



Universidade Federal de Pelotas
Instituto de Química e Geociências
Programa de Pós Graduação em Química

Viviane Maciel da Silva

**Avaliação da Atividade Antitumoral, e Caracterização Parcial
dos Extratos Metanólicos da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn**

Dissertação de Mestrado

Pelotas
2009

Viviane Maciel da Silva

Avaliação da Atividade Antitumoral, e Caracterização Parcial
dos Extratos Metanólicos da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Química. Área de Concentração:
Processos Aplicados aos Recursos
Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Pelotas
2009

Viviane Maciel da Silva

Avaliação da Atividade Antitumoral, e Caracterização Parcial dos Extratos Metanólicos da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. 2009.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Pelotas.
Programa de Pós-Graduação em Química. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Francisco Augusto Burkert Del Pino

Co-orientadora: Fátima Tereza Alves Beira

1. Plantas medicinais. 2. Cancerosa. 3. Ácidos Graxos.
4. MCF-7. 5. Citotoxicidade. 6. Ação Antitumoral.

Viviane Maciel da Silva

Avaliação da Atividade Antitumoral, e Caracterização Parcial dos Extratos Metanólicos da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn

Dissertação defendida em 23/06/2009 e aprovada pela banca examinadora:

Orientador: _____

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino – UFPel

Examinadora: _____

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Alves Rodrigues – UFPel

Examinador: _____

Prof. Dr. Luciano do Amarante – UFPel

Suplente: _____

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund – UFPel

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

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus, por me oferecer uma vida maravilhosa.

Aos meus pais pelo apoio incondicional.

Ao meu esposo Paulo Roberto Faber Tavares Jr. por me acolher nas diversas vezes em que precisei de um ombro, ou naquelas em que hesitei seguir em frente.

Ao meu terapeuta Ricardo Silva, pelas sacudidas e puxões de orelha que me impulsionaram.

Ao professor Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino, por me ensinar autonomia e dedicação à pesquisa. Sua orientação ao longo de todos estes anos me fez crescer muito como profissional.

Ao professor Dr. Geonir Machado Siqueira, pelo apoio desinteressado, e pelas diversas vezes em que me atendeu com boa vontade quando bati sua porta para pedir esclarecimentos ou equipamentos, sempre gentilmente emprestados.

À professora Dr^a. Maria Regina Rodrigues. Bondosa, confiante, grande pesquisadora. Sou honrada em ter sido sua aluna.

À querida colega mestranda Anaí Duarte, que tão carinhosamente apoiou-me e comigo compartilhou seu conhecimento e amizade ao longo de todos estes anos de UFPel.

Aos colegas de laboratório Bruna Coi dos Santos, Karine Begnini, Fernanda Nedel, Juliana Saraçol, Juliana Hartleben, Samuel Ribeiro, Lara Loguercio, Gabriela Hörnke Alves membros dos Laboratórios de Bioquímica Clínica, Cultivo Celular, Materiais e Catálise, e de Biocombustíveis da Universidade Federal de Pelotas, por terem dividido comigo seus conhecimentos, sua dedicação e em algumas vezes suas férias e horários de descanso.

Aos amados colegas Msc. Elizabeth Schegler, Msc. Maikel Goularte, Mateus Lopes e Paula Montagner, cuja convivência muito me ensinou, além é claro de alegrar minha estada no campus, com boa conversa, música e mate novo.

À equipe do Instituto de Instituto de Química e Geociências, coordenada pela Prof^a. Dra. Irene Terezinha Garcia, que auxiliaram sempre que possível no desenvolvimento do projeto.

Ao prof. Dr. Rafael Guerra Lund, amigo de longa convivência e bons conselhos, sei que posso contar com você. Admiro muito sua competência.

À Prof^a Dra. Fátima Tereza Alves Beira minha co-orientadora, agradeço muito por sua amizade e receptividade em seu laboratório. Me fez sentir em casa e parte de sua equipe.

Ao Sr. Hélio pela amizade, carinho e ajuda na coleta das minhas plantinhas, também a ele minhas desculpas pelas espinhadas que elas causaram ao serem transportadas. Sua alegria é responsável por tornar nossos dias nos laboratórios bem mais agradáveis.

À professora Dr^a Isabel dos Santos, agradeço a colaboração com o desenvolvimento da segunda metade dos ensaios biológicos. Mas acima disso, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa demonstrada diariamente.

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.

Resumo:

A atividade citotóxica dos extratos brutos da *Jodina rhombifolia* foi atestada frente à linhagem tumoral mamária e a atividade específica aumentada, após o fracionamento destes em resina Sephadex LH-20, no qual três das dezoito frações obtidas mostraram valores expressivos de inibição. As análises de caracterização química parcial do Infravermelho e da Cromatografia Gasosa demonstram que os principais grupos orgânicos encontrados nas amostras são ácidos graxos.

Abstract:

The cytotoxic activity of the *Jodina rhombifolia* raw extracts was tested against to the mammary tumor cell lineage and the specific activity increased, after the fractionation of these in Sephadex LH-20 resin, in which three of the eighteen fractions obtained showed significant inhibition values. The analysis of partial chemical characterization of infrared and gas chromatography showed that the main groups found in organic samples are fatty acids.

A natureza tornou os brasileiros íntimos de todas as cores. Ela nos ensinou a descobrir em nós a graça renovadora da mistura, o convívio harmonioso das diferenças. As cores são a melhor tradução da nossa diversidade. O Brasil é de todos os tons. De todas as culturas. De todas as crenças. (...) Em harmonia com a natureza celebramos, juntos, nossos sonhos e as cores que só as palavras não conseguem mostrar.

Sumário:

I) Introdução	1
1.1) Medicamentos derivados de produtos naturais.....	1
1.2) Plantas utilizadas na medicina popular	4
1.3) Fármacos antitumorais derivados de plantas.....	6
1.4) A Espécie <i>Jodina rhombifolia</i> Hook. et Arn	9
1.5) Cromatografia em coluna utilizando resina de Sephadex – LH20.....	11
1.5.1) Cromatografia sólido-líquido em coluna.....	11
1.5.2) A coluna.....	11
1.5.3) Processo de adsorção em coluna.....	11
1.5.4) Separação por adsorventes	12
1.5.5) Reações na coluna	12
1.5.6) Escolha dos eluentes.....	13
1.5.7) Preenchimento da coluna	14
1.5.8) Resina de Sephadex LH-20	14
1.6) Câncer.....	16
1.6.1) Início de um comportamento celular anormal.....	16
1.6.2) Neoplasia mamária.....	17
1.6.3) Morte celular programada	18
1.7) Linhagens celulares cultivadas	25
1.7.1) Linhagem celular de adenocarcinoma humano de mama – MCF-7	25
1.7.2) Linhagem celular de fibroblastos – NIH/3T3	25
1.7.3) Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon, grau II – HT-29	25
1.7.4) Linhagem celular tumoral de carcinoma epidermóide de boca – KB	26
II. Objetivos	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
III. Material e Métodos.....	28
3.1) Material vegetal.....	28
3.2.1) Processo de maceração dinâmica	30
3.4) Diluição dos extratos.....	35
3.4.1) Diluição 1 – extrato bruto	35

3.4.2) Diluição 2 – frações da coluna	35
3.5) Técnicas de cultivo celular	37
3.5.1) Descongelamento	37
3.5.2) Cultura	38
3.5.3) Contagem celular	39
3.6) Ensaio biológico para extrato bruto e frações – Citotoxicidade	40
3.7) Ensaio biológico das frações ativas – Mecanismo de ação	42
3.7.1) Cultura de células	42
3.7.2) Extração de RNA	42
3.8) Espectroscopia por infra vermelho	45
3.9) Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	46
 IV. Resultados e Discussão:	 47
4.1) Produção do extrato bruto	47
4.2) Ensaio biológico a partir do extrato bruto	47
4.3) Ensaio biológico das frações	50
4.5) Análise das frações dos extratos de <i>Jodina</i> no infra vermelho.	57
 V. Conclusão	 63
 VI. Bibliografia	 65
 Anexo	 72
Anexo 1	72
Anexo 2	73
Anexo 3	74
Anexo 4	75

Índice de Figuras:

Figura 1: Estrutura vegetal, folha e inflorescência da <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arm..	9
Figura 2: Estrutura Química da Resina de Sephadex.....	15
Figura 3: Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose(b) versus necrose(a).....	21
Figura 4: Vias sinalizadoras do metabolismo, em que estão descritos os genes que atuam inibindo a divisão celular encontram-se suprimidas nos tumores.....	24
Figura 5: estufa de circulação e renovação de ar utilizada para secagem de plantas	29
Figura 6: moinho de trituração de plantas, acoplado a malha de 0,5 µm.....	29
Figura 7: Evaporador rotativo, destinado a secagem dos extratos, acoplado a sistema hidráulico de vácuo.....	31
Figura 8: Preparo e montagem da coluna de fracionamento.....	32
Figura 9: Inserção da amostra e conexão à bomba de sucção.....	33
Figura 10: Imagem da coluna de fracionamento, destinada a purificação do extrato bruto de <i>Jodina rhombifolia</i>	33
Figura 11: Armazenagem dos cultivos celulares em frascos criogênicos, sob atmosfera de nitrogênio líquido.....	37
Figura 12: Armazenagem dos cultivos celulares em garrafas de polietileno, sob temperatura controlada em estufa com atmosfera de CO ₂	38
Figura 13: Câmara de Neubauer, destinada a contagem de células.....	39
Figura 14: Microscópio invertido, e garrafas contendo os cultivos de células de MCF-7 e NH/3T3.....	39
Figura 15: disposição dos extratos de <i>Jodina</i> nas placas de Elisa.....	41
Figura 16: Médias dos três ensaios sobre o efeito das frações dos extratos metanólicos de <i>Jodina</i> sobre o crescimento/inibição de MCF-7.....	52
Figura 17: Médias dos três ensaios sobre o efeito das frações dos extratos metanólicos de <i>Jodina</i> sobre o crescimento/inibição de NH/3T3.....	52
Figura 18: PCR em gel de agarose dos cultivos controle de MCF-7, 3T3 e controle do kit.....	54
Figura 19: PCR em gel de agarose dos cultivos de MCF-7, tratados com as diluições dos extratos de <i>Jodina</i>	55
Figura 20: Detalhe dos IR do extrato metanólico 1 de <i>Jodina rhombifolia</i>	57
Figura 21: Detalhe dos IR do extrato metanólico 2 de <i>Jodina rhombifolia</i>	58
Figura 22: Detalhe dos IR do extrato metanólico 14 de <i>Jodina rhombifolia</i>	59
Figura 23: CG/MS da fração 1 do extrato, (a) original e (b) ampliado da região de interesse.....	60

Figura 24: CG/MS da fração 2 do extrato, (c) original, (d) ampliado da região de interesse.....	61
Figura 25: CG/MS da fração 14 do extrato, (E) original, (f) ampliado da região de interesse.....	62

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Diluição dos extratos brutos de Jodina rhombifolia.....	35
Tabela 2: Diluição das Frações do extrato metanólico de Jodina rhombifolia.....	36
Tabela 3: resultados dos extratos brutos de Jodina, em células tumorais (MCF-7) frente a extratos de diferentes solventes e de células saudáveis (NH/3T3) frente aos mesmos extratores.....	47
Tabela 4: Resultados obtidos nos ensaios com o extrato metanólicos bruto de Jodina em diferentes linhagens celulares.....	49
Tabela 5: Porcentagem de inibição e proliferação celular linhagens MCF-7 e NH/3T3 das 18 frações do extrato metanólico obtidas na coluna Sephadex.....	51
Tabela 6: Resultados de melhor desempenho nos testes das frações de Jodina.....	53

Lista de Acrônimos:

OMS – Organização Mundial de Saúde
MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma humano de mama
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: Deoxyribonucleic acid)
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês: Ribonucleic acid)
INCA – Instituto Nacional do Câncer
FAS – Avaliação da proteína apoptótica
NIH/3T3 – Linhagem celular de fibroblastos
HT-29 – Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon, grau II
KB - Linhagem celular tumoral humana de carcinoma epidermóide de boca
JRA – Extrato aquoso de *Jodina rhombifolia*
JRM – Extrato metanólico de *Jodina rhombifolia*
JRC – Extrato clorofórmico de *Jodina rhombifolia*
DMSO – Dimetil-sulfóxido
DMEM – meio de cultivo (do inglês: Dubelcco's Modified Eagle's Medium)
PBS – Solução tampão fosfato salina (do inglês: Phosphate buffered saline)
TCA – Ácido tricloroacético (do inglês: TriChloroacetic Acid)
CCD – Cromatografia em camada delgada
TRIZOL – Extrator de RNA patenteado pela Invitrogen
p.a. – Para análise
rpm – Rotações por minuto
cDNA – DNA complementar, sintetizado por uma molécula de RNA mensageiro numa reação catalisada pela enzima transcriptase reversa
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DEPC – Dimetil-pirocarbonato
Buffer RT – Solução tampão 500 mM Tris-HCl, pH 8,3 + 750 mM KCl + 30 mM MgCl₂ + 50 mM DTT, patenteada pela Invitrogen
DTT – Dithiothreitol (C₄H₁₀O₂S₂)
RNase H – Ribonuclease H

I) Introdução

1.1) Medicamentos derivados de produtos naturais

As pesquisas e o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais vêm demonstrando o potencial da biodiversidade brasileira. Um exemplo disso pode ser constatado logo após o descobrimento do Brasil, quando os primeiros médicos portugueses, diante da escassez de medicamentos empregados na Europa, foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas¹. Os excursionistas que visitavam regiões pouco conhecidas se abasteciam destes medicamentos.

Apenas em 1808 com a vinda da Corte Real para o Brasil, e o decreto de D. João VI, que permitiu abertura dos portos brasileiros às nações amigas, houve um dos marcos histórico oficiais na ciência brasileira. A partir deste decreto que começaram a chegar ao País às primeiras expedições científicas, com a incumbência de coletar espécimes de animais e de plantas para os museus europeus. Não se pode, entretanto, deixar de mencionar que a Europa já tinha conhecimento de plantas medicinais brasileiras, através da obra “*Historia Naturalis Brasiliae*” escrita por Freedberg, que reunia dados sobre o ar, a água e a topografia do Brasil, além das doenças endêmicas, venenos e seus antídotos e as plantas medicinais. Este livro representa a primeira história natural completa da América do Sul ².

A biodiversidade brasileira também pode ser destacada pelo trabalho do médico português Bernardino Antônio Gomes, na procura por novas drogas para uso medicinal, Laboratório “Chimico” da Casa da Moeda, em Lisboa, isolou a cinchonina das cascas da quina. Formado em Medicina pela Universidade de Coimbra, em 1793, Bernardino Antônio Gomes (1768-1823) prestou serviço, vários anos no Brasil, na Armada Portuguesa, onde fez valiosas observações botânico-médicas sobre plantas locais, que lhe conferiram grande notoriedade. A cinchonina foi o primeiro alcalóide natural sob a forma de base pura, na história da Química³.

Na mesma expedição científica veio o farmacêutico alemão, Theodoro Peckolt, para estudar a flora, ficando conhecido, anos mais tarde como o pai da fitoquímica brasileira, além de ser o patriarca de uma família de cientistas que

se dedicaram ao estudo químico das plantas brasileiras. Inicialmente instalado na cidade de Cantagalo no Estado do Rio de Janeiro, a mesma cidade onde nasceu Rodolpho Albino Dias da Silva (1889-1931), o autor único da primeira Farmacopéia Brasileira².

Cada vez mais as plantas medicinais são um tema recorrente na pauta da ciência brasileira. Químicos e farmacólogos brasileiros têm realizado estudos com plantas medicinais, mesmo que sem a atenção merecida por parte das agências financiadoras brasileiras, e sem que haja um processo coordenado de todos os autores (indústria, farmacólogos, fitoquímicos, químicos sintéticos, farmacêuticos, médicos, etc.) visando o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas⁴.

As plantas medicinais são, tradicionalmente, importantes fontes de matéria prima para a indústria farmacêutica, embora a química sintética também produza novas substâncias bioativas. Técnicas combinatórias expandem o número dos compostos disponíveis para testes, gerando uma quantidade relativamente elevada de produtos naturais entre as drogas disponíveis no mercado⁵.

