



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

**MAICON ROBERTO KVIECINSKI**

**Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae)**

**Florianópolis**

**2007**

**Maicon Roberto Kwiecinski**

**Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae)**

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

Área de Concentração: Fármaco-Medicamentos

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

**Florianópolis**

**2007**

Kviecinski, Maicon Roberto

Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae)

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

1. Plantas medicinais. 2. *Bidens pilosa*. 3. Compostos polifenólicos.  
4. Antioxidante. 5. Antiinflamatório. 6. Citotoxicidade. 7. Antitumoral.

Aos meus pais, pelo apoio fundamental para que eu cumprisse esta etapa de minha formação acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me oferecer uma vida maravilhosa.

Aos meus pais e irmãos.

Aos professores Msc. Silvana Muraro Wildner e Dr. Luís Flavio da Silva, que me conduziram da graduação à pós-graduação, foram extremamente amigos, sensíveis e companheiros.

Ao excelentíssimo Sr. Pe. Ivacir João Franco, principal entrevistado no estudo etnofarmacológico. Muito experiente e praticante da medicina popular no sul do Brasil, ele é autor de vários livros sobre o tema. Foi de fundamental importância, sendo que apontou em seu relato para *Bidens pilosa* L. com suas utilidades terapêuticas.

À professora Dra. Rozangela Curi Pedrosa. É impossível com palavras expressar minha gratidão a esta pessoa. Bondosa, confiante, grande pesquisadora. Ser honrado com sua orientação mudou minha vida para sempre.

À querida colega Msc. Jussara Mattos Rebello, que tão carinhosamente me recebeu nesta universidade localizada em uma cidade completamente nova para mim, apoiou-me e comigo compartilhou seu conhecimento.

À querida colega Msc. Valdelúcia Grinevícius. Ela certamente ensinou-me, entre tantas outras coisas, a ver a vida com outros olhos.

À colega Farmacêutica Karina Bettega Felipe. Impressionante talvez, seja o termo que melhor a define. Deus lhe reserva um futuro brilhante.

Aos amados colegas Msc. Ana Kelly Pitlovanciv, Msc. Elizandra Machado e doutorandos Silvio Ávila Júnior e Silvia Dalbó, cuja convivência muito me ensinou.

Aos colegas de laboratório Farmacêuticos Msc. Eduardo Antônio Ferreira, Luis Paulo Wiese, Mariane Manjavachi, Msc. Reginaldo Geremias, Msc. Tatiane Schoenfelder, Veterinária Paola dos Santos, e demais membros do Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina.

À 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.

Ao meu mais que amigo, Sr. Édison Weber da Silva, representante da Sigma-Aldrich em Santa Catarina e Paraná.

Aos componentes da banca examinadora Prof. Dr. Edson Luiz da Silva, Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg e Prof. Dr. Rivaldo Niero. Agradeço pelas sugestões, considerações e pela disponibilidade para a avaliação deste trabalho.

Ao querido Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, por sua disponibilidade para presidir a sessão de defesa desta dissertação, e pela valiosa prestatividade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos que amo e que me apóiam nesta vida. A energia vinda de vocês é que motiva meu dia-a-dia.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os 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.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ASC	Ascorbato
ATP	Trifosfato de adenosina
CASP	Caspases
CAT	Catalase
CDKs	Quinases Ciclina-dependentes
Ce-EtOH	<i>Hydroethanol crude extract</i>
CE <sub>50</sub>	Concentração Eficaz 50%
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CFT	Conteúdo de Fenóis Totais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato
EAC	<i>Ehrlich Ascites Carcinoma</i>
EAG/mg	Equivalentes do Ácido Gálico/mg
Eb-EtOH	Extrato Bruto Hidro-etanólico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
f-AcOEt	Fração Acetato de Etila
f-CHCl <sub>3</sub>	Fração Clorofórmica
f-EtOAc	<i>Ethyl Acetate Fraction</i>
f-MeOH	Fração Metanólica
FRAP	<i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i>
GAE/mg	<i>Galic Acid Equivalents / mg</i>
GTPase	Guanosina Trifosfatase
GSH	Glutationa Reduzida
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>

IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
IL – 1	Interleucina 1
ILS(%)	<i>Increased Life Span</i>
LC <sub>50</sub>	<i>Lethal Concentration 50</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
MDA	Malondialdeído
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MRP- 1	Proteína de Resistência Multifármacos tipo 1
MST	<i>Mean Survival Time</i>
MTT	Sal de Tetrazólio
NAC	<i>Nucleic Acid Content</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina Difosfato Reduzida
NRU	<i>Neutral Red Uptake</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAL	Percentual de Aumento da Longevidade
PBS	Tampão Salina
Pgp	Glicoproteína P
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SD	<i>Standard Deviation</i>
TAE	Tumor Ascítico de Ehrlich
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TPC	<i>Total Phenol Content</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{13}\text{C}$	Isótopo do Carbono, $\text{C}^{13}$
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de Cálcio
$\text{CCl}_3^\bullet$	Radical Tricloroperoxila
$\text{CCl}_4$	Tetracloroeto de Carbono
$\text{CHCl}_3$	Clorofórmio
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
$\text{Fe}^{2+}$	Íon Ferroso
$\text{Fe}^{3+}$	Íon Férrico
$\text{FeCl}_3$	Cloreto Férrico
$\text{HO}^\bullet$	Radical Hidroxil
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
$\text{NaCl}$	Cloreto de Sódio
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical Ânion Superóxido
$\text{O}_2$	Oxigênio Molecular
$^\bullet\text{OH}$	Radical Hidroxila

## RESUMO

*Bidens pilosa* L. (Asteraceae) é uma planta tradicionalmente utilizada na medicina popular brasileira, caribenha e cubana. Possui vários nomes populares, entre eles picão-preto. Um extrato bruto hidro-etanólico (Eb-EtOH) foi obtido a partir das partes aéreas da planta. Ele e algumas de suas frações foram avaliados com respeito às atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Tanto o Eb-EtOH, como a maioria das frações apresentaram atividade seqüestradora de radicais DPPH e radicais hidroxila. Uma análise fitoquímica preliminar mostrou que todas as amostras avaliadas apresentaram determinado conteúdo de compostos fenólicos totais, sendo que a fração acetato de etila (f-AcOEt) apresentou o mais elevado conteúdo. Considerando dados complementares, acredita-se que esta fração deva possuir flavonóides em sua constituição. A f-AcOEt, seguida pelo Eb-EtOH, apresentou maior atividade antioxidante *in vitro*, sugerindo uma possível associação entre a atividade antioxidante e o conteúdo polifenólico da amostra. Nos ensaios *in vivo* a f-AcOEt, seguida novamente pelo Eb-EtOH, mostrou melhor proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo CCl<sub>4</sub>, como demonstrado pela inibição da lipoperoxidação de membranas (~28%), carbonilação de proteínas (~80%) e fragmentação do DNA (~50%). A f-AcOEt ainda elevou o potencial redutor total do plasma (~40%). A f-AcOEt e o Eb-EtOH apresentaram importante atividade antiinflamatória como demonstrado pela redução do edema de pata induzido pela Carragenina (55% e 36%). O efeito antiinflamatório pode ser associado às propriedades antioxidantes da f-AcOEt e Eb-EtOH. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* indicaram que a fração clorofórmica (f-CHCl<sub>3</sub>) apresentou maior toxicidade para as células do carcinoma de Ehrlich, com baixos valores de CI<sub>50</sub> (97,0±7,2 µg/mL no ensaio do sal tetrazólio e 83,0±5,2 µg/mL no ensaio do vermelho neutro). As avaliações morfológicas e bioquímicas realizadas nas amostras obtidas de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich demonstraram que os animais tratados com f-CHCl<sub>3</sub> apresentaram menor ganho de peso corporal (~25%) e de circunferência abdominal (~33%), menor volume de líquido ascítico (~45%) e de células compactadas (~45%) e número inferior de células tumorais viáveis (~45%) quando comparados ao

grupo controle negativo. A f-CHCl<sub>3</sub> ainda elevou a contagem de células tumorais inviáveis (~5x) e reduziu a atividade sérica da LDH (~38%) e o conteúdo de GSH (~50%) no líquido ascítico dos animais tratados. O tempo médio de sobrevivência destes animais aumentou cerca de 40%. Portanto, os resultados obtidos evidenciaram uma potencial atividade antitumoral para o picão-preto. Finalmente, os dados obtidos permitem concluir que algumas das amostras testadas de picão-preto apresentaram atividades biológicas que corroboram as informações da medicina popular sobre a utilidade antiinflamatória e antitumoral desta planta.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. *Bidens pilosa*. Compostos polifenólicos. Antioxidante. Antiinflamatória. Citotoxicidade. Antitumoral.

## ABSTRACT

*Bidens pilosa* L. (Asteraceae), known in Brazil as picão-preto, is traditionally used in Brazilian, Cuban and Caribbean folk medicine. A hydroethanol crude extract (Ce-EtOH) obtained from the aerial plant parts and some of its fractions were evaluated for antioxidant, ant inflammatory, cytotoxic and antitumor activities *in vitro* and *in vivo*. Most of the samples here evaluated presented scavenger activity on DPPH and hydroxyl radicals. A previous analysis showed that all the samples present detectable phenol content and the ethyl acetate fraction (f-EtOAc), followed by Ce-EtOH, contains the highest one with respective highest antioxidant activity *in vitro* suggesting a possible association between the antioxidant activity and the total phenol content. f-EtOAc seems to possess flavonoids in its constitution. Ce-EtOH and fractions were studied *in vivo* and once again f-EtOAc (followed by Ce-EtOH) showed best protection against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress as demonstrated by the decreased levels of lypoperoxidation (~28%), protein carbonylation (~80%) and DNA fragmentation (~50%). Interestingly, the same extracts had also anti-inflammatory activity as demonstrated by the reduction of the Carrageenan-induced paw edema (f-EtOAc=55% and Ce-EtOH=36). The anti-inflammatory effect of f-EtOAc and Ce-EtOH could be associated to antioxidant properties. MTT and NRU cytotoxicity assays indicated that the chloroform fraction (f-CHCl<sub>3</sub>) was effective at low IC<sub>50</sub> (97.0±7.2 and 83.0±5.2 µg/mL, respectively). Morphological and biochemical evaluations in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice showed that animals treated with f-CHCl<sub>3</sub> presented significant reduction in the body weight (~25%), abdominal circumference (~33%), ascitic fluid volume (~45%), packed cell volume (~45%) and viable cell count (~45%) when compared to the negative control group. f-CHCl<sub>3</sub> increased nonviable cell count (~5x) and decreased serum LDH activity (~38%) and GSH content in the ascitic fluid (~50%). Mean survival time was 40% increased. These results pointed to an antitumor activity of *B.pilosa*. There might be any cytotoxic substance(s) in the plant chemical constitution. These data suggested the examined samples of *Bidens pilosa* did present bioactivities that corroborate folk

medicine informations considering the ant inflammatory and antitumor utilities of this plant.

**Keywords:** Medicinal plants. *Bidens pilosa*. Polyphenols. Antioxidant. Ant inflammatory. Cytotoxicity. Antitumor.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 As plantas medicinais e a pesquisa de novos fármacos.....	17
1.2 <i>Bidens pilosa</i> Linné.....	19
1.3 Estudos fitoquímicos sobre o Picão-preto.....	22
1.4 Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	23
1.5 Radicais livres e inflamação.....	27
1.6 Câncer e terapia antitumoral.....	28
1.7 Resistência à quimioterapia e toxicidade dos fármacos antitumorais.....	36
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS GERADOS A PARTIR DO ESTUDO.....</b>	<b>41</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1 Conteúdo polifenólico total dos extratos e frações de <i>Bidens pilosa</i> e seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios.....	42
4.2 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i> e antitumoral <i>in vivo</i> de <i>Bidens pilosa</i> .....	51
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>78</b>

ANEXO A - Cópia do primeiro artigo gerado por este estudo:

<i>Free-radical scavenging and in vivo antioxidant activity of polyphenol extracts from Bidens pilosa L. (Asteraceae) with anti-inflammatory properties.....</i>	79
<i>Abstract.....</i>	80
<i>Keywords.....</i>	80
<i>Introduction.....</i>	80
<i>Material and Methods.....</i>	81
<i>Plant samples and extracts preparations.....</i>	81
<i>Determination of total phenol content (TPC).....</i>	82
<i>Analysis of ethyl acetate fraction.....</i>	82
<i>Free radical scavenging activity.....</i>	82
<i>Antioxidant tests in vivo.....</i>	83
<i>Animal treatment.....</i>	83
<i>Experimental protocol.....</i>	83
<i>Plasma ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay.....</i>	84
<i>Reduced glutathione assay (GSH).....</i>	84
<i>Catalase activity assays (CAT).....</i>	85
<i>Determination of lipid peroxidation (TBARS).....</i>	85
<i>Assay of carbonyl protein.....</i>	85
<i>Detection of DNA damage.....</i>	86
<i>Anti-inflammatory activity.....</i>	86
<i>Statistical analysis.....</i>	87
<i>Results.....</i>	87
<i>Total Phenol Content, EtOAc extracts chemical profile and free radical scavenging activity .....</i>	87
<i>In vivo antioxidant potential.....</i>	88
<i>In vivo antiinflammatory activity.....</i>	90
<i>Discussion and conclusions.....</i>	90
<i>Figure captions.....</i>	95
<i>Table 1. In vitro antioxidant activity of the Bidens pilosa L. extracts and Rutin.....</i>	97

<i>Table 2 Effects on plasma FRAP level and hepatic GSH concentration and CAT activity</i> .....	98
<i>Figure 1. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction</i> .....	99
<i>Figure 2. Lipoperoxidation in liver (TBARS levels) of mice</i> .....	100
<i>Figure 3. Hepatic carbonyl protein levels in mice</i> .....	101
<i>Figure 4. Blood DNA damage Index in mice</i> .....	102
<i>Figure 5. Oral antiinflammatory activity of polyphenol extracts of Bidens pilosa on the carrageenan-induced paw edema in mice</i> .....	103
<i>Acknowledgement</i> .....	104
<i>References</i> .....	104

ANEXO B - Cópia do segundo artigo gerado por este estudo:

<i>Study of the antitumor potential of Bidens pilosa (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine</i> .....	108
<i>Abstract</i> .....	109
<i>Keywords</i> .....	109
<i>Introduction</i> .....	109
<i>Material and Methods</i> .....	111
<i>Plant samples and extracts preparation</i> .....	111
<i>Toxicity study</i> .....	111
<i>Brine shrimp assay</i> .....	111
<i>Hemolytic assay</i> .....	112
<i>Cytotoxic activity in vitro</i> .....	112
<i>Neutral red uptake (NRU)</i> .....	113
<i>Tetrazolium salt assay (MTT)</i> .....	113
<i>Antitumor activity in vivo</i> .....	114
<i>Animals</i> .....	114
<i>Experimental protocol</i> .....	114
<i>Tumor growth response</i> .....	115
<i>Assay for lactate dehydrogenase release</i> .....	115
<i>Reduced glutathione assay (GSH)</i> .....	115



<i>Statistical analysis</i> .....	116
<i>Results</i> .....	116
<i>Results of the toxicity study</i> .....	116
<i>Results of cytotoxic activity in vitro</i> .....	116
<i>Results of antitumor activity in vivo</i> .....	117
<i>Discussion and conclusions</i> .....	118
<i>Acknowledgement</i> .....	121
<i>References</i> .....	121
<i>Figure captions</i> .....	128
<i>Table 1. The toxicity of Bidens pilosa extracts and Doxorubicin measured by Brine shrimp toxicity (LC<sub>50</sub>, µg/mL), hemolytic activity (IC<sub>50</sub>, µg/mL) and in vitro cytotoxicity to EAC cells measured by MTT (IC<sub>50</sub>, µg/mL) and NRU (IC<sub>50</sub>, µg/mL) assays</i> .....	129
<i>Table 2. Effect of the extracts of Bidens pilosa (150 mg.kg<sup>-1</sup>) and doxorubicin (DOX, 1.2 mg.kg<sup>-1</sup>) on increase body weight and abdominal circumference, mean survival time (MST), tumor volume, packed cell volume, and viable and nonviable tumor cell count of EAC-bearing mice and normal mice</i> .....	130
<i>Figure 1. Effect of extracts of Bidens pilosa (f-CHCl<sub>3</sub>, f-EtOAc, Ce-EtOH, f-MeOH) on increased life span (ILS %)</i> .....	131
<i>Figure 2. Effect of extracts of Bidens pilosa on serum activity of LDH</i> .....	132
<i>Figure 3. Effect of extracts of Bidens pilosa on ascitic GSH concentration</i> .....	133

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 As plantas medicinais e a pesquisa de novos fármacos

Os fármacos utilizados na medicina moderna são obtidos de muitas fontes, podendo ter origem sintética ou natural; sendo que a fonte natural pressupõe origem a partir das plantas, fungos, microrganismos, animais ou minerais (VIEGAS Jr.; BOLZANI, 2006). Apesar de a maioria dos medicamentos utilizados hoje ter origem sintética, a terapêutica moderna composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores. Segundo vários autores, é possível estimar que até um terço do total dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir dos produtos naturais. No caso dos antitumorais e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (CRAGG; NEWMAN, 1999; YUNES; CALIXTO, 2001).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. A variedade e a complexidade das macromoléculas que constituem os metabólitos secundários das plantas e organismos marinhos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Apesar das plantas serem consideradas uma das principais fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996). O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta (CRAGG; NEWMAN, 1999 apud

CALIXTO, 2003). Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. Tudo isso confirma a importância de se investir na pesquisa dos fitofármacos (CALIXTO, 2003).

A utilização das plantas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga. Além disso, devido ao elevado custo de muitos medicamentos, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna, tem se utilizado dos produtos naturais para o tratamento de suas enfermidades. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 65% a 80% da população mundial (estimada em 6 bilhões de pessoas) não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio para muitas doenças (ELISABETSKI, 1987 apud SIMÕES et al., 2003).

Muitas estratégias podem ser consideradas para a investigação das atividades biológicas das plantas medicinais. Entre elas, a abordagem etnofarmacológica que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais, ou pessoas experientes, que fazem uso da flora medicinal com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados. São procedimentos que vão desde a coleta e análise de dados etnofarmacológicos à elucidação das estruturas das substâncias ativas isoladas e/ou obtenção de derivados (ELISABETSKY, 1987).

A motivação pela pesquisa sobre a atividade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral de *Bidens pilosa* (Asteraceae) realizada no presente trabalho surgiu primeiramente a partir de um levantamento etnofarmacológico aqui previamente realizado. Procuramos relatos populares sobre a utilidade das plantas no tratamento dos tumores e/ou inflamações. Também pretendíamos estudar mais profundamente os compostos acetilenos e flavonóides que, de acordo com o descrito na literatura, estão presentes na composição química desta planta e já possuem comprovada atividade biológica.

## 1.2 *Bidens pilosa* Linné

Muitas plantas utilizadas na medicina tradicional popular para tratar várias desordens orgânicas apresentam sua utilidade ainda não totalmente compreendida. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) é um exemplo dessas espécies. Embora alguns estudos concentrados sobre ela tenham sido conduzidos em alguns países, a complexidade da sua constituição fitoquímica ainda dificulta as conclusões acerca de muitas informações necessárias para a explicação das suas utilidades populares e mesmo para prospecção.



Figura 1. *Bidens pilosa* Linné.

Fonte: RAIN TREE-HEALTH, 2005

*Bidens pilosa* é uma espécie vegetal de pequeno porte, de vasta ocorrência natural, sendo nativa das áreas tropicais na América do Sul, África, Caribe e Filipinas (RAIN TREE-HEALTH, 2005; CORRÊA, 1984). É uma espécie da família das Asteráceas e possui variada denominação popular dependendo da localidade onde é encontrada. No Brasil é conhecida como Picão-preto, Erva-picão, Carrapicho de duas

pontas, Goambú, Micella do Campo, Picão do campo, Piolho de padre. No exterior é conhecida como Aceitilla, Seta e Té de Milpa, no México; Amores Secos, Cadillo Rocero e Puinca, na Venezuela; Arponcito, Cadillo e Sirvulaca, no Panamá; Margarita e Romerillo, em Porto Rico; Marumaruke, na Índia holandesa, Motsiji, no Transwaal; Mozote, em Costa Rica; Mozotillo, em outros países da América Central; Purikel, nas Filipinas, Saetilla, na Argentina; Shepherd's needle, dos norte-americanos; Spanish needle, nas Antilhas Inglesas; Tangamagnia, no Congo belga (CORRÊA, 1984). É uma planta anual, de caule ereto e quadrangular, que pode atingir até 150 cm de altura. É ramosa de ramos opostos, glabra, com folhas opostas, verdes brilhantes e às vezes alternadas, na porção superior são pecioladas, até 10 cm de comprimento, membranosas, simples ou decompostas, com segmentos ovados até lanceolados, agudos ou acuminados, serrados. Os capítulos são poucos, pedunculados, reunidos em corimbos de 30-40 flores amareladas ou brancacentas, aromáticas; involúcro campanulado, escamas exteriores em geral foliáceas, quase sempre as interiores mais curtas, membranosas, brancacentas e ciliadas nas margens; língulas poucas, brancas, freqüentemente maiores que o involúcro, 2-3 lobadas; fruto aquênio anguloso, estreito, preto, de 18-24 mm de comprimento, com 2-4 arestas amarelas, recurvadas, de 3-4 mm, muito aderentes à roupa e ao pêlo dos animais (CORRÊA, 1984). Possuem brotos florais terminais compostos de flores tubulares e radiadas de cor amarelo intenso (HAKANSSON, 2003; VALDÉS; REGO, 2001; CORRÊA, 1984). É considerada uma erva daninha em muitos lugares, podendo ser invasora das plantações. Entretanto, é apreciada pelos animais que sempre que a encontram, comem com avidez. Ela pode ser considerada forrageira de qualidade regular, pois o Instituto Agrônômico de Campinas (Brasil) analisou-a antes da florescência e encontrou respectivamente na substância úmida e na substância seca, 2,27 e 13,64% de matéria azotada, 0,43 e 2,62% de matéria graxa, 8,15 e 48,99% de matéria não azotada, 3,94 e 23,71% de matéria fibrosa e 1,84 e 11,04% de matéria mineral, sendo de 83,33% a quantidade de água existente na substância úmida e elevando-se a 2,182% o azoto contido na substância seca. Esta planta vegeta em terrenos expostos ou baldios, assim como nos campos cultivados, de preferência silicosos. Sua variedade *bipinnatus* (*Bidens bipinnatus* L., *B. wallichii* DC.) é atualmente, para várias autoridades, considerada

espécie distinta (CORRÊA, 1984). Ela também possui constituição semelhante a *Bidens tripartita*, cuja história de uso na medicina popular européia já é antiga (RAINTREE-HEALTH, 2005).

Existem vários relatos populares que apontam para a utilidade de *Bidens pilosa* para contornar inúmeros desconfortos e enfermidades, incluindo inflamações e tumores. Estes relatos chegam de Cuba, Bahamas, Amazônia e região sul do Brasil (FRANCO; FONTANA, 2004; VALDÉS; REGO, 2001). *Bidens pilosa* tem longa história de uso pelos povos indígenas da Amazônia. Praticamente todas as partes da planta são utilizadas nas preparações medicinais que são aplicadas por via tópica e/ou oral. Na Amazônia peruana, o Picão-preto é utilizado para o tratamento da angina, diabetes, disenteria, dismenorréia, edemas, hepatites, icterícia, laringite, verminoses, febre aftosa em gado bovino. A tribo Cuna da região amazônica costuma usar uma mistura das folhas da planta esmagadas com água para tratar dores de cabeça (VASQUEZ, 1990; CORRÊA, 1984). O Picão-preto ainda é usado pelos povos indígenas para: dores de dente (principalmente a raiz), inflamação da garganta, nas feridas de mau caráter, retenção hídrica, lacerações, alívio de calafrios, blenorragia, leucorréia, tonsilites, obstruções hepáticas, infecções urinárias e vaginais, como emoliente, adstringente, antipirético (VALDÉS; REGO, 2001; CORRÊA, 1984). É estimulante, desobstruente, sialogoga, com ação antiescorbútica (CORRÊA, 1984). As flores são usadas para desconfortos gástricos em intoxicações alimentares (ALMEIDA, 1993; COIMBRA, 1994; DUKE; VASQUEZ, 1994; RUTTER, 1990). Nas Bahamas e em Cuba tem sido utilizada para tratar tumores (VALDÉS; REGO, 2001). Também existem relatos do uso popular do Picão-preto para o tratamento de tumores por adeptos da medicina natural do oeste de Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul (FRANCO; FONTANA, 2004).

*Bidens pilosa* L. tem sido objeto de estudos, os quais têm explicado alguns dos seus usos na medicina popular. A atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas foi demonstrada para material vegetal da África do Sul em um estudo de 1997 (RABE, 1997). Também foi documentada a atividade hepatoprotetora de *Bidens pilosa* proveniente de Taiwan (CHIN et al., 1996).

Recentemente, uma formulação tópica incluindo *Bidens pilosa* foi patenteada e lançada na Ásia como cosmético altamente seguro, mesmo quando utilizado por um longo período de tempo, que é capaz de produzir efeitos como prevenção da pele áspera e da dermatite atópica (f.i. Cosmetic Yoshida Yatsuka / Musashino Meneki Kenkyusho:KK, patent # JP2004323466). Outro estudo recente relata um potencial efeito anti-hipertensivo para esta planta, uma vez que seu extrato bruto foi capaz de causar relaxamento da musculatura lisa em ratos (NGUELEFACK et al., 2005). Também já se demonstrou que *Bidens pilosa* tem efeito alelopático sobre algumas espécies de plantas (CAMPBELL, 1992).

### 1.3 Estudos fitoquímicos sobre *Bidens pilosa* L.

Estudos fitoquímicos realizados sobre *Bidens pilosa* detectaram a presença de aminas, fitosteróis ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol), fitosterina B, esculetina e lupeol em material vegetal proveniente do Egito (SARG et al., 1991). Outros estudos apontam também para a presença de terpenos, flavonóides, glicosídeos de auronas e chalconas, cujas geninas mais comuns são okanina, lanceolina e buteína (VALDÉS ; REGO,2001). Todas as partes da planta encerram tanino e duas resinas aromáticas (CORRÊA, 1984).

De acordo com Valdés e Rego (2001), em se tratando do Picão-preto, a grande diversidade de ações farmacológicas atribuídas deve-se possivelmente a grande variedade de compostos químicos presentes na planta. De acordo com os mesmos autores, pode-se observar ainda a presença de outros metabólitos secundários, como: taninos (os de maior porcentagem, responsáveis pelas propriedades antiulcerativas e antimicrobianas), saponinas, alcalóides, açúcares, carotenos e fenóis. Também foram detectados compostos poliacetilênicos benzóides (fenil heptatrina e a-tertienil), carbonatos, cloretos, proteínas (albumina), um éster de peso molecular 74,6, um álcool alifático (hentrianocontanol) e um óleo essencial. Os autores também mencionam o

ácido nicotínico, o ácido tânico, ácido p-cumárico, ácido silícico, ácido linólico, ácido  $\alpha$ -linolênico e hidrocarbonetos. Valdés e Rego (2001) atribuem a maioria das propriedades biológicas à fenil heptatrina.

Novos compostos bioativos foram descobertos no extrato metanólico de *Bidens pilosa* em 1996. Tratam-se de poliacetilenos, entre eles o  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6(E)-tetradeceno-8, 10,12-trieno. Estes compostos isolados demonstraram efeito antiproliferativo sobre linhagens celulares humanas normais e transformadas com crescimento acelerado (ALVAREZ et al., 1996).

Outros poliacetilenos e flavonóides também já foram isolados nesta planta (BRANDÃO et al., 1997). Os poliacetilenos são hidrocarbonetos que absorvem fortemente luz ultravioleta e sua ação terapêutica é acentuada com a exposição à luz (fotoativação) (WAT et al., 1980). Alguns deles exibiram efeitos citotóxicos sobre parasitas (BRANDÃO et al., 1997; GEISSBERGER; SEQUIN, 1991; RABE, 1997) e células modificadas em cultura (ALVAREZ et al., 1996). A fenil heptatrina já foi associada ao efeito antiinflamatório de *B. pilosa* (GEISSBERGER; SEQUIN, 1991).

