de atividade antitumoral comprovada (DA SILVA et al., 2008b; DA SILVA et al., 2009; WANG et al., 2009, SANTOS et al., 2010). Cabe ressaltar a necessidade da realização de estudos mais aprofundados com o objetivo de estabelecer o mecanismo de ação pelo qual estes extratos causam o efeito antiangiogênico.

Em resumo, os ensaios realizados durante a execução do presente estudo indicaram que os extratos bruto e supercrítico de *B. pilosa* não apresentaram uma concomitante promissora atividade citotóxica e antitumoral na faixa de concentração testada (0,1 - 500 μ g). Por outro lado, tanto os extratos bruto quanto supercríticos, com ou sem adição de co-solvente, apresentaram importante atividade citotóxica, antiproliferática, antitumoral e antiangiogênica na faixa de concentração testada em ensaios *in vitro* e *in vivo* (0,1 a 100 μ g).

5. CONCLUSÕES

1. A primeira abordagem desse trabalho permitiu concluir que os EB e ESC de *B. pilosa* não apresentaram atividade citotóxica e citotástica (antiproliferativa) para células T-24, na faixa de concentração considerada bioativa (até 200 µg). Portanto, não teria atividade antitumoral promissora no que se refere ao câncer de bexiga.
2. A segunda abordagem desse trabalho permitiu concluir que os extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* apresentaram atividade citotoxicidade e citotástica (antiproliferativa) para células MCF-7 e T-24 na faixa de concentração considerada bioativa (até 200 µg). Portanto, teria atividade antitumoral promissora no que se refere ao câncer de mama e bexiga.
3. A terceira abordagem desse trabalho permite concluir que um dos possíveis mecanismos de ação associados à atividade citotóxica e citotástica dos extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* deve-se à capacidade de fragmentar o DNA, seja por intercalação direta dos seus constituintes químicos com esta macromolécula, ou por ataque oxidativo às bases nitrogenadas.
4. A quarta abordagem desse trabalho permitiu concluir que os extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* apresentaram, em determinadas concentrações, atividade antitumoral frente ao tumor ascítico de Erlich, comprovado tanto pelo aumento da sobrevivência dos animais, quanto pela inibição do crescimento tumoral.
5. A quinta abordagem desse trabalho permitiu concluir que um dos possíveis mecanismos de ação associados à atividade antitumoral dos extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* se deve possivelmente à sua capacidade de fragmentar o DNA e desta forma induzir a apoptose. Entretanto, este fato não exclui a participação da necrose neste processo de morte celular uma vez que em dose maiores dos ESC foi possível detectar células em estágio de necrose.

6. A sexta abordagem desse trabalho permitiu concluir que os extratos bruto e supercrítico de *C. sylvestris* possuem atividade antiangiogênica em determinadas concentrações. Entretanto melhores estudos devem ser realizados para ajustar a faixa de concentração em que este efeito se manifesta adequadamente.
7. Dados relatados na literatura nos permitem especular que, possivelmente, as atividades citotóxica, citotástica, pró-apoptótica, antitumoral e antiangiogênica dos extratos de *C. sylvestris* devem-se à presença de diterpenos clerodânicos, α -humuleno e β -cariofileno presentes nesta composição química.
8. Finalmente, todos os ensaios biológicos e bioquímicos realizados nos permitiram concluir que os extratos supercríticos estudados foram mais eficientes que o extrato bruto, no que diz respeito às atividades citotóxica, citotástica, pró-apoptótica, antitumoral e antiangiogênica. Adicionalmente, a adição de um co-solvente a extração supercrítica aumentou esta eficiência biológica, apesar de não ter sido possível distinguir entre o etanol e o acetato de etila sobre a maior eficiência para as atividades avaliadas.

6. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desse estudo abriram novas propostas de trabalho que possam servir de complemento ou até mesmo de novos rumos a serem tomados a partir dos resultados obtidos, tais como:

1. O efeito citotóxico e citotástico devem ser avaliados sobre outras linhagens celulares tumorais e normais, para caracterizar melhor o efeito e a seletividade dos compostos presentes nos extratos.
2. Com relação ao efeito pró-apoptótico, deve-se investigar a expressão de marcadores de apoptose como p53, Bcl-2, citocromo c.
3. Com relação ao efeito citotástico, deve-se investigar a os marcadores de progressão do ciclo celular por citometria de fluxo.
4. Devem-se realizar estudos em outras concentrações de extratos supercríticos para avaliação da atividade antitumoral com utilização da citometria de fluxo, para melhor avaliar o efeito sobre o ciclo celular e apoptose.
5. Devem-se realizar estudos em outras concentrações e condições de extratos supercríticos, para melhor avaliar a atividade antiangiogênica utilizando outros modelos além do CAM, além de se avaliar a expressão do VEGF e metaloproteinase.
6. Por fim, fazer uma análise fitoquímica mais detalhada, que permita caracterizar adequadamente a presença e a concentração dos compostos α -humuleno, β -cariofileno e diterpenos clerodânicos em cada extrato testado.