Um dos problemas na comercialização de fitoterápicos no Brasil esta na dificuldade de exportação devido à falta do status de “medicamento ético” que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário⁶.

Da biota brasileira, muitos exemplos de plantas medicinais podem ser citados, entretanto, a maioria das plantas ditas medicinais pelo senso comum e comercializadas no Brasil, são introduzidas do comércio exterior (por exemplo, o boldo chileno). Assim, as plantas medicinais nacionais ainda são pouco conhecidas, conseqüentemente, constituindo um fascinante assunto de pesquisa para as academias.

Neste contexto, os químicos de produtos naturais não só devem estar envolvidos no isolamento e identificação dos constituintes ativos, como também empenhados no desenvolvimento de pesquisas que busquem a validação de métodos analíticos modernos, para ampliar o controle de qualidade na obtenção dos princípios ativos destas plantas⁶.

Os inconvenientes ao uso de produtos naturais quando se busca produzi-los em grande escala está na incerteza em se obter quantidades

suficientes de material, na variabilidade da composição das amostras, nas diferenças de atividades biológicas e na ausência de padrões que auxiliem o reconhecimento de determinadas estruturas químicas contidas nos extratos brutos⁵.

Uma das alternativas para minimizar os riscos à introdução de novos produtos na indústria farmacêutica é isolar os princípios ativos dos produtos naturais ainda brutos, e encurtar os tempos de pesquisa, o que conseqüentemente aumenta o grau de especialização requerido para estas. As descobertas e a manutenção de grupos exploratórios necessitam de dispendiosos incentivos para o desenvolvimento de seus programas⁷.

Até recentemente grande parte da pesquisa farmacêutica era conduzida internamente, produzindo resultados individualizados e em alguns casos até repetitivos. A estratégia moderna endossa pesquisas de entidades diversificadas que incluem projetos ou tecnologias integradas, fornecidas em parte pelas companhias de biotecnologia e por grupos acadêmicos, minimizando incertezas na seleção e facilitando a identificação dos fármacos⁷.

A introdução de novas entidades químicas e biológicas buscando avanços na pesquisa de matérias destinadas a farmacêutica humana podem representar um indicativo de crescimento ainda maior nas perspectivas da indústria farmacêutica.

Destas linhas de pesquisa surgiram publicações importantes, por exemplo, a que trata da caracterização da vimblastina, de 1959, é um potente alcalóide isolado pelo Dr. Clark Noble a partir das folhas da planta Madagascar periwinkle (*Vinca rosea*). Pesquisada inicialmente para o combate do diabetes, as folhas tinham pouco efeito nos níveis de açúcar no sangue, mas possuía efeitos inibitórios surpreendentes na contagem de glóbulos brancos, sugerindo que pudesse ter potenciais aplicações em nível do tratamento de cancro, em particular a leucemia. Em 1999 há ainda o relato de uma nova descoberta de agentes antineoplásicos obtidos pela extração de uma planta do Cazakstão⁸.

1.2) Plantas utilizadas na medicina popular

O conhecimento sobre a aplicabilidade de plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos. A utilização de plantas na terapêutica e na cura de enfermidades é tão antiga quanto a espécie humana. Ainda nos dias atuais é comum encontrar nas regiões mais pobres do país e até mesmo nos grandes centros urbanos, plantas medicinais sendo comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais⁹.

Antecedendo a medicina moderna, a medicina tradicional é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo a união de todos os conhecimentos teóricos e práticos, explicáveis ou não, utilizados para diagnóstico, prevenção e tratamentos físicos, mentais ou sociais, amparados basicamente na experiência e observação, transmitidos verbalmente ou por escrito de uma geração a outra¹⁰.

O reconhecimento da OMS data de 1978 na Conferência de Alma Ata, nela o aproveitamento das plantas medicinais foi ressaltado como parte do Programa “Saúde para Todos no Ano 2000” recomendando-se, inclusive a realização de mais estudos e a propagação do uso das plantas medicinais regionais como uma maneira de diminuir custos dos programas de saúde pública¹¹.

A utilização dos fitofármacos nos programas de atenção primária à saúde pode se apresentar como uma alternativa terapêutica bastante viável devido à sua eficácia aliada a um baixo custo operacional, a relativa facilidade para aquisição das plantas e a compatibilidade cultural do programa com a população atendida¹⁰.

As contribuições populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa maneira, pacientes consumidores de plantas medicinais do mundo todo, mantêm em evidência a prática do consumo de fitoterápicos, ratificando informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos⁹.

Através de um modo adverso, este tipo de cultura medicinal fomenta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas contribuem e enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial⁹.

1.3) Fármacos antitumorais derivados de plantas

De um modo geral, a natureza é a responsável pela produção da maioria dos compostos orgânicos conhecidos e a fauna, principalmente a brasileira, pela maior parcela da variedade química conhecida e registrada na literatura científica¹².

A diversidade e a complexidade das macromoléculas que constituem os metabólitos secundários das plantas e organismos são as conseqüências de milhões de anos de evolução, e elevado refinamento de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores, e ainda de difícil avaliação por métodos laboratoriais comuns¹³. A utilização de plantas no tratamento de diferentes espécies de câncer já é bastante ampla, ainda que, observada com ceticismo em função da gravidade da doença¹⁴.

O interesse na investigação de plantas medicinais como possíveis fontes de obtenção de princípios ativos é um processo histórico. Instituições como o Instituto de Investigações do Câncer dos Estados Unidos, vêm desenvolvendo estudos neste campo desde 1955, quando coordenou um programa voluntário de cooperação para a terapia de câncer. Desde então foram avaliadas, mais de 400 000 substâncias sintéticas e naturais, das quais algumas com atividade antitumoral¹⁴.

Em 1982, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) avaliou 114.000 extratos de cerca de 35.000 espécies diferentes plantas. A atividade antitumoral dos extratos foi testada utilizando principalmente dois modelos de leucemia em ratos, o L1210 e P388. Dois compostos clinicamente ativos foram encontrados em decorrência desta pesquisa, Paclitaxel (nome comercial: Taxol, registrada pela empresa Bristol-Myers Squibb), obtido a partir da árvore *Taxus brevifolia* Nutt e Camptothecina de árvore nativa chinesa *Camptotheca acuminata* *caduca*^{13,15}.

Das 92 drogas comercializadas, avaliadas entre 1983 e 1994 pelo INCA, aproximadamente 62% podem ser classificadas como originárias de produtos naturais^{12,15}. Porém, uma característica comum a muitos produtos naturais – derivados de drogas anticâncer já em uso clínico, é sua toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis, como irritabilidade da pele, hipersensibilidade, entre outros¹². Assim, compostos semi-sintéticos podem ser produzidos com base na

estrutura dos produtos naturais, tendo por finalidade a diminuição destes problemas pela modificação seletiva das estruturas¹⁵.

Na atualidade, os pacientes com este tipo de enfermidade têm buscado terapias alternativas, como por exemplo, acupuntura, reiki, homeopatias, dietas, entre outras, muito utilizadas na medicina oriental e das quais existem informações na literatura que avaliam seus usos clínicos, numa tentativa de minimizar os danos causados pela quimioterapia¹⁴.

A quimioterapia é o tratamento mais ortodoxo do câncer e baseia-se no uso de drogas que inibem o desenvolvimento descontrolado de células anormais. Numa perspectiva farmacológica, o fármaco "ideal" mataria as células de câncer sem causar danos às células normais¹⁴. Porém os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais, estruturas normais que se renovam como a medula óssea, os pêlos e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas¹⁶.

No entanto, como as células normais apresentam um tempo de recuperação previsível, ao contrário das anaplásicas, é possível que a quimioterapia seja aplicada repetidamente, se observado o intervalo de tempo necessário para a recuperação da medula óssea e da mucosa digestiva. Por este motivo, é aplicada em ciclos¹⁶.

A cada dia, medicamentos novos são postos à disposição dos oncologistas visando à redução da toxicidade dos quimioterápicos, intensificando a importância dos fitofármacos. É preciso salientar, porém, que a maioria desses medicamentos tem se mostrado inacessível à maioria dos pacientes, mais em função dos seus custos do que por sua disponibilidade no mercado. Pode-se também destacar os efeitos tardios, efeitos colaterais, ainda não totalmente conhecidos e nem bem controlados¹⁶.

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros. Novas drogas estão sendo permanentemente isoladas e aplicadas experimentalmente em modelos animais antes de serem usadas no homem.

Os inibidores mitóticos derivados de produtos naturais podem, ao que se acredita, paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual

migram os cromossomos. Deste modo, os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo a interrupção da divisão celular¹⁶.

Esta função tem sido útil na "sincronização" das células quando os inibidores mitóticos são combinados com agentes específicos da fase S do ciclo. Devido ao seu modo de ação específico, os inibidores mitóticos devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia. Neste grupo de drogas estão incluídos os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina e vindesina) e os derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposídeo e o VM-26, teniposídeo)¹⁶.

1.4) A Espécie *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn

Em geral, a *Jodina rhombifolia* apresenta-se como árvores, arbustos ou subarbustos, que podem ou não apresentar ramos e caule providos de espinhos¹⁷. As inflorescências são de tamanho reduzido, dispostas em racemos ou em panículas, tem coloração amarelada que frutifica na primavera, adquirindo coloração avermelhada⁹.

Ela apresenta folhas simples, alternas, sem pêlos, de forma romboédricas com um espinho em cada uma das extremidades, medindo de 3 a 5 cm de comprimento (Figura 1)¹⁸.

Figura 1: Estrutura vegetal, folha e inflorescência da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn ¹⁸.



É popularmente conhecida como “cancorosa”, “espinheira santa de 3 pontas”, “cancerosa” ou “sombra de touro”¹⁹. É uma planta nativa da região Sul do Brasil, principalmente da Depressão Central do RS e também se encontra nos países vizinhos Paraguai, Argentina, Bolívia e Uruguai²⁰. Os herbários britânicos a classificam com *Iodina*¹⁸.

Atualmente, ela encontra-se em perigo de extinção, problema agravado pelo extrativismo indiscriminado das folhas para comercialização, incidência de árvores nativas não cultivadas, e longo tempo de crescimento de novas árvores²¹.

As folhas e os ramos das árvores são utilizados na medicina tradicional, segundo orientação do senso comum, sob forma de infusão para uso interno e o chá empregado contra resfriados e problemas estomacais. Para uso externo,

no tratamento de ulcerações crônicas, carcinomas dérmicos e outros ferimentos infecciosos^{19, 22}.

A família Santalaceae compreende 37 gêneros e aproximadamente 450 espécies. É classificada como pertencente à Divisão: *Magnoliophyta*, Classe: *Magnoliopsida*, Subclasse: *Rosidae*, Ordem: *Santalales*, Família: *Santalaceae*, Gênero: *Acanthosyris*, Espécie: *Jodina rhombifolia*²³.

Existem poucos relatos sobre *Jodina rhombifolia*. Hopkins em seus experimentos comprovou a presença de ácidos hidroxilados nas sementes da planta²⁴. Novamente este cientista em 2001, juntamente com Chisholm e Cody, divulgaram o estudo “Fatty acid components of some Santalaceae seed oils” no qual se dedicaram a investigar os óleos essenciais extraídos das sementes de várias espécies da *Santalaceae*, e detectaram na jodina uma quantidade significativa de ácido non-hydroxy C-17²⁵.

Gleye evidenciou a presença de esteróides e/ou triterpenos em grande quantidade na fração etanólica da planta, sendo também encontrado, em menor proporção, alcalóides, cumarinas e saponinas²⁶. Vargas divulgou um estudo realizado também com o extrato aquoso da planta Jodina, no qual estes extratos não apresentam atividade mutagênica frente a *Salmonella*²⁷.

No estudo de Sobottka, os autores pesquisaram o efeito do extrato aquoso da planta na reprodução de ratas fêmeas²⁸. A toxicidade subcrônica de extratos de folhas e troncos de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. foi avaliada em ratas tratadas com doses de 800 mg/Kg destes extratos durante 30 dias consecutivos. O estudo dos órgãos dos animais tratados não indicou nenhuma alteração nos aspectos morfológicos nem dos tecidos²⁹.

No presente estudo foram isoladas, a partir da avaliação do extrato bruto, três frações de extratos metanólicos das folhas de *Jodina rhombifolia*. A análise destas frações detectou uma potente atividade antiproliferativa frente às linhagens de tumores de mama (MCF-7). Assim, as atividades antiproliferativas da *Jodina* podem, provavelmente, contribuir para o conhecimento terapêutico.

1.5) Cromatografia em coluna utilizando resina de Sephadex – LH20

1.5.1) Cromatografia sólido-líquido em coluna

Este sistema de separação cromatográfica é aplicado quando se busca partição, adsorção, afinidade ou troca iônica como produto de extração. Em geral, deve contar de duas partes: uma fase estacionária (resinas, sílicas ou terras específicas) e uma fase móvel (água ou solventes orgânicos), de acordo com a característica da amostra aplicada ou o tamanho da coluna, podendo ser utilizada para fins preparativos, nestes casos devem ser monitoradas por cromatografia em camada delgada³⁰.

1.5.2) A coluna

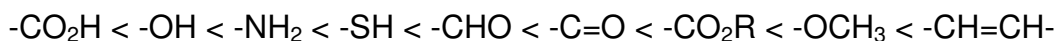
Em geral se apresenta como um tubo de vidro vertical com controle de vazão da fase móvel na parte inferior, na parte superior deve haver um reservatório de eluente, semelhante ao da parte inferior, ambos adequados ao tipo de amostra que se pretende obter³⁰.

Existem variações nas colunas que são comercialmente prontas, em função na natureza da amostra aplicada. A coluna pode ser de vidro temperado, as paredes de vidro podem contar com diferentes espessuras, os orifícios de entrada e saída podem ser fechados por filtros de malhas e o controle de saída da fase móvel adaptado para que seja produzido por bombas de sucção³¹.

1.5.3) Processo de adsorção em coluna

A força de adsorção da amostra na coluna cromatográfica varia de acordo com a natureza do adsorvente, as substâncias aplicadas eluirão da coluna conforme sua polaridade, ou sua afinidade com o adsorvente.

Se a fase estacionária da coluna tiver em sua estrutura grupos polares, diminuirá o tempo de retenção sobre substâncias também polares, observando a ordem abaixo indicada:



Devem-se evitar movimentos de escoamento muito lentos ou que apresentem fluxo de velocidade variada, para que as bandas das funções orgânicas não sejam muito largas quando observadas ao Infra-Vermelho³¹.

1.5.4) Separação por adsorventes

Alguns adsorventes são ativados pelo calor (entre 200 e 400°C, por pelo menos 2h), porém, devem ser evitados excessos de calor ou de tempo de exposição, para não provocar perda da atividade da resina.

A capacidade adsorvente pode ser calculada pela adição de diferentes corantes²⁵. Em geral, é construído um gradiente a partir de dois corantes de polaridades opostas, com este teste é possível conhecer não só a capacidade de adsorção, mas também o volume da coluna utilizada³¹.

A cromatografia tem como desvantagens produzir cauda (difusão), especialmente quando a fase estacionária apresentar bolhas de ar ou não estiver devidamente nivelada; e não apresentar separações reprodutíveis, pois o adsorvente pode ter atividade variada, principalmente se sua utilização for prolongada e os sítios de absorção estiverem ocupados por resíduos de amostras anteriores.

A quantidade de adsorvente varia com a adsorbilidade do material, a proporção mínima é de 25:1 (adsorvente/ substância)³⁰.

1.5.5) Reações na coluna

Ao iniciar cada processo cromatográfico deve-se conhecer a composição da fase estacionária, pois, em alguns casos os sólidos utilizados nas colunas cromatográficas às vezes tornam-se catalisadores de reação. É necessário, portanto, utilizar a resina que melhor se adeque ao produto que se deseja purificar³².

1.5.6) Escolha dos eluentes

É considerado função da fase móvel:

- Atuar como solvente da mistura cromatografada, se a amostra não for completamente solúvel ficará retida na parte superior do sistema de separação.
- Apresentar baixo ponto de ebulição – para ser facilmente evaporado.
- Desenvolver os compostos da mistura aplicada na coluna e desorvê-los do adsorvente.

Os eluentes são escolhidos de acordo com seu poder eluente, ou seja, habilidade de remover substâncias fixadas, geralmente é mais facilitada em solventes polares, quando o eluente for apolar o adsorvato ficará mais retido no adsorvente³⁰.