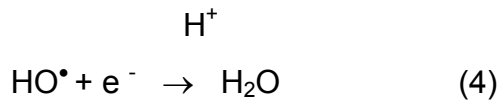
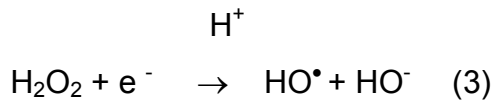
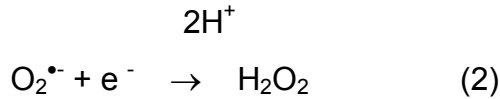
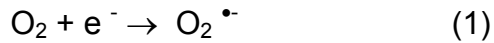
Muitos dos flavonóides de *Bidens pilosa* ainda não foram completamente elucidados. Entre aqueles já caracterizados encontra-se a luteolina e a quercetina (CHIANG et al., 2004; LING, 1995; ZHANG, 1989). Apesar dos flavonóides serem os polifenóis majoritários, o ácido clorogênico, o ácido cafoilquínico, a jaceína e a centaurina, também já foram identificados em *Bidens pilosa* (CHIANG et al., 2004).

#### 1.4 Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes

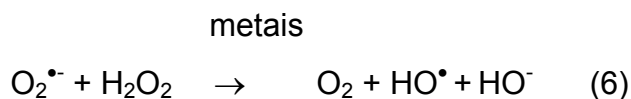
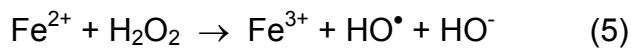
O oxigênio molecular é essencial à vida dos organismos aeróbios, sendo que sua função predominante nos eucariontes é de servir como últimoceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando é finalmente reduzido à água durante o complexo processo de fosforilação oxidativa. A redução completa do oxigênio à água requer 4 elétrons, e esta redução produz seqüencialmente do começo ao fim 3 produtos de



redução, quais sejam, o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ), os quais conjuntamente são denominados de Espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies ocorrem de acordo com o esquema a seguir:



Dentre as EROs geradas, destaca-se o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ) como um dos mais reativos que, juntamente com o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) são caracterizados como radicais livres de oxigênio. Embora o  $H_2O_2$  não seja um radical livre, o mesmo também é um produto reativo e, via reação de Haber-Weiss (equação 6) ou reação de Fenton (equação 5), pode servir como um importante precursor de  $HO^{\bullet}$  (DI GIULIO et al., 1995; WINSTON, 1991), veja:



As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e carboidratos, sendo capazes de provocar danos oxidativos nestas estruturas. Por isso, nos sistemas vivos existe uma variedade de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas que controlam a formação excessiva das EROs. Dentre as defesas enzimáticas, encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD) e

catalase (CAT), enquanto que compostos como glutathiona reduzida (GSH) e ascorbato (ASC), fazem parte do sistema de defesa não enzimático celular (ALSCHER et al., 2002; MEAGHER; FITZGERALD, 2000; PENG et al., 2000).

Contudo, quando há uma produção excessiva de EROs e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes capaz de comprometer o balanço redox, o organismo pode estar submetido a um processo denominado de estresse oxidativo. Atualmente, aceita-se que em muitas situações patológicas um estresse oxidativo pode ser instalado nos organismos aeróbicos, sendo que as EROs podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento do dano tecidual (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Estudos mostraram que as EROs podem estar intimamente envolvidas na patogênese de processos inflamatórios e que podem exacerbar o dano tecidual (HENSLEY et al., 2000). Os estudos ainda mostraram que as EROs podem desempenhar um importante papel na sinalização celular em baixas concentrações, mas em concentrações elevadas elas têm relação importante particularmente com o dano a biomoléculas (SIES, 1997). Assim, as EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, seja através de ligações covalentes ou por ataque às cadeias laterais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os níveis elevados de EROs no organismo parecem ser um dos maiores responsáveis pelo processo de envelhecimento (HARMAN, 1992), e por muitos processos degenerativos como o câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, cataratas, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Estes são alguns dos motivos para o crescente interesse sobre as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) desde o início da década de oitenta. Os estudos também revelaram que estas espécies podem estar relacionadas a doenças inflamatórias, tais como artrite crônica, enfisema de pulmão e aterosclerose (SIES, 1997).

Como já explicado anteriormente, os organismos aeróbicos são protegidos contra as EROs e as ERNs por um complexo sistema antioxidante de defesa, que inclui produtos enzimáticos e não-enzimáticos (COTGREAVE et al., 1988). Além dos efeitos protetores do sistema de defesa antioxidante endógeno, produtos naturais com atividade antioxidante são também importantes para atenuar o dano oxidativo, desta

maneira complementando estas defesas (KANTER, 1998). Neste sentido, há um interesse crescente pelos efeitos antioxidantes de produtos naturais e do seu papel na saúde e na doença. Neste contexto, as propriedades antioxidantes dos compostos polifenólicos das plantas foram sugeridas como efectoras de um papel importante na manutenção da saúde humana e na prevenção de várias doenças. (MONTORO et al., 2004). Por exemplo, o flavonóide rutina, composto que foi tomado como padrão em parte de nosso estudo. Ele é um glicosídeo de flavonol que compreende a aglicona quercetina e o dissacarídeo rutinose. Ele é um composto polifenólico encontrado em muitas plantas, especialmente no trigo, chá preto, cascas de maçã, entre outros. Este flavonóide é uma substância sólida, amarelo-clara e pouco solúvel em água. É, contudo, muito mais hidrossolúvel que sua aglicona, a quercetina (THOMSON HEALTHCARE, 2006).

A rutina demonstrou em estudos laboratoriais apresentar atividade antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica, antitrombótica, citoprotetora e vasoprotetora e por isso existem medicamentos disponíveis à base de plantas ricas em rutina (CARBONARI et al., 2006; THOMSON HEALTHCARE, 2006).

Acredita-se que muitas das atividades potenciais da rutina podem ser devidas, pelo menos parcialmente, à sua atividade antioxidante. A rutina é um antioxidante fenólico capaz de seqüestrar radicais superóxido, além de quelar íons metálicos, tais como o cátion ferroso que está envolvido na reação de Fenton, que gera EROs (KOSTYUK; POTAPOVICH, 1998). A rutina pode ainda modular a função aeróbica de neutrófilos (KOSTYUK et al., 1996). Do ponto de vista estrutural, a atividade antioxidante *in vivo* da rutina parece ser devida em grande parte à sua aglicona quercetina, na qual ela é convertida após hidrólise (OLTHOF et al., 2000). A rutina pode também inibir a lipoperoxidação e auxiliar na manutenção dos níveis do mais importante antioxidante biológico, a glutatona reduzida (GSH).

## 1.5 Radicais livres e inflamação

Os maiores produtores de EROs no tecido inflamatório são os leucócitos sanguíneos, os quais tornam-se ativados e aderem-se à superfície das células endoteliais. A NADPH oxidase de leucócitos polimorfonucleares, contém citocromo b245 que catalisa a redução monovalente do  $O_2$  para formar  $O_2^{\cdot-}$  (SEGAL, 1991 apud SIES, 1997). Existem outras células inflamatórias como linfócitos e macrófagos que também possuem NADPH oxidase na membrana (HANCOCK et al., 1989 in SIES, 1997). A cascata do ácido araquidônico que gera prostaglandinas e leucotrienos, também gera EROs no processo de síntese de eicosanóides (CADENAS; SIES, 1985).

O íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) geralmente não está presente em condições fisiológicas (*in vivo*) e não se acreditava que esse íon pudesse ser disponibilizado em concentrações suficientes para catalisar a formação de  $O_2^{\cdot-}$  em condições normais. No entanto, com medidas químicas sensíveis, foi possível detectar concentrações importantes de ferro reduzido no líquido sinovial de animais com processos inflamatórios induzidos, o que poderia catalisar a reação de Fenton e gerar grandes quantidades de EROs (CUZZOCREA et al., 1998; 1999; 2000).

Também já foi relatado que a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), dois mediadores importantes no processo inflamatório, são capazes de induzir a produção de EROs (ADAMSON; BILLINGS, 1992; LO; CRUZ, 1998). A ativação de células endoteliais também gera EROs e contribui significativamente para a manutenção de um ambiente oxidante no sítio inflamatório.

Uma característica-chave das doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, é o aumento da expressão de certos genes que codificam proteínas (como as citocinas) e proteinases envolvidas na destruição celular. Uma importante característica da expressão gênica é o controle da transcrição por proteínas específicas, os fatores de transcrição (McKAY; IMHOF, 1993). Dois dos fatores de transcrição, AP-1 e NF- $\kappa$ B, são influenciados pelo *status* redox. Vários autores têm postulado que a ativação do NF- $\kappa$ B pelas EROs pode ser um dos eventos iniciais na indução de reações inflamatórias (KALTSCHMIDT et al., 1997). Também tem sido demonstrado que as EROs podem induzir a atividade do NF- $\kappa$ B em células T humanas (SCHRECK et al., 1991).

Nas doenças inflamatórias, a homeostase entre a produção de antioxidantes e pró-oxidantes pode ser afetada, acarretando um aumento na produção de EROs, que

por sua vez, destroem o antígeno responsável pelo processo inflamatório. Tal produção excessiva leva à injúria tecidual pelo dano causado às macromoléculas e lipoperoxidação de membranas. Ademais, as EROs podem atuar como mensageiras secundárias, ativando a produção de outros mediadores envolvidos no processo inflamatório (HAANEN;VERMES, 1995; MAXWELL, 1995; MIESEL et al., 1995; POLLA et al., 1995; WHISLER et al., 1995).

Vários fármacos antiinflamatórios têm mostrado um mecanismo antioxidante como parte de sua atividade biológica. Entre tais fármacos pode-se citar o nimesulida (FACINO et al., 1993), aminosalicilatos (MILES; GRISHAM, 1994), entre outros. Então, o estudo da atividade e do mecanismo antioxidantes dos extratos naturais utilizados na medicina tradicional com finalidade antiinflamatória se tornou igualmente interessante.

## 1.6 Câncer e terapia antitumoral

Atualmente, o câncer é considerado a segunda principal causa mundial de morte humana no mundo ocidental (COZZI, 2003; OTTO, 2002). A incidência média desta enfermidade é de aproximadamente 10 milhões, com 6 milhões de mortes que ocorrem por ano (OMS, 2005). Estima-se ainda que cerca de 15 milhões de novos casos irão existir até 2020. A estimativa brasileira para 2006 é de quase meio milhão de novos casos entre homens e mulheres (COZZI, 2003; INCA, 2005; OTTO, 2002; WHO, 2005).

O câncer é mais freqüentemente diagnosticado e mais prevalente nos indivíduos mais velhos. A maioria dos casos é diagnosticada após os 65 anos. A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados com múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (BRASIL, 2002).

Câncer é a denominação genérica para as neoplasias malignas. Neoplasia, por sua vez, significa “crescimento novo” e define condições de proliferação celular anormal, encontrada nos tumores benignos e malignos (NAKAGAWA; LOPES, 2000). Historicamente, o estudo das neoplasias primariamente interessava aos médicos que

eram procurados para curar pacientes com "tumor" (etimologicamente, "amontoado"). Os clínicos da época classificaram os tumores primeiramente em duas categorias, benignos e malignos, de acordo com seu comportamento clínico. Em geral, os tumores benignos eram, e são ainda assim considerados, aqueles que são circunscritos, freqüentemente separados dos tecidos normais adjacentes por uma cápsula; crescem lentamente, e em geral, eles não ameaçam a vida. Os tumores malignos, em vez disso, crescem de forma invasiva em tecidos adjacentes e, freqüentemente, originam tumores secundários (metástases), o que pode acontecer em órgãos distantes. Depois do tratamento, os tumores malignos freqüentemente podem reincidir, tanto localmente, como à distância da situação primária. Muitos pacientes morrem em consequência destas metástases (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004).

Estas generalizações, no entanto, escondem um bom número de exceções (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004). Hoje em dia a terminologia "tumor" tem um sentido mais genérico, representando aumento regional de volume ou tumefação, podendo ser ou não de caráter neoplásico (NAKAGAWA; LOPES, 2000).

Atualmente, a nomenclatura dos neoplasmas utilizada pelos patologistas e outros especialistas indica a fonte de tecido do qual os neoplasmas derivam. Um neoplasma benigno de origem epitelial é chamado "adenoma" (de estruturas glandulares) ou papiloma (estruturas como verrugas). Um neoplasma maligno de origem epitelial é chamado "carcinoma". Neoplasias benignas de tecidos conectivos são chamadas "fibromas" (de tecido fibroso), "osteoma" (de osso), e assim por diante (LANGLEY et al., 1991). Esta nomenclatura é neutra em significado etiológico. Os estudos histológicos das neoplasias revelaram uma constante variação entre as neoplasias originadas em órgãos particulares.

Os patologistas introduziram o conceito de "diferenciação" para denotar o grau de divagação achado entre a arquitetura da neoplasia e do tecido normal de que ele presumivelmente surgiu. O mais próximo ao tecido normal, é considerado o tumor que mais "diferenciou", e contrariamente, tumores que são menos semelhantes ao tecido de origem são chamados "anaplásticos" ou "não diferenciados" (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004).

Qualquer que seja a causa, o câncer é basicamente uma doença celular, caracterizada por desvio nos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular, além de processos de apoptose celular (MOFFAT et al., 2000). Tudo isto em decorrência de certa mudança no repertório da expressão gênica devido a alguma mutação ocorrida no DNA que determina o aparecimento e/ou o comportamento da neoplasia (DUESBERG; RASNICK, 2000).

Tem sido proposto que uma célula neoplásica resulta de uma célula normal que sofreu mutação. Hoje se considera que uma mutação refere-se a uma mudança na estrutura linear do DNA. A teoria somática da mutação, a teoria atualmente predominante da carcinogênese, está baseada nesta suposição (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004). Os agentes ambientais possuem um papel mais proeminente na etiologia das mutações devido à introdução indiscriminada de novos produtos químicos sintéticos (BOFFETTA; FREDRICK, 2003). Os achados de que “agentes filtráveis” (vírus) geraram sarcoma em aves domésticas introduziram uma etiologia também viral para outras mutações tumorigênicas. Tumores "espontâneos" foram observados em muitas espécies multicelulares, demonstrando que o desenvolvimento neoplásico é possível em todo reino metazoa (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004).

A homeostasia tecidual depende de células cujos ciclos celulares são rigidamente controlados. A progressão normal do ciclo celular depende da capacidade da célula para traduzir sinais extracelulares, tais como os estímulos mitogênicos e as matrizes extracelulares, de maneira íntegra para que ocorra a perfeita duplicação do DNA e a sua divisão. As quinases dependentes de ciclina (CDKs) respondem a estes sinais, e são, em grande parte, responsáveis pela evolução do ciclo celular. Devido ao seu papel fundamental na divisão celular, a natureza desenvolveu mecanismos reguladores da atividade das CDKs (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000). As ciclinas são ligantes adjuvantes das CDKs que são necessárias para as suas atividades e seus níveis estão intimamente ligados à cada etapa do ciclo celular (PINES, 1999). Uma variedade de outros reguladores de CDKs, tais como eventos de fosforilação, inibidores naturais entre outros fatores, também está relacionada ao controle do ciclo celular (PINES, 1998).

A fosforilação de vários substratos das CDKs resulta em diversos eventos, tais como mudanças na expressão gênica, formação de complexos pré-replicativos e colapso do envelope nuclear (PINES, 1999).

De acordo com vários autores, o câncer desenvolve-se em parte por deleção dos mecanismos normais de regulação do ciclo celular (KAMB, 2000; MOFFAT et al., 2000), como a atividade atípica das CDKs que pode ser acompanhada por amplificação da ciclina, mutação das CDKs ou de seus substratos, assim como a inativação de inibidores de CDKs. A proliferação seletiva das células cancerosas também pode ser originária da amplificação de sinais positivos de crescimento, mutação dos mecanismos de controle e dos genes envolvidos com o reparo, assim como a falha da morte programada da célula por apoptose (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000). Acredita-se que o potencial pleno das terapias antitumorais, incluindo a terapia gênica, depende do conhecimento adequado desses inibidores e estimuladores moleculares envolvidos na regulação do ciclo celular (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000).

Segundo Serrano et al. (1993), a maquinaria molecular do ciclo celular está envolvida na carcinogênese. Descobertas recentes têm revelado vários reguladores do ciclo celular como fatores determinantes para o câncer humano. Entre estes tipos de moléculas, estão os inibidores das quinases dependentes de ciclina, tal como a proteína P16 (KAMB, 2000). Estas proteínas supressoras de tumor estão perfeitamente posicionadas para regular as decisões críticas no desenvolvimento da célula. O gene P16 parece ser um alvo particularmente significativo para as mutações dos tumores.

Os mecanismos que regulam o ciclo celular envolvem muitos elementos que podem ser vistos como intermediários de vias genéticas distintas. Nesse caso, o propósito final da via não é a produção de um metabólito essencial, mas sim o controle preciso da divisão de celular (KAMB, 2000). Múltiplas vias provavelmente estão envolvidas na prevenção da perda do controle do ciclo celular. Algumas dessas vias podem ser gerais, funcionando em muitos tecidos, enquanto outras podem ser muito mais específicas, operando em só alguns tipos de células. Várias são as vias genéticas que podem estar relacionadas com a carcinogênese, uma das vias mais importantes envolve a rede sinalizadora RAS (GTPase, p.ex.) (BOGUSKI; MCCORMICK, 1993; KAMB, 2000). Outra via importante envolve o gene supressor de tumor p53, o p21



inibidor de CDK e um de seus alvos, o complexo CDK2-ciclina E (DULIC et al., 1994; EL-DEIRY et al., 1993). Uma terceira via envolve os complexos de ciclina D<sub>1</sub> e CDK4 gerados no processo de regulação do ciclo celular (SERRANO ET AL., 1993). Todos os genes supressores de tumor conhecidos e também os proto-oncogenes, estão relacionados em pelo menos uma dessas vias reguladoras. Em analogia com as vias bioquímicas, a alteração de um único elemento numa via de controle do ciclo celular (como a inativação de um gene supressor de tumor ou a hiperativação de um proto-oncogene) é suficiente para romper a função dessa via e para torná-la um obstáculo para os processos reguladores (KAMB, 2000).

Segundo alguns autores, o equilíbrio entre a sobrevivência e a morte celular está sob estrito controle genético. Quando a célula é exposta à lesão bioquímica, biológica ou física; ou estiver privada de substâncias necessárias à sua sobrevivência, ela ativa uma série de genes de resposta ao estresse. A partir daí, em alguns casos, a célula pode eventualmente se recuperar, mas geralmente o que ocorre é a morte desta célula por apoptose. A célula morre e a vizinhança é reciclada. Se o evento acomete um grande número de células, então isto sugere necrose, que é geralmente acompanhada de resposta inflamatória (KAM; FERCH, 2000). A apoptose tem papel central na patogênese de várias doenças humanas quando os mecanismos de controle apoptótico estão suprimidos, super ou sub expressos ou alterados por mutação (THATTE; DAHANUKAR, 1997). Por outro lado, os agentes antitumorais podem induzir os tumores à apoptose (KERR et al., 1994).

Kam e Ferch (1997) explicam que, a partir de um estímulo determinado, uma célula pode entrar em processo de apoptose. Aceita-se que este mecanismo de morte ocorra em basicamente dois estágios. O primeiro estágio (de decisão) é controlado geneticamente por dois importantes genes, Bcl-2 e p53. O primeiro, Bcl-2, é uma família de genes que regula negativamente a apoptose (BROWN, 1996; CLEARY et al., 1986; TSUJIMOTO et al., 1985; VAUX et al., 1992) na membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático, ela pode atuar pelo controle sobre canais de cálcio. Atualmente, é reconhecida a existência de uma família de proteínas nos mamíferos semelhante à Bcl-2 que promove ou inibe a apoptose (HOCKENBERY et al., 1993; YANG et al., 1997). As proteínas, tais como Bcl-2 e Bcl-xL, previnem a apoptose, ao passo que proteínas

Bcl-2 associadas a proteínas x, tais como Bax, Bak e Bcl-xS, promovem a apoptose (HAUNSTETTER; IZUMO, 1998; SAVITZ et al., 1998). A p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa, que se liga ao DNA para atuar como um fator de transcrição e está implicada no controle da proliferação celular e no reparo do DNA (MIYASHITA; REED, 1995). Mutações da p53 foram encontradas em pelo menos 50% dos carcinomas humanos e também são associadas com a resistência à quimioterapia (DONEHOWER et al., 1992). A c-myc também é uma proteína ligante de uma seqüência específica do DNA, que age como um fator de transcrição e induz a apoptose na presença de p53. A proteína codificada pelo gene c-myc está elevada em muitos tumores (PRITCHARD; WATSON, 1996).

O segundo estágio da apoptose (fase de execução) é o responsável pelas mudanças morfológicas celulares características. Os eventos centrais envolvidos nesta fase da apoptose são proteólise e inativação mitocondrial. A perturbação celular resulta da ativação de uma família de cisteína-proteases chamada caspases (CASP) (SAVITZ et al., 1998; WYLLIE, 1997). As caspases são pró-enzimas que têm sido conservadas dos nematóides aos homens. Cerca de dez caspases humanas já foram descritas.

Em resumo, os progressos da bioquímica e biologia molecular trouxeram esclarecimentos sobre a patogenia do câncer em nível bioquímico, o que permitiu novas abordagens terapêuticas. Entretanto, como o câncer é uma família de doenças, cada tipo de câncer tem sua evolução clínica característica, e, conseqüentemente, terapia diferenciada (GORCZYCA et al., 1999). Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é considerada como o mais efetivo método de tratamento do câncer (AJITH; JANARDHANAN, 2002), uma vez que muitos tumores caracterizam - se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, o que evidencia a necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica que é realizada pela quimioterapia (ENGERS; GABBERT, 2000)

Historicamente, há evidências da utilização de agentes quimioterápicos sob a forma de sais metálicos à base de arsênio, cobre e chumbo em civilizações antigas do Egito e da Grécia (BONASSA, 2001). Porém, a partir da década de 50, com a identificação dos primeiros antibióticos antitumorais, houve um rápido desenvolvimento da quimioterapia

antitumoral. Nas décadas seguintes, levando ao descobrimento de diversos fármacos importantes (BONASSA, 2001). O sucesso no tratamento dos tumores por meio de fármacos depende da maior sensibilidade ao tratamento das células neoplásicas, comparativamente às células normais, uma vez que células em proliferação são, em geral, mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes. Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre células neoplásicas e normais são, às vezes, pequenas, e a toxicidade é um problema comum (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996).

As principais classes dos vários fármacos usados na quimioterapia do câncer atualmente incluem: os antimetabólitos, que inibem principalmente a síntese de purinas (ex: mercaptopurina, tioguanina, etc); agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxiuréia, fluoruracila); agentes que modificam o DNA por alquilação (ex: cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, etoposídeo); e agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina) (RANG et al., 1999; RICHARDSON et al., 2000). Dentre estes grupos, os antibióticos antitumorais estão entre os mais importantes agentes utilizados na quimioterapia do câncer, e incluem os membros do grupo da antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácido aureólico (ROCHA et al., 2001).

Entre os antibióticos clinicamente mais utilizados, encontram - se os derivados da daunomicina, particularmente doxorrubicina e a mitomicina C (CRAGG; NEWMAN, 1999). A grande maioria destes antibióticos exerce suas atividades antitumorais por inibição da topoisomerase II, um grupo de enzimas que catalisam o relaxamento da super-hélice do DNA no processo de replicação e neo-síntese (BURDEN; OSHEROFF, 1998). Entretanto, para todos os grupos de agentes antitumorais apresentados existe uma alta incidência de efeitos adversos associados à elevada toxicidade. Além disto, no caso particular do câncer, a eficácia da sua terapia ainda pode ser comprometida pela resistência aos fármacos disponíveis (MDR = *multidrug resistance* ou resistência multifármacos) que é muito acentuada, obrigando o clínico a optar por terapias de associação de dois ou mais fármacos (JENDIROBA et al., 2002).

A atividade antitumoral *in vivo* de *Bidens pilosa* também foi avaliada, fazendo-se comparações entre informações obtidas a partir da avaliação sobre um grupo de

animais (controle positivo), portador do tumor ascítico de Ehrlich e tratado com um fármaco antitumoral já disponível no mercado, tomado como padrão, a doxorubicina, também conhecida como adriamicina. Este fármaco é um antibiótico antitumoral derivado da daunomicina, do grupo das antraciclinas (CRAGG; NEWMAN, 1999).

As propriedades citotóxicas da doxorubicina sobre as células malignas e os seus efeitos tóxicos em vários organismos parecem estar principalmente relacionados com a intercalação dos seus anéis planares entre os pares de bases nucleotídicas. A intercalação no DNA inibe a replicação nucleotídica e pode desencadear a quebra do DNA pela topoisomerase II, originando distúrbios sérios na estrutura terciária do DNA. A capacidade da doxorubicina para se ligar à membrana celular pode afetar uma variedade de funções. A doxorubicina também parece estar envolvida nas reações de oxidação/redução, com a produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos. Células tratadas com a doxorubicina têm manifestado alterações nas características morfológicas associadas à apoptose, o que pode ser um dos mecanismos de ação deste fármaco (SINGAL; ILISKOVIC, 1998; CHING YU et al., 2005).

A doxorubicina é ativa durante todo o ciclo celular, inclusive na interfase. Tecidos de rápida proliferação, como os tecidos tumorais (mas também a medula óssea, mucosa, gastrointestinal e oral e folículos capilares), são os mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos da doxorubicina (SINGAL; ILISKOVIC, 1998; CHING YU et al., 2005).

A doxorubicina não é absorvida pelo trato gastrointestinal e, uma vez que o fármaco é irritante para os tecidos, não deve ser administrado por via oral. A doxorubicina apresenta meia-vida biológica muito curta (cerca de 5 minutos) e volume de distribuição no estado de equilíbrio de 20 a 30 L/kg, não atravessando a barreira hematoencefálica em quantidades detectáveis. A ligação às proteínas plasmáticas é de cerca de 75% e não é dependente da concentração plasmática a partir de 2  $\mu$ M. Este fármaco é metabolizado principalmente pelo fígado, sendo seu principal metabólito o doxorubicinol. Após a administração intravenosa, os níveis plasmáticos da doxorubicina seguem um declínio multifásico, com uma meia-vida terminal de 20 a 48 horas (SINGAL; ILISKOVIC, 1998; CHING YU et al., 2005).

### 1.7 Resistência à quimioterapia e toxicidade dos fármacos antitumorais

A resistência à quimioterapia (Multidrug resistance ou Resistência multifármacos = MDR) é um tipo de resistência das células tumorais a múltiplas classes de fármacos quimioterápicos. Ela pode ser resultado de uma variedade de mecanismos que ainda não são completamente compreendidos (VOLM; MATTERN, 1996). Considera-se a MDR clássica, aquela onde há transporte alterado através das membranas celulares, o que resulta em concentrações mais baixas de fármaco nas células-alvo (DIETEL, 1991). A MDR clássica ainda é relacionada à expressão de uma variedade de proteínas que agem como bombas de extrusão ATP-dependentes. A glicoproteína P (Pgp) e a proteína de resistência multifármaco (MRP1) são os membros mais importantes e mais estudados da superfamília ABC de transportadores de membrana (DIETEL, 1991). Aparentemente, além dos seus papéis na MDR, estas proteínas têm várias funções fisiológicas, uma vez que são expressas também em muitos tecidos não tumorais importantes e estão presentes em abundância nos organismos procarióticos. Já foram identificados alguns fármacos que são capazes de inverter os efeitos da Pgp e MRP1, além de outras proteínas homólogas de MDR (TEODORI et al., 2002).

Os mecanismos mais importantes de MDR incluem: (a) transporte de membrana alterado tanto por decréscimo no aporte de fármaco ou por acréscimo no efluxo (DIETEL, 1991); (b) expressão alterada de enzimas-alvo ou enzimas-alvo alteradas (BECK,1990); (c) ativação ou degradação alterada do fármaco (MORROW; COWAN, 1990); (d) reparo aumentado ao DNA (HAMMOND et al., 1989); e (e) falência dos processos de apoptose (HANNUN, 1977; LIU et al., 2001). Alguns desses mecanismos de resistência a fármacos podem coexistir, levando a um alvo tumoral refratário ao tratamento por fármacos (TEODORI et al., 2002).

Por outro lado, os avanços ocorridos no tratamento do câncer nestas últimas duas décadas levaram à elevação dos índices de sobrevivência a longo prazo. Embora a quimioterapia do câncer tipicamente seja associada com a toxicidade aguda relacionada ao tratamento, a toxicidade a longo prazo também pode causar morbidez significativa. Poucos relatórios sobre estas seqüelas podem ser encontrados na literatura. No entanto, muitos casos de toxicidade significativa têm sido relatados por afetar o sistema cardiopulmonar, nervoso, tegumentar e genitourinário. Ainda mais

recentemente, têm-se considerado as potenciais malignidades secundárias decorrentes da quimioterapia (SKIRVIN et al., 1996).