REFERÊNCIAS

- ABSY, M.L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *C. sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, p. 641-676, 1973.
- AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-11, 2004.
- AITHAL, K.B.; KUMAR, S.; RAO, B.N.; UDUPA, N.; RAO, S.B. Tumor growth inhibitory effect of juglone and its radiation sensitizing potential: *in vivo* and *in vitro* studies. **Integrative Cancer Therapies**, vol. 11(1) p. 68-80, 2012.
- 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.
- ALISSON, M.R. **The cancer Handbook**. 1ed. – 2 volumes- New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129. 2005.
- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos**. Rosario: Corpus Libros, 2004. p. 577–579.
- ALVAREZ, L.; MARQUINA, S.; VILLARREAL, M.L.; ALONSO, D.; ARANDA, E.; DELGADO, G. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, vol. 62, 355–357, 1996.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: ANVISA, 2011.126p.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *C. sylvestris* –I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 1059 p.

BERTRAM J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p.167-223, 2001.

BLAISE, G.A.; GAUVIN, D.; GANGAL, M. AUTHIER, S. Nitric oxide, cell signaling and cell death, **Toxicology**, v. 208, p. 177-192, 2005.

BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA D.H.; LOPES, M.N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71 (2), p. 181-187, 1999.

BONIFAZI, E.L.; RÍOS-LUCI, C.; LEÓN, L.G.; BURTON, G.; PADRÓN, J.M.; MISICO, R.I. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol, **Bioorganic Medicine Chemistry**. Vol. 18 p. 2621–2630, 2010.

BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal Ethnopharmacology**, vol. 57, p. 131–138, 1997.

- BRASSARD, D.L.; MAXWELL, E.; MALKOWSKI, M.; NAGABHUSHAN, T.L.; KUMAR, C.C., ARMSTRONG, L. Integrin $\alpha v \beta 3$ - mediated activation of apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 251, p. 33-45, 1999.
- BROOKS, P.C. Role of integrins in angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 2423-2429, 1996.
- BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**, vol. 4, Darmstadt, Steinkopff, 1994.
- BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67(12), p. 2141-2153, 2004.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciências e Cultura**, v.55 (3), 2003.
- CAMARGO, F.G.; GOMES, E.; PANNUNZIO, E.; BUENO, V.S. Uso tópico do extrato fluido de folha de guaçatonga (*C. sylvestris* Swartz) topicamente em lesões de estomatite herpética. **LECTA- Universidade de São Francisco (USF) de Bragança Paulista**, v. 1, p.121-127, 1993.
- CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, vol. 6, p. 389–395, 2000.
- CARMELIET, P. Angiogenesis Modulations in cancer research: novel clinical approaches. **Nature Review**, vol. 1, p. 415–426, 2002.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature**, v. 9, n. 6, p. 653-660. 2003.
- CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature Reviews**, vol. 473, p. 298-307, 2011.

CHIPPERFIELD, H.; KULDIP, S.B.; SIMON, M.C.; NURCOMBE, V. Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. **International Journal of Developmental Biology**, v.46, p. 661–670, 2002.

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

COLMAN, M.S.; AFSHARI, C.A., BARRET, J.C. Regulation of p53 and activity in response to genotoxic stress. **Mutation Research**, v.462, p. 179-188, 2000.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; Robbins. **Patologia Estrutural e Funcional**, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996.

CONZEN, S.D.; GOTTLOB,K.; KANDEL, E.S.; KHANDURI P.; WAGNER, A.J.; O'LEARY, M.; HAY, N. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20(16), p. 6008-6018, 2000.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**, v.2, p.647-656, 2002.

DA SILVA, A.C.; BALZ, D.; DE SOUZA, J.B.D'A.; MORSCH, V.M. CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase, 50-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *C. sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509–514, 2006.

DA SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *C. sylvestris* (Flarcortinaceae). **European Journal of Pharmacology**. v. 608 (1-3), p. 76-83, 2009.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *C. sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008a.

DA SILVA, S.I.; FIGUEIREDO, P. M. S.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *C. sylvestris* on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazon**, v. 38, p.107-112, 2008b.