O solvente utilizado como fase móvel pode ser escolhido de acordo com a série gradual de eluentes, apresentada abaixo, em ordem crescente de polaridade^{30,31};

Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$)

Éter de Petróleo (mistura de hidrocarbonetos)

Ciclohexano (C_6H_{12})

Tetracloroeto de Carbono (CCl_4)

Benzeno (C_6H_6)

Tolueno (C_7H_8)

Diclorometano (CH_2Cl_2)

Clorofórmio (CHCl_3)

Éter Etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$)

Acetato de Etila ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)

Piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$)

Acetona (CH_3COCH_3)

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Metanol (CH_3OH)

Ácido Acético (CH_3COOH)

Uma série gradual de eluentes pode ter diferentes combinações, por exemplo, éter de petróleo/ etanol (1:6) ou (1:3) – a polaridade da série deve ser determinada em função de medições práticas, realizadas com a amostra de

interesse, mas a polaridade do eluente não deve aumentar rapidamente para evitar sobreposições das bandas, quando o produto for avaliado em infravermelho^{30,31}.

1.5.7) Preenchimento da coluna

Quanto mais uniforme for a distribuição da fase estacionária na coluna, maior será sua eficiência, se contiver ar retido, este poderá alargar as bandas de eluição, ou ainda provocar caudas na passagem da amostra. O adsorvente deve ser hidratado com o eluente, em seguida agitado também com ele e largado na coluna que já o contém. Algumas colunas necessitam ser “empacotadas”, são feitas leves batidas no corpo da coluna para evitar a formação de bolsas de ar³².

1.5.8) Resina de Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 é uma resina cromatográfica média, designada para o dimensionamento de produtos naturais, tais como esteróides, terpenóides, lipídios, moléculas de baixo peso molecular e peptídeos (com até 35 resíduos de aminoácidos)³³.

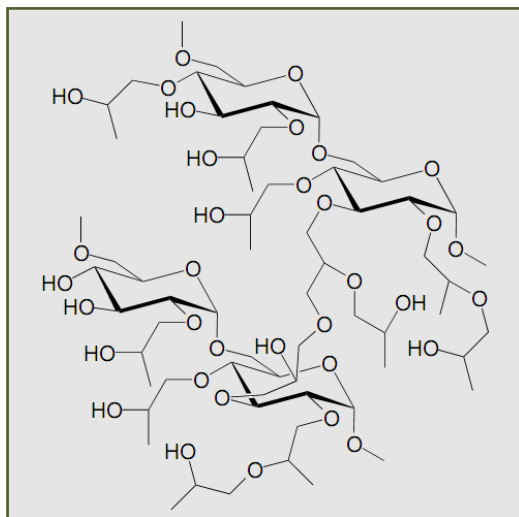
Dependendo do solvente escolhido, esta resina possui uma capacidade diferente de dilatação, que permite calcular o volume desejado para a cama de fracionamento, como por exemplo, água ou outros de diferentes naturezas orgânicas e polaridades³². Pode ser aplicada na separação dos componentes da amostra por partição, através da interação entre a fase móvel (solvente escolhido) e a fase estacionária (resina Sephadex)³³.

Devido às propriedades físico-químicas desta resina descrita pelo fabricante, ela pode ser utilizada como fase de purificação inicial, antes ainda que se realize uma separação de alto desempenho de troca iônica, fase reversa, cromatografia ou da etapa de preparação final de diastereoisômeros^{33,32}.

Sephadex LH-20 pode ser caracterizado por: i) seletividade cromatográfica devido à natureza dupla de sua matriz (hidrofílica/ lipofílica); ii)

facilidade de eluição devido a estrutura química da amostra (figura 2); iii) excelente reprodutividade³³.

Figura 2: Estrutura Química da Resina de Sephadex ³².



1.6) Câncer

1.6.1) Início de um comportamento celular anormal

O câncer é uma neoplasia maligna caracterizada por uma população de células que cresce e se divide sem respeitar os limites normais, invadem e destroem tecidos adjacentes, e podem se espalhar para lugares distantes no corpo, através de um processo chamado metástase³⁴.

Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes (embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornarem malignos). O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o acréscimo da idade. O câncer causa cerca de 13% de todas as mortes no mundo, sendo os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama os que mais matam³⁴.

Quase todos os cânceres são causados por anomalias no material genético de células transformadas. Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de carcinógenos, como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos. Outros tipos de anormalidades genéticas podem ser adquiridos através de erros na replicação do DNA, ou são herdadas, e conseqüentemente presente em todas as células ao nascimento³⁶.

As interações complexas entre carcinógenos e o genoma hospedeiro podem explicar porque somente alguns desenvolvem câncer após a exposição a um carcinógeno conhecido. Novos aspectos da genética da patogênese do câncer, como a metilação do DNA e os microRNAs estão cada vez mais sendo reconhecidos como importantes para o processo³⁷.

As anomalias genéticas encontradas no câncer afetam tipicamente duas classes gerais de genes. Os genes promotores de câncer, oncogenes, estão geralmente ativados nas células cancerígenas, fornecendo a estas células novas propriedades, como o crescimento e divisão hiperativa, proteção contra morte celular programada, perda do respeito aos limites teciduais normais e a habilidade de se tornarem estáveis em diversos ambientes teciduais³⁵. Os genes supressores de tumor estão geralmente inativados nas células cancerígenas, resultando na perda das funções normais destas células, como

uma replicação de DNA acurada, controle sobre o ciclo celular, orientação e adesão nos tecidos e interação com as células protetoras do sistema imune³⁵.

O câncer é geralmente classificado de acordo com o tecido de qual as células cancerígenas se originaram, assim como o tipo normal de célula com que mais se parecem. Um diagnóstico definitivo geralmente requer exame histológico do tecido por um patologista, embora as indicações iniciais da malignidade possam ser sintoma ou anormalidades nas imagens radiográficas³⁶.

A maioria dos cânceres pode ser tratado e alguns curados, dependendo do tipo específico, localização e estadiamento. Uma vez diagnosticado, o câncer geralmente é tratado com uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Com o desenvolvimento das pesquisas, os tratamentos estão se tornando cada vez mais específicos para as diferentes variedades de câncer. Ultimamente tem havido um progresso significativo no desenvolvimento de medicamentos de terapia que agem especificamente em anomalias moleculares detectáveis em certos tumores, minimizando o dano às células normais³⁸.

A graduação histológica e a presença de marcadores moleculares específicos podem também ser úteis em estabelecer o prognóstico, assim como em determinar tratamentos personalizados³⁷.

1.6.2) Neoplasia mamária

O carcinoma de mama é uma forma bastante comum de neoplasia. É a primeira causa de morte entre as mulheres no país³⁹, e o segundo tipo de neoplasia mais freqüente no mundo, perdendo apenas para o câncer de pulmão, e sua incidência teve um crescimento contínuo na última década⁴⁰.

Inicialmente o processo neoplásico se inicia por uma transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, a partir daí é desencadeada uma multiplicação exagerada e desordenada das células. Essas células dividem-se e formam pequenos nódulos (tumores benignos), que quando não tratados podem evoluir para tumores malignos, que são caracterizados pelo espalhamento da neoplasia para áreas próximas⁴¹.

O câncer de mama feminino tem 95% de chance de cura, se o tratamento for feito precocemente. No entanto, dados do Instituto Nacional do Câncer informam que 27 mulheres por dia morrem por causa do câncer de mama⁴².

Para o ano de 2008, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou 49.400 casos novos de câncer de mama, com maior incidência na região Sudeste do país, com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil mulheres^{39,40}.

1.6.3) Morte celular programada

A interação entre as células que constituem os organismos multicelulares influenciam seu desenvolvimento e sua manutenção. No processo de desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a perfeita evolução dos órgãos e tecidos.

A morte celular, durante muito tempo, foi entendida como um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Conseqüentemente, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas³⁷.

Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares³⁸.

Os mecanismos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: autofagia, necrose, mitose catastrófica, senescência e apoptose³⁷.

Autofagia é um mecanismo de adaptação conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ocorre em resposta a uma perturbação metabólica que resulta na desintegração de componentes celulares³⁷. Na autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos, que irão se fundir com os lisossomos. Em seguida, o conteúdo dos autofagossomos é degradado pelas hidrolases lisossomais³⁷.

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um estresse que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina,

desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular³⁸.

A ruptura celular libera nos tecidos vizinhos o conteúdo celular, rico em proteases e substâncias tóxicas. Além da toxicidade direta para as células vizinhas, este derrame gera compostos que atraem as células do sistema imune, causando reações inflamatórias: alguns tipos de glóbulos brancos (em especial neutrófilo e macrófagos) convergem para o tecido em necrose e fagocitam as células mortas.

A inflamação, característica da necrose, é importante para limitar infecções e remover resíduos de células, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem também danificar tecidos vizinhos normais³⁸. É considerada uma resposta inflamatória no local passiva à injúria celular, entretanto estudos sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente³⁷.

A mitose catastrófica resulta em uma segregação cromossômica incorreta. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a morte celular³⁷.

A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros. As células que entram em senescência perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares³⁷.

A apoptose ocorre em diversas situações, por exemplo, na organogênese, hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos³⁷.

Pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. A apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa³⁸.

A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (blebs) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela

membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos (Figura 3). Os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório³⁸.

Outra característica marcante da morte apoptótica é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base³⁹.

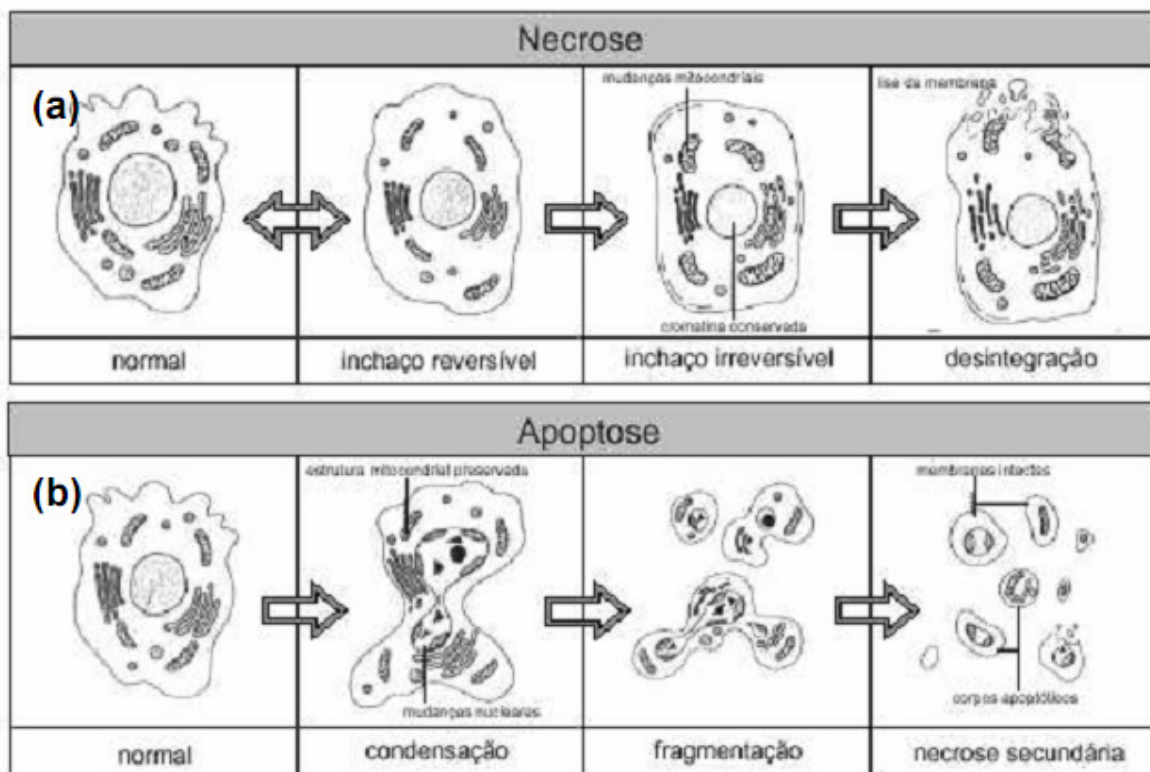
Se o DNA de uma célula apoptótica for analisado por eletroforese, será vista uma “escada”, na qual os “degraus” indicam o tamanho de fragmento: 200 pares de bases, 400, 600 etc. A presença dessa “escada” é usada como uma marca da apoptose, embora ainda haja controvérsia sobre se todas as células em apoptose sofrem fragmentação do DNA³⁹.

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer⁴⁰.

Em geral duas vias desencadeiam o mecanismo de morte:

(a) Apoptose via receptor, de morte tais como FAS, também chamado de CD95 ou APO-1 e TNF-R1. (b) Apoptose via mitocondrial é ativada por alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial.

Figura 3) Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose(b) versus necrose(a).



A necrose (a) é caracterizada pela perda de integridade da membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. O processo apoptótico (b) envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

1.6.4) Genes BCL2, P53 e P21

Muitos genes estão envolvidos diretamente no processo de apoptose. Uma importante família é a do gene Bcl2, que apresenta genes reconhecidos como Pró e Anti-Apoptóticos³⁹. Ou seja, algumas proteínas codificadas por genes componentes dessa família bloqueiam/inibem a morte celular por apoptose (Bcl2 e Bclx – Anti-Apoptóticos) e outros a promovem (Bax, Bid e Bak – Pró-Apoptóticos)^{39,41}.

O Bcl2 é um gene promotor da sobrevivência celular por inibição da ocorrência de apoptose. A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa de numerosos tipos celulares, como epitélios capazes de proliferação e morfogênese⁴².

A proteína Bcl-2 bloqueia a liberação de Citocromo C pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação das caspases⁴².

A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax). Ao que parece, Bcl-2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax; por outro lado o homodímero Bax/Bax promoveria a morte celular programada. O mecanismo pelo qual a família do gene bcl2 controla a apoptose seria através da formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da apoptose^{40,43}.

Outro importante gene envolvido no processo de morte e proliferação celulares é o gene p53, um dos genes chamados supressores de tumor³⁹. Este gene é o mais freqüentemente mutado em todos os tipos de câncer humano e é um sensor universal de estresse genotóxico. A frequência de mutações do gene p53 varia dependendo do tipo de tumor, mas em média, 50% dos tumores apresentam uma lesão no locus p53⁴⁴.

Normalmente, a proteína p53 é encontrada na célula em níveis basais; isso sugere que o p53 pode servir a uma função que é necessária ocasionalmente em circunstâncias especiais. O aumento artificial da proteína p53 em cultura inibe a proliferação celular⁴¹. Altos níveis de p53 bloqueiam a proliferação celular, atrasando a fase G1 do ciclo celular e impedindo a passagem para a fase S⁴⁵.

A proteína p53 é considerada uma das proteínas mais importantes para manter a estabilidade e integridade do genoma. Ela protege a célula, impedindo a proliferação celular após um dano no DNA e ativando a apoptose (figura 4), no caso de dano irreparável⁴².