A neurotoxicidade é um efeito adverso comumente associado com alguns agentes quimioterápicos, tais como os alcalóides da *Vinca*, a cisplatina, citarabina, e muitos dos recentes taxanos (SKIRVIN et al., 1996). Entre alguns dos relatos da literatura, pode-se citar Postma et al. (1993), que observou em seu estudo realizado com pacientes com linfoma não-Hodgkin tratados com a vincristina, que cerca de 1/3 apresentavam queixas neuropáticas. Outros relatos também se referem à toxicidade associada ao sistema pulmonar, como no caso do bussulfano que é o fármaco de escolha para o tratamento da leucemia mielogênica (GINSBERG; COMIS, 1982)

A falência congestiva do coração é a potencial “marca registrada” a longo prazo, resultado do tratamento com as antraciclinas e doxorrubicina. O início dos sinais e sintomas (taquicardia, respiração acelerada, edema, distensão venosa da jugular) é variável, podendo ir de meses a anos depois do início do tratamento. Também pode ocorrer tão cedo quanto durante o primeiro ciclo de quimioterapia (KANTROWITZ, BRISTOW, 1984; LENAZ; PAGE, 1976). A cardiotoxicidade associada às antraciclinas pode ser fatal em até 60% dos pacientes, enquanto pode ser eficientemente reduzida, quando administrada com agentes inotrópicos e diuréticos (LENAZ; PAGE, 1976).

Também se devem considerar os problemas causados pelo extravasamento de um fármaco antineoplásico que pode gerar uma gama de sintomas que vão desde irritação, dor progressiva, necrose tecidual até deformações ulcerativas incuráveis. Para prevenir a progressão dessas lesões, intervenções cirúrgicas podem ser necessárias (WHEDON, 1992). Alterações na pigmentação da pele e das unhas podem ocorrer em pacientes tratados com agentes como a fluoruracila, a bleomicina, ciclofosfamida, bussulfano e doxorrubicina (DUNAGIN, 1982).

Entre os problemas comuns encontrados por pacientes mais jovens (tratados para doenças tais como doença de Hodgkin, câncer testicular, ginecológico, cânceres de peito, e leucemias de infância), a infertilidade é uma seqüela bastante importante que também ocorre em pacientes de transplante de medula óssea (McINNES; SCHILSKY, 1996). Pacientes tratados com ciclofosfamida, ifosfamida e bussulfano, possivelmente podem desenvolver cistite hemorrágica, que é um evento clássico de toxicidade da

quimioterapia do tratamento de tumores da bexiga (BROCK, 1989). A nefrotoxicidade devida a agentes quimioterápicos pode manifestar-se como uma insuficiência renal aguda ou crônica, ou falência, além de perda de eletrólitos como hipomagnesemia (RIES; KLASTERSKY, 1986).

As malignidades secundárias da quimioterapia não configuravam preocupação até recentemente, quando dados atualizados de estudos a longo prazo tornaram-se disponíveis. Vários fatores podem desempenhar algum papel importante para malignidade secundária, incluindo o potencial mutagênico e carcinogênico de alguns agentes utilizados, a exposição à radiação por razões terapêuticas e também, o estado imunológico do paciente (ERLICHMAN; MORRE, 1996). Cânceres secundários têm sido identificados em pacientes com doença de Hodgkin, cânceres pediátricos, cânceres de ovário, mama e leucemia (ERLICHMAN; MORRE, 1996; PEDERSEN-BJERGAARD, 1995).

Em suma, as informações acumuladas até o presente mostram que muitos fatores são determinantes para a toxicidade dos quimioterápicos, tanto aguda quanto crônica. Elas dependem de fatores que incluem, por exemplo, a dose, a duração do tratamento e o tipo de quimioterapia. Nem todos os pacientes experimentam toxicidade a longo prazo devido à quimioterapia, mas um determinado nível de dano significativo pode ocorrer num padrão imprevisível (SKIRVIN et al., 1996).

Embora já existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhuma das abordagens terapêuticas foi capaz de regredir completamente as diferentes manifestações desta doença, ou mesmo reduzir significativamente sua toxicidade e MDR. Por isso, o interesse pelos medicamentos desenvolvidos a partir das plantas medicinais tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Na busca de fármacos tão ou mais eficazes do que os quimioterápicos tradicionais usados no tratamento do câncer, porém com menos efeitos tóxicos e com menor probabilidade de multiresistência.

Neste contexto, pretendeu-se avaliar no presente trabalho, o extrato bruto hidroetanólico de *Bidens pilosa* e algumas de suas frações, visando a aumentar a oferta de produtos e moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antitumoral. Paralelamente ao estudo da atividade antitumoral, foram

realizados ensaios para a avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória de *Bidens pilosa*, uma vez que existem relatos na literatura do uso popular desta planta para combater processos inflamatórios cuja etiologia está claramente associada à geração de EROs.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar as potenciais atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico de *Bidens pilosa* e três de suas frações (clorofórmica, acetato de etila e metanólica) utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*, considerando informações da medicina popular.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo fenólico total do extrato bruto hidro-etanólico de *Bidens pilosa* e de suas três frações;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto hidro-etanólico de *Bidens pilosa* e de suas três frações através de ensaios laboratoriais *in vitro*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos de *Bidens pilosa* revelados mais promissores pelos ensaios *in vitro*, utilizando ensaios *in vivo* realizados em camundongos isogênicos;
- Avaliar a potencial atividade antiinflamatória *in vivo* dos extratos de *Bidens pilosa* revelados mais promissores pelos ensaios *in vitro* de atividade antioxidante;
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto hidro-etanólico de *Bidens pilosa* e de suas três frações, através dos ensaios de toxicidade aguda com *Artemia salina* e atividade hemolítica, além de ensaios de citotoxicidade *in vitro* utilizando cultura de células da linhagem do tumor (carcinoma) de Ehrlich;
- Avaliar o potencial antitumoral dos extratos de *Bidens pilosa*, através de avaliações morfológicas, histo-citológicas e bioquímicas *in vivo*, utilizando camundongos isogênicos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

### 3. ARTIGOS CIENTÍFICOS GERADOS A PARTIR DO ESTUDO

ANEXO A - Cópia do primeiro artigo científico gerado por este estudo intitulado *Free-radical scavenging and in vivo antioxidant activity of polyphenol extracts from Bidens pilosa L. (Asteraceae) with anti-inflammatory properties*. Artigo submetido ao editorial do periódico *Journal of Pharmacological Sciences* (Sociedade Farmacológica Japonesa).

ANEXO B - Cópia do segundo artigo científico gerado por este estudo intitulado *Study of the antitumor potential of Bidens pilosa (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine*. Artigo submetido ao editorial Elsevier do periódico *Journal of Ethnopharmacology* (Sociedade Internacional de Etnofarmacologia).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Conteúdo polifenólico dos extratos e frações de *Bidens pilosa* e seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios

O estresse oxidativo possui um importante papel na gênese de várias doenças, tais como injúria por isquemia e reperfusão, processos inflamatórios, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer. No caso particular da inflamação, os radicais livres estão envolvidos principalmente ao dano à membrana celular e na biossinalização induzida pelos fatores de necrose e apoptose desencadeados pelos linfócitos e macrófagos. Neste contexto, o presente trabalho estabeleceu como um de seus principais objetivos, a investigação sobre a atividade antioxidante e antiinflamatória de *Bidens pilosa* (*in vitro* e *in vivo*) e sua inter-relação.

Nos organismos aeróbicos, para que não ocorram erros metabólicos e/ou lesões a biomoléculas, as espécies reativas geradas precisam estar estritamente controladas por mecanismos de defesa antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em algumas disfunções do organismo, as defesas antioxidantes podem ser sobrepujadas e, níveis elevados de espécies reativas (principalmente EROs e ERNs) podem instalar a condição de estresse oxidativo. Uma ampla gama de fatores ambientais está implicada na indução do estresse oxidativo, como a ação dos xenobióticos, a invasão por alguns patógenos (reações de hipersensibilidade), o estresse induzido por radiação UV, a escassez de oxigênio, entre outros (BLOKHINA et al., 2002).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação de radicais livres, os organismos aeróbicos foram dotados ao longo do tempo evolutivo de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes endógenos podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos como a SOD, CAT e GPx, ou não enzimáticos, tais como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) e GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os antioxidantes podem exercer seus efeitos por mecanismos diferentes, tais

como supressão da formação de espécies reativas por redução de hidroperóxidos e peróxido de hidrogênio e/ou por seqüestro de íons metálicos, captação de radicais livres ativos e reparo. Alguns antioxidantes ainda induzem a biossíntese de outros antioxidantes ou sistemas enzimáticos (NOGUCHI; NIKI, 2000).

Vários estudos também já demonstraram que os produtos naturais com atividade antioxidante são também importantes, pois eles complementam o sistema antioxidante endógeno de defesa (KANTER, 1998). Neste sentido, um interesse particular tem sido dado às plantas, uma vez que existem várias evidências de que um grande número de plantas medicinais contém compostos químicos que exibem atividade antioxidante (SCHINELLA et al., 2002). Acredita-se que a grande concentração e a diversidade de antioxidantes presentes nas plantas devem-se ao fato de as mesmas terem que se proteger dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo imposto pelos raios solares e pela exposição ao oxigênio (SCARTEZZINI; SPERONI, 1999).

Existem muitos dados sobre os efeitos antioxidantes de diversos grupos de compostos polifenólicos presentes nos extratos de plantas, como flavonóides, taninos, catequinas, proantocianidinas e alguns ácidos polifenólicos (ACKER et al., 1996). Os polifenóis de origem natural, particularmente os flavonóides, têm uma estrutura ideal para captação de radicais livres (HASLAM, 1966), sabe-se que sua atividade antioxidante supera o efeito de antioxidantes conhecidos, como as vitaminas A e E (RICE-EVANS et al., 1996).

Os flavonóides estão largamente distribuídos nas plantas superiores e são capazes de captar o ânion superóxido e radicais hidroxila por transferência de elétron (RICE-EVANS et al., 1996). Este grupo de compostos polifenólicos em geral contém um número variado de grupos hidroxila fenólicos ligados às estruturas aromáticas, o que lhes confere a atividade antioxidante (HARBORNE, 1986). Os flavonóides freqüentemente ocorrem na forma glicosídica e a hidrólise do polifenol acontece provavelmente no trato gastrointestinal. Estes compostos são multifuncionais e podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, e *quencher*s (“extintores”) de oxigênio singlete. Também têm sido propostas propriedades quelantes de metal, particularmente de ferro e zinco, para este grupo de compostos (RICE-EVANS et al., 1996).

*Bidens pilosa*, planta medicinal rica em compostos polifenólicos (flavonóides) e poliacetilenos, é uma espécie largamente distribuída pela América do Sul. Ela tem sido utilizada pela medicina popular com vários propósitos, incluindo o tratamento das doenças inflamatórias e tumores, embora os mecanismos responsáveis por estas ações terapêuticas não tenham sido ainda completamente compreendidos (CHIANG et al., 2004; LING, 1995; VALDÉS; REGO, 2001; ZHANG, 1989).

Os resultados obtidos mostraram que os compostos polifenólicos foram detectados em todas as frações e no extrato bruto hidro-etanólico (Eb-EtOH) de *Bidens pilosa*, sendo que a fração acetato de etila (f-AcOEt) apresentou a maior concentração de tais compostos, seguida pelo extrato bruto hidro-etanólico, fração metanólica (f-MeOH) e fração clorofórmica (f-CHCl<sub>3</sub>). Dados complementares ainda não divulgados obtidos por nossos colaboradores a partir de uma análise fitoquímica que se baseou em um processo de separação de compostos fenólicos e caracterização por HPLC e <sup>13</sup>C RMN, demonstraram que a f-AcOEt deve possuir flavonóides em sua constituição.

Estudos realizados por outros autores já demonstraram que à medida que o conteúdo polifenólico de chás herbáceos diminui, os efeitos antioxidante e antiinflamatório também são atenuados (STANDLEY et al., 2001). Esta observação corrobora nossa sugestão de uma possível associação entre os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios de *Bidens pilosa* com seu conteúdo polifenólico.

Os efeitos antioxidantes *in vitro* dos extratos e frações de *Bidens pilosa* foram primeiramente discerníveis através do ensaio com o radical DPPH, que avalia principalmente a capacidade doadora de próton de determinado composto ou associação. O DPPH é um composto radicalar de absorção característica que possui um próton livre, sendo que, na presença de compostos captadores de prótons, a absorção do DPPH diminui significativamente (CONSTANTIN et al., 1990; MENSOR et al., 2001). No presente estudo, o extrato Eb-EtOH e as frações f-AcOEt, f-MeOH e f-CHCl<sub>3</sub> demonstraram capacidade de captação de radicais DPPH de forma concentração-dependente. A fração f-AcOEt exibiu a maior capacidade de captação do DPPH, quando comparado às outras amostras testadas de *Bidens pilosa* (CE<sub>50</sub> = 32,3 ± 6,7 µg.mL<sup>-1</sup>).

Evidências *in vitro* da capacidade de captação de radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) foram obtidas através do emprego de um sistema de oxidação da desoxirribose pelo radical livre gerado pelo ferro reduzido na presença de peróxido de hidrogênio (HALLIWELL et al., 1987). Vários estudos realizados com este sistema para avaliar a atividade biológica de biomoléculas naturais derivadas de plantas demonstraram que os compostos capazes de inibir a degradação da desoxirribose são aqueles que podem quelar íons ferro, deixando-os pouco ativos para a reação de Fenton (SMITH et al., 1992). Os dados obtidos demonstraram que f-AcOEt apresentou a maior capacidade para neutralizar os radicais  $\bullet\text{OH}$ , apresentando  $\text{CE}_{50}$  muito semelhante ao padrão rutina ( $4,3 \pm 1,5$  e  $1,4 \pm 0,2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , respectivamente).

Os constituintes polifenólicos, particularmente os flavonóides, representam uma forma importante de defesa antioxidante devido a seus efeitos quelantes sobre metais. É possível que os extratos da planta possuam um efeito quelante sobre íons metálicos, especialmente de íons  $\text{Fe}^{2+}$ , que são capazes de gerar EROs (peróxidos que, a propósito, estão implicados em muitas doenças incluindo as inflamatórias), a partir da reação de Fenton. Através da diminuição das concentrações biodisponíveis de  $\text{Fe}^{2+}$ , estas substâncias podem proteger as células contra o dano oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Cabe destacar que a fração f-AcOEt apresentou o maior conteúdo de fenóis totais ( $3,6 \pm 0,2 \text{ EAG/mg}$ ) e também foi considerada a fração que exibiu a maior capacidade de captação de radicais  $\bullet\text{OH}$ . Esta informação corrobora as evidências que apontam para o potencial antioxidante dos extratos polifenólicos.

Segundo alguns autores, uma associação potencial pode ser estabelecida entre a atividade antioxidante e o potencial redutor de certos extratos de plantas (REITER et al., 2006). As propriedades redutoras de determinados produtos geralmente estão associadas à presença de agentes redutores, os quais exibem uma ação antioxidante por bloqueio das vias de geração de radicais livres, por doarem átomos de hidrogênio (CADENAS; SIES, 1985). Os agentes redutores também podem reagir sobre certos precursores de peróxidos, assim prevenindo a sua formação (GORDON, 1990). Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que o extrato bruto hidro-etanólico e as frações de *Bidens pilosa* foram capazes de proteger as amostras de homogenato de fígado de camundongos contra a lipoperoxidação induzida pelo tert-butil peróxido *in*

*vitro*. A oxidação dos ácidos graxos insaturados das membranas biológicas leva à formação e à propagação de radicais que causam um rearranjo das duplas ligações nos lipídios insaturados, e a conseqüente fragmentação dos mesmos nas membranas (GOULART et al., 2005). Vários são os produtos gerados por esta ruptura, um deles é o malonilaldeído. A maioria das amostras avaliadas de *B.pilosa* apresentou elevada proteção contra a lipoperoxidação ( $CE_{50} < 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os dados obtidos confirmam o potencial antioxidante dos extratos e frações avaliados e, mais uma vez, o conteúdo polifenólico mais elevado de f-AcOEt foi relacionado a uma atividade antioxidante igualmente mais elevada ( $CE_{50} = 25,1 \pm 4,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Estes resultados também corroboram os achados de outros pesquisadores que apontam para o poder antioxidante dos polifenóis nas plantas (IVANOVA et al., 2005). Vale destacar de novo que compostos fenólicos como a quercetina, jaceína, ácido caféico (CHIANG et al., 2004), lanceolina e buteína (VALDÉS; REGO, 2001), já foram identificados em *Bidens pilosa*.

Estudos comparativos com alguns extratos polifenólicos realizados por Guo et al. (1996), utilizando inclusive alguns dos ensaios supracitados, realizados também por este estudo (captação de radical  $\bullet\text{OH}$ , lipoperoxidação), além de outros como peroxidação em sinaptossomas, demonstraram que os polifenóis ativos presentes nas plantas podem ser relacionados com a ação protetora contra a peroxidação  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -iniciada graças não só à atividade ferro-quelante e de captação de radicais livres, mas também por possuírem papel na estabilidade de radicais das semiquinonas. A ubisemiquinona, por exemplo, é um radical livre resultante da remoção de um átomo de hidrogênio durante o processo de desidrogenação de uma hidroquinona à quinona, ou alternativamente, a adição de um átomo de hidrogênio singlete à quinona nas células. Com os resultados obtidos neste estudo, é possível especular que os polifenóis presentes em *Bidens pilosa* podem possuir habilidades semelhantes às referidas por Guo et al. (1996), quando administrados *in vivo*.

Em resumo, os resultados obtidos com os estudos *in vitro* demonstraram que as amostras de *Bidens pilosa* contêm compostos antioxidantes, particularmente flavonóides, que podem captar várias EROs eficientemente, em níveis comparáveis

aos do polifenol-padrão rutina. O amplo espectro de atividades relacionadas aos extratos e frações, sugere que múltiplos e sinérgicos mecanismos provavelmente podem ser responsáveis pela atividade antioxidante. Levando estes resultados em consideração, e dado o fato de que vários eventos patológicos, tais como os processos inflamatórios, podem estar associados com a geração de EROs e à indução da lipoperoxidação, a potencial atividade antioxidante de *Bidens pilosa* poderia justificar parcialmente seu potencial efeito antiinflamatório.

As observações descritas acima motivaram a investigação da atividade antioxidante e antiinflamatória *in vivo* do extrato bruto hidro-etanólico e da fração acetato de etila de *Bidens pilosa*, na seqüência desta etapa da pesquisa. Os resultados obtidos demonstraram que a *overdose*, ou seja, a intoxicação causada pelo agente indutor de estresse oxidativo CCl<sub>4</sub>, gerou toxicidade hepática importante em camundongos, detectada através do aumento dos níveis de peroxidação lipídica, como foi demonstrado pelos níveis elevados de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS nas amostras de fígado dos animais (controle CCl<sub>4</sub>, 185 ± 11 nmol.g<sup>-1</sup>). A hepatotoxicidade determinada pelo CCl<sub>4</sub> depende da desalogenação oxidativa catalisada pelo citocromo P450 no retículo endoplasmático das células hepáticas (RECKNAGEL et al., 1992). A desalogenação leva à geração de um complexo instável denominado radical triclorometilperoxila (CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>), uma espécie altamente reativa (RECKNAGEL et al., 1992). Estes radicais livres atacam lipídios de membrana, causando sua peroxidação, e também podem ligar-se covalentemente a lipídios e a proteínas, iniciando assim vários processos que levam ao dano celular.

Neste estudo, a administração do CCl<sub>4</sub> resultou em uma depleção de GSH, diminuição do poder redutor/antioxidante férrico do plasma (FRAP), com elevação concomitante na atividade da CAT, nos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas, bem como fragmentação de DNA (P<0,05). Este estudo também demonstrou que f-AcOEt e Eb-EtOH podem exercer suas atividades protetoras contra as lesões induzidas pelo CCl<sub>4</sub>, por diminuírem o dano de peroxidação de lipídios, os níveis de radicais livres ou devido à atividade antioxidante do agente protetor por ele mesmo.

As administrações de f-AcOEt e Eb-EtOH de *Bidens pilosa* a camundongos resultaram em um aumento médio do FRAP, em comparação aos grupos controles



(aumento > 80%), com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Alguns estudos já relataram que compostos polifenólicos presentes nas plantas podem aumentar o FRAP *in vivo* (PULIDO et al., 2000). Por outro lado, embora f-AcOEt e Eb-EtOH não tenham sido capazes de restabelecer os níveis de GSH e nem mesmo diminuir a atividade da CAT, ambos foram capazes de proteger os constituintes biológicos dos hepatócitos contra o estresse oxidativo induzido pelo  $\text{CCl}_4$ , sendo que os níveis de proteínas carboniladas foram normalizados.

O radical triclorometilperoxila pode reagir com grupos sulfidrilas, presentes na GSH e grupamentos tióis das proteínas. A ligação covalente das biomoléculas com este radical é considerada o passo inicial numa cascata de reações, que eventualmente conduzem à peroxidação de lipídios de membrana (BRATTIN et al., 1985). f-AcOEt e Eb-EtOH de *Bidens pilosa* protegeram os lipídios contra a peroxidação (aproximadamente 28%) e também foi observado um efeito protetor muito forte sob a carbonilação das proteínas. Vários eventos fisiopatológicos, como algumas doenças de pulmão, artrite crônica e doenças relacionadas ao envelhecimento apresentam oxidações catalisadas por metais que foram identificadas como carbonilação protéica (ABRAHAM et al., 1994). De forma semelhante à rutina, a fração acetato de etila e o extrato bruto hidro-etanólico causaram proteção sobre a carbonilação de proteínas em nível superior a 80%, sendo que os animais pré-tratados apresentaram níveis de proteína carbonilada equivalentes aos do grupo controle normal e quase quatro vezes inferiores aos do grupo controle  $\text{CCl}_4$  (pré-tratado somente com salina).

Os radicais livres, principalmente as EROs, infligem dano em muitas estruturas celulares e componentes funcionais, incluindo o DNA, mesmo sob condições fisiológicas (DIZDAROGLU, 1991). O presente estudo demonstrou um índice de fragmentação no DNA elevado em camundongos expostos ao  $\text{CCl}_4$ . O índice de dano foi aumentado em aproximadamente 3 vezes, quando comparado ao índice médio do grupo controle normal. No entanto, o dano ao DNA reduziu em animais pré-tratados com f-AcOEt e Eb-EtOH, sugerindo que o sistema enzimático de reparo pode ter sido induzido, ou que houve aumento das defesas antioxidantes, e/ou redução da geração de EROs no núcleo celular. Embora especulativamente, poderia ser sugerido que este

efeito fosse devido às propriedades antioxidantes dos polifenóis naturais, o que seria confirmado pelo aumento do potencial antioxidante/redutor férrico do plasma (FRAP), e pela diminuição da lipoperoxidação por radicais •OH, como foi aqui observado *in vitro* e *in vivo*.

Considerando os possíveis efeitos benéficos de *Bidens pilosa* sobre os processos de inflamação, o presente estudo forneceu informações importantes. O modelo do edema de pata induzido pela carragenina é uma ferramenta valiosa para a triagem de compostos ou misturas de compostos com potencial atividade antiinflamatória. A inflamação, induzida pela carragenina na pata de camundongos, representa um modelo clássico de formação de edema e hiperalgesia. Este modelo tem sido utilizado extensivamente no desenvolvimento de fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (GUAY et al., 2004). Observou-se retração do edema quando os animais foram pré-tratados com f-AcOEt e Eb-EtOH. No entanto, este achado isolado não pode ser considerado suficiente para se extrapolar e fazer afirmações acerca da administração dos extratos aos humanos. Então, considera-se que ensaios mais aprofundados são justificáveis a partir desses achados. Aparentemente, deve existir uma explicação para a utilidade de *Bidens pilosa* como um agente antiinflamatório, conforme relatado pela medicina popular.

Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), do ponto de vista molecular os processos inflamatórios devem-se parcialmente à superprodução de EROs e ERNs. O ensaio de edema de pata induzido pela carragenina (150 mg.kg<sup>-1</sup>/50 µL) mostrou que ambos, o extrato bruto e a f-AcOEt, quando solubilizados em álcool/água (1:10; v/v), e pré-administrados por via oral, meia hora antes da administração intraplantar do agente flogístico, causaram significativa redução do edema da pata (avaliado aos 30, 60, 120 e 240 minutos após a indução), quando comparado com as alterações observadas nas pata dos animais pré-tratados somente com salina. O extrato bruto hidro-etanólico causou redução somente a partir dos 60 minutos (18%), a partir daí ele promoveu 24% de redução aos 120 minutos, e aos 240 minutos, observou-se 36% de redução. f-AcOEt apresentou resultados mais promissores, uma vez que a partir dos 120 minutos, seus dados não diferiram estatisticamente dos dados obtidos quando se fez o pré-tratamento com o padrão indometacina. Observou-se 31, 39, 36 e 55% de redução aos

30, 60, 120 e 240 minutos após a indução do edema, respectivamente, demonstrando importante atividade antiinflamatória.

A indometacina, fármaco antiinflamatório utilizado como padrão neste estudo, foi efetiva em reduzir o edema de forma bastante semelhante a f-AcOEt, causando 34, 30, 28 e 60% de redução no edema da pata, respectivamente, nos mesmos tempos de aferição. Entretanto, seria importante observar que a dose do fármaco foi cerca de 10 vezes menor que aquelas de f-AcOEt e Eb-EtOH. Mesmo que ambas as amostras de *Bidens pilosa* testadas tenham apresentado atividade supressora sobre o edema, é muito interessante notar que f-AcOEt, com o maior conteúdo de polifenóis e potencial antioxidante, também mostrou maior capacidade de supressão do edema. Uma vez que a mais alta atividade antiinflamatória foi observada exatamente na mesma fração com maior potencial antioxidante, é possível supor que pode existir uma associação positiva entre os efeitos antioxidantes dos extratos polifenólicos de *Bidens pilosa* e seu efeito antiinflamatório.

Como já mencionado anteriormente, várias são as fontes de EROs na inflamação, como a ativação da NADPH oxidase de leucócitos polimorfonucleares, do sistema xantina oxidase e do citocromo B<sub>245</sub> que catalisa a redução monovalente do O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>-</sup> (FORMAN; THOMAS, 1986 apud SIES, 1997; MERRY et al., 1989 apud SIES, 1997; SEGAL, 1991 apud SIES, 1997), além da cascata do ácido araquidônico que gera prostaglandinas e leucotrienos a partir da biosinalização das EROs (CADENAS; SIES, 1993). Também os principais mediadores do processo inflamatório IL-1 e o TNF- $\alpha$  são capazes de induzir a produção de EROs, perpetuando assim sua formação e ação (ADAMSON; BILLINGS, 1992; LO et al., 1995).

Os resultados dos ensaios realizados corroboram as informações da medicina popular sobre a utilidade farmacológica de *Bidens pilosa* por seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. Os vários constituintes polifenólicos que compõe a planta foram associados a fortes efeitos antioxidantes e também à supressão de edemas na pata de camundongos. Considera-se que ensaios adicionais, ainda em nível pré-clínico, e também ensaios em nível clínico seriam necessários para sugerir prospecção. Pode-se sugerir que, em princípio, modelos de pleurisia induzida *in vivo* poderiam ser utilizados

para se gerar informações complementares sobre a atividade antiinflamatória do picão-preto.

#### 4.2 Estudo da atividade citotóxica *in vitro* e antitumoral *in vivo* de *Bidens pilosa*

O uso dos produtos naturais como agentes antitumorais tem longa história que começou com a medicina popular e através dos tempos, tem sido incorporado à medicina tradicional e alopática (COSTA-LOTUFO et al.,2002). Vários fármacos atualmente utilizados na quimioterapia foram primeiramente isolados de alguma espécie de planta ou derivados de um protótipo natural. Eles incluem os alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina, isolados da *Catharanthus roseus*; o etoposídeo e o teniposídeo, os derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina, isolada de espécies do gênero *Podophyllum*; os taxanos, derivados naturais e isolados de espécies do gênero *Taxus* e os derivados semi-sintéticos da camptotecina, irinotecano, topotecano, isolados da *Camptotheca acuminata*, entre muitos outros (CRAGG et al., 1993; WANG, 1998). De acordo com Cragg e Newmann (2000), pode-se estimar que mais de 50% dos fármacos que se encontram sob pesquisa em fase clínica foram isolados de fontes naturais ou a elas estão relacionados.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou providenciar informações sobre o potencial citotóxico *in vitro* e antitumoral *in vivo* do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa*, utilizada na medicina popular para o tratamento de tumores em algumas regiões da América (BRANDÃO et al.,1997; FRANCO; FONTANA, 1997; VALDÉS; REGO, 2001).