D'AMORE, P.A., THOMPSON, R.W. Mechanisms of angiogenesis. **Annual Review of Physiology**, v.49, p.453-464, 1987.

DEBATIN, K.M. Activation of apoptosis pathways by anticancer drugs. **Advances in Exerimental Medicine and Biology**, v. 457, p. 237-244. 1999.

DEJEANS, N.; TAJEDDINE, N.; BECK, R.; VERRAX, J.; TAPER, H.; 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, **Biochemistry of Pharmacology**, vol. 79, p. 1221–1230, 2010.

DE CARVALHO, P.R.F.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; KINGSTON, D.G.I.; BOLZANI, V.S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *C. sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49 (6), p. 1659-1662, 1998.

DE MATTOS, E.S.; FREDERICO, M.J.S. ; COLLE, T.D. ; DE PIERI, D.V. ; PETERS, R.R.; PIOVEZAN, A.P. Evaluation of antinociceptive activity of *C. sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.1-6, 2007.

DE MESQUITA, M.L., DESRIVOT, J., BORIES, C., FOURNET, A., PAULA, J.E., GRELLIER, P., ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 783–787, 2005.

DE MESQUITA, M.L.; DE PAULA, J.E; PESSOA C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123 (3), p. 439-445, 2009.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJÓ, J.C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-69, 2006.

DUESBERG, P.; RASNICK, D. Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.47, p.81-107, 2000.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 663-669, 2004.

EISINGER, F.; JACQUEMIER, J.; CHARPIN, C.; STOPPA-LYONNET, D.; BRESSAC-DE-PAILLERETS, B.; PEYRAT, J.P.; LONGY, M.; GUINEBRETIERE, J.M.; SAUVAN, R.; NOGUCHI, T.; BIRNBAUM, D.; SOBOL, H. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited, **Cancer Research**. v. 58, p.1588-1592, 1998.

ELICEIRI, B.P.; CHERESH, D.A. Adhesion events in angiogenesis. **Current Opinion Cell Biology**, v. 13(5), p. 563-568, 2001.

ENGERS, R.; GABBERT, H.E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.126, p.682-692, 2000.

ESTEVEES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; SCHNEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CRAVALHO, J.C.T. **Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from**

C. sylvestris Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 191-196, 2005.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v. 281, p.1317-1322, 1998.

FACHINGER, G.; DEUTSCH, U.; RISAU, W. Functional interaction of vascular endothelialprotein- tyrosine phosphatase with the angiotensin receptor Tie-2. **Oncogene**, v.18 (43), p.5948-5953, 1999.

FELLOWS, L.E. **Pharmaceuticals from traditional medical plants and other: Future prospects:** In: J. D. Coomers, ed. New drugs from natural sources. 1^a Ed. London: IBC technical Services, 1992.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569(3), p.228-236, 2007.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 14, p. 235–245, 1999.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 188, p. 497–504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review.

Anais da Academia Brasileira de Ciências, vol. 83, p. 1373-1384, 2011.

FELIPE, K.B. **Estudo do efeito antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 105 p., 2009.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 313, p. 355-364, 1992.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **New England Journal of Medicine**, v.333, p.1757 – 1763, 1995.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v.285, p. 1182-1186, 1971.

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

FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Biochemical modulation of cisplatin mechanism of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 645-662. 2003.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? **Acta Tropica**, vol. 48 p. 251–261, 1991.

GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEL, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.55, p. 178-194, 2005.

GIANNIS, A.; RÜBSAM, F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis: new drugs in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 36(6), p. 588-590, 1997.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria as targets for chemotherapy. **Apoptosis**, v. 14, p.624-640, 2009.

GREEN D.R., REED J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p.1309-1312, 1998.

GRETARSDOTTIR, S.; THORLACIUS, S.; VALGARDSDOTTIR, R.; GUDLAUGSDOTTIR, S.; SIGURDSSON, S.; STENARSDOTTIR, M.; JANASSON, J. G.; ANAMTHAWAT-JOHSSON, K.. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability, **Cancer Research**, v. 58, p.859-862, 1998.

GRIFFIOEN, A.W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacological intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 237-268, 2000.

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha\beta 3$ integrin for a new cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 36, p. 1374-1389, 1997.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis, **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substância vegetais tóxicas e medicinais**. Ed. Graphicars: São Paulo, p. 196-199, 1939.