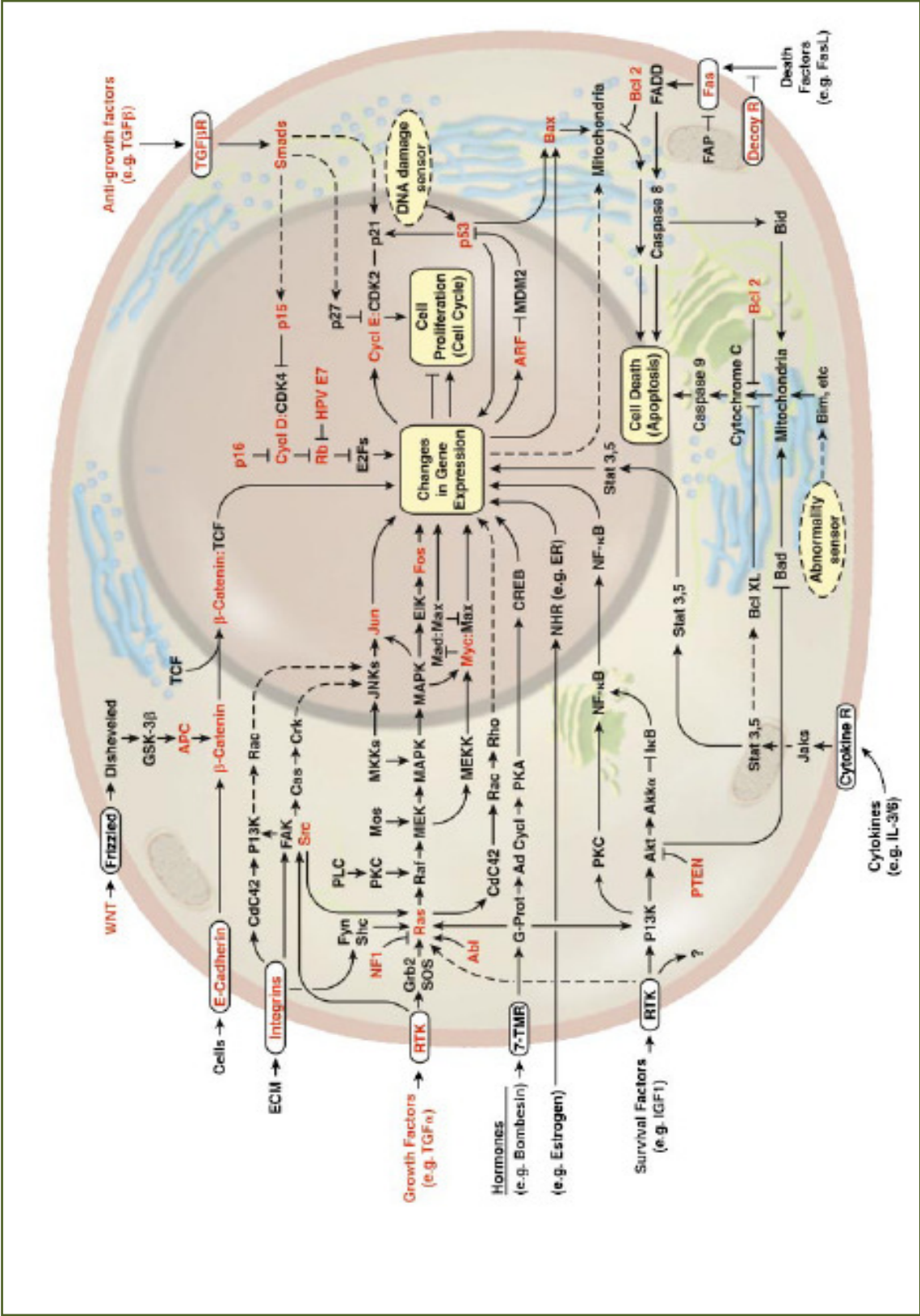
Células expostas à irradiação e que não apresentam o gene p53 continuam dividindo-se e replicando o DNA sem pausa para o reparo das lesões⁴³.

Desde a descoberta da proteína p53 como uma seqüência específica de fator de transcrição, têm sido identificados muitos genes e vias reguladas por esta proteína. A interrupção do crescimento celular mediado por p53 resulta da transativação de p21 dependente de p53⁴³.

P21 é a proteína chave para determinar se a célula prolifera ou se diferencia. A proteína p21 é uma reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular, que é codificada com informação do cromossomo 6⁴². Esta transição é particularmente importante no estudo de células cancerígenas, pois é na fase S que se dá a replicação do DNA, uma das fases onde existe maior probabilidade de ocorrerem mutações genéticas provocadas por uma perda da integridade do genoma⁴⁵.

É a proteína p53 a reguladora da expressão de p21. Esta proteína liga-se às ciclinas D e E, inibindo a cinases dependentes destas ciclinas (cdk 2 e cdk 4) necessárias para a progressão do ciclo celular (figura 4). Devido à sua função e cooperação com a proteína p53, a p21 é considerada uma proteína supressora de tumores⁴⁴.

Figura 4: Vias sinalizadoras do metabolismo, em que estão descritos os genes que atuam inibindo a divisão celular encontram-se suprimidas nos tumores ⁴⁵.



1.7) Linhagens celulares cultivadas

1.7.1) Linhagem celular de adenocarcinoma humano de mama – MCF-7

MCF-7 é uma linhagem celular do cancro da mama que foi isolada no ano de 1970, a partir de uma mulher, caucasiana de 69 anos. A paciente realizou uma primeira mastectomia, nela o tecido removido foi diagnosticado como benigno. Cinco anos mais tarde, o segundo procedimento removeu um adenocarcinoma maligno. Ao longo dos próximos três anos a paciente foi tratada para recorrências por radioterapia e hormonoterapia. Durante a remoção de nódulos da parede torácica, foi descoberto um derrame pleural, a partir do qual a linhagem celular MCF-7 foi obtida⁴⁵. (vide anexo 1).

Esta linhagem celular mantém várias características do epitélio mamário, incluindo a capacidade para processar estradiol através de receptores de estrogênio citoplasmático, esta linhagem celular expressa o oncogene WNT7B⁴⁵.

1.7.2) Linhagem celular de fibroblastos – NIH/3T3

As células NIH/3T3 são provenientes de uma linhagem celular elucidada no ano de 1962 pelos cientistas George Todaro e Howard Green, no Departamento de Patologia da Escola de Medicina da Universidade de Nova Iorque⁴⁷.

A linhagem celular NIH/3T3 tornou-se o padrão de fibroblastos linhagem celular aceite mundialmente. Todaro e Green obtiveram originalmente as células 3T3 a partir dos tecidos de ratos embriões⁴⁷. (vide anexo 2).

1.7.3) Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon, grau II – HT-29

HT-29 é uma linhagem celular provenientes da extração de um adenocarcinoma de cólon humano, de uma paciente, caucasiana com 44 anos. Estas células se formam em pequenos vacúolos e vesículas intracelulares, e com o aumento da proliferação produzem epitélios polarizados⁴⁸. (vide anexo 3).

O processo de diferenciação em células HT-29 é aparentemente semelhante ao observado durante o desenvolvimento embrionário do intestino. Portanto, células HT-29 representam um modelo útil para estudar sistema de diferenciação epitelial in vitro⁴⁸.

1.7.4) Linhagem celular tumoral de carcinoma epidermóide de boca – KB

KB é uma linhagem celular conhecida por ser uma derivação da linhagem HeLa, ricas em queratina. Ela foi originalmente pensada para ser um derivado de um carcinoma epidérmico de boca, mas foi posteriormente encontrada, com base em análises isoenzimáticas, nos marcadores cromossômicos HeLa.

As linhagens comerciais foram originalmente extraídas de um paciente, caucasiano, tabagista de 42 anos. (vide anexo 4).

Seqüências genéticas do papilloma-virus18 humano (HPV-18), têm sido relatadas nas células KB.

II. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral do extrato bruto metanólico de *Jodina rhombifolia*, utilizando ensaios *in vitro* e parcialmente caracterizar frações com maior atividade anti proliferativa.

2.2 Objetivos específicos

- × Determinar atividade citotóxica do extrato bruto metanólico de *Jodina rhombifolia* frente às linhagens de células tumorais mamárias (MCF-7) e saudáveis *in vitro* (NH/3T3);
- × Purificar o extrato bruto através de fracionamentos, a fim de aumentar o fator dose x resposta;
- × Determinar a citotoxicidade das frações obtidas e encontrar a dosagem adequada de utilização nas linhagens celulares;
- × Avaliar seu mecanismo de atuação e morte celular, das frações ativas da *Jodina rhombifolia*, cuja atividade específica for mais pronunciada;
- × Produzir extrações dos RNAs celulares para testar a ativação dos genes apoptóticos;
- × Caracterizar parcialmente a composição química dos extratos por aplicação das técnicas de Infra Vermelho e Cromatografia Gasosa;

III. Material e Métodos

3.1) Material vegetal

3.1.1) Coleta

A coleta da *Jodina rhombifolia* Hook. Et Arn foi feita pela primeira vez no dia vinte e um de junho de 2007 às 10:00h, em uma propriedade situada à rua Plácido de Castro nº 44 no bairro Lindóia, município de Pelotas/RS, a segunda em sete de maio de 2008 às 09:00 h em dia de céu limpo. A árvore doadora é uma espécie adulta de aproximadamente 25 anos, segundo relato do morador da propriedade.

Nas amostragens foram feitas divisões imaginárias em três terços da árvore e as folhas coletadas do segundo terço desta, com a finalidade de evitar as folhas mais velhas, para minimizar o risco de contaminação com poluentes e microorganismos, bem como evitar as folhas mais jovens, que poderiam não conter o princípio ativo encontrado em partes adultas da planta – procedimento foi acompanhado por um engenheiro.

3.1.2) Preparo das amostras

No laboratório de Fitoquímica do departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Pelotas as plantas foram separadas de seus caules, lavadas individualmente com uma esponja macia, enxaguadas duas vezes em água limpa e finalmente em água destilada.

Em seguida, as amostras foram distribuídas de maneira uniforme em bandejas de metal e encaminhadas à estufa de secagem (Estufa Marconi – modelo MA035), onde permaneceram submetidas à temperatura constante de 36°C com circulação e renovação de ar (figura 5), em ambas as coletas, o tempo total de secagem foi de 48h⁴⁹.

Figura 5: estufa de circulação e renovação de ar, utilizada para secagem de plantas



As amostras foram pulverizadas em moinho (Moinho Fritsch – Modelo Pulverisette 34) de malha 0,5 mm, a velocidade de 1200 rpm (Figura 6), e armazenadas em sacos de papel âmbar⁴⁹. O material vegetal foi mantido em uma sala de secagem e desumidificação de plantas, com temperatura constante de 22°C e umidade controlada de 40%.

Figura 6: moinho de trituração de plantas, acoplado a malha de 0,5 µm;



3.2) Produção dos extratos

3.2.1) Processo de maceração dinâmica

Destina-se a remoção dos princípios ativos das plantas a partir de uma escala decrescente de polaridade.

Inicialmente foram pesados 60g de material vegetal em balança analítica, e colocado em um béquer de 1000 mL. Foi adicionada à amostra 900 mL de água MilliQ[®] em ebulição, e macerado sob agitação magnética por uma hora. A mistura resultante foi filtrada a vácuo, o filtrado foi recolhido e identificado como Extrato Aquoso (JRA).

O resíduo sólido, retido no filtro, foi novamente transferido para o béquer e a ele foram adicionados 300 mL de álcool metílico destilado, o sistema foi mantido sob agitação magnética por 8 horas a temperatura ambiente⁵⁰.

Ao final do período a mistura foi filtrada, e novamente adicionada a ela igual volume de metanol. O procedimento foi repetido uma vez mais. Ao final das três extrações sucessivas, os filtrados foram homogeneizados e identificados como Extrato Metanólico (JRM)⁵⁰.

O resíduo sólido retido no filtro foi transferido para o béquer e a ele foi adicionado 300 mL de clorofórmio destilado. Procedimento idêntico ao do extrato metanólico foi repetido, e o extrato resultante identificado como Extrato Clorofórmico (JRC). Após a extração o resíduo sólido foi estabilizado e descartado.

Os extratos JRM e JRC foram secos em evaporador rotativo sob vácuo e temperatura não superior a 30°C (figura 7), o extrato JRA foi liofilizado. Os extratos foram armazenados sob refrigeração até o momento dos ensaios biológicos⁵⁰.

Figura 7: Evaporador rotativo, destinado a secagem dos extratos, acoplado a sistema hidráulico de vácuo.



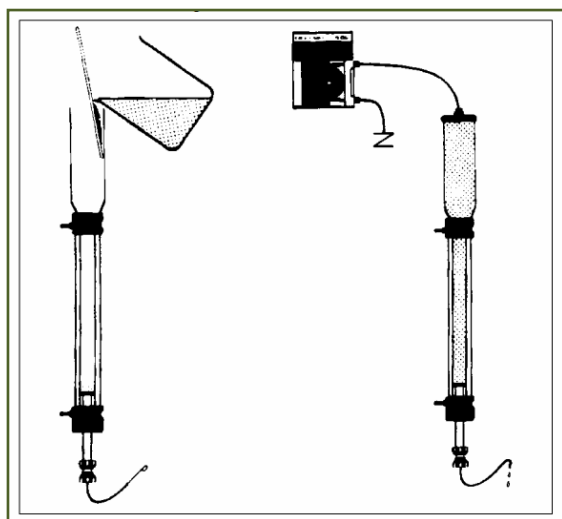
3.3) Fracionamento em camada sólida

Foi utilizado como fase estacionária, para o processo de fracionamento, resina de Sephadex LH-20®, indicada para produtos de origem natural, com baixo peso molecular. E como fase móvel foi utilizado álcool metílico³⁴.

Inicialmente a resina foi ressuspensa em excesso de solvente, sem mexer, deixando-se o sistema em repouso para que inchasse, o período recomendado pelo fabricante é de no mínimo 3 horas. Em seguida, a mistura já estabilizada foi transferida para um kitassato e submetida a vácuo, para eliminar bolhas de ar⁵¹.

A mistura foi vertida de maneira lenta e contínua para o interior da coluna, com a ajuda de um bastão de vidro, evitando nova incorporação de bolhas de ar. Após o término, a coluna foi fechada e conectada a uma bomba de sucção (Figura 8). A coluna foi mantida sob circulação, até que o fluxo de escoamento fosse contínuo⁵².

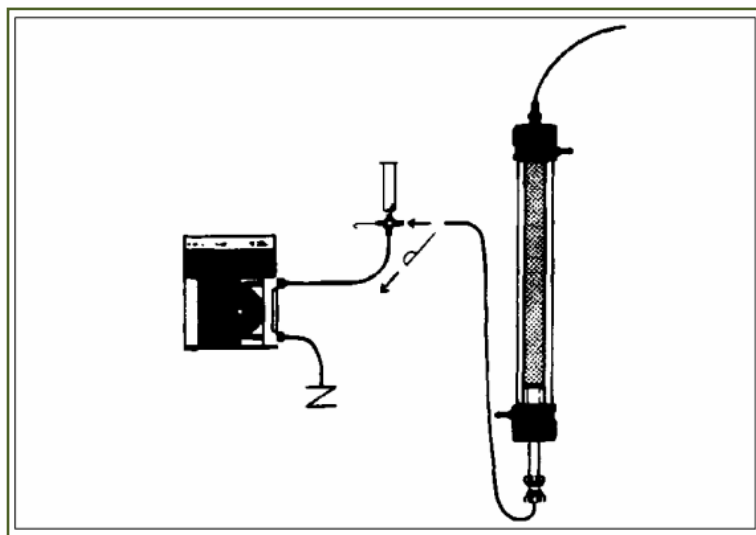
Figura 8: Preparo e montagem da coluna de fracionamento



Quando a coluna estivesse completamente preenchida, ou seja, a velocidade de escoamento e a altura da cama mantiveram-se constantes, a coluna estava pronta para ser usada. O processo demorou em média 2 horas para estar concluído, de forma que, a altura da fase móvel e da fase estacionária fossem as mesmas. Em seguida, a coluna foi lacrada para que a amostra pudesse ser injetada^{35,51}.

A amostra foi ressuspensa no solvente da fase móvel e adicionada à coluna com o auxílio da mangueira de sucção (figura 9). A velocidade de escoamento foi ajustada para 1 mL/ min e o volume da coluna conhecido (em média 120 mL de volume de solvente)⁵².

Figura 9: Inserção da amostra e conexão à bomba de sucção



Com a coluna completamente preenchida (figura 10) foram obtidas dezoito frações de 40 mL⁵¹.

Figura 10: Imagem da coluna de fracionamento, destinada a purificação do extrato bruto de *Jodina rhombifolia*.



Ao final do fracionamento foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo aplicado como revelador permanganato de potássio e luz UV.

As frações obtidas foram secas em evaporador rotativo, sob vácuo à temperatura de 37°C, posteriormente acondicionadas em frascos de vidro, previamente tarados e identificados.

As frações dos extratos, antes de encaminhadas ao ensaio biológico foram ressuspensas em DMSO na proporção 1:1⁵².

3.4) Diluição dos extratos.

Ensaio Biológico – os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido p.a. (DMSO) na proporção 1:1. As diluições necessárias feitas a partir desta solução mãe.

Fracionamento – os extratos foram ressuspensos em álcool metílico na proporção 1:2.