Normalmente, a utilidade de um determinado composto ou mistura de compostos dos quais se suspeita possuir atividade antitumoral é julgada, primeiramente, através de ensaios de citotoxicidade *in vitro*. O interesse concentra-se em avaliar a capacidade destes compostos para inibir o crescimento e/ou induzir a morte das células tumorais *in vitro*. No caso de *Bidens pilosa*, existem alguns relatos na literatura científica sobre a presença de compostos acetilenos que foram nela

identificados e que demonstraram atividade citotóxica em ensaios laboratoriais. Geissberger e Sequin (1991) identificaram a fenil-heptatrina e outros ácidos graxos em *Bidens pilosa* que demonstraram atividade antimicrobiana. Alvarez et al. (1996) isolaram  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6(E)-tetradecen-8,10,12-triina, um novo poliacetileno que demonstrou atividade antiproliferativa contra linhagens celulares humanas normais e transformadas em cultura. Em 1997, Brandão e colaboradores buscavam comprovar a atividade antimalárica de *Bidens pilosa*. Eles observaram que os extratos podiam inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum in vitro* e ainda diminuir a parasitemia de camundongos infectados (*Plasmodium berghei*). Eles também identificaram outro composto acetileno lipofílico na planta, 1-fenilhepta-1,3-diina-5-em-7-ol-acetato, entre vários outros compostos relacionados. Brandão et al. (1997) analisaram várias espécies do gênero *Bidens*, identificando compostos poliacetilenos nos extratos da maioria delas. Um ponto bastante interessante do estudo de Brandão e colaboradores, é que extratos obtidos da espécie *Bidens parviflora*, nos quais não foram identificados acetilenos, foram considerados inativos nos ensaios antiprotozoário. Então, uma relação entre o conteúdo de compostos poliacetilenos e o potencial citotóxico da planta foi também sugerida.

Evidências acerca da relação entre a atividade citotóxica e a presença de compostos poliacetilenos já existiam desde que Wat et al.(1980), fizeram a observação de que extratos de *Bidens* e de outras ervas da mesma família perdiam atividade citotóxica frente a bactérias, fungos e larvas de insetos, em experimentos laboratoriais no escuro. Sabe-se que os poliacetilenos são hidrocarbonetos que absorvem fortemente luz UV e que a sua atividade citotóxica é aumentada sob exposição à luz (fotoativação).

Outra importante observação sobre a *Bidens pilosa* ocorreu no Brasil e acrescentou mais informações sobre a constituição fitoquímica desta planta. Grombone-Guarantini et al. (2004) realizaram uma pesquisa buscando resolver o problema taxonômico observado com o gênero *Bidens*, o qual pode constituir um “complexo” de diferentes espécies. Extratos à base de diclorometano das folhas de diferentes populações da planta, correspondendo a três espécies referidas como pertencentes ao gênero *Bidens*, foram submetidos à cromatografia gasosa com

detecção por espectrometria de massa. Vinte e quatro substâncias foram detectadas, das quais quatro assemelhavam-se a poliacetilenos, e outros a sesquiterpenos. O poliacetileno fenilhepta-1,3,5-triina foi identificado somente em *Bidens alba*. Cinco sesquiterpenos foram identificados como *E*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno-D, biciclogermacreno e  $\alpha$ -muuorleno, sendo encontrados em todas as três espécies de *Bidens*. A atividade antiproliferativa de alguns sesquiterpenos encontrados em algumas espécies de plantas da mesma família de *Bidens pilosa* já foi relatada em outros estudos (CHO et al., 2003; SÁNCHEZ-VIESCA; ROMO, 1963). Cabe destacar que o estudo feito por Grombone-Guarantini et al. (2004) utilizou amostras da planta coletadas no sudeste do Brasil, exatamente na região de onde se originaram as amostras de planta utilizadas nesta pesquisa.

Neste estudo, a citotoxicidade dos extratos foi avaliada *in vitro* com o uso de células da linhagem do tumor ascítico de Ehrlich, realizando os testes do sal de tetrazólio (MTT) e do vermelho neutro (NRU). O ensaio do MTT avalia a função celular em nível mitocondrial, pois após a sua absorção, o MTT é reduzido no interior das mitocôndrias das células viáveis a um produto chamado formazan, numa reação colorimétrica útil para se avaliar a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Outra avaliação funcional ocorre no teste de captação do vermelho neutro (NRU - *Neutral Red Uptake*). O ensaio do NRU avalia a viabilidade celular em nível lisossomal. Somente as células viáveis são capazes de reter o corante, pois possuem lisossomos funcionais. O vermelho neutro acumula-se nos lisossomos das células viáveis por que se liga a sítios aniônicos na matriz lisossomal por interações eletrostáticas hidrofóbicas (NAM et al., 2004). Os resultados dos ensaios realizados revelaram que as frações clorofórmica (f-CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (f-AcOEt) apresentaram atividade citotóxica *in vitro*. Segundo Suffines e Pezzuto (1990), somente os extratos com valor de CI<sub>50</sub> < 200 µg/mL podem ser considerados ativos. Essa preconização foi considerada e nesse sentido, a fração f-CHCl<sub>3</sub> foi revelada como a mais ativa em ambos os ensaios, exibindo CI<sub>50</sub>'s inferiores (83 µg/mL no ensaio do NRU e 97 µg/mL no ensaio do MTT).

As inibições verificadas *in vitro*, das atividades mitocondriais e lisossomais, podem estar relacionadas à presença de alguns compostos citotóxicos nos extratos e frações de *Bidens pilosa*. Interessantemente, observou-se que a fração f-AcOEt

revelou-se 2 a 3 vezes menos ativa que f-CHCl<sub>3</sub>. Estudos prévios realizados por Sundararajan et al. (2006), também demonstraram a ocorrência de atividade citotóxica de extratos de *Bidens pilosa* à base de CHCl<sub>3</sub> e AcOEt contra as linhagens tumorais HeLa e KB. Foi revelado um perfil de resposta semelhante ao observado por este trabalho.

Para evidenciar se a citotoxicidade apresentada pelos extratos era inespecífica ou não, foram realizados os ensaios de toxicidade aguda com *Artemia salina* e atividade hemolítica. Apesar da significativa citotoxicidade da fração f-CHCl<sub>3</sub>, revelada através dos ensaios do MTT e NRU, esta fração não exibiu valores de CI<sub>50</sub> que indicassem importante atividade sobre os microcrustáceos e sobre os eritrócitos de camundongo (CI<sub>50</sub> >1000 µg/mL em ambos os ensaios). Portanto, considerou-se que a atividade citotóxica observada não fora relacionada a propriedades líticas e nem de instabilidade da membrana celular induzida pelos extratos sob análise, ou seja, não se trata de uma toxicidade inespecífica. Então, é provável que esta atividade esteja relacionada a mecanismos de toxicidade específica, como dano à integridade mitocondrial ou lisossomal, uma vez que os resultados obtidos evidenciaram um claro comprometimento destas organelas. Também ações sobre o DNA e/ou síntese de proteínas, ou mesmo outro mecanismo desconhecido, poderiam ser sugeridos. Entretanto, estudos mais detalhados acerca dos prováveis mecanismos de citotoxicidade são necessários para uma caracterização aprimorada dos eventos bioquímicos relacionados à atividade citotóxica de *Bidens pilosa*.

A etapa *in vitro* dos estudos de citotoxicidade indicou que duas frações do extrato total de *Bidens pilosa* (f-CHCl<sub>3</sub> e f-AcOEt) exibiram alguma atividade citotóxica. Sendo *Bidens pilosa* uma planta popularmente utilizada para tratar tumores, neste sentido, dando continuidade aos ensaios de avaliação, os efeitos do extrato bruto hidroetanólico e frações foram também avaliados *in vivo*. Utilizou-se o carcinoma ascítico de Ehrlich, inoculado intraperitonealmente em camundongos isogênicos Balb-c.

Nos camundongos inoculados, o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) causou um rápido desenvolvimento de ascite tumoral. Esta ascite causou no animal portador um aumento exagerado de seu peso e de sua circunferência abdominal. O líquido ascítico é a fonte nutricional direta para as células do tumor e a observação de um aumento

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

O tratamento feito com f-CHCl<sub>3</sub> diminuiu o volume de líquido ascítico (cerca de 50%), a contagem de células tumorais viáveis (pouco mais de 45%), e aumentou em cerca de 5 vezes a percentagem de células mortas de acordo com o indicado pelo método do azul de tripan, embora a alteração no volume de células compactadas não tenha sido significativa. Estes animais apresentaram ganho de peso e circunferência abdominal inferiores, quando comparados ao grupo controle negativo. Em média, os animais tratados com a f-CHCl<sub>3</sub> apresentaram ganho de peso cerca de 25% e aumento na circunferência abdominal cerca de 35%, inferiores aos dados obtidos com o grupo controle negativo.

Um dos critérios de confiança mais aceitos pela comunidade científica para julgar o valor de qualquer agente antitumoral é o aumento no tempo de sobrevivência dos animais (CLARKSON; BURCHENAL, 1965). A administração do extrato e frações da planta aumentou a longevidade dos animais, como foi demonstrado pelo percentual de aumento na longevidade (PAL). A fração f-CHCl<sub>3</sub> causou a maior elevação no PAL (cerca de 50%), seguida pelo extrato bruto hidro-etanólico e f-AcOEt (PAL ~ 25%). A fração f-MeOH não produziu aumento no tempo médio de sobrevivência dos animais tratados. Portanto, é provável que o extrato e frações, por diminuírem o volume de líquido ascítico nutricional e combaterem o tumor, tenham aumentado o tempo médio de sobrevivência dos animais portadores tratados.

Já a doxorubicina, tomada por este estudo como o fármaco referência para a atividade antitumoral, foi capaz de causar total inibição do desenvolvimento do tumor. A doxorubicina, ou hidroxidaunorubicina, é um antibiótico do grupo das antraciclinas que é produzida pelo fungo *Streptomyces peucetius*. Ela danifica o DNA por intercalação da porção antraciclina, quelatação de íons metálicos, ou pela geração de radicais livres. Também foi demonstrado que a doxorubicina pode inibir a topoisomerase II e, ainda, possui citotoxicidade fase - não específica do ciclo celular (JAIN, 2000).

O tratamento com a doxorubicina causou uma forte redução na atividade da LDH plasmática, quando comparado ao controle negativo (aproximadamente 50%). As



isoformas de LDH estão presentes em praticamente todas as células humanas e de camundongos. Elas catalisam a interconversão pH-dependente do lactato ao piruvato (ARGUELLO et al., 1996) e, segundo Wolf; Williams, (1973) e Campo e colaboradores (1966), as células carcinogênicas produzem e retêm o LDH para manter o crescimento do tumor (WOLF; WILLIAMS, 1973). Acredita-se que esta elevação possa ser causada por um “vazamento” enzimático acontecido nas células carcinogênicas mortas, conseqüência do seu acelerado *turn over* (renovação) (EPSTEIN et al., 1988). Em 1977, Pesce e colaboradores observaram que isoenzimas de LDH humanas podiam ser identificadas contra um *back ground* (fundo) de isoenzimas de LDH de camundongos. Demonstrou-se que células de carcinoma de laringe e bexiga, implantadas subcutaneamente em camundongos nus podiam liberar enzimas na circulação sangüínea dos hospedeiros, e que estas proteínas podiam ser utilizadas como marcadores da resposta à quimioterapia. Ainda considerando a origem da LDH aumentada em portadores de tumores malignos, também já foi demonstrado que a origem preferencial da elevação de LDH em humanos e animais com câncer é o tumor por si mesmo; esta fonte parece ser mais importante que outras, tais como o dano a tecidos normais ou outros órgãos com função inadequada (JACOBSON et al., 1963).

Os dados obtidos na avaliação da atividade da LDH em camundongos inoculados com TAE confirmaram a capacidade deste tumor para induzir forte aumento na atividade sérica da enzima. Os níveis séricos foram aproximadamente 4 vezes superiores, quando comparados aos dados obtidos com o grupo normal. É interessante observar que a retração do tumor causada pela doxorrubicina, foi associada com a redução concomitante na atividade da LDH sérica. Nesta avaliação experimental, a doxorrubicina causou a eliminação do carcinoma de Ehrlich e sua administração foi capaz de causar uma diminuição de cerca de 50% na atividade da LDH, quando comparado ao grupo controle negativo (tratado com placebo) Isto sugere que estes níveis foram conduzidos à normalidade. Quando a atividade da LDH foi medida no soro de animais tratados com o extrato bruto hidro-etanólico de *Bidens pilosa*, nenhuma diferença neste parâmetro foi observada, ao comparar estes dados com os do controle negativo. Os resultados mais promissores foram observados quando os animais foram

tratados com a fração clorofórmica (f-CHCl<sub>3</sub>). Houve uma redução de cerca de 25% na atividade enzimática em comparação aos dados do grupo controle negativo (p<0,05).

Vários pesquisadores já tentaram correlacionar os níveis de GSH com o estabelecimento e o desenvolvimento de tumores. Já foi observado, por exemplo, que muitas células tumorais são dependentes de GSH e suspeita-se que elas o utilizem para se proteger contra o dano durante o estresse oxidativo induzido pelos fármacos quimioterápicos. Geralmente, os níveis elevados de GSH nos tumores estão relacionados a efeitos anti-quimioterápicos e de resistência multifármacos (HAMILTON et al., 1985; SHIMURA et al., 2000). Também existem alguns estudos, que por técnicas de depleção de GSH em células de tumor, demonstraram uma maior sensibilização das mesmas a agentes citotóxicos (MITCHELL et al., 1989; OZOLS et al. 1987). Portanto, acredita-se que seja possível avaliar a eficácia da quimioterapia se o conteúdo de GSH tumoral estiver disponível para ser analisado por qualquer método (SHIMURA et al., 2000).

Os dados obtidos com a análise do conteúdo ascítico de GSH, em camundongos portadores de TAE, revelaram que a administração do extrato bruto hidro-etanólico e a administração da fração metanólica não foram capazes de reduzir os níveis desta defesa antioxidante no tumor. Não se observou diminuição no conteúdo de GSH no tecido tumoral dos animais, quando comparado aos níveis observados nos camundongos do grupo controle negativo. Por outro lado, a administração de f-CHCl<sub>3</sub>, fração possivelmente rica em compostos poliacetilenos e sesquiterpenos, foi novamente considerada ativa, por ter sido relacionada a uma significativa diminuição observada nos níveis de GSH no tecido tumoral de camundongos tratados, quando comparado aos níveis do controle negativo (aproximadamente 60%). Então, poder-se-ia sugerir que a elevação na contagem de células tumorais inviáveis, observada nos camundongos tratados com f-CHCl<sub>3</sub>, poderia estar relacionada, ao menos em parte, a uma capacidade de f-CHCl<sub>3</sub> para consumir GSH no tecido tumoral.

Os resultados mostraram que a administração de f-CHCl<sub>3</sub> foi associada ao aumento na contagem de células tumorais inviáveis e à diminuição na contagem de células tumorais viáveis, em camundongos portadores de TAE. Os animais tratados com f-CHCl<sub>3</sub> ganharam menos peso, apresentaram aumento inferior da circunferência

abdominal, menor volume de líquido ascítico e de células compactadas. A administração foi ainda relacionada a aumento no tempo médio de sobrevivência dos animais e à diminuição da atividade da LDH sérica e do conteúdo de GSH no tumor. Logo, esta fração apresentou atividade antitumoral *in vivo*. Este estudo forneceu informações adicionais sobre as atividades biológicas de *Bidens pilosa*, que aparentemente estão alinhadas às suas propriedades relatadas pela medicina popular. Estudos mais aprofundados, com metabólitos secundários de *Bidens pilosa* isolados e/ou mais purificados, foram considerados necessários e estão em curso no laboratório.

Finalizando, este estudo demonstrou que a fração acetato de etila deve conter em sua constituição fitoquímica substâncias com potencial antioxidante, que, provavelmente, tratam-se de compostos fenólicos do tipo flavonóides. Esta fração apresentou também atividade antiinflamatória significativa que, muito possivelmente, expressou - se devido a estes processos ocorrerem, pelo menos em parte, pela geração de radicais livres (principalmente EROs) no sítio inflamatório. Por outro lado, detectou-se importante potencial citotóxico e antitumoral para a fração clorofórmica. Portanto, *Bidens pilosa* pode ser considerada uma espécie valiosa para a obtenção de substâncias bioativas. Embora considerando que outros ensaios adicionais mais aprofundados ainda seriam necessários para se gerar informações fundamentais à prospecção, os dados obtidos permitem finalmente concluir que o picão-preto apresentou atividades biológicas que corroboram as informações da medicina popular sobre a utilidade antiinflamatória e antitumoral da planta.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com o presente trabalho, é possível concluir que:

- A planta é rica em compostos fenólicos, possivelmente flavonóides que se concentram mais na fração acetato de etila;
- A planta possui efeito antioxidante que foi caracterizado por ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo f-AcOEt a fração mais ativa. Os compostos polifenólicos possivelmente estão relacionados à atividade antioxidante;
- A fração f-AcOEt, seguida pelo extrato Eb-EtOH, foi considerada a mais ativa no ensaio de atividade antiinflamatória;
- A fração clorofórmica do extrato bruto hidro-etanólico de *Bidens pilosa* apresentou toxicidade para células do tumor ascítico de Ehrlich;
- Os resultados dos ensaios de citotoxicidade inespecífica sugerem que a toxidade da fração clorofórmica não esteja relacionada a propriedades líticas ou de indução de instabilidade da membrana celular;
- Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral *in vivo* demonstraram que f-CHCl<sub>3</sub> apresentou significativa atividade, uma vez que foi capaz de reduzir o ganho de peso e a circunferência abdominal, o volume de líquido ascítico, o número de células viáveis, o conteúdo de GSH ascítico e a atividade da LDH, além de aumentar a sobrevivência média dos animais tratados portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

## 6. PERSPECTIVAS

Após o desenvolvimento deste trabalho, ficam algumas propostas para estudos futuros mais aprofundados:

- Os extratos e frações promissores poderiam ser mais bem avaliados fitoquimicamente. Suas constituições fitoquímicas poderiam ser elucidadas melhoradamente e assim poder-se-ia fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e frações e suas atividades biológicas;
- Complementar o estudo da atividade antioxidante *in vitro* com a determinação do potencial de captação sobre radicais ânions superóxido e óxido nítrico;
- Complementar a avaliação do efeito antioxidante de *Bidens pilosa* em modelos de estresse oxidativo, através da determinação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glicose 6-fosfato desidrogenase;
- Com relação à potencial atividade antiinflamatória, poder-se-ia empregar alguns ensaios mais específicos, procurando contribuir ainda mais para a validação do uso popular do Picão-preto. O ensaio de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos poderia ser considerado como uma alternativa para se aprofundar o estudo;
- A citotoxicidade *in vitro* poderia ser mais bem avaliada em cultura sobre outras linhagens de células normais e/ou transformadas;
- Poder-se-ia isolar e caracterizar os compostos poliacetilenos na fração clorofórmica de *Bidens pilosa* e avaliar os mesmos com respeito à atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*;
- Finalmente, poder-se-ia fazer uma avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* da fração clorofórmica, juntamente com alguns de seus compostos isolados, associada à exposição à radiação UV. Alguns estudos apontam para a fotoativação de poliacetilenos como forma de otimização de suas atividades.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, Z.; REZNICK; PACKER, L. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods. Enzymol.**, v.233, p.357-363, 1994.

ACKER, S.A.B.E.; BERG, D.J.V.D.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.V.; VIJGH, W.J.F.V.D.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v.20, n.3, p.331-342, 1996.

ADAMSON, G.M.; BILLINGS, R.E. Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. **Arch.Biochem.Biophys.**, v.294, n.1, p.233-9, 1992.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods. Enzymol.** v.105, p.121-126,1984.

AJITH,T.A.; JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **J. Ethnopharmacol.**, v.84, p.157-162, 2003.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo, Brasil: Hemus Editora, 1993.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ALVAREZ, L.; MARQUINA, S.; VILLARREAL, M.L.; ALONSO, D.; ARANDA, E.; DELGADO, G. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. **Planta Med.** v.62, n.4, p. 355-357, 1996.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods. Enzymol.**, v.113, p. 548-55, 1985.

ARGUELLO, F.;STERRY, J.A.;ZHAO, Y.Z.;ALEXANDER, M.R.A.;SHOEMAKER, R.H. Two serologic markers to monitor the engraftment, growth, and treatment response of human leukemias in severe combined immunodeficient mice. **Blood**, v.87, p.4325-4332,1996.

BECK, W.T. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. **Cancer Treat. Rev.**, v.17, p.11-20, 1990.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods. Enzymol.**, v.299, p.15-27, 1999.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.

BOFFETTA, P.; FREDRICK, N. Contribution of environmental factors to cancer risk. **British Med. Bulletin**, v. 68, p. 71-94, 2003.

BOGUSKI, M.S.; MCCORNIMICK, F. Protein regulating Ras and its relatives. **Nature**, v.366, p.643-654, 1993.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em quimioterapia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2001, p 3 – 20.

BOREFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). **J.Tissue Cult.Methods**, v.9, p.7-9, 1984.

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. **J.Ethnopharmacol.** n.57, p.131-138, 1997.

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

BRATTIN, W.J.; GLENDE, J. E.A.; RECKNAGEL, R.O. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v.1, p.27-38, 1985.

BROCK, N. Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award Lecture. **Cancer Res.**, v. 49, p. 1-7, 1989.

BROWN, R. The Bcl-2 family of proteins. **British Med. Bulletin**, v.53, p.466-77, 1996.

BURDEN, D.A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochem.Biophys. Acta**, p. 139-154, 1998.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat.Prod.**, v.67, p.2141-2153, 2004.

CADENAS, E.; SIES, H. Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity. **Adv. Enz. Regul.**, v. 23, p.217-237, 1985.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc.Cult.**, v.55, n.3, 2003.

CAMPBELL, G. Allelopathic properties of a-terthienyl and phenylheptatrine in the essential oil of *Bidens pilosa*. **J Chem Ecol.** v.8, n.6, p.961-72, 1992.

CANCERBACKUP - Europe's leading cancer information charity. Disponível em: <<http://www.cancerbackup.org.uk/Treatments/Chemotherapy/Individualdrugs/Doxorubicin>>. Acesso em 13 novembro 2006.

CARBONARI, A.C; FERREIRA, E.A; REBELLO J.M.; FELIPE, K. B.; ROSSI, M.H.; FELÍCIO, J.D.; WILHELM, D.F; YUNES, R.A; PEDROSA, R.C. Free-radical scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. **Red. Rep.**, v.11, p.124-130, 2006.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipidic peroxidation induced by CBrCl<sub>3</sub> in liver, lung, heart, and spleen. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p.854-858, 1996.

CHIANG, Y.M.; CHUANG, D.Y.; WANG, S.Y.; KUO, Y.H.; TSAI, P. W.; SHYUR, L.F. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v.95, p.409-419, 2004.

CHIN H.W.; LIN, C.C.; TANG, K.S. The hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine ham-hong-chho in rats. **Am J Chin Med.** v.24, n.3-4, p.231-240, 1996.

CHING YU, P; CALDERARO, D; IKEOKA, D.T; DEMARCHI, L.M.M.F.; CARAMELLI, B. Toxicidade miocárdica por doxorubicina. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 51, n. 3, p.67-74, 2005.

CHO, S.-H.; NA, Y.-E.; AHN, Y.-J. Growth-inhibiting effects of seco-tanaparthalides identified in *Artemisia princeps* var. *orientalis* whole plant on human intestinal bacteria. **J.A.Microbiol.** Korea, v. 95, n. 1, p. 7, 2003.

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

CLEARY, M. L.; SMITH, S.D.; SKLAR, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for Bcl-2 and a hybrid Bcl-2 immunoglobulin transcript resulting from the T (14; 18) translocation. **Cell**, v.47, p.19-28, 1986.

COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia** 2.ed. Belém: Editora Cejup, 1994.

CONSTANTIN, M., BROMONT, C., FICKAT, R., MASSINGHAM, R. Studies on the activity of bepridil as a scavenger of free radicals. **Biochem. Pharmacol.**, v.40, p.1615-1622, 1990.



CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil – e das exóticas cultivadas. Brasil: Instituto Brasileira de desenvolvimento florestal (Ministério da Agricultura): 1984, v.II, p.459-460.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A. ; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N. V. ; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v.40, p.1231-1234, 2002.

COTGREAVE, I. A., MOLDEUS, P., ORRENIUS, S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.28, 189-212, 1988.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. **II Farmaco**. v.58, n.3, p. 213-220, 2003.

CRAGG, G.M.; SCHEPARTZ, S.A.; SUFFNESS,M.; GREVER,M.R. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **J.Nat.Prod.**, v.56, p.1657-1668,1993.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Invest.**, v.17, p.153-163, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.9, p.1-15, 2000.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine a combinades inhibitor of nitric oxide synthase and peroxyxynitrite scavenger in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Radic. Biol.Med.**, v.24, p.450-59,1998.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **J.Immunol.**, v.163, p.5094-5104, 1999.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Am.J.Respir.Crit.Care Med.**, v.162, p.1859-1866, 2000.

DEVIPRIYA, S.; GANAPATHY,V.; SRINIVASULU,C.; SHYAMALADEVI,C.S. Supression of tumor growth and invasion in 9,10 dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by the plant bioflavonoid quercetin. **Chemico-Biol.Interact.**, v.162, p.106-113, 2006.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSAO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v.65, p.337-353, 1999.

DI GIULIO, W.H.; BENSON, B.M.; SANDERS, P.A.; VAN VELD. a. biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. RAND, G. M. (ed.) 2ed. USA: Taylor & Francis, 1995. p. 523-560.

DIETEL, M. What's new in cytostatic drug resistance and pathology. **Pathol.Res.Pract.**, v.187, p.892-905, 1991.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic. Biol. Med.**, v.10, p.225-242, 1991.

DONEHOWER, L.A.; HARVEY, M.; SLAGLE, B.L. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, v.356, p.215-221, 1992.

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.

DUKE, J.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1994.

DULIC, V.; KAUFMANN, W.K.; WILSON, S.J.; TISTY, T.D.; LEES, E.; HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J.; REED, S.I. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. **Cell**, v.76, p.1013-1023, 1994.

DUNAGIN, W.G. Clinical toxicity of chemotherapeutic agents: dermatologic toxicity. **Semin. Oncol.**, v.9, p. 14-22, 1982.

EL-DEIRY; W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V.E.; LEVY, D.B.; PARSON, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v.75, p.817-825, 1993.

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory working hypothesis: the case of "Nerve Tonics" from the Brazilian Amazon. **Intern. Found. Sci., Prov. Rep. series**. Grev Turegatan, Stockholm, Sweden, v.19, p. S-11438, 1987.

ENARI, M.; HUG, H.; NAGATA, S. Involvement of an ICE-like protease in FAS-mediated apoptosis. **Nature**, v.375, p.78-81, 1995.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **J.Cancer Res.Clin.Oncol.**, v.126, p.682-692, 2000.

EPSTEIN, A. L.; CHEN, F. M.; TAYLOR, C. R. A novel method for the detection of necrotic lesions in human cancers. **Cancer Res.**, v.48, p.5842, 1988.

ERLICHMAN, C. MORRE, M. Carcinogenesis: a late complication of cancer chemotherapy. In: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemother. Biother., Principles and Practice**. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven:1996, p. 45-58.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v.366, p.704-707, 1993.

FACINO, R. M.; CARINI, G.; ALDINI, G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites. **Drugs**, v.46, p.15-21, 1993.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES, S. L. M.; QUEIROZ, S. R. R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências (Brasil): 1998, p.28-51.

FIELD, M.; BLOCK, J. B.; LEVIN, R.; RALL, D. P. Significance of blood lactate elevations among patients with acute leukemia and other neoplastic proliferative disorders. **Am.J. Med.**, v.40, p.528,1966.

FOUNTOULAKIS, M.; VERA, M-C.; CRAMERI, F.; BOESS, F.; GASSER, R.; ALBERTINI, S.; SUTER, L. Modulation of gene and protein expression by carbon tetrachloride in the rat liver. **Toxicol. App. Pharmacol.**, v.183, p.71-80, 2002.

FRANCO, I.J.;FONTANA,V.L. **Ervas e plantas: a medicina dos simples**.9.ed. Erechim, RS, Brasil: Editora Livraria Vida, 2004.

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

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 Trop.**, v.48, n.4, p. 251-61, 1991.

GINSBERG, S.; COMIS, R.L. The pulmonary toxicity of antineoplastic agents. **Semn.Oncol.**, v.9, p.34-51, 1982.

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

GORDON; M.I.R. **The mechanism of antioxidant action *in vitro***. London: Elsevier Applied Science,1990, p.1-18.

GOULART, M.; BATORÉU, M.C.; RODRIGUES, A.S.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. **Mutagen.**, v.20, n.5, p.311-315, 2005.

GROMBONE-GUARANTINI, M.T.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J.; TRIGO, J.R. Sesquiterpen and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil. **Biochem.Syst.Ecol.**, v.33, p. 479-486, 2005.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **J. Biol.Chem.**, v.279, p. 24866–24872, 2004.