HUNTER, M.S.; CORLEY, D.G.; CARRON, C.P.; ROWOLD, E.; KILPATRICK, B.F.; DURLEY, R.C.; **Journal of Natural Products**, v. 60 (9), p.894-899, 1997.

IGNEY, F.H; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature**, v. 2, p. 277-288, 2002.

ISRAELS, L.G.; ISRAELS, E.D. Apoptosis. **Steam Cells**, v.17, p. 306-313, 1999.

JENDIROBA, D.B. et al. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dymethylsphingosine. **Leukemia Research**, v.26, p.301-310, 2002.

JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D.J.; ALITALO, K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v.2, p.257 – 267, 2001.

JUNGLES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. **Caderno de Farmácia “I”**, p. 95-101, 1985.

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

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; SADLER, I. H.; WATERMAN, P. G. **Phytochemistry**, v.29 (11), p. 3591-3595, 1990.

KITZBERGER, C.S.G.; LOMONACO, R.H.; MICHIELIN, E.M.Z.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35-43, 2009.

KRUEGER, A.; BAUMMAN, S.; KRAMMER, P.H.; KIRCHHOFF, S.; FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor mediated apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 8247-8254, 2001.

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.

KVIECINSKI, M.R.; BENELLI, P.; FELIPE, K.B.; CORREIA J.F.G.; PICH, C.T.; FERREIRA, S.R.S.; PEDROSA, R.C. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with

antitumor activity. **Journal Supercritical Fluids**, vol. 56, p. 243-248, 2011.

KVIECINSKI, M.R.; PEDROSA, R.C.; FELIPE, K.B.; FARIAS, M.S.; GLORIEUX, C.; VALENZUELA, M.; SID B.; BENITES, J.; VALDERRAMA, J.A.; VERRAX, J.; CALDERON, P.B. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 421, p. 268–273, 2012.

LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.

LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STELLER-STEVENSON, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-336, 1991.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992, p.115.

MAESHIMA, Y.; COLORADO, P.C.; TORRE, A.; HOLTHAUS, K.A.; GRUNKEMEYER, J.A.; ERICKSEN, M.B.; HOPFER, H.; XIAO, Y.; STILLMAN, I.E. ; KALLURI, R. (2000). Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 275(28), p. 21340-21348, 2000.

MAISTRO, E.L., CARVALHO, J.C., MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *C. sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 337–342, 2004.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P.; TONELLATO, U. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v.20, p.2540-2548, 2005.

MASQUELIER, M., ZHOU, Q.F.; GRUBER, A.; VITOLS, S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1047-1056. 2004.

MEDEMA, R.H.; BOS, J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v.4, p.615-661, 1993.

MELECCHI, M.I.S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 51, p. 10–16, 2009.

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**, vol.100 p. 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 (12), p. 2151-2157, 2000.

MONTENEGRO, R.C.; ARAÚJO, A.J.; MOLINAB, M.T.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; ROCHA, D.D.; LÓPEZ-MONTERO, E.; GOULART, M.O.F.; BENTO, E.S.; ALVES, A.P.N.N; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-o-methyl

derivative. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 184, p. 439–448, 2010.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *C. sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.39 (3), p. 693-697, 1991.

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.

MOSADDIK, M.A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. Flórida: CRC Press LLC, 2000. 339p.

NAKAGAWA, Y.; AKAO, Y.; MORIKAWA, H.; HIRATA, I.; KATSU, K.; NAOE, T.; OHISHI, N.; YAGI, K. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. **Life Sciences**, v. 70, p. 2253–2269, 2002.

NAKAGAWA, W.T.; LOPES, A. Conceitos Básicos em Oncologia. In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**, São Paulo: LEMAR, 2000, p.1-19.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, J.M.; SNADER, K.M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

NGUYEN, M., SHING, Y. FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick-embryo chorioallantoic membrane. **Microvascular Research**, v.47 (1), p.31-40. 1994.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 22(8), p.299-306, 1997.

OBERLIES, N.H., BURGESS, J.P., NAVARRO, H.N., PINOS, R.E., FAIRCHILD, C.G.R., PETERSON, R.W., SOEJARTO, D.D., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, D., WANI, M.C., WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *C. sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p.95–99, 2002.

PARISOTTO, E.B.; MICHIELIN, E.M.Z.; BISCARO, F.; FERREIRA, S.R.S. WILHELM-FILHO, D.; PEDROSA, R.C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, Vol. 61, p. 101-107, 2012.

PATHACK, S. Organ- and tissue-specific stem cells and carcinogenesis. **Anticancer Research**, v. 22, p. 1353-1356, 2002.