3.4.1) Diluição 1 – extrato bruto

Os extratos brutos secos foram ressuspensos em eppendorfs de 2mL, na proporção de 1g de extrato bruto em 1 mL de DMSO p.a – solução mãe, e diluídos novamente conforme descrito na tabela 1.

O extrato clorofórmico não é solúvel em DMSO puro, devendo, portanto, ser re-suspendido inicialmente em Teem (TWEEN) 80, um surfactante, e na seqüência diluído com DMSO. A melhor proporção encontrada foi 1:1.

Tabela 1: Diluição dos extratos brutos de *jodina rhombifolia*

Diluição	Volume de extrato (µL)	Volume de DMSO (µL)	Princípio Ativo (g/mL)	Concentração por célula (g/mL)
6:1000	6	994	6.10^{-3}	$1,2.10^{-5}$
1:100	10	990	1.10^{-2}	2.10^{-5}
6:100	60	940	6.10^{-2}	$1,2.10^{-4}$
1:10	100	900	1.10^{-1}	2.10^{-4}
6:10	600	400	6.10^{-1}	$1,2.10^{-3}$

3.4.2) Diluição 2 – frações da coluna

As 18 frações, obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto em coluna de Sephadex LH-20, foram ressuspensas seguindo a proporção 1g/mL, e diluídas novamente conforme a tabela 4 abaixo;

Tabela 2: Diluição das Frações do extrato metanólico de *Jodina rhombifolia*

Diluição	Vol. extrato (µL)	Vol. DMSO (µL)	Princípio Ativo (g/ml)	Concentração por Célula (g/mL)
1:1000 (10)	10	990	2.10^{-6}	2.10^{-9}
1:600 (60)	60	940	$1,2.10^{-5}$	$1,2.10^{-8}$
1:100 (100)	100	900	2.10^{-4}	2.10^{-7}

3.5) Técnicas de cultivo celular

3.5.1) Descongelamento

As cepas de células matrizes foram armazenadas em tubos de eppendorf à -80°C ou nitrogênio líquido em meio dimetil-sulfóxido (DMSO), na proporção 8:2 (figura 11), identificada por linhagem celular e número da passagem. As cepas foram descongeladas rapidamente, em banho-maria a 37 °C, em seguida, os frascos foram ser abertos cuidadosamente, em câmara de fluxo à temperatura ambiente, evitando contato com o conteúdo²⁹.

Figura 11: Armazenagem dos cultivos celulares em frascos criogênicos, sob atmosfera de nitrogênio líquido



O volume contido em cada frasco foi pipetado, e despejado em um tubo Falcon. O material celular foi centrifugado por 7 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi retirado com a finalidade de inativar o DMSO utilizado para o congelamento. O *pellet* formado foi ressuspendido em 2 mL de meio de cultivo (DMEM + SBF 9:1) e transferido para uma garrafa de cultivo²⁹.

Na garrafa foram adicionados 10 mL de meio de cultivo e esta deixada em estufa de cultivo com atmosfera de CO₂ a 37°C durante 24 h (figura 12). Ao final do período o meio foi trocado, com a finalidade de proporcionar suporte nutricional as células em crescimento e as condições de armazenagem, em estufa mantidas, ao final de 48h o procedimento é repetido²⁹.

Figura 12: Armazenagem dos cultivos celulares em garrafas de polietileno, sob temperatura controlada em estufa com atmosfera de CO₂



3.5.2) Cultura.

A qualidade das células, quanto à morfologia, foi verificada ao microscópio óptico de luz invertida. Quando a ocupação do fundo do frasco for suficiente, com pipeta de Pasteur, suga-se o meio de cultivo. Em seguida, as células foram lavadas com 2 mL de tampão PBS (livre de cálcio e magnésio)²⁹.

O tampão foi retirado e 4,5 mL de tripsina são adicionadas às células, deixou-se reagir por 7 minutos para que elas se desprendessem do fundo do frasco. As células foram transportadas para um frasco de centrifuga (Falcon), e centrifugadas a pelo menos 1000 rpm e por 8 minutos à temperatura ambiente.

Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado e o *pellet* de células misturado a 1 mL de meio de cultivo²⁹.

3.5.3) Contagem celular

Da amostra preparada conforme descritos anteriormente foram retirados 20 μ l de solução homogênea das células e misturados a 20 μ l do corante Azul de Trypan. Homogeneizados em um eppendorf, a fim de submetê-las ao teste de viabilidade celular²⁹.

Uma gota dessa mistura (20 μ l) foi levada à câmara de Neubauer (figura 13), a gota se dispersou na câmara por capilaridade. Ao microscópio invertido (figura 14) células claras foram visualizadas, permitindo assim a identificação e a contagem destas.

Figura 13: Câmara de Neubauer, destinada a contagem de células



Figura 14: Microscópio invertido, e garrafas contendo os cultivos de células de MCF-7 e NH/3T3



3.6) Ensaio biológico para extrato bruto e frações – Citotoxicidade

Depois de quantificadas as células foram semeadas em placas para Elisa, $2 \cdot 10^4$ unidades de células por cavidade da placa e a elas adicionados 100 μL de meio de cultivo. As placas foram armazenadas em estufa de CO_2 a 37°C por 24 horas. Este período foi destinado à adesão das células na superfície da placa de cultivo²⁹.

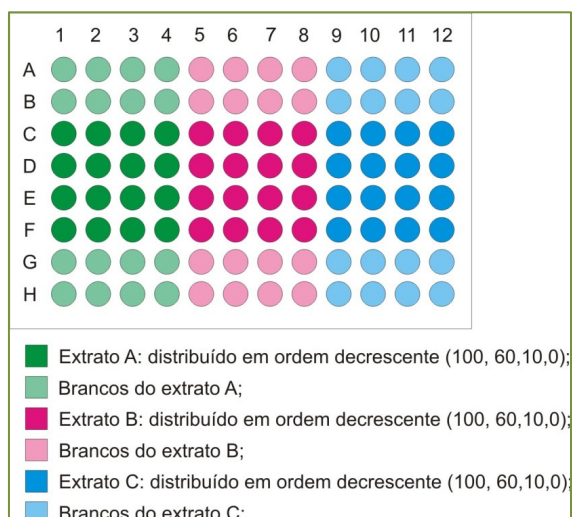
As placas foram retiradas da estufa e a cada cavidade adicionados 2 μL do extrato bruto/ fração e 100 μL de meio de cultivo. Foram novamente armazenadas, sob as mesmas condições, por 48 horas. Este período foi necessário a interação dos princípios ativos adicionados com as células²⁹.

As placas foram organizadas de maneira a dispor as diluições dos extratos em ordem decrescente de concentração. Para extratos brutos, inicialmente ressuspensos na proporção 1:1 (m/v), estas diluições são da ordem de 600, 100, 60, 10 μL , que correspondem, respectivamente, à uma massa de 0,6; 0,1; 0,06; 0,01 g/ mL de diluição. Considerando os 2 μL adicionados a cada cavidade, a massa passa a ser, respectivamente, de $1,2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $1,2 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-5}$ g de material vegetal bruto²⁹.

Para cada uma das 18 frações, as proporções de diluição foram 1:100, 1:600 e 1:1000. Esta diluição totalizou um volume de amostra de $2 \cdot 10^{-4}$, $1,2 \cdot 10^{-5}$ e $2 \cdot 10^{-6}$ g de amostra, respectivamente. Todas as frações e suas diluições foram submetidas a ensaio biológico, distribuídas conforme demonstrado na figura 15. Cada ensaio foi produzido com 4 repetições, em que, para cada uma das diluições foi utilizado 2 μL de extrato por repetição²⁹.

Conseqüentemente, o peso de material vegetal acrescentado por repetição foi de $2 \cdot 10^{-7}$, $1,2 \cdot 10^{-8}$ e $2 \cdot 10^{-9}$ g, respectivamente, para o volume de $2 \cdot 10^4$ unidades de células. Foram mensurados ao todo três ensaios²⁹.

Figura 15: disposição dos extratos de Jodina nas placas de Elisa



Posteriormente, o experimento foi finalizado pela adição de 50 μL de ácido tricloroacético (TCA). Esta ação destinou-se a romper a membrana das células e a fixação de suas proteínas na superfície da placa. As placas foram deixadas a 4°C por pelo menos 1 hora antes da coloração²⁹.

Estas proteínas foram coradas com 100 μL de solução de sulforodamina B, e imediatamente foram lidas em espectrofotômetro de Elisa a 492 nm²⁹.

Simultaneamente ao experimento foram produzidas placas, chamadas T0, que foram tratadas com TCA após o período de 24 horas de incubação. Assim, foi possível mensurar a concentração inicial de células que estavam aderidas à superfície da placa, antes da adição do princípio ativo e compará-las às placas teste, que receberam o tratamento²⁹.

3.7) Ensaio biológico das frações ativas – Mecanismo de ação

3.7.1) Cultura de células

A linhagem celular de carcinoma da mama MCF-7, bem como a de células saudáveis de fibroblastos NH/3T3, foram cultivadas conforme descrito no capítulo 3.5. Em seguida, foram extraídas das garrafas de cultivo com auxílio de 1 mL de Trypsina e semeadas em placas Petri, estéreis, de polietileno com 60 mm de diâmetro.

A cada placa foi adicionado 1.10^6 unidades de células e 5 mL de meio de cultivo, mantidas por 24 horas à 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Este período destina-se a proporcionar a aderências das células a superfície da placa de cultivo⁵³.

Em seguida, foram adicionados às placas Petri 100 µL dos diferentes extrato testado e 5 mL de meio de cultivo, mantidas por 48 horas sob as mesmas condições descritas no parágrafo anterior. Neste período esperava-se que a linhagem tumoral tivesse seu crescimento inibido, enquanto que a linhagem saudável proliferação e aumento no crescimento²⁹.

3.7.2) Extração de RNA.

As placas Petri contendo células de MCF-7 e NH/3T3, cultivadas conforme o descrito no item anterior, foram retiradas da estufa e dispostas em bandejas contendo gelo, deixadas em repouso por aproximadamente 5 minutos.

O meio de cultivo das placas foi desprezado e as células aderidas lavadas com 1 mL de PBS para RNA por duas vezes, e lizados com 1 mL de Trizol[®]. As placas foram deixadas por aproximadamente 2 minutos em repouso e transferidas para tubos eppendorf.

A separação dos RNAs e proteínas foram feita, incubando-se os eppendorfs à temperatura ambiente por 5 minutos e adicionando 0,2 mL de clorofórmio p. a.. Os tubos foram agitados por 15 segundos e incubados mais 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos à 4°C. O sistema foi dividido em três fases: i) uma

fina superfície rósea; ii) uma fase aquosa (RNA) e iii) uma fase vermelha (clorofórmio/fenol).

A fase intermediária do RNA foi transferida para outro eppendorf e o RNA da fase aquosa foi precipitado ao misturar 0,5 mL de álcool isopropílico e seguido do armazenamento dos tubos a -20°C por 24 horas pra completa precipitação.

Após o período de precipitação, os eppendorfs foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos antes de centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C. O RNA precipitou formando um *pellet* sem cor.

O sobrenadante foi vertido e o tubo deixado de boca para baixo para escorrer resíduos do sobrenadante. O *pellet* foi lavado com álcool etílico 75%, agitado e centrifugado à 7500 rpm por 5 minutos à 4°C⁴³.

Verteu-se novamente o sobrenadante e os tubos foram deixados virados por 10 minutos a temperatura ambiente, o *pellet* seco foi dissolvido com 1 mL de água sem RNA e incubado por 10 minutos à 60°C.

A concentração de RNA na amostra pode ser quantificada diluindo-se a amostra em água miliQ (1:500) e realizada a leitura em duplicatas em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant®) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm⁴³. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre as duas absorbâncias estava superior a 1,6.

No comprimento de onda de 260 nm uma unidade de absorbância corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução, logo, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula⁴³:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ µg/mL}$$

Onde: A = absorbância; D = diluição da alíquota usada na quantificação (por exemplo, para 1 µL da solução de RNA em 400 µL de água, D = 1:499 = 500 vezes). Além da quantificação foi verificado também a integridade do RNA em gel de agarose 1,5%.

3.7.3) Síntese do cDNA.

A síntese do cDNA PE feita a partir do kit SuperScript® (Invitrogen).

Em ependorfs, de 500µL, numerados colocou-se 1µL do RNA total das amostras e igual volume do RNA controle. Em seguida adicionou-se 1µL de dNTP 10 mM, 1µL dos primers desenhados, completou-se o volume até 10µL com água deionizada e tratada com DEPC. Incubou-se a mistura RNA/primers a 65°C por 5 minutos, em seguida, transferiu-se para banho de gelo por pelo menos 1 minuto.

Em um eppendorf de 2mL, preparou-se um meio de reação reação, contendo 2µL de buffer RT 10x, 4µL de MgCl₂ 25mM, 2µL de DTT 0,1M e 1µL de RNase out. Os volumes da reação foram ajustados ao número de ensaios realizados.

Adicionou-se os 9µL da reação a mistura RNA/primers, homogeneizou-se e centrifugou-se brevemente. Incubou-se a 42°C por 2 minutos.

Adicionou-se 1µL de SuperScript II RT em cada tubo menos no controle, adicionou-se 1µL de água tratada com DEPC. Incubou-se à 42°C por 50 minutos. Paralisou-se a reação a 70°C por 15 minutos, e em seguida transferiu-se o sistema para o banho de gelo.

Finalmente centrifugou-se brevemente, adicionou-se 1µL de RNase H em cada tubo e incubou-se à 37°C por 20 minutos. A reação foi estocada à temperatura de -20°C, ou ainda, poderia ter sido testada em gel de agarose 2%.

3.8) Espectroscopia por infra vermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético, é aplicada para a identificação de compostos ou investigar a composição de amostras⁵⁴.

A espectroscopia no infravermelho se baseia nas frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico.

As amostras das frações foram ressuspensas em álcool metílico p.a. na proporção 2:1, ou seja, 2g do extrato para 1 mL do solvente. A necessidade da alta concentração deve ao pequeno volume de amostra que é depositado sobre o substrato⁵⁵. O substrato utilizado foi um filme fino de silício, escolhido especificamente por ser transparente no infra vermelho.

Os substratos foram cortados em tamanhos iguais e limpos através de submersão em diferentes solventes. O primeiro aplicado foi acetona p.a., o substrato foi deixado em repouso nesta solução por 15 minutos, lavado três vezes com água MilliQ®, e novamente submerso em um segundo solvente, agora ácido sulfúrico 15%. O procedimento foi repetido ainda com ácido nítrico 20% e detergente não iônico. Os substratos foram secos em estufa por 2 horas à 30°C e limpos com gás nitrogênio, com a finalidade de remover as marcas deixadas pela água na secagem⁵⁵.

Os extratos foram depositados por Spin-Coated, método que consiste em intensa agitação da amostra sob vácuo, com a finalidade de evaporar o solvente permitindo que o resíduo sólido fique distribuído de maneira homogênea na superfície do substrato.

Em seguida as amostras foram mantidas em estufa de secagem a temperatura de 30°C por 4 horas, e deixadas para resfriar em dessecador.

A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de IR com transformada de Fourier (IR Prestige-21 Shimadzu), em transmitância, na faixa espectral de 400 à 4000 cm^{-1} , com resolução de 50 ciclos de varredura por minuto.

Um substrato limpo foi utilizado para zerar o aparelho. Em seguida os substratos contendo a amostra foram fixados ao leitor e submetidos ao feixe.

3.9) Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Devido à natureza desconhecida das amostras, e a dificuldade de remoção de compostos graxos das colunas do aparelho, foi feita a derivatização das amostras. Este procedimento consiste em promover a esterificação dos possíveis ácidos graxos que compoñham as amostras, evitando assim que os mesmos inviabilizem a coluna.

Em um erlenmeyer de 100 mL com boca esmerilada foi pesado 250 mg da amostra, foi adicionado 6 mL de uma solução 2% NaOH em metanol. A mistura foi acoplada a um condensador de Liebig, aquecida e deixada em refluxo por 10 minutos.

Foi adicionado 7 mL da solução BF_3 em metanol e a mistura aquecida por 2 minutos, 5 mL de hexano p.a. e o sistema deixado em ebulição por mais 1 minuto. O aquecimento foi removido para que esfriasse naturalmente.