GUO, Q.; ZHAO, B.; LI, M.; SHEN, S.; XIN, W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1304, p.210–222, 1996.

HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. **Mediators of inflammation**, v.4, p.5-15, 1995.

HAKANSSON, S. **Weeds and weed management on arable land: an ecological approach**. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing, 2003.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Formation of thiobarbituric- acid- reactive substance from deoxyribose in the presence of iron ions- the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**, v.128, p.347-352, 1981.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., ARUOMA O. I. The deoxyribose method: a simple “test tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analyt. Biochem.**, v.165, p.215-219, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 3ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HAMILTON, T.C.; WINKER, M.A.; LOUIE, K.G.; BATIST, G.; BEHRENS, B.C.; TSURUO, T.; GROTZINGER, K. R.; MCKOY, N.M.; YOUNG, R.C.; OZOLS, R.F. Augmentation of adriamycin, melphalan, and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. **Biochem. Pharmacol.**, v.34, p.2583-2586, 1985.

HAMMOND, J.R.; JOHNSTONE, R.M.; GROS, P. Enhanced efflux of (3H)vimblastine from Chinese hamster ovary cells transfected with a full-length complementary DNA clone for the *mdr 1* gene. **Cancer Res.**, n.49, p. 3867-3871, 1989.

HANNUN, Y.A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. **Blood**, v.89, p.1845-1853, 1977.

HARBORNE, J. B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: Cody, B.; Middleton, E.; Harborne, J. B. **Plant flavonoids Biology and Medicine**. New York: AlanLiss, 1986, p.15-24.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutat. Res.**, v. 275, p. 257-266, 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v.59, p.205-215, 1966.

HAUNSTETTER, A.; IZUMO, S. Apoptosis – basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circulation Res.**, v.82, p.1111-29, 1998.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw edema: a new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.20, p.243 - 249, 1987.

HENSLEY, K., ROBINSON, K.A., GABBITA, S.P., SALSMAN, S., FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radic. Biol. Med.** v.28, 1456-1462, 2000.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G. AND STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radic. Biol. Med.**, v.19, p.271-280, 1995.

HOCKENBERY, D.; OLTAVI, Z.; YIN, X.; MILLIMAN, C.; KERSMEYER, B. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v.75, p.241-251, 1993.

INCA-Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> acesso em 09 janeiro 2005.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, v.96, p.145-50, 2005.

JACOBSON, K.B.; NISHIO, K. Studies on plasma lactic dehydrogenase in mice with myeloid leukemia II on the site of production of the enzyme. **Cancer Res.**, v.24, p.344, 1963.

JAIN, D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. **J.Nucl.Cardiol.**, v.1, p.53-62, 2000.

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

KALTSCHMIDT, B.; UHEREK, M.; VOLK, B.; BAEUERLE, P.A.; KALTSCHMIDT, C. Transcription factor NF- $\kappa$ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci.**, v.94, p.2642-2647, 1997.

KAM, P.C.A.; FERCH, N.I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. **Cancer**, v.73, p.2013-2026, 1994.

KAMB, A. Cell-cycle regulators and cancer. **Anaesthesia**, v.55, p.1081-1093, 2000.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceeding Nutr. Soc.**, v.57, p.9-13, 1998.

KANTROWITZ, N.E.; BRISTOW, M.R. Cardiotoxicity of antitumor agents. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v.27; p.195-200, 1984.

KERR, J.; WITERFORD, C.; HARMON, B. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, p.2013-2026, 1994.

KORNBERG, A. Lactic dehydrogenase of muscle. **Methods. Enzymol.**, v.2, p.441-443, 1995.

KOSTYUK, V.A.; POTAPOVICH, A.I. Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury. **Arch Biochem Biophys.** v.355, p.43-48, 1998.

KOSTYUK, V.A.; POTAPOVICH, A.I.; SPERANSKY, S.D.; MASLOVA, G.T. Protective effect of natural flavonoids on rat peritoneal macrophages injury caused by asbestos fiber. **Free Radic Biol Med.** v.21, p.487-493, 1996.

LANGLEY, F.A.; BAAK, J.P.A.; OORT, J. Diagnosis: error sources. In: **Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis**, New York: Springer, 1991, p.19-27.

LENAZ, L.; PAGE, J.A. Cardiotoxicity of Andriamcin and related anthracyclines. **Cancer Treat. Rev.**, v.3, p.111-120, 1976.

LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMET, I., LENZ, A.G., STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods. Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.

LIN, C-C; NG, L-T.; YANG, J.J.; HSUM, Y-F. Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of peh-chi-cao in male rats. **Am. J. Chin. Med.** v.30, p. 225-234, 2002.

LING, Y.R. **A New Compendium of Materia Medica**. Beijing: Science Press, 1995.

LIU, Y.; HAN, T.; GIULIANO, A.E.; CABOT, M.C. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. **Faseb J.**, v.15, p.719-730, 2001.

LO, Y.Y.C.; CRUZ, T.F. Involvement of Reactive Oxygen Species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. **JBC**, v.270, n.20, p. 11727-11730, 1995.

MAXWELL, S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v.49, n.3, p.345-361, 1995.

MAZUMDER, U.K., GUPTA, M., MAITI, S., MUKHERJEE, M. Antitumor activity of *Hygrophilaspinoso* on Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180 induced mice. **Indian J. Expt. Biol.**, v.35, p.473-477, 1997.

MCDONALD, E.R., EL-DEIRY, W.S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). **Int. J. Oncol.**, v.16, n.5, p.871-886, 2000.

MCINNES, S.; SCHILSKY, R.L. Infertility following cancer chemotherapy. In: CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Principles and Practice**. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven, 1996, p.31-44.

MCKAY, C.R.; IMHOF, B.A. Cell adhesion in immune system. **Immunol.Today**, v.14, p.99-112, 1993.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MENNA, P.; MINOTTI, G.; SALVATORELLI, E. *In vitro* modeling of the structure-activity determinants of anthracycline cardiotoxicity. **Cell Biol Toxicol.** v.9, 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITAO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapeutic Res.**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTMAM, J.E.; JACOBS, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIM, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v.45, p.31-34, 1982.

MIESEL, R.; SANOCKA, M.; KURTPISZ, D.; KROGER, H. **Inflammation**, v.19, p.347-361, 1995.

MILES, A.M.; GRISHAM, M.B. **Methods enzymol.**, v.234, p.555-572, 1994.

MITCHELL, J.B.; COOK, J.A.; DEGRAFF, W.; GLATSTEIN, E.; RUSSO, A. Glutathione modulation in cancer treatment: Will it work? **Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.**, v.16, p.1289-1295, 1989.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. **Cell**, v.80, p.293-299, 1995.

MOFFATT, 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 ascites tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**, v.21, n.12, p.2151-2157, 2000.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim.Nova**, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chem.**, v.24, n.1, p.105-111, 2004.

MORROW, C.S.; COWAN, K.H. Glutathione S-transferases and drug resistance. **Cancer Cells**, v.2, p.15-22, 1990.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v.65, p. 55-63, 1983.

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.

NAM, C.; AN, S.; LEE, E.; MOON, S.; KANG, J.; CHANG, I. An *In Vitro* Phototoxicity Assay Battery (Photohaemolysis and 3T3 NRU PT test) to Assess Phototoxic Potential of Fragrances. **ATLA** 32, Supplement 1, p. 693-697, 2004.

NGUELEFACK, T.B.; DIMO, T.; MBUYO, E.P.; TAN, P.V.; RAKOTONIRINA, S.V.; KAMANYI, A. Relaxant effects of the neutral extract of the leaves of *Bidens pilosa* L. on isolated rat vascular smooth muscle. **Phytother.Res.**, v.19, n.3, p.207-10, 2005.

NOGUCHI, N.; NIKI, E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. **Free Radic. Biol.Med.**, v.28, n.10, p.1538-46, 2000.

OLIVETTI, G.; ABBI, R. QUAINI, F. Apoptosis is the failing human heart. **New England J. Med.**, v.336, p.1131-41, 1997.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; VREE, T.B.; KATAN, M.B. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. **J Nutr.** v.130, p.1200-1203, 2000.



OMS-Organização mundial de saúde. Câncer. Disponível em:<<http://www.who.int/cancer/en/>>acesso em 13 maio 2005.

OTTO,S. **Enfermagem Prática:Oncologia**. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso, 2002, p.526.

OZOLS, R.F.;LOUIE,K.G.;PLOWMAN, J.;BEHRENS, B.C.;FINE, R.L.;DYKES, D.;HAMILTON,T.C. Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer *in vitro* and in tumor –bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione. **Biochem. Pharmacol.**, v.36, p.147-153,1987.

PACKER, J.E., SLATER, T.F., WILSON, R.L. Reaction of the carbon tetrachloride related peroxy free radical with amino acids: pulse radiolysis evidence. **Life Sci.**, v.23, p.2620-2627, 1987.

PEDERSEN-BJERGAARD, J. Long-term complications of cancer chemotherapy. **J. Clin. Oncol.**, v.13, p.1534-36, 1995.

PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, p. 1598-1606, 2000.

PESCE,A.J.; BUBEL,H.C.; DIPERSIO,L.; MICHAEL,J.G. Human lactic dehydrogenase as a marker for human tumor cells grown in athymic mice. **Cancer Res.**, v.37, p.1998, 1977.

PINES, J. Four-dimensional control of the cell cycle. **Nature Cell Biol.**,v.1, E73-79, 1999.

POLLA, B. S.; STUBBE, H.; KATENGWA, S.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; JACQUIER-SARLIN. **Inflammation**. v.19, p.363-78,1995.

POSTMA,T.J.; BERNARD,B.A.; HUIJGENS,P.C. Long term effects of vincristine on the peripheral nervous system. **J.Neurooncol.**, v.15, p.1534-1536, 1995.

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

PRITCHARD, D. M.; WATSON, A. J. M. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. **Pharmacol. Ther.**, v.72, p.149-169, 1996.

PULIDO,R.; BRAVO,L.; SAURA-CALIXTO,F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J.Agric.Food Chem.**, v.48, n.8, p.3396-3402, 2000.

RABE T., Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **J Ethnopharmacol.** v.56, n.1, p.81-87, 1997.

RAINTREE HEALTH (UK). Disponível em: <<http://www.raintree-health.co.uk/>>. Acesso em: 06 de maio de 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.,M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A; DOLACK, J. A; WALTER, R. L. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacol.Ther.**, v.43, p.139-154, 1992.

REITER, R. J.; GULTEKIN, F.; FLORES, L. J.; TERRON, M.P.; TAN, D. X. Melatonin: potential utility for improving public health. **TSK Koruyucu H. B.**, v.5, n.2, 2006.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol.Med.**, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

RICHARDSON, M. A. Complementary/alternative medicine use in comprehensive cancer center and the implications oncology. **J.Clin.Oncol.**, v.18, p.2505-2514,2000.

RIES, F.; KLASTERSKY, J. Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. **Am. J. Kidney Dis.**, v.8,p.368-379, 1986.

ROCHA, B. A.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Pharmacol.**, v.1, p.364-369,2001.

ROJA, G.; HEBLE, M. R. The quinoline alkaloids Camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nathapodytes foetida*. **Phytochem.**, v.36, p.65-66, 1994.

ROY, N.; MAHADEVAN, M. S.; MCLEAN, M. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. **Cell**, v.80, p.167-78, 1995.

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

RUTTER, R. A. **Catalogo de plantas utiles de la Amazonia Peruana**. Yarinacocha, Peru: Instituto Linguistico de Verano, 1990.

SÁNCHEZ-VIESCA, F.; ROMO, J. Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Willd). **Tetrahedron**.México, v.19, n.8, p.1285-291, 1963.

SARG, T. M.; ATEYA, A. M.; FARRAG, N. M.; ABBAS, F. A. Constituents and biological activity of *Bidens pilosa* L. grown in Egypt. **Acta Pharm Hung.** v.61, n.6, p. 317-23, 1991.

SAVITZ, S. I.; DANIEL, B. A.; ROSENBAUM, M. D. Apoptosis in neurological disease. **Neurosurgery**, v.42, p.555-572, 1998.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **J.Ethnopharmacology**, v.71, p.23-43, 2000.

SCHINELLA, G. R.; TOURNIER H. A.; PRIETO, J. M.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO P.; RIOS., J. L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. **Life Sci.**, v.70, p.1023-1033, 2002.

SCHRECK, R., RIEBER, P., BEAUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **EMBO J**, v.10, p.2247-2252, 1991.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v.366, p.704-707, 1993.

SHIMURA, N.; MUSYA, A.; HASHIMOTO, T.; KOJIMA, S.; KUBODERA, A.; SASAKI, T. Usefulness of <sup>99</sup>Tc-d,1 HMPAO for estimation of GSH content in tumor tissues. **Nucl. Med. Biol.**, v.27, p.577-580, 2000.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur.J.Biochem.**, v.215, p.213-219, 1993.

SIES, H. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. USA: Academic Press. *Advances in Pharmacology*, v.38, p.707, 1997.

SIETSMA, H.; VELDMAN, R. J.; KOK, J. W. The involvement of sphingolipids in multidrug resistance. **J.Membrane Biol.**, v.181, p.153-162, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p.291-320, 2003.

SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **N Eng J Méd**, v.339, p.900-905, 1998.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER E. L. A simple technique for quantitation of levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p.184-191, 1988.

- SINGLETON, V.I.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **Am. J. Enol. Vit.**, v.16, p.144-158, 1965.
- SKIRVIN, J.A.; RELIAS, V.; KOELLER, J. Long-term sequelae of cancer chemotherapy. **Highlights in Oncol. Pract.**, v.14, n.2, 1996.
- SMITH, C., HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. **Food and Chem. Toxicol.**, v.30, p.483-489, 1992.
- SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J.Ethnopharmacol.**, v.51, p.1-15, 1996.
- SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? **Bioassays**, v.26, p.1097-1107, 2004.
- STANDLEY, L.; WINTERTON, P.; MARNEWICK, J.L.; GELDERBLUM, W.C.; JOUBERT, E.; BRITZ, T.J. Influence of processing stages on antimutagenic and antioxidant potentials of rooibos tea. **J.Agric. Food Chem.**, v.49, n.1, p.114-117, 2001.
- STEEL, G.G. Cell loss as a factor in the growth rate of human tumors. **Eur.J.Cancer**, v.3, p.381, 1967.
- SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochem.: Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133, 1990.
- SUNDARARAJAN, P.; DEY, A.; SMITH, A.; DOSS, A.G.; RAJAPPAN, M.; NATARAJAN, S. Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. **African Health Sci.**, v.6, p.1-4, 2006.
- SURH, Y.-J. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutation Res.**, v.428, p.305-327, 1999.
- TEODORI, E.; DEI, S.; SCAPECCHI, S.; GUALTIERI, F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. **Il Farmaco**, v.57, p.385-415, 2002.
- THATTE, U.; DAHANUKAR, S. Apoptosis – clinical relevance and pharmacological manipulation. **Drugs**, v.54, p.511-32, 1997.
- THOMSON HEALTHCARE – PDRHealth (USA, CA). Disponível em:  
<[http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/rut\\_0230.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/rut_0230.shtml)>. Acesso em: 14 de novembro de 2006.
- THORNBERRY, N.A. The caspase family of cysteine proteases. **British Med. Bulletin**, v.53, p.478-90, 1996.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E.; CROCE, C. Involvement of Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**, v.288, p.1440-3, 1985.

VALDÉS, H.A.L.; REGO, H.P.L. *Bidens pilosa* Linné. **Rev Cubana Plant Med.** v. 1, p.28-33, 2001.

VASQUEZ, M. R. **Useful plants of Amazonian Peru**. Second Draft. Filed with USDA's National Agricultural Library. USA: 1990.

VAUX, D. L.; WEISSMAN, I. L.; KIM, S. K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2. **Science**, v.258, p.1955-7, 1992.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím.Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VOLM, M.; MATTERN, J. Resistance mechanisms and their regulation in lung cancer. **Crit. Rev. Oncogen.**, v.7, p.227-244, 1996.

WANG, H.K. Plant-derived anticancer agents currently in clinical use or clinical trials. **The Invest. Drugs J.**, v.1, p.92-102, 1998.

WAT, C.K.; JOHNS, T.; TOWERS, G.H.N. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.2, n.3, p.279-290, 1980.

WHEDON, M.B. **Cancer chemotherapy guidelines, Recommendations for the management of vesical extravasation, hypersensitivity and Anaphylaxis**. Pittsburg, Pa: Oncology Nursing Society: 1992, p.1-15.

WHISLER, R. L.; GOYETTE, M. A.; GRANTS, I. V.; NEWHOUSE, Y. G. **Arch.Biochem.Biophys.**, v.319, p.23-35, 1995.

WHO – World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <[www.who.int/cancer/en/](http://www.who.int/cancer/en/)> acesso em: 13 maio 2005.

WINSTON, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochem. Physiol.**, v. 100, p. 173-176, 1991.

WOLF, P. L.; WILLIAMS, D. **Practical Clinical Enzymology**. New York: John Wiley, 1973.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **British Med. Bulletin**, v.53, p.451-65, 1997.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. **Science**, v.275, p.1129-32, 1997.

YOSHITAKE, I., OHISHI, E., SANO, J., MORI, T., KUBO, K. Effects of KF-14363 on liver fibrosis in rats with chronic liver injury induced by carbon tetrachloride. **J. Pharmacobio-Dynamics**, v.14, p.679–685, 1991.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: ARGOS, 2001, 523p.

ZHANG, J. Effects of *Bidens bipinnata* and *Bidens parviflora* on platelet aggregation. **Hebei Med.J.**, v.11, n.4, p.241-2, 1989.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### **Free-radical scavenging and *in vivo* antioxidant activities of polyphenol extracts from *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) with anti-inflammatory properties**

Maicon Roberto Kwiecinski<sup>1</sup>, Karina Bettega Felipe<sup>1</sup>, Maria Helena Rossi<sup>2</sup>, Julian Miguel Fachini<sup>1</sup>, Joana D'arc Felício<sup>2</sup>, Edlayne Gonzalez<sup>2</sup>, Silvia Dalbó<sup>3</sup>, Danilo Wilhelm Filho<sup>4</sup>, Rozangela Curi Pedrosa<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Ecologia e Zoologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

#### **Type of the paper**

Full Paper

#### **Subject categories**

Toxicology (1st choice)

Biochemical pharmacology (2nd choice)

#### **Correspondence address**

\* Rozangela Curi Pedrosa, Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil; e-mail: roza@ccs.ufsc.br - Tel. (55)483331-5048; FAX: (55)483331-9672

#### **Running title**

Antioxidant activity of *Bidens pilosa* L.



## Abstract

*Bidens pilosa* .L. (Asteraceae), a traditional plant used in Brazilian medicine as anti-inflammatory was screened for *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities versus anti-inflammatory property. The plant extracts inhibited the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/FeCl<sub>3</sub> induced oxidation of deoxyribose, in particular the ethyl acetate (EtOAc) extract (IC<sub>50</sub>=4.3 ± 4.5 µg/ml). High level of scavenger activity on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical was detected in the ethanol extract (EtOH) (IC<sub>50</sub>=32.3 ± 6.7 µg/ml). In addition, it was demonstrated that this fraction showed a strong decrease of lipoperoxidation in hepatocytes (IC<sub>50</sub>=25.1 + 4.5 µg/ml). In accordance with these data, the total soluble phenol constituents showed greater concentrations in EtOAc extracts (3.6 ± 0.5 gallic acid equivalents-GAE/mg). The *in vivo* antioxidant activity assay with EtOH and EtOAc extracts showed protection against hepatic oxidation of lipids (28% decrease of lipoperoxidation), protein carbonylation (>80% of protection) and DNA fragmentation (>50% of protection) associated with significant increase of ferric reducing antioxidant power in plasma after treatment with a stressor agent (CCl<sub>4</sub>). Interestingly, data obtained in acute inflammation model *in vivo* (Carrageenan paw edema assay) indicated that the EtOAc extract had also an anti-inflammatory activity (55% of reduction in the paw edema). The results suggest that the anti-inflammatory effect of this extract could be explained, at least in part, by its antioxidant properties.

**Keywords:** *Bidens pilosa*, free radical scavenger, oxidative stress, antioxidant, anti-inflammatory.

## Introduction

It is generally accepted that in most pathological processes an oxidative stress is also associated. When oxygen is supplied in excess or its reduction is insufficient, reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) such as superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, and peroxynitrite are generated (1). Reactive oxygen species play an important role in the development of tissue damage. Recent studies showed that reactive oxygen species are intimately involved in the

pathogenesis of inflammatory processes, which can exacerbate tissue damage (2). Several studies have shown that reactive oxygen and nitrogen species may play important role in cellular signaling at relatively low concentrations, but in high concentrations they can damage important biomolecules such as DNA, proteins and lipids (3). Reactive oxygen and nitrogen species can be associated with inflammatory diseases such as chronic arthritis, lung emphysema, atherosclerosis and also neurodegenerative diseases.

The use of traditional medicine is widespread and plants still present a large source of natural antioxidants that might serve as leads for the development of new drugs. Several anti-inflammatory, digestive, antinecrotic, neuroprotective, and hepatoprotective drugs have been shown antioxidant and/or antiradical scavenger properties (4-5). In the other hand, anti-inflammatory drugs have shown an antioxidant activity, such as nimesulide and aminosalicylates, among others (6). Thus, it is interesting to study products of natural origin, such as plant extracts used in traditional medicine as anti-inflammatory, which also might have antioxidant properties.

*Bidens pilosa* L.(Asteraceae) is a medicinal plant with wide occurrence in the tropical regions and have many popular names according to the place where it is found (7). In Brazil it is generally known as Picão-preto and it has a long history of popular use by Amazon Indians for several purposes including the treatment of pain, aftosa fever, angina, diabetes, edemas, infections and the treatment of inflammations (8-9).

The current study was undertaken to investigate the *in vivo* and *in vitro* antioxidant and radical scavenging properties of *Bidens pilosa* L. extracts by applying established assays and to provide evidence for the possible relationship between their polyphenolic contents, anti-inflammatory and antioxidant capacities.

## **Material and methods**

### *Plant samples and extracts preparations*

*Bidens pilosa* L. was collected at the Jureia Botanical Reserve (Atlantic Forest), São Paulo state, Brazil. The plant was identified by Inês Cordeiro, and a voucher specimen

(M.H. Rossi SP384167) was deposited at the Herbário do Estado Eneida P.K. Fidalgo of the Botanical Institute, São Paulo, Brazil.

The dried aerial parts of the plant were powdered and exhaustively extracted with ethanol-water solution (9:1) at room temperature for 3 days (3 times). The solvent was eliminated under low pressure to obtain a dried ethanol extract (EtOH). After performing fast column silica gel 60 chromatography with vacuum and applying solvents with different polarities, three fractions were obtained from EtOH. They were named chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) fractions according to the respective solvent used. The extracts were housed at warm temperature in dryer device protected against the light.

#### *Determination of total phenol content (TPC)*

The total phenol content was determined according to the Folin-Ciocalteu method (10). The reaction mixture was composed of 0.1 mL of extracts, 7.9 mL of distilled water, 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent and 1.5 mL of 20% sodium carbonate. The opaque flasks were mixed and allowed to stand for 2 hours. The absorbance was measured at 765 nm and total phenol content was expressed as gallic acid equivalent (GAE )/mg of extracts.

#### *Analysis of ethanolic extract and ethyl acetate fraction*

The EtOH and EtOAc fraction were submitted to reversed phase HPLC (Shimadzu LC 6AD, J. T. Baker ODS C-18 column, 5 µm, 4,6x250 mm, Kyoto, Japan) using a mixture of water (5% acetic acid): methanol 65:35 as mobile phase a flow rate of 1mL/min and UV detection at 258 nm (Shimadzu, SPD 6AV). NMR <sup>13</sup>C spectrum for this fraction was recorded on Bruker –AC 200 (Rheinstetten, Germany) in DMSO-d<sub>6</sub>

#### *Free radical scavenging activity*

The free radical scavenging activity of *Bidens pilosa* L. (EtOH , MeOH, EtOAc and CHCl<sub>3</sub> extracts) was evaluated using 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH)

radical scavenger method measured at 518 nm (11). The hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>) was generated by the deoxyribose method, and its reaction with thiobarbituric acid (TBA) was indirectly detected through the pink chromophore measured at 532 nm (12). Protection against lipid peroxidation (LPO) in rat hepatic homogenate was assayed using the TBA method as described by Chen and Tappel, 1996 (13). Rutin was used as the polyphenol antioxidant standard. The antioxidant activities of plant extracts were evaluated in range of 0.5 to 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and the results were expressed as IC<sub>50</sub>, which was defined as the concentration (in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of extract required to inhibit the generation rates of radicals or lipoperoxidation by 50%.

### *Antioxidant tests in vivo*

#### *Animal treatment*

Male isogenic Balb-c mice, weighing  $20 \pm 5$  g, were housed under controlled conditions (12 h light-dark cycle,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 60% air humidity), and had free access to standard laboratory chow and water. All animals were allowed to acclimatize for at least 5 days prior to the first treatment. Animals were fasted for 12 h before experiments and allowed water *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with legal requirements appropriate to the species (Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication #85.23, revised in 1985) and with the local Committee (365/CEUA and 23080.016010/2005-32/UFSC).

#### *Experimental protocol*

The oxidative stress was induced by CCl<sub>4</sub> according to the methods described previously (14). Mice were randomly divided into 5 groups (n=6 each group): a control group (NC), which received saline for 8 days and on the 9<sup>th</sup> day received CCl<sub>4</sub> vehicle; the CCl<sub>4</sub> group (PC), which received saline for 8 days and on the 9<sup>th</sup> day received an overdose of CCl<sub>4</sub> (0.5 mL 100 g<sup>-1</sup> body weight, i.p.); two polyphenol extract (EtOH and

EtOAc) groups, which were pretreated with extracts (150 mg kg<sup>-1</sup> body weight, v.o.) for 8 days and on the 9<sup>th</sup> day received CCl<sub>4</sub>. Rutin, which has been shown to protect cells from oxidative damage, was used as a standard group (RT group, 6 mg kg<sup>-1</sup> body weight, v.o) (15). Twenty-four hours after CCl<sub>4</sub> administration, mice were anesthetized with diethyl-ether, and blood was collected before animals were killed by cervical dislocation. Livers were immediately excised and kept on ice during homogenate and acid extract preparations.

#### *Plasma ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay*

The ferric reducing/antioxidant power assay was performed as previously described by Benzie and Strain, 1999 (16). The experiment was conducted at 37 °C at pH 3.6 condition with a blank sample in parallel, using ascorbic acid as a control. In the ferric reducing/antioxidant power assay, antioxidants in the sample reduce the Fe (III)/tripyridyltriazine complex present in stoichiometric excess, to the blue ferrous form, with increase the absorbance at 596 nm. The change of absorbance is proportional to the combined (total) ferric reducing/antioxidant power (FRAP value) of the antioxidants in the sample. Briefly, the reaction is a kinetic determination where a work reagent composed is by acetate buffer 300mM (pH 3.6), tripyridyltriazine 10 mM in HCl 40 mM and FeCl<sub>3</sub>. 6 H<sub>2</sub>O mM (10:1:1). 100 µL of plasma was added to 3 mL of work reagent. Absorbances were recorded at 0 and after 240 s. The final results were expressed by means (± SD) of ferric reducing/antioxidant power value and determined using the following equation:  $FRAP = \Delta A_{596}(\text{test}) / \Delta A_{596}(\text{control}) \times FRAP (\text{control})$ .

#### *Reduced glutathione (GSH) assay*

Reduced glutathione content was measured according to Anderson, 1985 (17). Immediately after liver excision, acid homogenates were obtained by the addition of 12% trichloroacetic acid (1:4, w:v), and then centrifuged at 15000g for 5 min. Supernatants from the acid extracts were added to 0.25 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) in 0.1

M potassium phosphate buffer pH 8.0, and the formation of thiolate anion was immediately determined.

#### *Catalase (CAT) activity assays*

Mice liver homogenates (1:20; w:v) were prepared in a medium consisting of 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, and 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. Homogenization was carried out at 4°C, employing 20 strokes in a Potter-Elvehjen homogenizer, followed by centrifugation at 15000g for 5 min. The supernatant was stored in liquid nitrogen until the enzymatic assays. Catalase activity was determined by measuring the decrease in a 10 mM hydrogen peroxide solution at 240 nm during the first 5s and expressed in  $\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (18).