PRAGER, G.W.; POETTLER, M.; SCHMIDINGER, M.; MAZAL, P.R.; SUSANI, M.; ZIELINSKI, C.C.; HAITEL, A. CD98hc (SLC3A2), a novel marker in renal cell cancer. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, p.304-310, 2009.

QURESHI, S.O.A.; AL-SHABANAH, O.A.; AL-HARBI, M.M.; AL-BEKAIRI, A.M.; RAZA, M. Boric acid enhances *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 165, p. 1-11, 2001.

RAK J., FILMUS J., FINKENZELLER G., GRUGEL S., MARME D., KERBEL, R.S. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer metastasis Reviews**, v.14, p.263-277, 1995.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11 (1), p.57-69, 2001.

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-SC, 2004.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v.17, p.3225–3236, 1998.

REY, N.A.; NEVES, A.; SILVA, P.P.; PAULA, F.C.S.; SILVEIRA, J.N.; BOTELHO, F.V.; VIEIRA, L.Q.; PICH, C.T.; TEREZI, H.; PEREIRA-MAIA, E.C. A syntetic dinuclear copper (II) hydrolase and its potential as antitumoral: citotoxicity, celular uptake, and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 1323-1330. 2009.

REYNOLDS, J.E.; YANG, T.; QIAN, L.; JENKINSON, J.D.; ZHOU, P.; EASTMAN, A.; CRAIG, R.W. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Research**, vol. 54(24), p.6348-6352, 1994.

REVERCHON, E.; DE MARCO I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 38, p. 146–166, 2006.

RICHARDSON, M.A. 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 products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v.1, p.364-369,2001.

RODRIGUES, A.M., DE PAULA, J.E., DEGALLIER, N., MOLEZ, J.E., ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314–317, 2006.

RUSTIGI, A.K.; PODOLSKY, D.K. The molecular basis of colon cancer. **Annual Review of Medicine**, v.43, p.61-68, 1996.

SASSIOTO, M.C.P.; CARDOSO FILHO, N.; FACCO, G.G.; SODRÉ, S.T.; NEVES, N.; PURISCO, S.U.; FARIAS, A.G. Effect of *C. sylvestris* on bone repair with devitalized bovine bone matrix in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19 (6), p.637-641, 2004.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R.A.P.S. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 19 (1), p.73-81, 1979.

SCHOENFELDER, T.; PICH, C.T.; GEREMIAS, R.; ÁVILA, S.; DAMINELLI, E.N.; PEDROSA, R.C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v.79, p. 465-467, 2008.

SCHWARTZ, J.L.; TAMURA, Y.; JORDAN, R.; GRIERSON, J. R.; KRONH, K.A. Effect of p53 activation on cell growth, thymidine kinase -1 activity, and 3'-deoxy-3' fluorothymidine uptake. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, p. 419-423, 2004.

SILVA, T.H.A.; BUTERA, A.P.; LEAL, D.H.S.; ALVES, R.J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 1-17. 2007.

SOLIMENE, A.C.C.; BOSCARDIN, S.B.; FERRAZ, M.G.C.; CHAMMAS, R. Angiogenesis in solid tumors. **Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, v.1, p. 9–20, 1999.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? **Bioassays**, vol. 26, p. 1097-1107, 2004.

SREEDHARA A.; COWAN J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.4, p.337-347, 2001.

SRINIVASTA, V.; NEGI, A.S.; KUMAR, J.K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S.P.S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 13, p. 5892-5908, 2005.

SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, vol. 6, p. 71-133. 1990.

SUZIGAN, M.I.; BATTOCHIO, A.P.R.; COELHO, K.L.R.; COELHO, C.A.R. An aqueous extract of *Bidens pilosa* L. protects liver from cholestatic disease. Experimental study in young rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, vol. 24, p. 347-352, 2009.

TALAPATRA, S.K.; CANGULY, N.C.; GOSWAMI, S.; TALAPRA, B. **Chemical Journal of Natural products**, v. 46 (3), p.401-408, 1983.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. **Science**, vol. 267, P. 1456-1462. 1995.

TSANG, W.P.; CHAU, S.P.; KONG, S.K.; FUNG, K.P.; KWOK, T.T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53- independent apoptosis. **Life Sciences**, vol. 73, p. 2047-2058, 2003.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, vol. 36, p.165-175, 2003.

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

YUAN, L.P.; CHEN, F.H.; LING, L.; DOU, P.F.; BO, H.; ZHONG, M.M.; XIA L.J. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 116, 539–546, 2008.

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.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology and Therapeutic**, vol. 92, p. 57-70, 2001.