A mistura foi transferida para um tubo de ensaio e a ela foi adicionada 1 mL de solução saturada de NaCl, para facilitar a separação das fases. O sobrenadante foi retirado e transferido para um segundo tubo de ensaio contendo Na_2SO_4 , que tinha por finalidade certificar que não existia água na amostra.

A fase orgânica foi transferida para frascos de vidro tarados que foram armazenados em dessecador até o processamento.

A determinação da amostra foi feita em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa, CG/MS (GCMS-QP5050A Shimadzu), equipada com coluna rtx-Wax, através de método de inserção direta na coluna. As amostras foram dissolvidas em álcool metílico p.a.⁵⁴.

Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca do aparelho.

IV. Resultados e Discussão:

4.1) Produção do extrato bruto

Os extratos brutos produzidos demonstraram rendimento médio de 10%, ou seja, a partir de 60g de material vegetal pesado foram obtidos 6g de extrato bruto seco ao final do processo de rota evaporação e/ou liofilização.

Os três extratos JRA, JRM e JRC foram mantidos sob refrigeração por um período de 2 semanas, até serem submetidos ao ensaio biológico.

4.2) Ensaios biológicos a partir do extrato bruto

Foram realizados dois ensaios biológicos.

No primeiro ensaio foram testadas as cinco diluições dos extratos brutos em duas linhagens celulares: células saudáveis (NH/3T3) e tumorais mamárias (MCF-7), através dos resultados obtidos foi possível perceber que o extrato metanólico apresentou melhor desempenho frente às duas linhagens tumorais, conforme exposto na tabela 3.

Tabela 3: resultados dos extratos brutos de Jodina, em células tumorais (MCF-7) frente a extratos de diferentes solventes e de células saudáveis (NH/3T3) frente aos mesmos extratores.

Diluição	MCF-7 (%) Aquoso	MCF-7 (%) Metanólico	MCF-7 (%) Clorofórmico	3T3 (%) Aquoso	3T3 (%) Metanólico	3T3 (%) Clorofórmico
6:1000	-45,73*	-40,73	-73,03	-83,01	58,30**	-58,21
1:100	-48,32	-63,47	-71,41	-76,05	65,02	-50,03
6:100	-43,49	-90,38	-92,35	-76,51	63,08	-82,20
1:10	-51,31	-93,09	-87,52	-80,03	66,05	-78,75
6:10	-54,47	-95,26	-66,43	-80,31	76,99	5,49

* valores negativos correspondem a inibição do crescimento celular;

** valores positivos correspondem a proliferação do crescimento celular;

No segundo ensaio, foi testado o extrato metanólico bruto, frente a quatro linhagens celulares: 3T3 (fibroblasto saudável), MCF-7 (neoplasia mamária), KB (neoplasia de boca), HT-29 (neoplasia de colo de reto), com a finalidade de conhecer o comportamento deste extrato em outros tipos de neoplasias. Os resultados expressos são descritos em % de proliferação/ inibição celular, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos nos ensaios com o extrato metanólicos bruto de Jodina em diferentes linhagens celulares

Diluição	MCF-7 (% inibição)	3T3 (% proliferação)	KB (% inibição)	HT-29 (% proliferação)
6:1000	-44,27*	59,02**	-47,47	14,14
1:100	-61,77	65,62	-46,09	16,09
6:100	-93,3	64,58	-38,47	14,83
1:10	-95,08	93,05	-36,83	8,58
6:10	-93,06	66,84	-36,98	3,85

* valores negativos correspondem a inibição do crescimento celular;

** valores positivos correspondem a proliferação do crescimento celular;

Observando-se da tabela 3 é possível perceber que o extrato aquoso **JRA** não apresentou bom desempenho ao aplicado em células tumorais MCF-7, pois demonstrou valor médio de 48% de inibição, independente da concentração do extrato administrada. Aplicado às células normais 3T3, o extrato aquoso apresentou um desempenho ainda menor, pois produziu uma acentuada inibição, em 79% aproximadamente, comprovando toxidez para esta linhagem e ainda não apresentaram variabilidade significativa em relação à concentração do extrato administrada.

O extrato clorofórmico **JRC**, assim como o anterior, não apresentou bom desempenho quando aplicado às células tumorais MCF-7, pois no gradiente de concentração crescente têm um percentual de inibição também crescente, até a terceira diluição, na seqüência das demais diluições este fator não se confirma, produzindo um efeito contrário, conforme observado na tabela 3. Aplicado às células normais 3T3, o extrato clorofórmico apresentou um

desempenho ainda menos coerente, pois produz inibição desta linhagem, capaz de chegar a 82% na terceira diluição, e proliferação de 5% na maior concentração da diluição.

Em contrapartida, o extrato bruto Metanólico **JRM** produziu um resultado melhor, pois, confrontado as linhagens saudáveis de 3T3 apresentou efeito de proliferação celular que aumentou de maneira proporcional conforme o aumento da concentração (exceção extrato 6:100). Da mesma forma, diante das células tumorais de MCF-7 apresentou inibição celular, crescente em relação à concentração do extrato.

Os ensaios foram repetidos e os resultados confirmados. Assim, diante do exposto, optou-se por utilizar apenas o extrato metanólico nos ensaios subseqüentes, por entender-se que esta foi a fração cujos resultados foram mais adequados ao experimento.

No segundo experimento, o extrato metanólico bruto foi aplicado às quatro linhagens celulares disponíveis no laboratório de Cultivo Celular, cujos resultados obtidos estão expressos na tabela 4. As células MCF-7 e 3T3 tiveram comportamento semelhante ao obtido no primeiro experimento. A linhagem KB apresentou um percentual de inibição de 40% em média, enquanto que, a linhagem HT-29 demonstrou potencia de proliferação de até 14% quando exposto ao extrato de menor concentração.

Os resultados obtidos com a linhagem KB, embora interessantes, não foram explorados neste estudo, pois, nosso grupo de pesquisa desenvolveu outro fitofármaco que possui resultados mais significativos quando confrontado a esta linhagem. Assim, o extrato metanólico fracionado foi testado contra as duas primeiras linhagens celulares.

4.3) Ensaio biológico das frações

Foram realizados três ensaios com as 18 frações, a média destes valores foi expressa em percentuais de proliferação e/ou inibição celular conforme exposto na tabela 5.

Pode-se observar na tabela 5 que os extratos 1, 2, 11, 12, 13, 14 e 15 apresentaram inibição do crescimento das células de MCF-7 em qualquer concentração administrada. Os extratos 8, 9 e 10 inibiram o crescimento das mesmas células nas concentrações 60 e 100, enquanto que, os extratos 3, 4, 5, 16, 18 inibiram o crescimento apenas na concentração 100 e que os extratos 6 e 17 produziram proliferação celular em qualquer concentração.

Quando relacionados ao efeito nas células NH/3T3 os extratos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16 inibiram o crescimento celular apenas na concentração 100, os extratos 10 e 11 produziram inibição do crescimento celular nas concentrações 60 e 100. Os extratos 6, 14, 17 e 18 produziram proliferação celular em qualquer concentração.

Inter-relacionando os resultados foi possível perceber que, o melhor desempenho em valores de inibição de MCF-7 e proliferação de 3T3 foram dos extratos 1, 2, 12, 13, 14 e 15. Dentre os quais, foram escolhidos os de melhor desempenho para a terceira etapa do ensaio biológico.

Tabela 5: Porcentagem de inibição e proliferação celular linhagens MCF-7 e NH/3T3 das 18 frações do extrato metanólico obtidas na coluna Sephadex

Diluição\Fração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
MCF7																		
100	-91,86	-84,12	-59,45	-53,81	-59,46	16,27	-69,49	-69,91	-67,19	-58,65	-59,16	-61,59	-66,59	-77,48	-80,81	-1,32	18,97	-38,52
60	-47,17	-33,27	3,01	40,87	59,95	72,4	34,59	-3,96	-14,11	-50,91	-68,37	-60,81	-47,01	-63,22	-35,89	44,85	31,32	122,2
10	-36,44	-13,11	39,47	51,32	74,16	84,41	35,43	44,58	51,68	13,69	-26,29	-13,39	-22,01	-54,86	-25,93	96,02	85,58	197,2
3T3																		
100	-94,15	-59,78	-60,73	-56,92	-2,99	38,18	-74,78	-93,76	-97,03	-47,55	-106,37	-109,45	-74,16	48,36	-100,29	-51,76	19,06	25,63
60	46,62	31,96	8,22	40,98	87,84	57,06	31,43	19,12	33,81	-68,92	-31,26	0,08	36,99	93,37	4,04	40,53	52,39	171,59
10	68,25	33,54	12,15	60,14	78,48	106,89	79,28	49,74	5,68	53,53	36,65	44,43	82,69	108,87	31,12	76,51	58,21	138,64

Nas figuras estão apresentados os gráficos 1 e 2 estão representados os valores de inibição/proliferação celular descritos na tabela 5.

Figura16: Médias dos três ensaios sobre o efeito das frações dos extratos metanólicos de Jodina sobre o crescimento/inibição de MCF-7

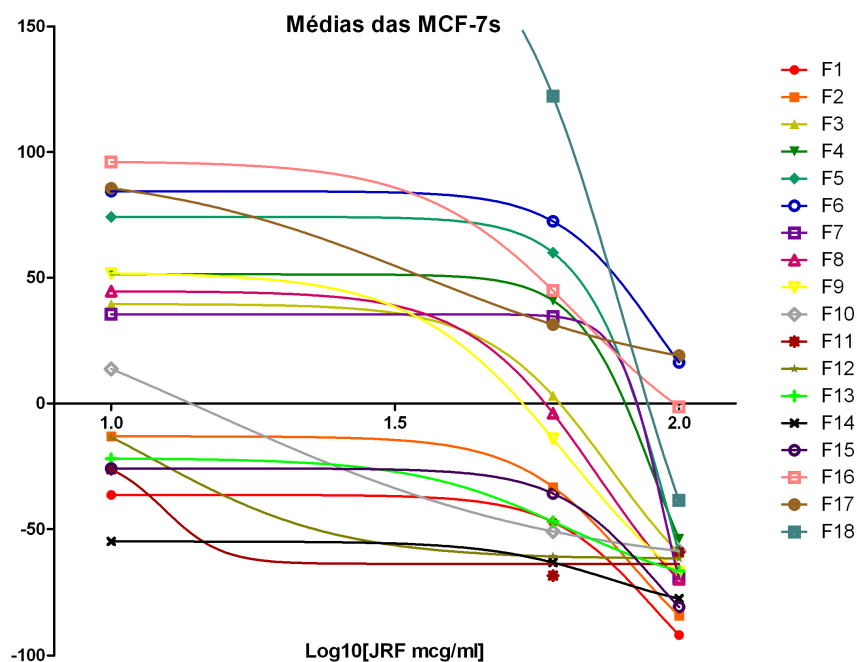
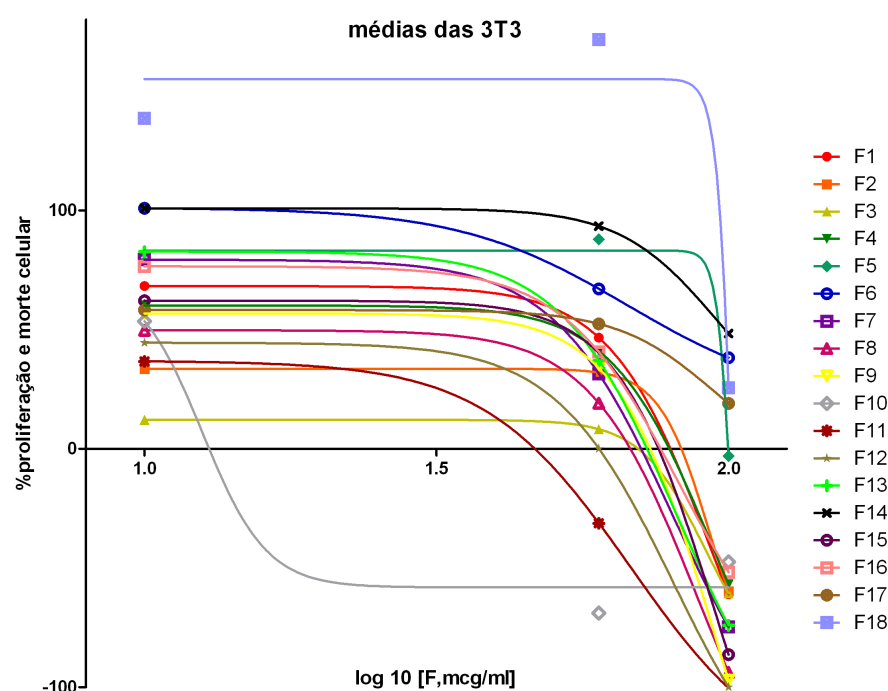


Figura 17: Médias dos três ensaios sobre o efeito das frações dos extratos metanólicos de Jodina sobre o crescimento/inibição de NH/3T3



Os extratos de melhor desempenho em inibição de MCF-7 e proliferação de 3T3 foram 1, 2, 12, 14 e 15, cujos resultados estão novamente descritos na tabela 6.

Tabela 6: Resultados de melhor desempenho nos testes das frações de Jodina

		1	2	12	14	15
MCF7	100	-91,86	-84,12	-61,59	-77,48	-80,81
	60	-47,17	-33,27	-60,81	-63,22	-35,89
	10	-36,44	-13,11	-13,39	-54,86	-25,93
3T3	100	-94,15	-59,78	-109,45	48,36	-100,29
	60	46,62	31,96	0,08	93,37	4,04
	10	68,25	33,54	44,43	108,87	31,12

A observação detalhada das frações 12 e 15 permitem perceber que seu desempenho foi inferior aos dos demais extratos, pois, em MCF-7 o percentual de inibição das duas maiores concentrações não demonstra variação significativa no extrato 12. Em 3T3 estes dois extratos tiveram uma inibição bastante pronunciada na concentração 100, em contrapartida, um crescimento pouco significativo na concentração 60, por este motivo, ambos foram desconsiderados.

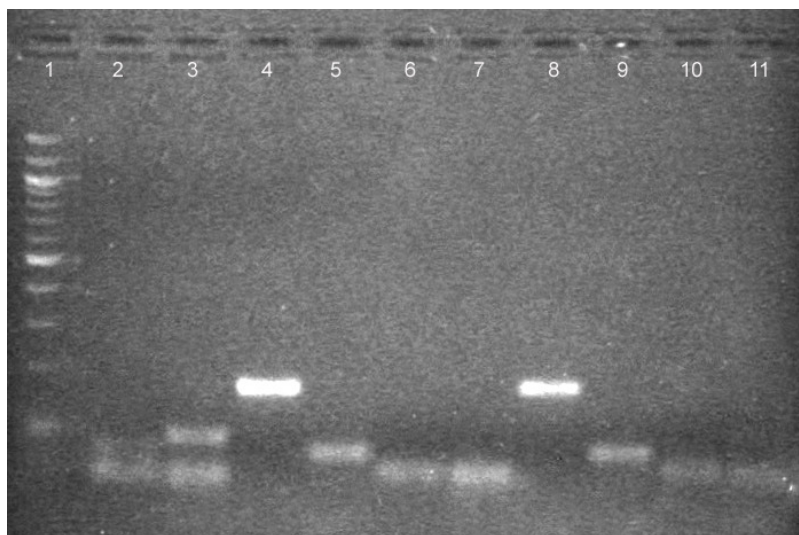
4.4) Ensaio biológico de verificação do mecanismo de apoptose

Foram realizados diversos ensaios de extração do RNA. No primeiro foi feito o cDNA dos ensaios em branco das células, conforme o exposto na figura 18.

Segundo a legenda é possível perceber que houve resultado positivo para todos os testes aplicados. O Gene P21 que é um gene supressor de tumor que apareceu de maneira fraca em ambas as linhagens, porém, conforme o previsto é mais visível em 3T3 onde deve estar naturalmente mais ativado, afinal, MCF-7 já possui código genético tumoral.

O Gene BCL2 que é um promotor da sobrevivência celular, inibindo a apoptose, e assim como o anterior pode ser percebido em ambas as linhagens. Sua presença era esperada em MCF-7, por se tratar de uma linhagem tumoral, cujo desenvolvimento é anormal em relação a 3T3. Da mesma forma, era esperado em 3T3, pois no período avaliado as células estavam em curva de ascensão do crescimento.