#### *Determination of lipid peroxidation (Thiobarbituric acid reactive species-TBARS)*

Liver homogenates were prepared with samples of mice livers and phosphoric acid 1% (1:20 w/v) in a Potter homogenizer. Malondialdehyde (MDA), the major product of *in vivo* lipid peroxidation, was measured through the method described by Hermes-Lima, Willmore and Storey, 1995 (19). Malondialdehyde reacts with a variety of compounds to produce a pink pigment that can be quantified spectrophotometrically at 532 nm. Thiobarbituric acid (1%) was used to perform the reaction to produce thiobarbituric acid reactive species. After quantification, the results were expressed by means of thiobarbituric acid reactive species concentration  $\pm$  SD ( $\text{nmol g}^{-1}$ ).

#### *Assay of carbonyl protein*

Oxidative damage to proteins was quantified as carbonyl protein according to Levine et al. 1990 (20) using liver samples. In proteins, the introduction of carbonyl groups to their amino acid residues is a typical characteristic of oxidative protein modification. 2,4-dinitrophenyl-hydrazine, a classic carbonyl-specific reagent, has been used with success for the detection of carbonyl-modified proteins. Ethanol: Ethyl acetate (1:1; v:v)

was used to remove hydrazine excess. In the following, incubation with guanidine chloride  $6 \text{ mol L}^{-1}$  was performed and then the maximum absorbance in the range of 360–370 nm was recorded and the final carbonyl protein values expressed using the extinction coefficient of  $22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### *Detection of DNA damage*

The extent of DNA fragmentation was assessed using the alkaline comet assay (21). Blood cells ( $20 \text{ }\mu\text{L}$ ) were diluted in  $100 \text{ }\mu\text{L}$  PBS (1:10) and  $10 \text{ }\mu\text{L}$  of this solution was embedded in  $70 \text{ }\mu\text{L}$  of 0.75% low melting point agarose. The cell/agarose mixture was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of  $300 \text{ }\mu\text{L}$  of normal melting agarose (1%). The slides were lowered into cold, freshly made lysis solution (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO and 10 mM Tris, pH 10) for a minimum of 2h up to 1 week. Subsequently, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 30min. The DNA was subjected to electrophoresis for 30 min at 280 mA and 25 V, and then neutralized with 0.4 M Tris, pH 7.5. Finally, the DNA was stained with ethidium bromide ( $2 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal and comet image lengths (nuclear region + tail) were measured in arbitrary units. A DNA damage index was compiled according to tail size, from undamaged (0), to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently for each group studied. Thus, the damage index of each group range from 0 (completely undamaged) to 400 (maximum damage).

#### *Anti-inflammatory activity*

Carrageenan-induced inflammation in the mouse paw represents a classical model of edema formation and hyperalgesia, which has been extensively used in the development of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (22). Carrageenan ( $300 \text{ }\mu\text{g/paw}$ ;  $50\mu\text{L}$ ) was injected into the plantar surface of the right hind paw in male isogenic Balb/c

mice (n=10) to induce edema. Left hind paws were injected with PBS only (pH 7.4; 50 $\mu$ L). An oral pretreatment with EtOH or EtOAc (150 mg.Kg<sup>-1</sup>), or saline only (50 $\mu$ L), or the standard Indomethacin (5mg.kg<sup>-1</sup>) was preceded 1h prior to carrageenan treatment. All extracts were diluted in phosphate buffered saline (PBS). Control animals received only vehicle (0.1 mL/10g b.w). The contralateral paw received the same volume of PBS (50 $\mu$ L). Edema was measured plethysmographically 30, 60, 120 and 240min later. Results were expressed as the difference in volume between the carrageenan-paw and PBS-paw.

### *Statistical analysis*

All the biochemical determinations mentioned above were measured in duplicate in three separated experiments regarding the *in vitro* antioxidant activity. Data of the *in vivo* antioxidant activity were expressed as mean values  $\pm$  SD on 6 animals, while for the anti-inflammatory activity the values were expressed as mean values  $\pm$  SD on 10 animals, which were analyzed by ANOVA complemented with the Tukey-Kramer multiple comparison test. *P*-values less than 0.1% ( $p < 0.001$ ) were considered to be statistically significant.

## **Results**

### *Total Phenol Content, EtOAc extracts chemical profile and free radical scavenging activity*

The estimation of total phenol content, the scavenging of 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate and hydroxyl radicals and the levels of protection caused by *Bidens pilosa* L. extracts against lipoperoxidation *in vitro* are shown in Table 1. A comparative analysis shows that EtOAc extract presented greater contents of total phenol content while CHCl<sub>3</sub> showed the smallest one. There were marked differences at the 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate radical scavenging capacity between the least effective fraction (CHCl<sub>3</sub>, IC<sub>50</sub> = 248.0  $\pm$  1.8  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and the most effective one (EtOAc, IC<sub>50</sub> = 32.3  $\pm$



6.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), whilst Rutin showed the highest DPPH scavenging capacity ( $\text{IC}_{50} = 12.8 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

The HPLC chromatograms of ethanolic extract (EtOH) and ethyl acetate fraction (EtOAc) were obtained using water (5% acetic acid): methanol 65: 35 as mobile phase. This phase was employed by Felicio *et al* 2001(23) for quantitative separation of phenolic compounds from *Vitis vinifera*. The chromatogram of EtOH showed five peaks after retention times 3.13, 3.84, 5.15, 6.86 and 7.15 minutes corresponding to more polar substances and two peaks after retention times 13.25 and 14.05 of apolar substances (Figure 1.a). Three major peaks of polar compounds were obtained after retention times 3.10; 3.35 and 3.78 minutes for the EtOAc fraction (Figure 1.b). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of ethyl acetate fraction (EtOAc) showed chemical shifts corresponding to carbons typical of flavonoids.

The chemical shifts at 163.3; 153.3; 152.9; and 135.3; 134.7 are similar to carbons C5, C7 and C3 of oxygenated flavonols in these positions. These flavonoids are probably linked to a sugar, because in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum signals at 70.6; 71.5; 71.1; 71.8; 72.9; 73.0; 73.3 were observed.

The extracts were also evaluated for their ability to scavenge hydroxyl radical and/or to chelate iron using the deoxyribose degradation assay. The results showed that all samples and Rutin exhibited inhibitory activity against hydroxyl radical generation. Once again the EtOAc and EtOH extracts were the most effective extracts ( $\text{IC}_{50} = 4.3 + 1.5$  and  $14.2 + 3.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively), but they were less effective than Rutin ( $\text{IC}_{50} = 1.4 + 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

All tested products were able to decrease lipoperoxidation in a concentration-dependent manner, and again EtOAc exhibited the strongest antioxidant potential among the plant extracts ( $25.1 + 4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). At the  $\text{IC}_{50}$  level however, it was 2 times less potent than Rutin ( $10.4 + 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Table 1).

#### *In vivo antioxidant potential*

The *in vivo* assays were performed at concentrations of 50, 100, 150 and 300  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Below 150  $\text{mg.mL}^{-1}$ , important antioxidant effects for the EtOH and EtOAc extracts were

detected, whilst only a weak anti-inflammatory activity for the EtOH extract was obtained. After a treatment with  $300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a certain hepatotoxicity by the EtOH extract was detected. Consequently, the present work focused only on results regarding the concentration of  $150 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Carbon tetrachloride administration to mice resulted in a strong decrease of the ferric reducing/antioxidant power assay together with the depletion of liver reduced glutathione levels (Table 2). Pretreatments with the polyphenol extracts ( $150 \text{ mg kg}^{-1}/8$  days) or Rutin ( $6 \text{ mg kg}^{-1}/8$  days) were not effective to protect the liver against the carbon tetrachloride-induced reduced glutathione (GSH) depletion, however total plasma ferric reducing/antioxidant power was recovered.  $\text{CCl}_4$  was able to induce an increase liver catalase activity in treated mice, confirmed by positive controls (PC), when compared to negative controls (NC). The polyphenol extracts and Rutin were poorly effective to prevent the increase of catalase activity as shown in Table 2.  $\text{CCl}_4$  also was able to induce lipoperoxidation and therefore oxidative stress, as indicated by the higher thiobarbituric acid reactive species-TBARS levels in liver. The polyphenol extracts and Rutin showed anti-lipoperoxidative effects. The EtOAc and EtOH extracts prevented the  $\text{CCl}_4$ -induced lipoperoxidation at similar levels (about 28% of decrease) when compared to PC, whilst Rutin caused a decrease of 48% (Figure 2).

In addition, the polyphenolic extracts of *Bidens pilosa* (EtOH and EtOAc) strongly protected the livers against  $\text{CCl}_4$ -induced protein carbonylation (Figure 3). The livers of animals treated with  $\text{CCl}_4$  presented an evident increase in carbonyl protein levels, whilst the treatments with the polyphenol extracts caused similar levels of *in vivo* protection, once again attenuating more than 80% of the protein oxidation. This protection was equivalent to that one observed in the animals pretreated with Rutin.

The favorable results of *Bidens* extracts *in vivo* were confirmed by the prevention of the  $\text{CCl}_4$ -induced DNA fragmentation (Figure 4). In accordance with the lipoperoxidation and protein oxidation results, the fluorescence microscopy revealed approximately 30% less DNA fragmentation in blood samples from animals pretreated with the EtOH extract, and about 50% less DNA fragmentation in blood samples from animals pretreated with the EtOAc extract compared to the positive controls. Pretreatment with Rutin was able to decrease DNA fragmentation in about 60%.

### *In vivo* antiinflammatory activity

The classic flogistic agent Carrageenan was effective to produce edema as shown in Figure 5. The animals pretreated with the polyphenolic extracts (150 mg.kg<sup>-1</sup> v.o.) presented a significant decrease in the paw edema compared to the group pretreated with saline (NC=negative controls). The comparison between data obtained from negative controls and the group pretreated with the standard Indomethacin (5mg.kg<sup>-1</sup>) revealed that the standard was also very effective to suppress the edema. At 30, 60, 120 and 240 min after the edema induction, Indomethacin was able to decrease the paw volumes in 34%, 30%, 25% and 60%, respectively, compared to the negative controls ( $p < 0.001$ ). Similar to the effect showed by Indomethacin, the EtOAc extract caused a decrease of 31, 41, 41 and 55% in the edema, whilst the EtOH extract showed a lower effect in this regard (20, 26 and 36% of decrease, respectively).

### Discussion

Flavonoids are widely distributed in higher plants and they are able to scavenge superoxide and hydroxyl radicals by single-electron transference (23). Phenolic compounds such as quercetin, jacein, caffeic acid (24), okamine, lanceoline and buteine (25) were already identified in *Bidens pilosa*, and the EtOAc extract followed by EtOH extract concentrates large amounts of such compounds.

The *in vitro* antioxidant activity of the *Bidens pilosa* extracts was first discernible at the 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) radical assay, which primarily evaluates proton radical-scavenging ability. It is well accepted that DPPH free radical-scavenging by antioxidants is due to their hydrogen-donating ability. In the present study, the EtOH, EtOAc, MeOH and CHCl<sub>3</sub> extracts showed a concentration-dependent scavenging ability of DPPH radical, which may be attributable to this hydrogen-donating capacity. The EtOAc extract showed the best DPPH scavenger capacity when compared to the other extracts, and in some cases presented an IC<sub>50</sub> very similar to Rutin (Table 1).

*In vitro* evidences of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) scavenging activity of these extracts were obtained with a deoxyribose reaction system. Other earlier studies that used this system to assess the biological activity of natural plant derived biomolecules (e.g. Halliwell et al., 1987)(26), reported that molecules able to inhibit deoxyribose degradation are those that can chelate iron ions and render them inactive or poorly active for the Fenton reaction (27). Polyphenols, particularly flavonoids, consist of an important iron chelating defense. It is likely that the extracts of *Bidens pilosa* may have a chelating effect on metal ions, especially iron ions, which are implicated in many diseases such as inflammation processes. By decreasing  $\text{Fe}^{2+}$  concentrations, these substances can protect cells against oxidative damage (28). In this regard, it is worthwhile to note that the EtOAc extract, which presented the greatest total phenolic content, also showed the best hydroxyl radical scavenging ability (Table 1).

Sometimes a direct correlation between the antioxidant activity and the reducing power of certain plant extracts can be found. The reducing properties are generally associated with the presence of reductant agents, which have been shown to exert an antioxidant action by breaking the free radical chain by donating hydrogen atoms (29). Reductant agents are also reported to react with certain precursors of peroxide, thus preventing peroxide formation (30). The results demonstrated that *Bidens pilosa* extracts were effective to protect mice liver homogenates against t-butyl peroxide-induced lipoperoxidation *in vitro*. Oxidation of unsaturated fatty acids in biological membranes leads to the formation and propagation of lipid radicals, the rearrangement of double bonds in unsaturated lipids, and the eventual destruction of membrane lipids, which produce breakdown products of the lipid peroxidation process such as malondialdehyde. Most of *Bidens pilosa* extracts showed a high lipoperoxidation inhibitory activity, displaying  $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Table 1).

The extracts of *Bidens pilosa* showed *in vitro* antioxidant potentials, and once again the higher contents of polyphenols in the EtOAc extract were apparently associated with a higher antioxidant capacity (Table 1). This result confirms previous findings in other plant extracts that also showed antioxidant activity related to polyphenols (31). However, it is important to note that phenolic compounds involved in

each extract may vary widely, therefore such changes might also explain the differences in the antioxidant power of plant extracts.

As a consequence of the above results, in which the more important *in vitro* antioxidant activity and total phenol contents were associated with the EtOH and EtOAc extracts, the *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacity were evaluated only on these extracts.

The CCl<sub>4</sub> overdose caused an important toxicity by means of increased liver lipid peroxidation, as detected by the levels of thiobarbituric acid reactive species. CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity depends on the reductive dehalogenation of CCl<sub>4</sub> catalyzed by CYP 450 in the endoplasmic reticulum of the hepatic cell (32), leading to the generation of trichloromethyl peroxy radicals (CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>), an unstable complex reported to be highly reactive (33). These free radicals attack membrane lipids causing their peroxidation, and may also bind covalently to lipids and proteins, thereby initiating processes leading to cell damage. Accordingly, the administration of CCl<sub>4</sub> resulted in significant (P<0.001) depletion of hepatic reduced glutathione, decrease in ferric reducing/antioxidant power in plasma, and in a concomitant significant increase in catalase activity, lipid peroxidation, protein carbonylation and DNA fragmentation. Several upregulated genes are involved in CCl<sub>4</sub> stress response, DNA and protein damage and repair (34). Gene codes for several enzymes involved in different metabolic pathways, including catalase, were upregulated in CCl<sub>4</sub>-treated animals, and a single dose of CCl<sub>4</sub> caused changes in gene and protein expression that can be related to its toxicity mechanism (34).

It has been shown that *Bidens pilosa* may exert its protective actions against CCl<sub>4</sub>-induced injury by impairment of CCl<sub>4</sub>-mediated lipid peroxidation, either through decreased production of free radical derivatives or due to the antioxidant activity of the protective agent itself. Although in the preset study the extracts have not presented ability to reestablish reduced glutathione levels nor even to decrease catalase activity, the EtOAc and EtOH polyphenol extracts were able to protect the hepatocytes against oxidative stress induced by CCl<sub>4</sub>. Similar results were obtained on *Ouratea parviflora* and *Ulma davidiana*, a Brazilian and Korean medicinal plants, respectively, which are also frequently used in the treatment of inflammatory diseases (15, 33). Trichloromethyl free radicals can react with sulfhydryl groups, such as glutathione and protein thiols, and

their covalent binding to cell proteins is considered the initial step of chain reaction events, which eventually leads to membrane lipid peroxidation (35).

Several pathological events such as some lung diseases, chronic arthritis and ageing are characterized by oxidation processes catalyzed by metals, which have been identified as covalent modification of proteins (36). The polyphenol extracts obtained from *Bidens pilosa* conferred a slight protection (about 28%) against lipid peroxidation, but a very strong protection (about 80%) against protein carbonylation, a protection similar to that presented by Rutin. In this regard, carbonyl protein levels seemed to be totally normalized when the animals received polyphenol extracts previously to CCl<sub>4</sub> treatment.

Reactive oxygen species inflict damage on several cellular structures and functional components, including DNA, even under physiologic conditions (37). The present study showed an 20% enhancement of DNA fragmentation in mice exposed to CCl<sub>4</sub> compared to negative controls. However, the DNA damage decreased in animals pretreated with the two polyphenol extracts of *Bidens pilosa* and also in animals treated with Rutin, suggesting that either the system of enzymatic repair was induced or/and an increase in antioxidant defenses in the nuclei of cells occurred. Similar findings were obtained in mice pre-treated with the hydroalcoholic extract from *Ouratea parviflora*, which is rich in Rutin (15), and in murine microglia cells treated with the flavonoid catechin (38).

Although rather speculative, the above mentioned findings might be due to the antioxidant properties of the polyphenols, confirmed by the high plasma ferric reducing/antioxidant capacity, acting as scavengers of hydroxyl radical, as observed *in vitro* in the present study. Considering that oxidative stress is consistently present in inflammation processes (39), the present study provided important information about the therapeutic virtues of these two plant extracts, which are apparently well in line with its anti-inflammatory properties as reported by popular medicine.

The two polyphenolic extracts were therefore assayed for their anti-inflammatory activity *in vivo*. Data obtained through the assay of carragenan-induced paw edema were compared and they revealed that both, the EtOH extract and also its EtOAc fraction, when solubilized in ethanol/water (1:10; v/v) and given orally to fasted mice

through a single dose (150mg.kg<sup>-1</sup>/50μL), half hour before the induction of the edema, they both caused an important decrease in edema volume when compared to groups pretreated with saline only, and also with the standard Indometacin, a commercially available anti-inflammatory drug. Although both assayed extracts have presented effects on the edema, it is very interesting to note that the EtOAc extract from *B pilosa*, which showed the greatest content of polyphenols and antioxidant potential, also showed the higher ability to suppress the edema at levels similar to that of the standard Indometacin (5 mg.kg<sup>-1</sup>).

In conclusion, all the results here obtained suggest a possible correlation between *Bidens pilosa* antioxidant effects and its anti-inflammatory effect. In other words, the alleged beneficial anti-inflammatory health effects of this plant probably involve multiple and synergistic mechanisms responsible for the antioxidant activity related to its polyphenolic compounds.

## Figure and table captions

Table 1. *In vitro* antioxidant activity of the *Bidens pilosa* L. extract and Rutin (0.5 to 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) measured by scavenging of DPPH and  $\cdot\text{OH}$  radicals, and protection against lipoperoxidation (LPO) in hepatic homogenates and total polyphenol compounds content (TPC).

*Note:* All assays were done in duplicate and the values are expressed as means  $\pm$  SD. The results are mean values of three separate experiments.  $\text{IC}_{50}$ : inhibitory concentration at 50% was obtained by linear regression. (EtOH): ethanol crude extract; (EtOAc): ethyl acetate fraction; (MeOH): methanolic fraction; ( $\text{CHCl}_3$ ): chloroformic fraction.

Table 2. Effects on plasma ferric reducing/antioxidant power (FRAP) levels and hepatic reduced glutathione concentration and catalase activity in mice pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (150  $\text{mg kg}^{-1}$ , via oral, for 8 days) or Rutin (6  $\text{mg kg}^{-1}$ , via oral, for 8 days) and after with  $\text{CCl}_4$  (0.5 mL 100  $\text{g}^{-1}$  weight), and controls.

*Note:* All assays were done in duplicate and the values are expressed by means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ), superscripts (\*\*\*) denote significant differences when  $P < 0.001$  in relation to PC. (NC): negative control; (PC): positive control treatment with  $\text{CCl}_4$ ; (EtOH): pre-treatment with ethanol crude extract plus  $\text{CCl}_4$ ; (EtOAc): pre-treatment with ethyl acetate fraction plus  $\text{CCl}_4$ ; (RT): pre-treatment with Rutin plus  $\text{CCl}_4$ .

Figure 1. HPLC chromatogram of ethanol crude extract (a) and ethyl acetate extract (b) was obtained using water (5% acetic acid): methanol 65: 35 as mobile phase.

Figure 2. Lipoperoxidation (TBARS levels) in liver of mice pretreated with 50  $\mu\text{L}$  of saline via oral (negative control, NC), or pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, EtOAc, 150  $\text{m kg}^{-1}$ , via oral) or Rutin (RT, 6  $\text{m kg}^{-1}$ , via oral) during 8 days and at the 9<sup>th</sup> day treated with  $\text{CCl}_4$  (0.5 mL per 100g weight, via intraperitoneal) or only  $\text{CCl}_4$  at



the 9<sup>th</sup> day (positive control, PC). All biochemical determinations were done in triplicate and the values are expressed as means  $\pm$  SD with 6 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

Figure 3. Hepatic carbonyl protein levels in mice pretreated with saline via oral (negative controls, NC), or pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, EtOAc, 150 m kg<sup>-1</sup>, via oral) or Rutin (RT, 6m kg<sup>-1</sup>, via oral) during 8 days and 9<sup>th</sup> day treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 mL par 100g weight, via intraperitoneal) or only CCl<sub>4</sub> at the 9<sup>th</sup> day (positive control, PC). All biochemical determinations were done in triplicate and the results are expressed as means  $\pm$  SD with 6 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

Figure 4. Blood DNA damage Index (0 to 400) in mice pretreated with saline via oral (negative controls, NC), or pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, EtOAc, 150 m kg<sup>-1</sup>, via oral) or Rutin (RT, 6m kg<sup>-1</sup>, via oral) during 8 days and at the 9<sup>th</sup> day treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 mL par 100g weight, via intraperitoneal) or only CCl<sub>4</sub> at the 9<sup>th</sup> day (positive control, PC). All biochemical determinations were done in triplicate and the results are expressed as means  $\pm$  SD with 6 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

Figure 5. Oral anti-inflammatory activity of polyphenol extracts of *Bidens pilosa* on the carrageenan-induced paw edema in mice. Fasted animals pre-treated with the polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtAc and EtOH, 150 mg.kg<sup>-1</sup>, via oral) or saline only (50  $\mu$ L, negative control) or Indometacin (5 mg.kg<sup>-1</sup>, positive control). Paws monitored at 30, 60, 120 and 240min after the flogistic injection (Carrageenan 1% in PBS, 50 $\mu$ L). Paws monitored at 30, 60, 120 and 240min after the flogistic injection (Carrageenan 1% in PBS, 50 $\mu$ L). All values are expressed by means of difference in the volume between the hind right and left paws ( $\mu$ L)  $\pm$  SD. The results are means values of 10 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

Table 1.

*In vitro* antioxidant activity of the *Bidens pilosa* L. extract and Rutin (0.5 to 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) measured by scavenging of DPPH and  $\cdot\text{OH}$  radicals, and protection against lipoperoxidation (LPO) in hepatic homogenates and total polyphenol compounds content (TPC).

Samples	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			TPC (GAE\mg of extract)
	DPPH	$\cdot\text{OH}$	<u>LPO</u>	
EtOH	98.0 $\pm$ 1.0	14.2 $\pm$ 3.2	35.8 $\pm$ 3.9	2.1 $\pm$ 0.2
EtOAc	32.3 $\pm$ 6.7	4.3 $\pm$ 1.5	25.1 $\pm$ 4.5	3.6 $\pm$ 0.2
MeOH	102.9 $\pm$ 2.4	18.5 $\pm$ 8.2	90.4 $\pm$ 3.4	1.0 $\pm$ 0.1
CHCl <sub>3</sub>	248.0 $\pm$ 1.8	33.0 $\pm$ 6.0	166.3 $\pm$ 2.6	0.8 $\pm$ 0.1
RT	12.8 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.1	-

Table 2.

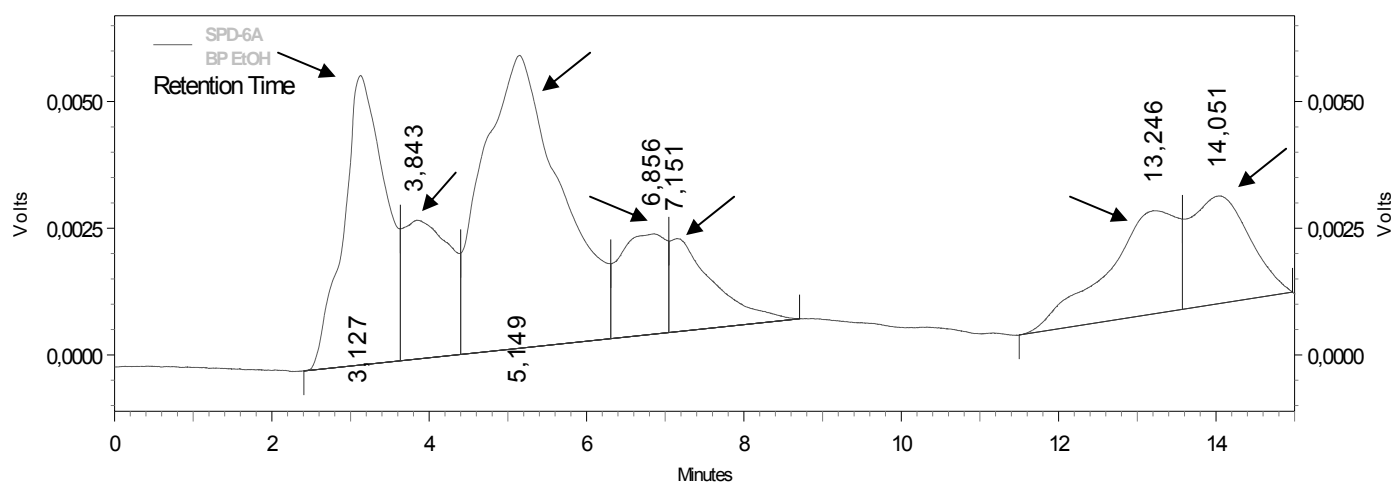
Effects on plasma ferric reducing/antioxidant power (FRAP) levels and hepatic reduced glutathione concentration and catalase activity in mice pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (150 mg kg<sup>-1</sup>, via oral, for 8 days) or Rutin (6 mg kg<sup>-1</sup>, via oral, for 8 days) and after with CCl<sub>4</sub> (0.5 mL 100 g<sup>-1</sup> weight), and controls.

Treatments	Assays		
	FRAP (mM)	GSH ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	CAT ( $\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ )
NC	21.69±0.72***	7.39±0.59***	163.73±29.64***
PC	11.72±0.82	2.07±0.65	517.60±67.90
EtOAc	18.87±0.88***	1.80±0.50	441.58±44.26
EtOH	20.69±0.72***	2.13±0.44	447.10±33.10
RT	24.50±2.00***	2.20±0.20	366.40±44.90

Figure 1

HPLC chromatogram of ethanol crude extract (a) and ethyl acetate extract (b) was obtained using water (5% acetic acid): methanol 65: 35 as mobile phase.

(a)



(b)

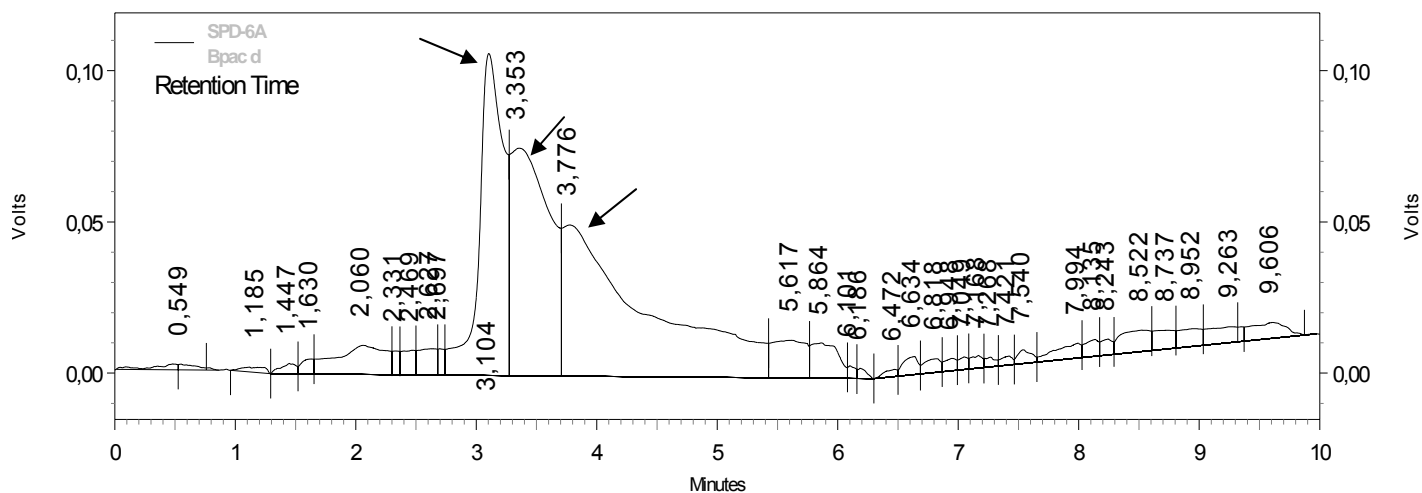


Figure 2.

Lipoperoxidation (TBARS levels) in liver of mice pretreated with 50  $\mu\text{L}$  of saline via oral (negative control, NC), or pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, EtOAc, 150 m  $\text{kg}^{-1}$ , via oral) or Rutin (RT, 6m  $\text{kg}^{-1}$ , via oral) during 8 days and at the 9<sup>th</sup> day treated with  $\text{CCl}_4$  (0.5 mL per 100g weight, via intraperitoneal) or only  $\text{CCl}_4$  at the 9<sup>th</sup> day (positive control, PC). All biochemical determinations were done in triplicate and the values are expressed as means  $\pm$  SD with 6 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

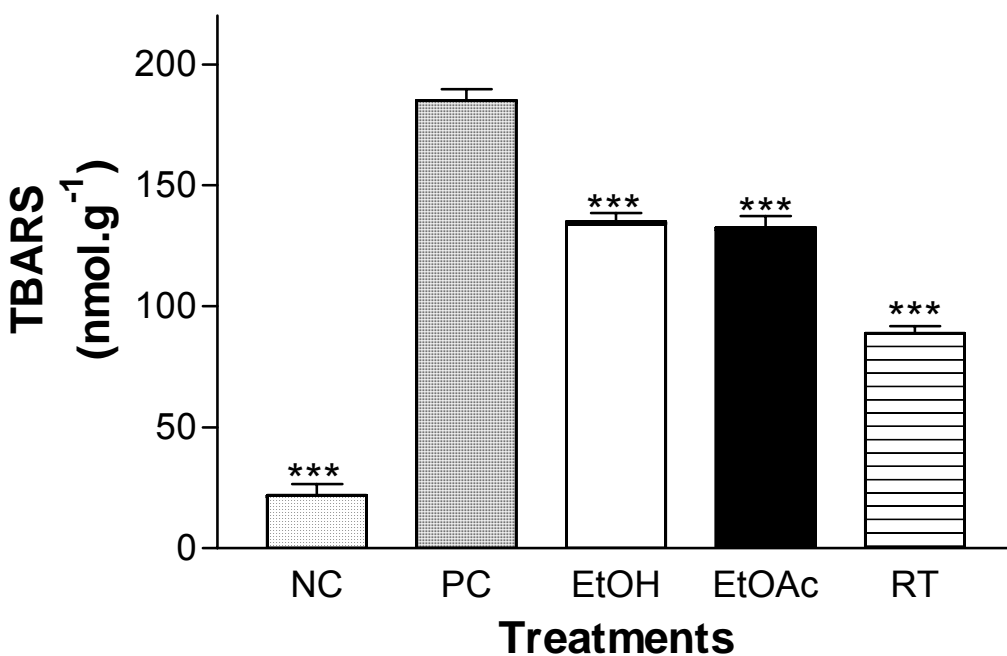


Figure 3

Hepatic carbonyl protein levels in mice pretreated with saline via oral (negative controls, NC), or pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, EtOAc, 150 m kg<sup>-1</sup>, via oral) or Rutin (RT, 6m kg<sup>-1</sup>, via oral) during 8 days and 9<sup>th</sup> day treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 mL par 100g weight, via intraperitoneal) or only CCl<sub>4</sub> at the 9<sup>th</sup> day (positive control, PC). All biochemical determinations were done in triplicate and the results are expressed as means  $\pm$  SD with 6 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

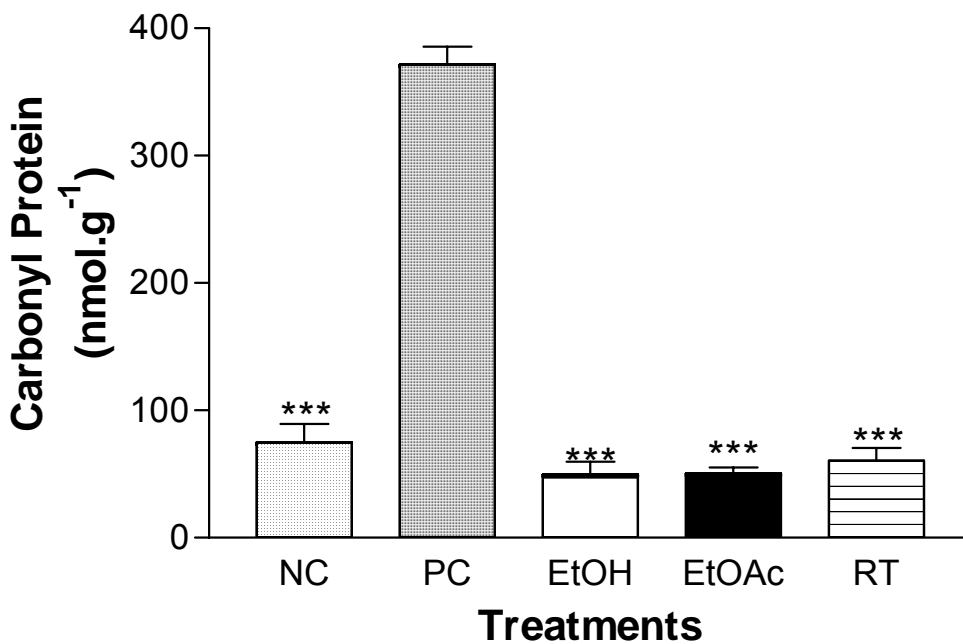


Figure 4

Blood DNA damage Index (0 to 400) in mice pretreated with saline via oral (negative controls, NC), or pretreated with polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, EtOAc, 150 m kg<sup>-1</sup>, via oral) or Rutin (RT, 6m kg<sup>-1</sup>, via oral) during 8 days and at the 9<sup>th</sup> day treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 mL par 100g weight, via intraperitoneal) or only CCl<sub>4</sub> at the 9<sup>th</sup> day (positive control, PC). All biochemical determinations were done in triplicate and the results are expressed as means  $\pm$  SD with 6 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).

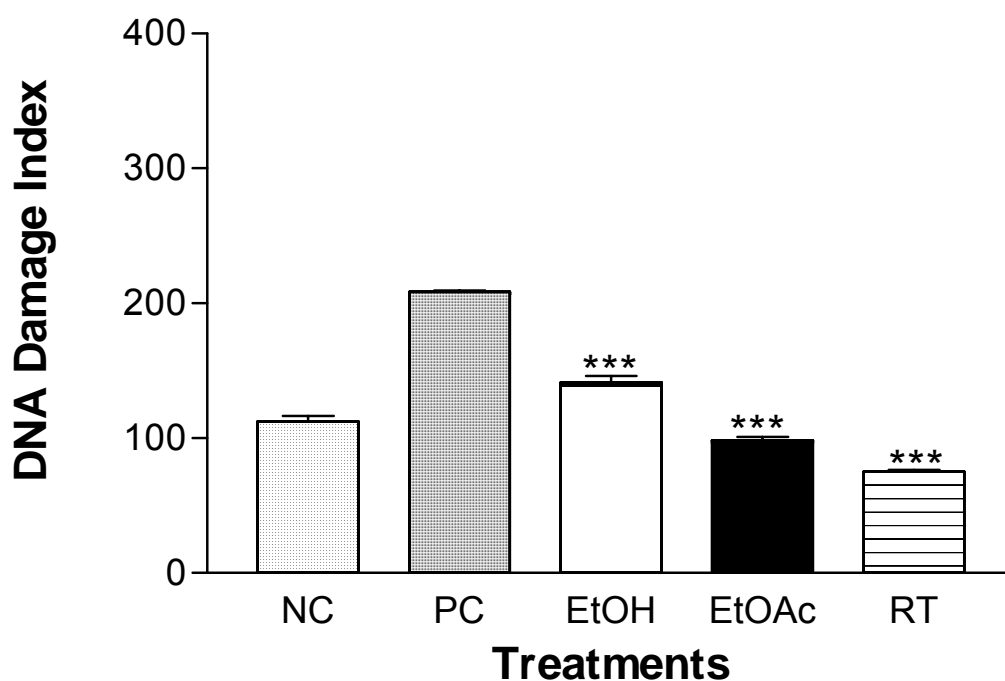
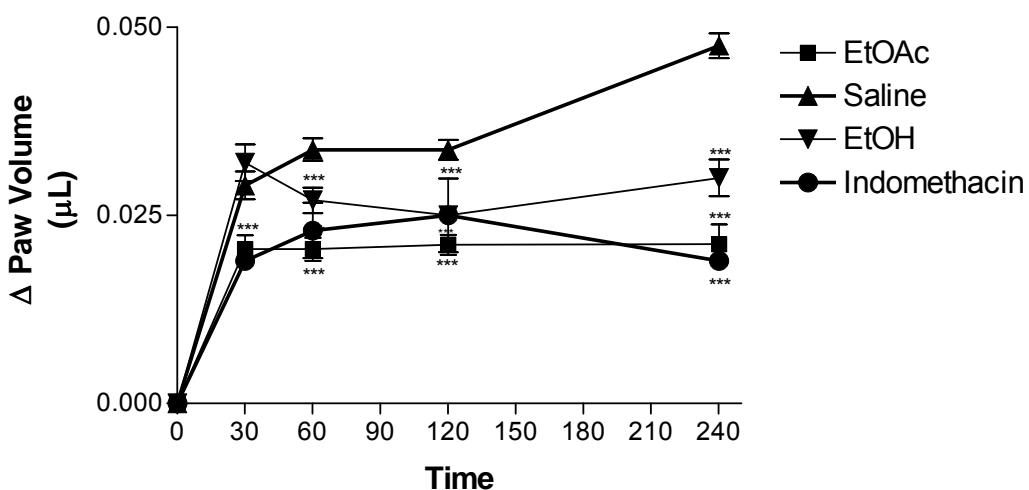


Figure 5

Oral anti-inflammatory activity of polyphenol extracts of *Bidens pilosa* on the carrageenan-induced paw edema in mice. Fasted animals pre-treated with the polyphenol extracts of *Bidens pilosa* (EtAc and EtOH, 150 mg.kg<sup>-1</sup>, via oral) or saline only (50 μL, negative control) or Indometacin (5 mg.kg<sup>-1</sup>, positive control). Paws monitored at 30, 60, 120 and 240min after the flogistic injection (Carrageenan 1% in PBS, 50μL). Paws monitored at 30, 60, 120 and 240min after the flogistic injection (Carrageenan 1% in PBS, 50μL). All values are expressed by means of difference in the volume between the hind right and left paws (μL) ± SD. The results are means values of 10 animals per treatment. (\*\*\*) statistically significant compared to PC group ( $P < 0.001$ ).





## Acknowledgements

R.C.P. (proc. 300718/2003-9) and D.W.F. (proc. 307485/2003-0) are recipients of a research grant from the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil.

## References

1. Halliwell B, Gutteridge JMC, Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. New York : Oxford University Press, 1989 , p.527-543.
2. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. Free Rad. Biol. Med. 2000; 28: 1456-1462.
3. Sies H. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. In: Advances in Pharmacology. New York: Academic Press, 1997, p.645-672.
4. Lin C-C, Ng L-T, Yang JJ, Hsum Y-F. Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of peh-chi-cao in male rats. Am. J. Chin. Med. 2002; 30: 225-234.
5. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazzo P, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. Life Sci. 2002; 70: 1023-1033.
6. Facino RM, Carini M, Aldini G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites. Drugs. 1993; 46:15-21.
7. Hakansson S, Weeds and weed management on arable land: an ecological approach. Cambridge: CABI Publishing, 2003, p.234-241.
8. Almeida ER. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus Editora, 1993, p.126-129.
9. Coimbra R. Manual de Fitoterapia 2 th ed. Belém: Editora Cejup, 1994, p.73-85
10. Singleton VI, Rossi J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. Am. J. Enol. Vit.. 1965; 16: 144-158.

11. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytoth. Res.* 2001; 15:127-130.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Formation of thiobarbituric- acid- reactive substance from deoxyribose in the presence of iron sits- the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Letters.* 1981; 128:347-352.
13. Chen H, Tappel AL. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipidic peroxidation induced by CBrCl<sub>3</sub> in liver, lung, heart, and spleen. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 854-858.
14. Yoshitake I, Ohishi E, Sano J, Mori T, Kubo K. Effects of KF-14363 on liver fibrosis in rats with chronic liver injury induced by carbon tetrachloride. *J. Pharmacobio-Dynamics.* 1991; 14: 679–685.
15. Carbonari AC, Ferreira EA, Rebello JM, Felipe K B, Rossi MH, Felício JD, Wilhelm DF, Yunes RA, Pedrosa RC. Free-radical scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. *Red. Rep.* 2006; 11:124-130.
16. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth. Enzymol.* 1999; 299: 15-27.
17. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.* 1985; 113: 548-55.
18. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
19. Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 19: 271-280.
20. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climet I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 1990; 186:464-478.

21. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantization of levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175:184-191.
22. Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D. Carrageenan-induced Paw Edema in Rat Elicits a Predominant Prostaglandin E2 (PGE2) Response in the Central Nervous System Associated with the Induction of Microsomal PGE2 Synthase-1. *J. Biol.Chem.* 2004; 279: 24866–24872.
23. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996; 20: 933-956.
24. Chiang YM, Chuang DY, Wang SY, Kuo YH, Tsai PW, Shyur LF. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 95:409-19.
25. Valdés HAL, Rego HPL. *Bidens pilosa* Linné. *Rev Cubana Plant Méd.* 2001; 1: 28-33.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Bioch.* 1987; 165: 215-219.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.* 1990; 186:1-85.
28. Smith C, Halliwell B, Aruoma OI. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components, *Food Chem. Toxicol.* 1992; 30:483-489.
29. Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity. *Adv. Enz. Regul.* 1985; 23: 217-237.
30. Gordon MIR. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. London: Elsevier Applied Science, 1990, p.1-18.
31. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96:145-50.

32. Recknagel RO, Glende EA, Dolack JA, Walter RL. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.* 1992; 43:139-154.
33. Jeong-Hyeon K, Kye-Taek L. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* NAKAI protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in the mouse. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 101:205-205.
34. Fountoulakis M, Vera M-C, Cramer F, Boess F, Gasser R, Albertini S, Suter L. Modulation of gene and protein expression by carbon tetrachloride in the rat liver. *Toxicol. App. Pharmacol.* 2002; 183:71-80.
35. Brattin WJ, Glende JEA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Rad. Biol. Med.* 1985; 1: 27-38.
36. Abraham Z, Reznick C, Packer L, Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 1994; 233: 357-363
37. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Rad. Biol. Méd.* 1991; 10:225-242. Borchers AT, Kenn CL, Stern JS, Gershwin. Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 72:339-347.
38. Huang Q, Wu L-J, Tashiro S-I, Gao H-Y, Onodera S, Ikejima T. (+)-Catechin, a ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest. *J. Pharmacol. Sci.* 2005; 98:16-24.
39. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 2004; 96:229-245.

## ANEXO B

### **Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine**

Maicon Roberto Kwiecinski<sup>a</sup>, Karina Bettega Felipe<sup>a</sup>, Tatiana Schoenfelder<sup>a</sup>, Luiz Paulo de Lemos Wiese<sup>a</sup>, Reginaldo Geremias<sup>a</sup>, Jéssica Vanat de Oliveira<sup>a</sup>, Maria Helena Rossi<sup>b</sup>, Edlayne Gonçalez<sup>b</sup>, Joana D'arc Felicio<sup>b</sup>, Rozangela Curi Pedrosa<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.*

<sup>b</sup>*Centro de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.*

#### **Correspondence address**

- Rozangela Curi Pedrosa, Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil; e-mail: roza@ccs.ufsc.br - Tel. (00-55)483331-5048 FAX: (00-55)483331-9672

## Abstract

*Bidens pilosa* Linné (Asteraceae) traditionally used in Brazilian and Caribbean folk medicine was investigated for antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. No toxicity of extracts was observed by the brine shrimp and hemolytic assays, but MTT and NRU cytotoxicity assays indicated that CHCl<sub>3</sub> was effective at low IC<sub>50</sub> (97.0±7.2 and 83.0±5.2µg/mL, respectively). The antitumor potential was evaluated using Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in isogenic Balb/c mice. Doses of 150 mg/kg body weight per day were administered to the animals for nine days beginning 24h after tumor inoculation. Histomorphological evaluations indicated the treatment with CHCl<sub>3</sub> and EtOAc extracts reduced significantly ( $P<0.05$ ) the body weight, abdominal circumference, tumor volume, packed cell volume and viable cell count when compared to EAC control group. Furthermore, nonviable tumor cell count increased significantly ( $P<0.01$ ) only under treatment with CHCl<sub>3</sub> and this was accompanied by a marked percentage increase in life span (54.2%). Biochemical assays revealed this extract was able to decrease serum LDH activity (39.5%) and GSH concentration (94.6%) in ascitic fluid. These data suggest an antitumor activity of *Bidens pilosa* which may rationalize its use in Brazilian folk medicine.

**Keywords:** medicinal plants; *Bidens pilosa*; cytotoxicity; antitumor.

## Introduction

Brazil is a rich source of medicinal plants and a number of plant extracts are used against diseases in folk medicine, but only a few of these have been scientifically investigated. Plant-derived natural products such as flavonoids, terpenes, alkaloids, and so on have received considerable attention in recent years due to their diverse pharmacological properties, including cytotoxic and cancer chemopreventive effects (Roja and Heble, 1994; Di Carlo et al., 1999).

According to Cragg and Newman (2000) over 50% of the drugs in clinical trials for antitumor activity were isolated from natural sources or are related to them. Several

plant products have been tested for antitumor activity and some of these, such as vincristine, taxol, and so on are now available as a drug of choice. The rich and diverse plant resources of the Amazon region are likely to provide effective antitumor agents. One of the best approaches in the search for antitumor agents from plant resources is the selection of plants based on ethnomedical leads, and testing the selected plants' efficacy and safety through modern scientific methods. The study of the traditional indigenous medical practices in Amazonia and Southern Brazil brought to light ethnomedicinal use of *Bidens pilosa* Linné (Asteraceae) to treat certain tumors. This plant is also known as an antitumor agent in Cuba and The Bahamas (Valdés and Rego, 2001).

*Bidens pilosa* is a widely occurring plant specie in the tropical regions and it has several popular names according to the place where it is found (Hakansson, 2003). In Brazil it is generally known as Picão-preto and it is widely used as folk medicine by indigenous people to treat a variety of illnesses including pain, fever, angina, diabetes, edema (water retention), infections and inflammation (Rutter, 1990; Vasquez, 1990; Almeida, 1993; Coimbra, 1994; Duke and Vasquez, 1994; Valdés and Rego, 2001; Franco and Fontana, 2004). In addition, infusions of *Bidens pilosa* are also regarded as useful in the treatment of liver disorders (Chin et al., 1996), jaundice, malaria (Brandão et al., 1997), other parasitoses, and even tumors (Alvarez et al., 1996). In the Amazon region, the plant is usually used in hydro alcoholic solutions (Brandão et al., 1997) and the whole plant is considered useful. Also, *Bidens pilosa* is a popular ingredient in herb teas in China (Chiang et al., 2004).

Phytochemical analyses of *Bidens pilosa* have revealed a broad chemical constitution, and it was previously believed that this fact could explain the plant's application is such varied illnesses (Geissberger and Sequin, 1991). The main compounds already isolated from the plant are polyacetylenic and flavonoidal substances (Brandão et al., 1997). Polyacetylenes are hydrocarbons that strongly absorb long-wave UV radiation, and their medicinal activity is altered upon exposure to light (photoactivation) (Wat et al., 1980). They have been reported to possess cytotoxic effects on parasites (Brandão et al., 1997; Rabe, 1997) and modified cells in culture (Alvarez et al., 1996). The specific flavonoids in *Bidens* have not been fully elucidated, although luteolin (Zhang, 1989;

Ling, 1995), quercetin and some others (Chiang et al., 2004) have been isolated so far. Interestingly, quercetin has been shown to suppress tumors in mice (Devipryia et al., 2006).

Taking these findings into account, the present work was carried out to evaluate the antitumor activity of extracts of the aerial parts of *Bidens pilosa* against the Ehrlich ascites carcinoma in cell culture and in isogenic Balb/c mice.

## **Material and methods**

### *Plant samples and extracts preparation*

*Bidens pilosa* L. was collected at the Jureia Botanical Reserve (Atlantic Forest), São Paulo state, Brazil. The plant was identified by Inês Cordeiro, and a voucher specimen (M.H. Rossi SP384167) was deposited at the Herbário do Estado Eneida P.K. Fidalgo of the Botanical Institute, São Paulo, Brazil. This study was followed the international, Brazilian and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Dried whole plant was powdered and exhaustively extracted with ethanol-water solution (9:1) at room temperature for 3 days (3 times). The solvent was eliminated under low pressure to obtain a dried ethanol extract (EtOH), 8.3% w/w yield of extracts in terms of starting crude material. Three fractions were obtained from EtOH by performing fast silica gel 60 column chromatography with vacuum and applying solvents with different polarities. The fractions were named chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) fraction according to the respective solvent. The extracts were kept at room temperature in a dryer device protected against light.

### *Toxicity study*

#### *Brine shrimp assay*



Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) eggs were hatched in a beaker filled with seawater under constant aeration. After 48 h the nauplii were collected by pipette against a lighted background. Ten nauplii were transferred to each well of 24-well plates containing the samples. The extract concentration ranged from 10 to 1000 µg/ml. The plates were maintained under illumination. Survivors were counted after 24 h of incubation and the percentage of deaths at each dose and in the control (seawater plus vehicle) was determined (Meyer et al., 1982).

#### *Hemolytic assay*

The hemolytic activity of *Bidens pilosa* extracts was investigated following the method proposed by Costa-Lotufo et al. (2002). Each well of 96-well plates received 100 µL of 0.85% NaCl solution containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>. The first well was the negative control and contained only the vehicle (DMSO 10%), while the second well contained 100 µL of test extracts diluted by 50%. The extracts were tested at concentrations ranging from 10 to 2500 µg/mL. The serial dilution continued until the 11<sup>th</sup> well. The last well received 20 µL of 0.1% Triton X-100 (in 0.85% saline) to obtain 100% hemolysis (positive control). Then, each well received 100 µL of a 2% suspension of mouse erythrocytes in 0.85% saline containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>. After incubation at room temperature for 30 min and centrifugation, the supernatant was removed and the released hemoglobin was measured spectrophotometrically by absorbance at 540 nm.

#### *Cytotoxic activity in vitro*

The cytotoxic effect of *Bidens pilosa* extracts and doxorubicin, expressed as cell viability, was assessed using the murine-derived Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) cell line. The EAC cells were grown in suspension in RPMI medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU penicillin/ml and 100 µg streptomycin/ml in a humidified incubator with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. The cells were plated onto 96-well plates at a density of 3X10<sup>4</sup> per mL. The medium was removed 48 h after cell seeding and replaced with one containing test extract (50-1000 µg/mL) or doxorubicin

(0.1-25 µg/mL), initially dissolved in methanol and then diluted in RPMI. The final concentration of methanol in the test and control media was 1%. The cells were exposed for 24 h to the test medium with or without *Bidens pilosa* extracts. Each extract concentration was tested in eight replicates and in three experiments. At the end of incubation, two independent endpoints for cytotoxicity, neutral red uptake and MTT reduction, were evaluated and each one is presented in the form of IC<sub>50</sub>.

#### *Neutral red uptake (NRU)*

Neutral red has been shown to produce changes in the structure of lysosomes as well as bringing about lysosomal enlargement and vacuolation when the cell dies. Consequently, the neutral red uptake assay was proposed by Borefreund and Puerner (1984) for the evaluation of cellular toxicity. Briefly, after 4 h of incubation with serum-free medium containing 50 µg of neutral red/mL, the cells were washed quickly with PBS and then 0.1 mL of an aqueous solution of 1% (v/v) acetic acid: 50% (v/v) ethanol was added to each well to extract the dye. After rapid shaking in a microtitre plate shaker, absorbance was read at 540 nm.

#### *Tetrazolium salt assay (MTT)*

The MTT assay is a test of metabolic competence based upon assessment of mitochondrial performance, relying on the conversion of a yellow dye 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to the purple formazan derivative by mitochondrial succinate dehydrogenase in viable cells (Mosmann, 1983). The cells were incubated with RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM glutamine, 100µ/ml streptomycin and 100 U/mL penicillin at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. For experiments, cells were plated in 96-well plates (10<sup>6</sup> cells/well in 100 µL of medium). After 24 h, the extracts (50 to 1000µM) were added, dissolved in DMSO. Doxorubicin (0.01-0.58 µg/mL) was used as a positive control. At the end of 72 h incubation, the medium in each well was replaced by fresh medium (200µL) containing 0.5mg/mL of MTT. Three hours later, the formazan product of MTT reduction was dissolved in DMSO,

and absorbance was measured using a multi-plate reader. The effect of extracts was determined as the percentage of reduced dye in the control samples at 550 nm.

### *Antitumor activity in vivo*

#### *Animals*

Male isogenic Balb/c mice, weighing  $20 \pm 5$  g, were housed under controlled conditions (12 h light-dark cycle,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 60% air humidity), and had free access to standard laboratory chow and water. All animals were allowed to acclimatize for at least 5 days prior to the first treatment. Animals fasted for 12 h before experiments, but water was allowed *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with legal requirements appropriate to the species (NIH publication #85.23, revised in 1985) and with the authorization of the local Ethics Committee (365/CEUA and 23080.016010/2005-32/UFSC).

#### *Experimental protocol*

The animals were divided into 7 groups (n=12). The normal group was not inoculated with tumor cells, while 6 groups were injected with EAC cells (0.2 mL of  $5 \times 10^6$  cells/mice) intraperitoneally. This was taken as day zero and the experimental treatment started 24 h later. From the first day, 50 $\mu\text{L}$ /mouse (per day) of sterile saline was administered intraperitoneally to the negative control group (EAC-bearing mice). EtOH, MeOH, EtOAc or  $\text{CHCl}_3$  at doses of 150 mg  $\text{kg}^{-1}$  were administered each day to the treated groups and the standard drug doxorubicin (DOX, 1.2 mg  $\text{kg}^{-1}$  per day) was administered to each animal from the positive control group. The pharmacological treatment lasted 9 days. Twenty-four hours after the last dose, six mice from each group were sacrificed for the study of THE antitumor activity. The rest of the animal groups were kept to check the survival time of EAC tumor-bearing hosts.

### *Tumor growth response*

The antitumor effects of the extracts were determined by the change in body weight and abdominal circumference, mean survival time (MST) and percentage increased life span (% ILS). The MST of each group containing six mice was identified by recording the mortality on a daily basis for 30 days, and the % ILS was calculated using the following equation (Mazumder et al., 1997):

$$\text{MST} = (\text{Day of first death} + \text{Day of last death}) / 2$$

$$\text{ILS (\%)} = [(\text{Mean survival time of treated group} / \text{mean survival time of control group}) - 1] \times 100$$

The effects of *Bidens pilosa* extracts were also assessed by the determination of the body weight, tumor volume, packed cell volume and viable and nonviable tumor cell count of EAC-bearing mice by the Trypan blue incorporation method (Freshney, 1999).

### *Assay for lactate dehydrogenase release*

The release of lactate dehydrogenase (LDH: EC 1.1.1.27) enzyme is a well-known method for the quantification of cell damage. The enzymatic activity was estimated in serum by the method of Kornberg (1955). The reaction mixture consisted of 0.1 mL of nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt (NADH, 0.02M), 0.1 mL of sodium pyruvate (0.01 M), plus 0.1 mL of serum, and this was made up to 3 mL with sodium phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4). The change in the absorbance at 340 nm was recorded at 30s intervals over 3 min and the enzyme activity was calculated using a molar extinction coefficient of  $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  before being expressed as IU/L.

### *Reduced glutathione assay (GSH)*

The ascitic GSH was measured according to Anderson (1985). Immediately after ascitic sample collection, acid homogenates were obtained by the addition of 12% trichloroacetic acid (1:4, v:v), and then centrifuged at 15000g for 5 min. Supernatants from the acid extracts were added to 0.25 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) in 0.1

M potassium phosphate buffer pH 8.0, and the formation of thiolate anion was immediately determined.

### *Statistical analysis*

All the biochemical parameters mentioned above were measured in triplicate. Data are presented as means  $\pm$  SD and were analyzed by ANOVA complemented with the Tukey-Kramer multiple comparison test. *P*-values less than 5% ( $p < 0.05$ ) were considered to be statistically significant.

## **Results**

### *Toxicity study*

In order to verify whether the toxicity of *Bidens pilosa* is related to membrane disruption or unspecific mechanisms, different *Bidens pilosa* extracts and doxorubicin were tested for their ability to induce the lysis of mouse erythrocytes and *Artemia salina* death. The results obtained from the hemolytic and microcrustaceous assays are presented in Table 1. These show that none of the examined extracts nor doxorubicin exhibited important unspecific toxicity.