Figura 18: PCR em gel de agarose dos cultivos controle de MCF-7, 3T3 e controle do kit



1 – Marcador

2 – MCF-7 P21

3 – MCF-7 BCL2

4 – MCF-7 GAPDH

5 – MCF-7 beta-actina

6 – 3T3 P21

7 – 3T3 BCL2

8 – 3T3 GAPDH

9 – 3T3 beta actina

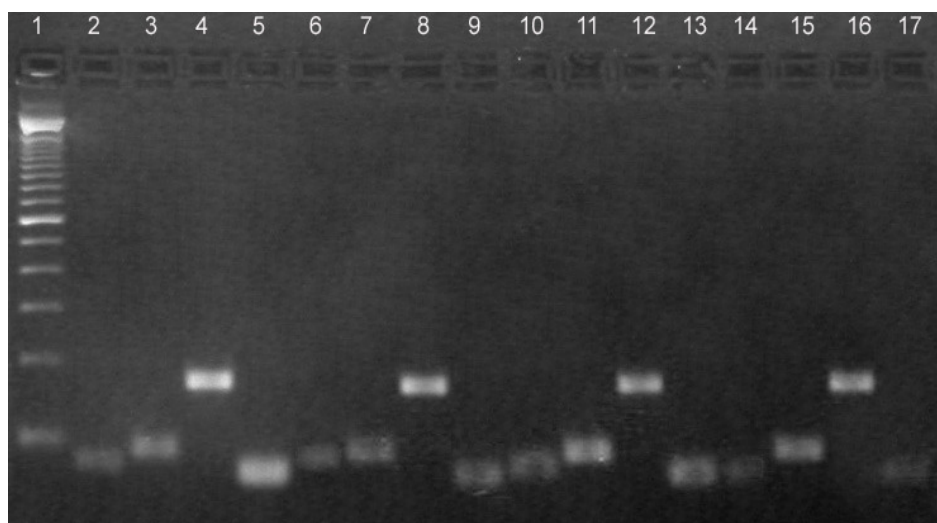
10 – Control GAPDH

11 – Control beta-actina

Foi analisado como controle da reação o gene da beta-actina. A análise da expressão desse gene mostra a presença do marcador, estando positiva nas 3 amostras, na região de 100pb. A beta-actina (gene ACTB) foi escolhida por ser uma das seis diferentes isoformas da actina que foram identificadas em humanos, sendo altamente conservadas nas proteínas que estão envolvidas na motilidade celular, estrutura e integridade.

O segundo controle adotado foi o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que é uma enzima envolvida na glicólise. O GAPDH é bastante conservado entre as espécies. Nos ensaios realizados (figuras 18 e 19) foi o marcador melhor identificado para as linhagens MCF-7 e 3T3, em função desta característica.

Figura 19: PCR em gel de agarose dos cultivos de MCF-7, tratados com as diluições dos extratos de Jodina



- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1 – Marcador | 9 – MF1410 beta actina |
| 2 – MF210 P21 | 10 – MF1460 P21 |
| 3 – MF210 BCL2 | 11 – MF1460 BCL2 |
| 4 – MF210 GAPDH | 12 – MF1460 GAPDH |
| 5 – MF210 beta-actina | 13 – MF1460 beta actina |
| 6 – MF1410 P21 | 14 – MC P21 |
| 7 – MF1410 BCL2 | 15 – MC BCL2 |
| 8 – MF1410 GAPDH | 16 – MC GAPDH |
| | 17 – MC beta actina |

O segundo ensaio realizado testou os cultivos tratados com os diferentes extratos e suas diluições, sem resultados satisfatórios. A revisão da metodologia fez perceber que a armazenagem a temperatura de -20°C não é adequada para a conservação dos RNAs celulares.

Diante disso, foi feito um gel de agarose 0,8%, no qual foram testados os RNAs extraídos. Destes estavam íntegros, apenas os provenientes dos cultivos MCF-7 extrato 2 – diluição 10, MCF-7 extrato 14 – diluições 10 e 60 e MCF-7 controle.

Consequentemente, não aparecem na figura 16 os resultados referentes aos cultivos de MCF-7 extratos 1 – diluição 10 e 60, MCF-7 extrato 2 – diluição 60 e todos os ensaios complementares com a 3T3.

Na figura 19 pode-se perceber, portanto, a identificação positiva para todos os marcadores testados em MCF-7 (GAPDH e beta-actina).

A presença de P21 foi percebida de maneira menos significativa nos tratamentos com os extratos MF210, MF1410 e MF1460 do que no teste com o controle (MC). Segundo o descrito pela literatura, é possível que este resultado indicasse que, os extratos aplicados não ativam a ação deste gene no metabolismo celular, em um fator acima do qual ele já estaria naturalmente presente.

O gene BCL2 aparece de maneira bem significativa, em todos os testes, MF210, MF1460 e MC, com exceção do F1410.

Conforme descrito anteriormente, admitindo-se que BCL2 atua como um inibidor apoptótico do metabolismo celular, é possível, portanto, crer que apenas este extrato, MF1410 estaria menos ativo, ou seja, desencadeando um processo apoptótico.

Assim sendo, os extratos 2 e 14, nas concentrações aplicadas não estariam produzindo morte celular via apoptose, existindo ainda a probabilidade de outra forma prevista pela literatura.

4.5) Análise das frações dos extratos de *Jodina* no infra vermelho.

Escolhidos as frações 1, 2, e 14, as amostras secas foram encaminhadas ao Laboratório de Materiais e Catálise, no qual foram depositadas por Spin-Coating em substratos de silício, conforme descrito no item 3.8.

A análise das frações forneceu as figuras 20, 21 e 22.

Conforme o previsto, podemos perceber que as figuras 20 e 21 são muito semelhantes, devido a sua proximidade de extração, embora se diferenciem em intensidade dos picos.

Os picos identificáveis, são a direita de 3500 cm^{-1} , banda larga correspondente a grupos --OH , logo em seguida, existem a direita de 3000 cm^{-1} , as bandas típicas das ligações de hidrocarbonetos --CH_3 e --CH_2 de deformação radial.

Em 2400 cm^{-1} há um sinal comum aos três espectros, que corresponde ao substrato de silício, embora o material seja indicado como translúcido ao infra, ele emite um pico nesta região.

Em 1750 cm^{-1} , há um pico que é mais expressivo no extrato 1, no extrato 2 ele indica o sinal, mas sobreposto a próxima banda, nesta região do espectro a correspondência costuma ser para ligação --C=O .

Figura 20: Detalhe dos IR do extrato metanólico 1 de *Jodina rhombifolia*

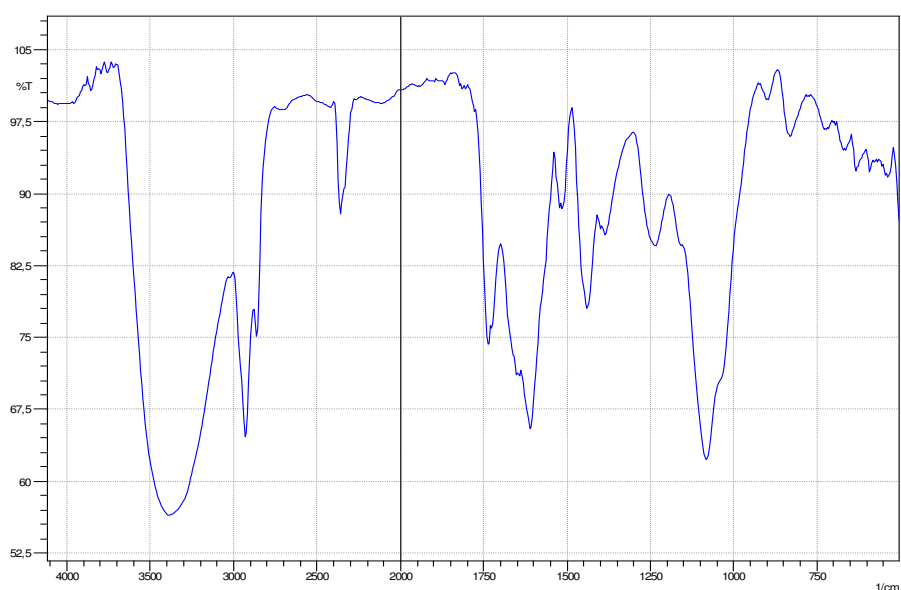
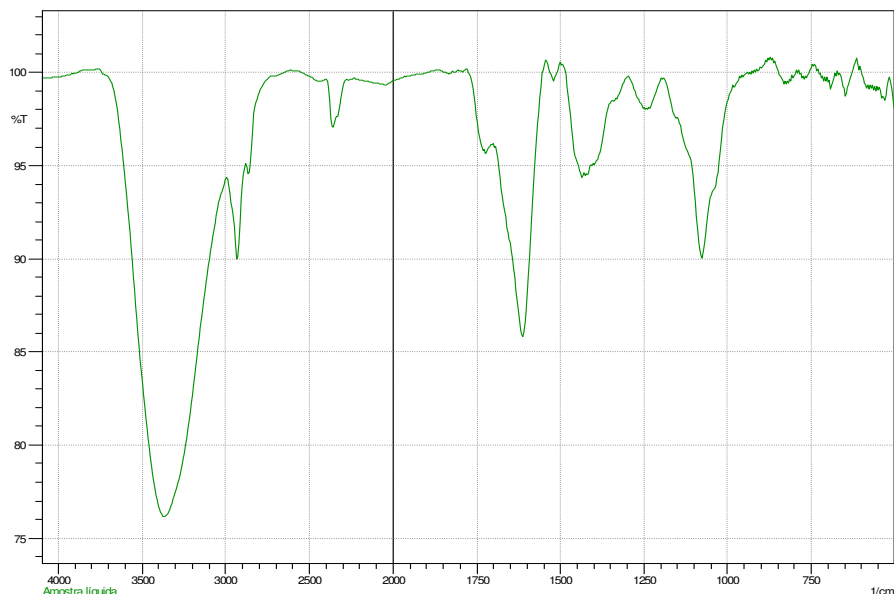


Figura 21: Detalhe dos IR do extrato metanólico 2 de *Jodina rhombifolia*



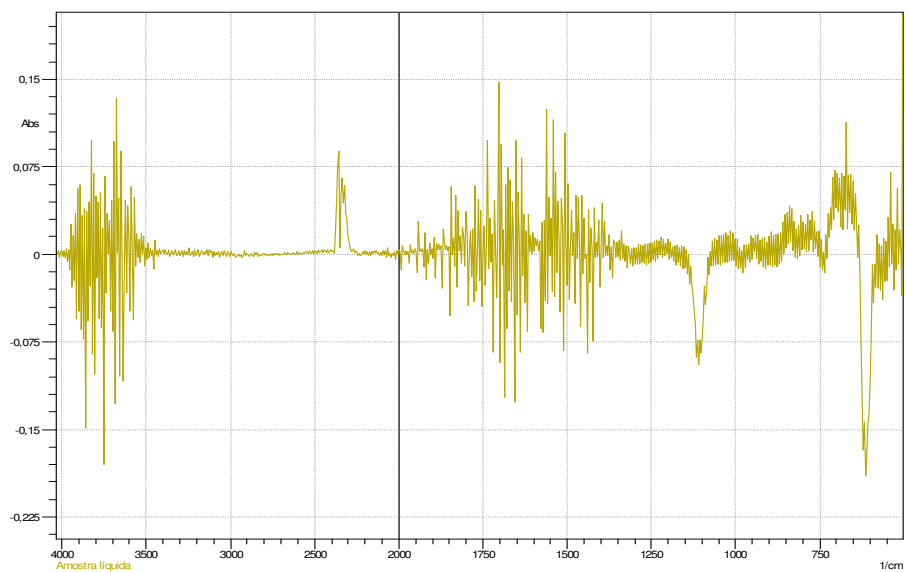
Entre 1550 e 1600 cm^{-1} aparecem às bandas comuns de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ de deformação axial. Entre 1450 e 1400 cm^{-1} a banda que pode ser observada corresponde às deformações produzidas pela ligação $-\text{C}=\text{C}$, mais uma vez o pico tem intensidade maior no extrato 1.

A última banda com sinal interessante nos gráficos 3 e 4 corresponde a uma deformação na região de 1000 a 1200 cm^{-1} que representa as ligações de $(-\text{CH}_2)_n$ de cadeia.

Na figura 22, as bandas são bastaste incomuns, os principais picos de sinal detectáveis são as de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ nas duas regiões de deformação, que correspondem à esquerda de 3500 cm^{-1} e entre a faixa de 1500 e 1750 cm^{-1} .

Os sinais seguintes são entre 1000 e 1200 cm^{-1} e próximo de 650 cm^{-1} , estas bandas correspondem, respectivamente as deformações de $(-\text{CH}_2)_n$ de cadeia e a estrutura ressonante de anel aromático.

Figura 22: Detalhe dos IR do extrato metanólico 14 de *Jodina rhombifolia*

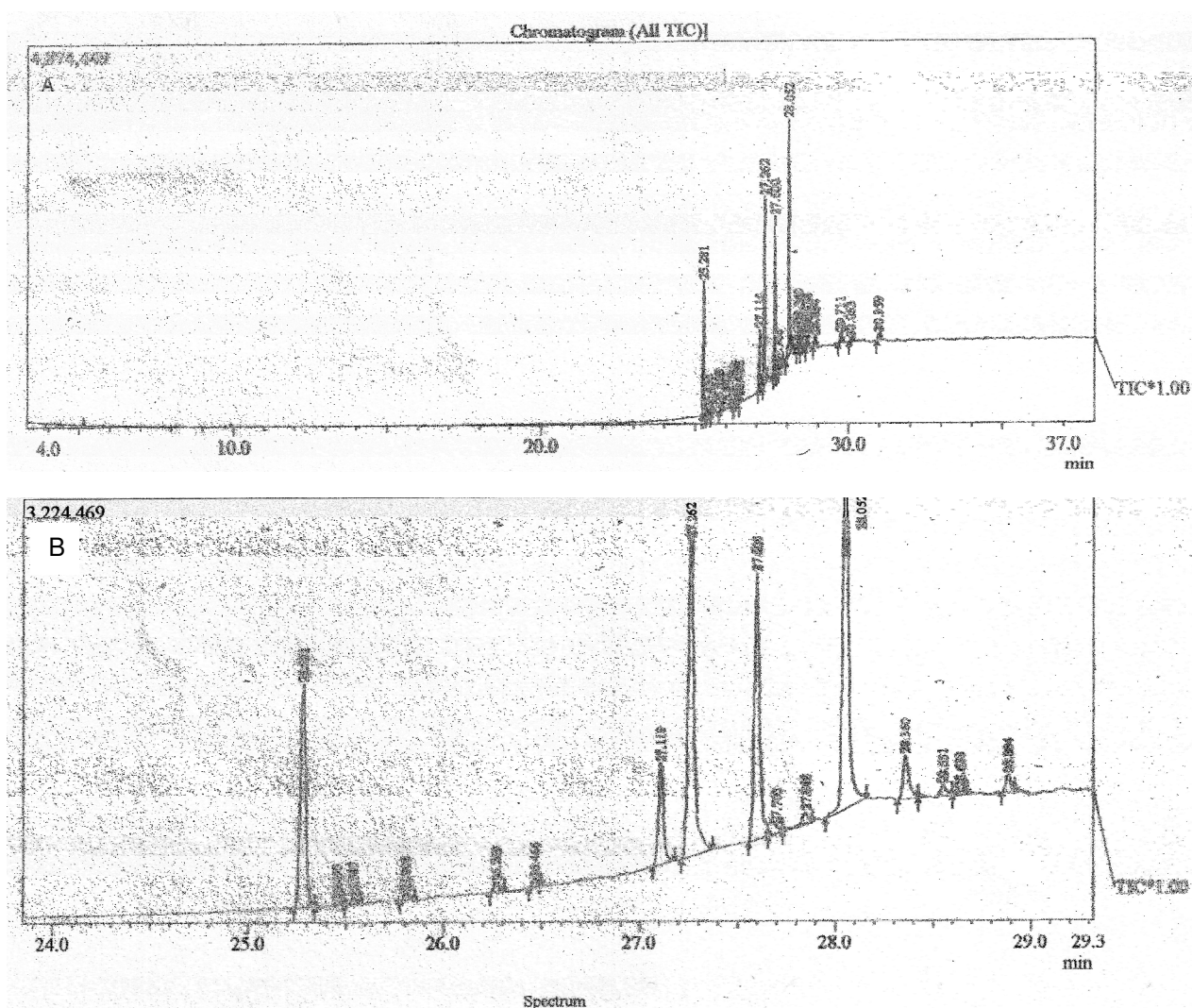


4.6) Testes dos extratos por CG/MS

O ensaio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, assim como o IR, demonstrou grande semelhança entre os extratos 1 e 2 (gráficos 6 e 7, respectivamente), diferindo apenas nas intensidades dos picos, que são mais baixos no extrato 2.