### *Cytotoxic activity in vitro*

The cytotoxicity of *Bidens pilosa* extracts and doxorubicin on the Ehrlich tumor cell line was evaluated using the specific mitochondrial and lysosomal toxicity measured by MTT and NRU assays, whose results are presented in Table 1. The  $\text{CHCl}_3$  extract was the most active in these assays, exhibiting lower  $\text{IC}_{50}$  values, around  $83.0 \pm 5.2$  and  $97.0 \pm 7.2$   $\mu\text{g/mL}$  in the NRU and MTT assay, respectively. However, doxorubicin showed lowest  $\text{IC}_{50}$  in the NRU and MTT assays ( $0.6 \pm 0.1$  and  $0.4 \pm 0.1$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively). The EtOAc extract also possessed cytotoxic activity, although only extracts with an  $\text{IC}_{50}$  value lower

than 200 µg/mL were considered active (Suffines and Pezzuto, 1990). The other extracts examined were considered inactive by these assays.

#### *Antitumor activity in vivo*

The CHCl<sub>3</sub> extract showed significant antitumor activity in EAC-bearing mice. The effects of *Bidens pilosa* extracts (at a dose of 150 mg kg<sup>-1</sup>) on body weight, abdominal circumference, mean survival time, tumor volume, packed cell volume, tumor cell count (viable and non viable cells) are shown in Table 2. Treatment with CHCl<sub>3</sub> and EtOAc extracts reduced significantly ( $P<0.05$ ) the tumor body weight, abdominal circumference, tumor volume, packed cell volume and viable cell count when compared to the EAC control group. Furthermore, nonviable tumor cell count increased significantly ( $P<0.01$ ) when compared to the EAC-bearing mice control group, but only when the treatment was done with CHCl<sub>3</sub>.

In the EAC control group, the mean survival time was 11.5± 0.1 days, while it increased to 19.5± 0.1, 15.0± 0.1 and 15.0±0.2 with CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and EtOH treatment, respectively, whereas the standard drug doxorubicin-treated group had a mean survival time of 30.0 days.

The effect of the treatments with *Bidens pilosa* CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, EtOH, and MeOH extracts and DOX on percentage life span of EAC-bearing mice is shown in Figure 1. ILS% increased significantly ( $P<0.001$ ) with CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and EtOH (54.2, 33.4 and 21.3 %, respectively) when compared to the EAC control group, whereas DOX and normal groups had ILS = 100%. There was no response in the EAC-bearing group treated with MeOH extract.

Ehrlich ascites carcinoma injection alone in mice led to a marked increase in serum LDH activity (273.3%) when compared to the normal group. CHCl<sub>3</sub> and EtOAc *Bidens pilosa* treatment resulted in a significant ( $P<0.01$ ) decrease in the activity of this enzyme, at 39.5 and 27.2% respectively, when compared to EAC-bearing mice (Figure 2). Remarkably, DOX administration protected against the LDH rise as evidenced by the serum enzyme activity with a reduction of 54.5%. There was no change in the LDH activity in the EAC-bearing group treated with EtOH or MeOH extracts.

Figure 3 shows the levels of GSH detected in the ascitic tumor fluid of EAC-bearing mice with different treatments. The GSH content in the EAC-bearing mice control group was  $16.6 \pm 0.3 \mu\text{mol.g}^{-1}$ . The administration of *Bidens pilosa* extracts ( $\text{CHCl}_3$  and EtOAc) lead to a 94.6 and 50.1% depletion of GSH in the tumor fluid of treated animals when compared to the negative control group ( $P < 0.001$ ). The results obtained when the animals were treated with EtOH or MeOH did not differ significantly from those of the EAC-bearing mice control group. Since the standard drug doxorubicin caused total inhibition of tumor development in inoculated mice it was not possible to evaluate the GSH ascitic level in this group.

## Discussion and Conclusions

Drug discovery from medicinal plants has played an important role in the treatment of cancer and, indeed, most new clinical applications of plant secondary metabolites and their derivatives over the last half century have been directed towards combating cancer (Butler, 2004).

In this study, the anticancer potential of four *Bidens pilosa* extracts from Brazilian folk medicine was investigated. The ability of these extracts to inhibit Ehrlich tumor cells growth and/or induce cell death was evaluated and measured by MTT and NRU assays. In addition, their toxicity on *Artemia salina* nauplii and hemolytic activity on mouse erythrocytes were also evaluated.

The  $\text{CHCl}_3$  extract showed important activity in the MTT and NRU assays indicating the presence of some cytotoxic compounds in this extract, and these could be responsible for the strong *in vitro* activity. Interestingly, in the present study the EtOAc extract was two to three times less active than that obtained with  $\text{CHCl}_3$ . Previous studies have demonstrated the cytotoxic activity of *Bidens pilosa* extracts against HeLa and KB carcinoma cell lines in culture and this same profile of response was reported (Sundararajan et al, 2006).

Despite the MTT and NRU assays results, none of the tested *Bidens pilosa* extracts possessed any activity against *Artemia salina* nauplii or against mouse erythrocytes.

These data suggest that the cytotoxic activity was not related to lytic properties or membrane instability induced by the extracts (Costa-Lotufo et al., 2005).

Finally, this study revealed that 2 extracts of *Bidens pilosa*, a plant used in Brazilian folk medicine for the treatment of tumors, presented some cytotoxic activity. Further studies will be necessary for an improved characterization of this event in more extensive biological evaluations. It is possible that this activity is related to another mechanism of toxicity such as mitochondrial or lysosomal interactions since the results were obtained by the MTT and NRU assays. In this sense, the present study was carried out also to evaluate the antitumor effect of *B.pilosa* extracts in mice inoculated with the same kind of tumor, the Ehrlich ascites carcinoma.

In EAC-bearing mice, a regular rapid increase in the ascites tumor volume was noted. Ascites fluid is the direct nutritional source for the tumor cells and a rapid increase in the ascitic fluid with tumor growth would be a means to meet the nutritional requirement of these cells (Prasad and Giri, 1994). The treatment performed with the CHCl<sub>3</sub> extract decreased the tumor volume and tumor cell count, and increased the percentage of Trypan blue-positive stained dead tumor cells. The most reliable criterion for judging the value of any antitumor drug is the prolongation of the life span of animals (Clarkson and Burchenal, 1965). The CHCl<sub>3</sub> extract increased the percentage of life span (%ILS) as shown in Figure 1. It was found that this extract increases the life span of EAC-bearing mice by decreasing the nutritional fluid volume and combating tumor growth. It is important to note that doxorubicin, the drug employed as the standard, caused the total inhibition of tumor development.

Doxorubicin or hydroxyl daunorubicin is an anthracycline antibiotic produced by the fungus *streptomyces peucetius* that damages DNA by intercalation of the anthracycline portion, metal ion chelation, or by generation of free radicals. Doxorubicin has also been shown to inhibit DNA topoisomerase II, which is critical to DNA function, and cytotoxic activity is not specific to any phase of the cell cycle (Jain, 2000). The treatment of tumor-inoculated mice with doxorubicin caused a strong reduction in plasma LDH activity when compared to the negative control (Figure 2).

LDH isoforms are present in practically all the cells of humans and mice. These enzymes catalyze the pH-dependent interconversion of lactate-pyruvate (Arguello et al.,



1996). Cancer cells produce and retain LDH to maintain the growth of the tumor (Wolf et al., 1973). The increased serum LDH level is well known as a common characteristic in humans and animals with malignant tumors (Field et al., 1966), and it is believed that this elevation is caused by enzyme leakage from dead cancer cells occurring during high tumoral cell turnover (Steel, 1967; Epstein et al., 1988). In 1977, Pesce et al. made the observation that human LDH isoenzymes could be identified against a background of mouse LDH isoenzymes. They showed that human larynx and bladder carcinoma cells, implanted subcutaneously in nude mice could release enzymes into the host's blood circulation, and that these proteins could be used as markers of the chemotherapeutic response. In fact, data obtained through evaluating the LDH activity in EAC-inoculated mice confirmed the ability of this kind of tumor to induce a strong increase in the enzyme activity, since the levels were increased about 4-fold when compared to the normal control group (Figure 2). It was particularly interesting to observe that the tumor retraction caused by the standard drug doxorubicin was associated with a respective decrease in the serum LDH activity. In this experimental evaluation doxorubicin appeared to present itself as a cure for Ehrlich carcinoma and its administration to mice under the indicated dose regimen caused a 54.7% decrease in the serum LDH activity when compared to the EAC-group, suggesting that these levels became normalized. When the LDH activity was measured in animals treated with the  $\text{CHCl}_3$  extract a significant difference in this parameter was observed when compared to the EAC-group. Since the  $\text{CHCl}_3$  extract was able to decrease LDH it appears to have an antitumor effect.

Several researchers have already tried to correlate the levels of GSH with tumors. It has been reported, for instance, that many tumors can be considered GSH-dependent and it is suspected that cancer cells use GSH for protection against damage during oxidative stress (Shimura et al., 2000). Increased levels of GSH in tumors are related to anti-chemotherapeutic effects and multidrug resistance (Hamilton et al., 1985; Shimura et al., 2000). Also, some studies have shown an increase in the sensitivity of these cells to cytotoxic agents through GSH depletion approaches (Ozols et al. 1987; Mitchell et al., 1989). It is believed to be possible to predict the efficacy of chemotherapy if the content of tumoral GSH is available for monitoring by any method (Shimura et al., 2000). Data

obtained on the fluid of EAC-inoculated mice revealed that the administration of *Bidens pilosa* EtOH extract failed to decrease the GSH levels in the tumoral tissue in treated mice when compared to non treated mice (negative control). On the other hand, the administration of the CHCl<sub>3</sub> extract, which is supposed to possess a greater concentration of polyacetylene compounds with cytotoxic activity (Brandão et al., 1997) did cause a marked decrease in GSH levels when compared to the EAC-group. If we accept that the efficacy of chemotherapy is associated with a reduction of GSH ascitic content we could suppose that the CHCl<sub>3</sub> extract has an anti-proliferative effect.

In conclusion, our study suggests that the CHCl<sub>3</sub> extract possesses antitumor activity, since it displayed important cytotoxicity *in vitro* (MTT and NRU assays), increased the life span of EAC-tumor bearing mice, and decreased their serum LDH activity and the GSH content of the tumor fluid. Thus, considering previous reports about *Bidens pilosa* cytotoxicity, this biomorphological and biochemical study provided additional information about the therapeutic virtues of this plant, which are apparently well in line with its antitumor properties as reported by Brazilian popular medicine. Further studies with more isolated or purified *Bidens pilosa* metabolites are considered relevant to demonstrate their efficacy and investigations are in progress in our laboratory to try to identify the active principles involved in this antitumor activity.

### **Acknowledgement**

R.C.P. (proc. 300718/2003-9) is a recipient of a research grant from the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil.

### **References**

Almeida, E.R. de. 1993. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo, Brazil: Hemus Editora.

Alvarez, L., Marquina, S., Villarreal, M.L., Alonso, D., Aranda, E., Delgado, G. 1996. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. *Planta Med.*, 62, 355-357.

Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.*, 113, 548-55.

Arguello, F., Sterry, J.A., Zhao, Y.Z., Alexander, M.R.A., Shoemaker, R.H. 1996. Two serologic markers to monitor the engraftment, growth, and treatment response of human leukemias in severe combined immunodeficient mice. *Blood*, 87, 4325-4332.

Borefreund, E., Puerner, J.A. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). *J. Tissue Cult. Methods*, 9, 7-9.

Brandão, M.G.L., Krettli, A.U., Soares, L.S.R., Nery, C.G.C., Marinuzzi, H.C. 1997. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 57, 131-138.

Butler, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.

Chiang, Y.M., Chuang, D.Y., Wang, S.Y., Kuo, Y.H., Tsai, P.W., Shyur, L.F. 2004. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 409-419.

Chin, H.W., Lin, C.C., Tang, K.S. 1996. The hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine ham-hong-chho in rats. *Am J Chin Med.*, 24, 231-240.

Clarkson, B.D., Burchenal, J.H. 1965. Preliminary screening of antineoplastic drugs. *Prog. Clin. Cancer*, 1, 625-629.

Coimbra, R. 1994. *Manual de Fitoterapia* 2<sup>nd</sup> ed. Belém, Brazil: Editora Cejup.

Costa-Lotufo, L.V., Cunha, G.M.A., Farias, P.A.M, Viana, G.S.B., Cunha, K.M.A. , Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Gramosa, N.V., Rao, V.S.N. 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*, 40, 1231-1234.

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2000. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9, 1-15.

Devipriya, S., Ganapathy, V., Srinivasulu, C., Shyamaladevi, C.S. 2006. Suppression of tumor growth and invasion in 9,10 dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by the plant bioflavonoid quercetin. *Chemico-Biological Interactions*, 162, 106-113.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capassao, F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65, 337-353.

Duke, J., Vasquez, R. 1994. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.

Epstein, A.L., Chen, F.M., Taylor, C.R. 1988. A novel method for the detection of necrotic lesions in human cancers. *Cancer Res.*, 48, 5842.

Field, M., Block, J.B., Levin, R., Rall, D.P. 1966. Significance of blood lactate elevations among patients with acute leukemia and other neoplastic proliferative disorders. *Am. J. Med.*, 40, 528.

Franco, I.J., Fontana, V.L. 2004. *Ervas e plantas: a medicina dos simples*. 9<sup>th</sup> ed. Erechim, RS, Brazil: Editora Livraria Vida.

Freshney, R. I. 1999. *Freshney's Culture of animal cells – a multimedia guide*. New York, CD-ROM.

Geissberger P., Sequin, U. 1991. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Trop.*, 48, 251-261.

Hakansson, S. 2003. *Weeds and weed management on arable land: an ecological approach*. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing.

Hamilton, T.C., Winker, M.A., Louie, K.G., Batist, G., Behrens, B.C., Tsuruo, T., Grotzinger, K.R., Mckoy, N.M., Young, R.C., Ozols, R.F. 1985. Augmentation of adriamycin, melphalan, and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2583-2586.

Jain, D. 2000. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *J. Nucl. Cardiol.*, 1, 53-62.

Kornberg, A. 1995. Lactic dehydrogenase of muscle. *Methods in Enzymology*, 2, 441-443.

Ling, Y.R. 1995. *A New Compendium of Materia Medica*. Science Press, Beijing.

Mazumder, U.K., Gupta, M., Maiti, S., Mukherjee, M. 1997. Antitumor activity of *Hygrophilaspinoso* on Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180 induced mice. Indian J. Expt. Biol., 35, 473-477.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobs, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med., 45, 31-34.

Mitchell, J.B., Cook, J.A., DeGraff, W., Glatstein, E., Russo, A. 1989. Glutathione modulation in cancer treatment: Will it work? Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 16, 1289-1295.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 16, 55-63.

Ozols, R.F., Louie, K.G., Plowman, J. Behrens, B.C., Fine, R.L., Dykes, D., Hamilton, T.C. 1987. Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer *in vitro* and in tumor-bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione. Biochem. Pharmacol., 36, 147-153.

Prasad, S.B., Giri, A. 1994. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. Indian J. Expt. Biol., 32, 155-162.

Pesce, A.J., Bubel, H.C., DiPersio, L., Michael, J.G. 1977. Human lactic dehydrogenase as a marker for human tumor cells grown in athymic mice. Cancer Res., 37, 1998.

Rabe, T. 1997. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. J Ethnopharmacol., 56, 81-87.

Roja, G., Heble, M.R. 1994. The quinoline alkaloid Camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nathapodytes foetida*. *Phytochemistry*, 36, 65-66.

Rutter, R.A. 1990. Catálogo de plantas utiles de la Amazonia Peruana. Yarinacocha, Peru: Instituto Linguistico de Verano.

Shimura, N., Musya, A., Hashimoto, T. Kojima, S., Kubodera, A., Sasaki, T. 2000. Usefulness of <sup>99</sup>Tc-d,1 HMPAO for estimation of GSH content in tumor tissues. *Nuclear Medicine & Biology*, 27, 577-580.

Steel, G.G. 1967. Cell loss as a factor in the growth rate of human tumors. *Eur. J. Cancer*, 3, 381.

Suffiness, M., Pezzuto, J.M. 1990. Assays related to cancer drug discovery. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, 6, 71-133.

Sundararajan, P., Dey, A., Smith, A., Doss, A.G., Rajappan, M., Natarajan, S. 2006. Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. *African Health Sciences*, 6, 1.

Valdés, H.A.L., Rego, H.P.L. 2001. *Bidens pilosa* Linné. *Rev Cubana Plant Méd.*, 1, 28-33.

Vasquez, M.R. 1990. Useful plants of Amazonian Peru. Second Draft. Filed with USDA's National Agricultural Library. USA.

Wat, C.K., Johns, T., Towers, G.H.N. 1980. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2, 279-290.

Wolf, P.L., Williams, D. 1973. *Practical Clinical Enzymology*. New York, John Wiley.

Zhang, J. 1989. Effects of *Bidens bipinnata* and *Bidens parviflora* on platelet aggregation. Hebei Medical Journal, 11, 241-242.



## Figure captions

Table 1. The toxicity of *Bidens pilosa* extracts and doxorubicin measured by Brine shrimp toxicity ( $LC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ), hemolytic activity ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) and *in vitro* cytotoxicity to EAC cells measured by MTT ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) and NRU ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) assays.

Table 2. Effect of the extracts of *Bidens pilosa* (EtOH, MeOH, EtOAc,  $\text{CHCl}_3$ ,  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and doxorubicin (DOX,  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) on increase in body weight and abdominal circumference, mean survival time (MST), tumor volume, packed cell volume, and viable and nonviable tumor cell count of EAC-bearing mice and normal mice.

*Note:* Data are expressed as the mean of 6 mice  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*) (\*\* and \*) significantly different in extracts-treated groups compared with the EAC-bearing mice ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ).

Figure 1. Effect of extracts of *Bidens pilosa* ( $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, EtOH, MeOH) on increased life span (ILS %) in EAC-bearing mice treated with saline v.o. (negative controls), different plant extracts ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or doxorubicin (DOX,  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). All values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (\*\*\*) statistically significant compared to EAC-bearing mice ( $P < 0.001$ ).

Figure 2. Effect of extracts of *Bidens pilosa* ( $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, EtOH, MeOH) on serum activity of LDH in EAC-bearing mice treated with saline v.o. (negative controls), plant extracts ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or doxorubicin (DOX,  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). All values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (\*\*\*) and (\*\*) statistically significant compared to EAC-bearing mice ( $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ ).

Figure 3. Effect of extracts of *Bidens pilosa* ( $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, EtOH, MeOH) on ascitic GSH concentration ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) in EAC-bearing mice treated with saline v.o. (negative controls), plant extracts ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or doxorubicin (DOX,  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). All values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (\*\*\*) statistically significant compared to EAC-bearing mice ( $P < 0.001$ ).

Table 1

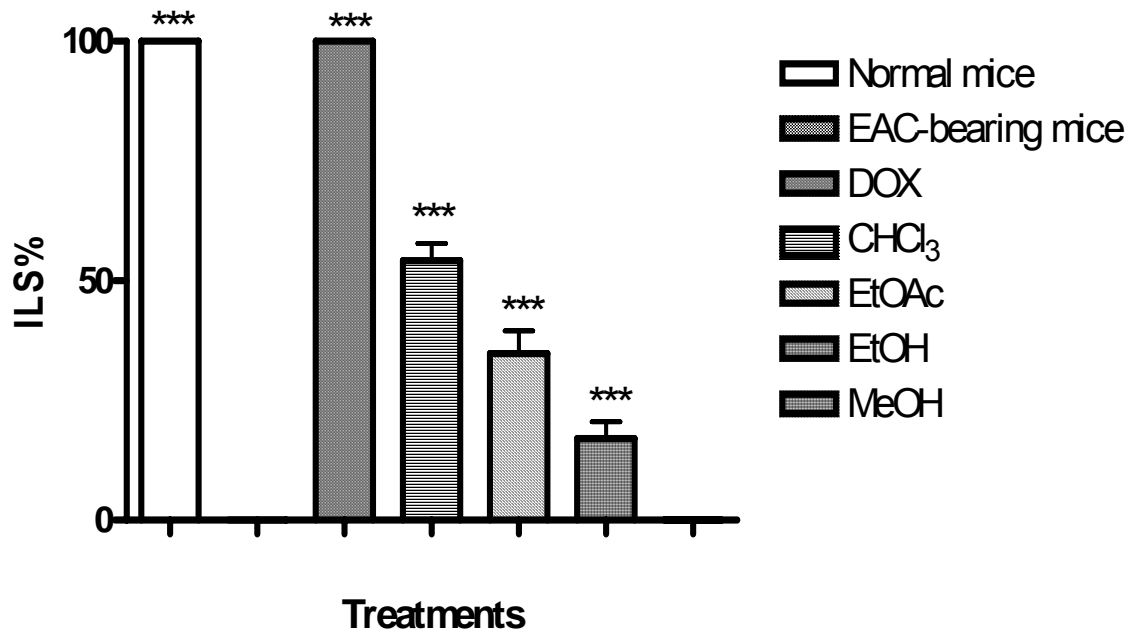
<i>B. pilosa</i> extracts	Brine shrimp toxicity	Hemolytic activity	NRU	MTT
EtOH	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
MeOH	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
EtOAc	> 1000	> 1000	234.0±8.7	467.3±6.9
CHCl <sub>3</sub>	> 1000	> 1000	83.0±5.2	97.0±7.2
DOX	> 1000	> 1000	0.6±0.1	0.4±0.1

\* The toxicity of *Bidens pilosa* extracts and doxorubicin measured by Brine shrimp toxicity (LC<sub>50</sub>, µg/mL), hemolytic activity (IC<sub>50</sub>, µg/mL) and *in vitro* cytotoxicity to EAC cells measured by MTT (IC<sub>50</sub>, µg/mL) and NRU (IC<sub>50</sub>, µg/mL) assays.

Table 2

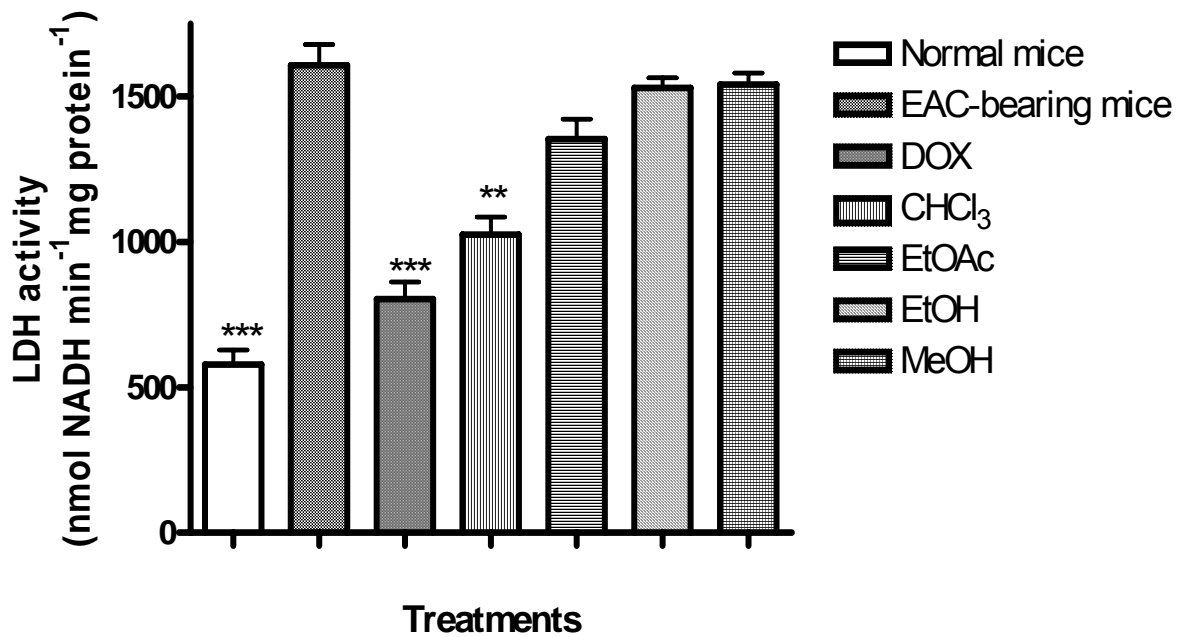
Parameter	Normal mice	EAC Control (5x10 <sup>6</sup> cells)	DOX	CHCl <sub>3</sub>	EtOAc	EtOH	MeOH
Increase in Body weight (g)	1.7 ± 0.5***	8.1 ± 1.7	2.2 ± 0.8***	6.09±1.3*	6.1 ± 1.1*	7.7 ± 2.0	7.5 ± 2.2
Increase in Abdominal circumference (cm)	0.2 ± 0.1***	2.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1***	1.8 ± 0.3*	1.2 ± 0.4*	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.4
Tumor volume (mL)	–	10.4 ± 2.1	–	5.8±2.7**	7.1 ± 1.9*	9.1 ± 0.9	10.1±0.9
Packed cell volume (mL)	–	3.4 ± 0.5	–	2.4 ± 0.4	2.1 ± 0.3	3.03±0.4	3.1 ± 0.5
Viable tumor cell count (10 <sup>7</sup> cells/mL)	–	15.9 ± 3.4	–	8.6±2.4*	11.2±2.5*	11.8±3.0*	13.0±2.0
Nonviable tumor cell count (10 <sup>7</sup> cells/mL)	–	1.1 ± 0.8	–	5.0±0.3**	2.8±0.5	2.8±0.3	1.8±0.2
MST (days)	30.0***	11.5 ± 0.1	30.0***	19.5±0.1**	15.0±0.1*	15.0±0.2*	12.0±0.4

Figure 1



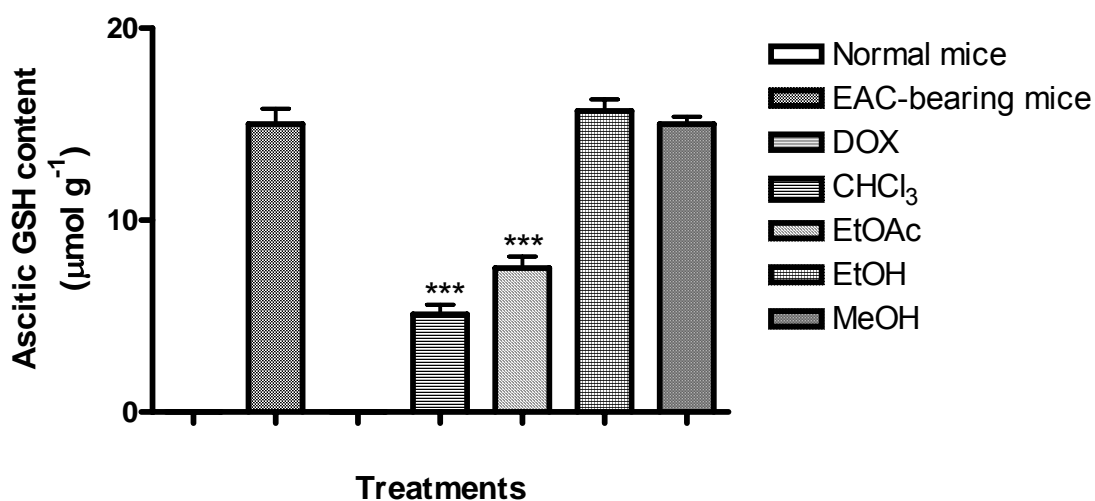
\* Effect of extracts of *Bidens pilosa* (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, EtOH, MeOH) on increased life span (ILS %) in EAC-bearing mice treated with saline v.o. (negative controls), different plant extracts (150 mg kg<sup>-1</sup>) or doxorubicin (DOX, 1.2 mg kg<sup>-1</sup>). All values are expressed as means ± SEM (n = 6). (\*\*\*) statistically significant compared to EAC-bearing mice (P < 0.001).

Figure 2



\* Effect of extracts of *Bidens pilosa* (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, EtOH, MeOH) on serum activity of LDH in EAC-bearing mice treated with saline v.o. (negative controls), plant extracts (150 mg kg<sup>-1</sup>) or doxorubicin (DOX, 1.2 mg kg<sup>-1</sup>). All values are expressed as means ± SEM (n = 6). (\*\*\*) and (\*\*) statistically significant compared to EAC-bearing mice ( $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ ).

Figure 3



\* Effect of extracts of *Bidens pilosa* (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, EtOH, MeOH) on ascitic GSH concentration (µmol.g<sup>-1</sup>) in EAC-bearing mice treated with saline v.o. (negative controls), plant extracts (150 mg kg<sup>-1</sup>) or doxorubicin (DOX, 1.2 mg kg<sup>-1</sup>). All values are expressed as means ± SEM (n = 6). (\*\*\*) statistically significant compared to EAC-bearing mice ( $P < 0.001$ ).