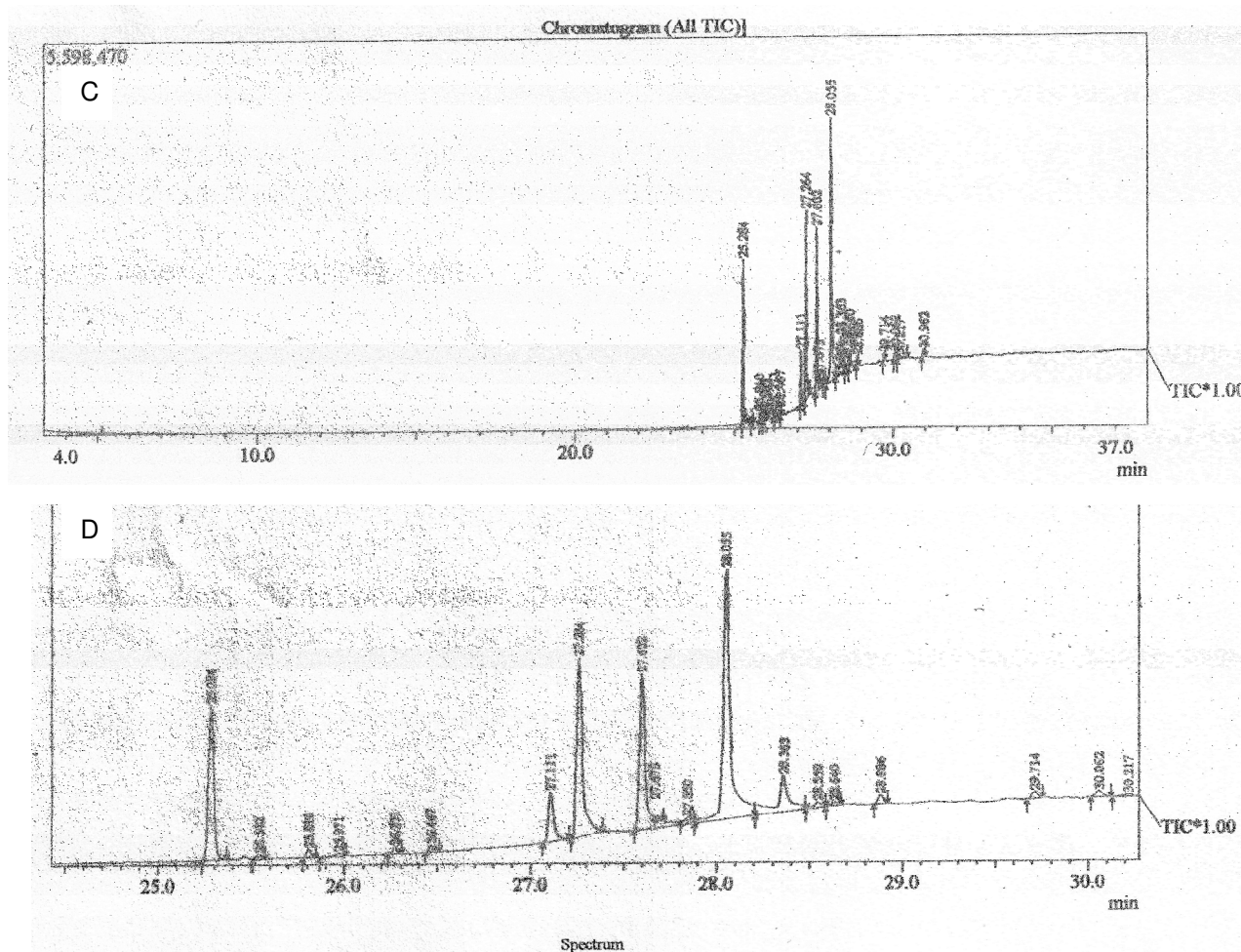
O Extrato 1 (figura 23) apresenta 6 picos de maior intensidade, cujos tempos de retenção e razão massa carga (m/z) são de 25'.28"(85), 27'.11"(111), 27'.26"(138), 27'.60"(139), 28'.05"(151), 28'.36"(64).

Figura 23: CG/MS da fração 1 do extrato, (a) original e (b) ampliado da região de interesse



O extrato 2 (figura 24) também apresenta 6 picos, com tempos de retenção iguais aos anteriores, mas razão massa/carga diferentes, são eles 25'28"(87), 27'.11"(95), 27'.27"(152), 27'.60"(154), 28'.06"(176).

Figura 24: CG/MS da fração 2 do extrato, (c) original, (d) ampliado da região de interesse



Em consulta à biblioteca do aparelho se constata que os compostos de maior probabilidade são em geral ésteres de ácidos graxos, que apresentam em sua configuração estrutural, ligações confirmadas pelo infravermelho. Ou seja, ambos indicam que os compostos orgânicos extraídos são terpenos, de cadeia reta, insaturada e que possuem ligações de $-C=O$ e $-OH$ em sua estrutura molecular.

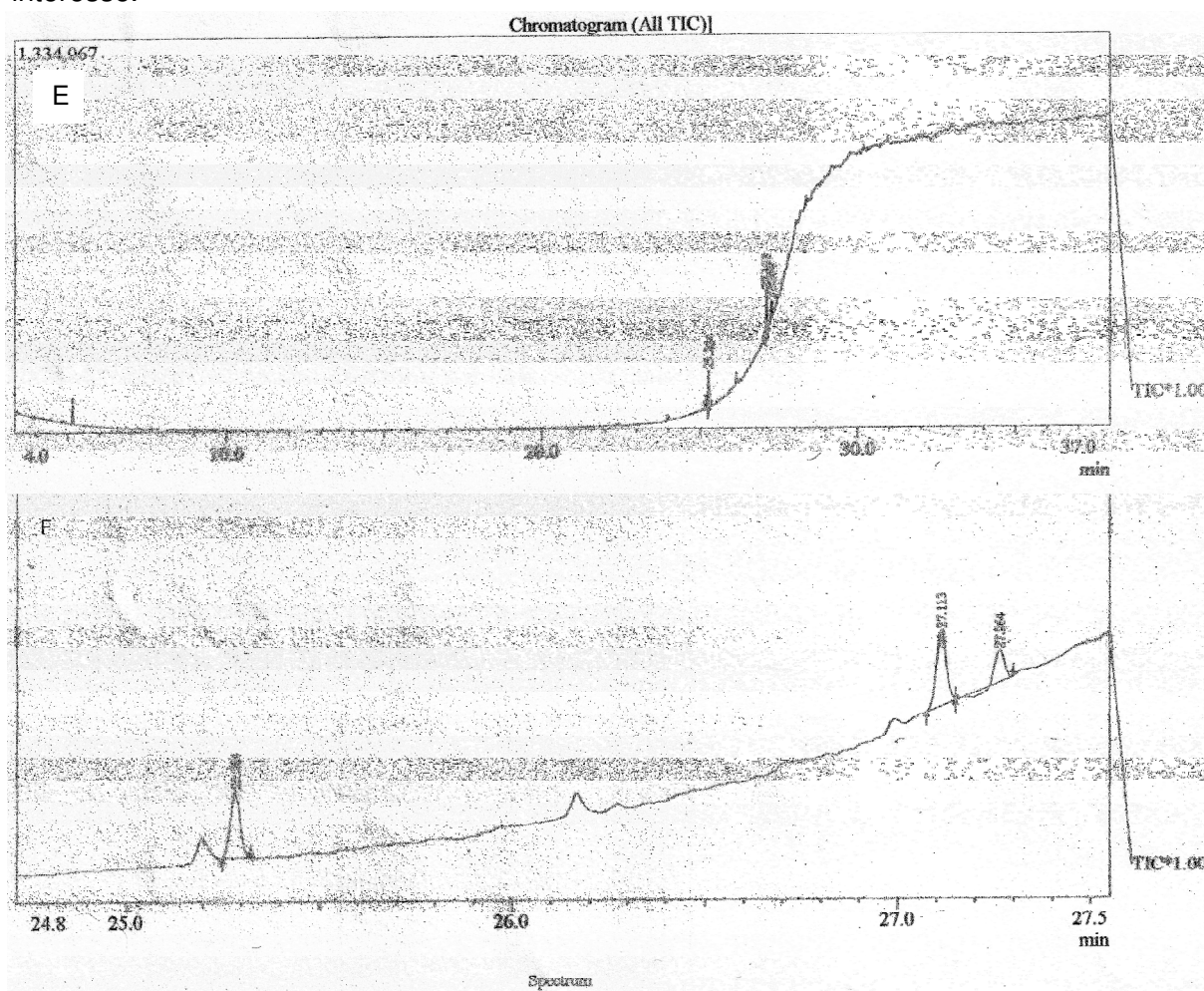
Para o extrato 1 foram indicados, respectivamente, ácido hexadecanóico-metil éster (93%), ácido octadecanóico-metil éster (93%), ácido 9-octadecenóico-metil éster (92%), ácido 9,12-octadienóico-metil éster Z,Z (93%),

9,12,15-octadecatrienol (Z,Z,Z) (91%), 2-hexadecenol (93%), como estruturas dos picos identificados. Para o extrato 2, as indicações são, respectivamente, ácido hexadecanóico-metil éster (93%), ácido octadecanóico-metil éster (93%), 9-octadecenóico (Z)-metil éster (93%), ácido 9,12-octadienóico (Z,Z)-metil éster (90%), 9,12,15-octadecatrienol (Z,Z,Z) (87%), éter monododecyl-etileno glicol (81%).

O extrato 14 (figura 25), também como descrito no infravermelho, apresenta poucos sinais de detecção, estes têm tempo de retenção e razão m/z de 25'.28"(29), 27'.11"(63), 27'.27"(32).

A consulta à biblioteca indicou compostos cíclicos, saturados e insaturados. Acredita-se que a aromaticidade do ciclo do composto, detectada pelo IR possa ter sido quebrada no processo de derivatização das amostras. São indicados, respectivamente, ácido hexadecanóico-metil éster (91%), octadecano (78%), ciclodecanol (80%).

Figura 25: CG/MS da fração 14 do extrato, (E) original, (f) ampliado da região de interesse.



V. Conclusão

A partir do exposto, é possível concluir que:

- × Dentre os extratos brutos, produzidos a partir das folhas da *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn, pelo processo de maceração dinâmica (sendo eles, aquoso, metanólico e clorofórmico), o extrato metanólico mostrou nas quatro repetições possuir atividade antiproliferativa e antineoplásica frente a linhagens de células tumorais mamária de MCF-7. Demonstrou ainda, manter o desenvolvimento normal e/ou promover o crescimento das células saudáveis, na linhagem de fibroblastos NH/3T3 pesquisada.
- × Testado em outras linhagens tumorais, o extrato bruto metanólico de *Jodina rhombifolia* apresentou atividade antineoplásica quando confrontado as células tumorais de câncer de boca (KB), mas não apresentou resultados interessantes para em linhagem de câncer de colo (HT29).
- × O fracionamento do extrato bruto em resina de Sephadex LH-20 produziu 18 frações, dentre as quais, três apresentaram ação ativa semelhante ao do extrato bruto. A purificação do extrato foi confirmada em função do aumentou a atividade específica do produto em duzentas vezes (200x). Este cálculo pode ser produzido através da diminuição massa de material vegetal adicionada por unidade de célula, com valores de inibição de 93%, no caso do extrato 1.
- × O isolamento do RNA das células de MCF-7, produzido com o objetivo de elucidar o mecanismo de atividade que conduziu a morte desta linhagem, permitiu constar que não houve ativação da Apoptose - morte celular programada - nos genes testados. Consequentemente, foi necessário reavaliar as causas da atividade do extrato.
- × A caracterização parcial da estrutura química destes fitomedicamentos, por infra vermelho e cromatografia gasosa, permitiu a identificação de metil ésteres dos ácidos graxos – éster do ácido mirístico (93%), éster do ácido esteárico

(93%), éster do ácido oléico (92%), éster do ácido linoleico (93%), éster do ácido linolênico (91%), para as frações 1 e 2 do extrato bruto, e para a fração 14 do extrato bruto foi identificado o éster do ácido mirístico (91%).

× As células tumorais têm caracteristicamente um aumento da fluidez e uma diminuição da estabilidade da membrana citoplasmática, diferente das células saudáveis, cuja, fluidez normal, promove a diferenciação celular. Com fluidez de membrana maior do que nas células normais, as células cancerosas são mais susceptíveis aos oxidantes, alguns ácidos graxos provocam a diminuição da fluidez de membrana das células tumorais do câncer de colo, mama, pâncreas humano e aumenta a viscosidade da membrana de células normais, conseqüentemente, sua estabilidade. O que pode justificar a proliferação de NH/3T3 e a inibição de MCF-7, contra os extratos de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

VI. Bibliografia

1. PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. *Química Nova*, v. 18, p. 608, 1995.
2. PINTO, A. C. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, v. 25, supl. 1, p. 45, 2002.
3. dos SANTOS, N. P; PINTO, A. C; de ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: Naturalista e Farmacêutico do Brasil Imperial. *Química Nova*, v. 21, p. 666, 1998.
4. BRITO, A. R; BRITO, A. A .S; Forty years of Brazilian medicinal plant research, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 39, supl. 1, p. 53, 1993.
5. SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. *Anais da Academica Brasileira de Ciências*, v. 74, supl. 1, p. 145, 2002.
6. BRITO, F. A; LIMA, L. A; RAMOS, M. F. S; NAKAMURA, M. J; CAVALHER-MACHADO, S. C; SIANI, A. C; HENRIQUES, M. G. M. O; SAMAPAIIO, A. L. F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, v. 40, supl. 1, p. 105, 2007.
7. CAVADA, D. Technology Providers and Integrators – A Virtual Architecture for Drug R&D. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v. 33, p. 365, 1998.
8. BERNA, P; GAUDILLIÈRE, B. To Market, To Market 1999. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v. 35, p. 331, 2000.
9. MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C; VEIGA Jr, V. F. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, supl. 3, p. 429, 2002.

10. PEREIRA, R. C; OLIVEIRA, M. T. R; LEMOS, G. C. S. Plantas Utilizadas Como Medicinais no Município de Campos de Goytacazes – RJ. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 14, supl. 1, p. 37, 2004.
11. TORRES, A. R; OLIVEIRA, R. A. G; DINIZ, M. F. F. M; ARAÚJO, E. C; Estudo Sobre o Uso de Plantas Medicinais em Crianças Hospitalizadas da Cidade de João Pessoa: Riscos e Benefícios, Revista Brasileira de Farmacognosia, volume 15, suplemento 4, 2005, página 373.
12. KVIECINSKI, M. R; Avaliação das Atividades Antioxidante, Antiinflamatória e Antitumoral do Extrato Bruto Hidro-etanólico e Frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), Dissertação (Mestrado) – UFSC, 2007, página 18.
13. BARQUERO, A; Plantas Sanadoras: Passado, Presente y Futuro, Revista Química Viva, volume 2, año 6, 2007, página 53.
14. LOCAES, D. L; LUIS, I. R; CABRERA, G. S; Descubrimiento y Desarrollo de Agentes Cancerígenos Derivados de Plantas Medicinales, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, volume 1605, 2002, página 26.
15. NEWMAN, D. J; CRAGGA, G. M; SNADERB, K. M; The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery, Natural Products Rep., volume 17, 2000, página 215.
16. SITE: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101 – Instituto Nacional de Câncer do Brasil, acessado em janeiro de 2009.
17. BARROSO, G. M; Sistemática de Angiospermas do Brasil. Editora da Universidade Federal de Viçosa, volume 2, 1991, página 34.
18. NORVERTO, L. C. A; Evolución de las Santalaceae, Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, volume 22, 2004, página 40.

19. IRGANG, B; BACKES, P; Árvores do Sul: Guia de Identificação e Interesse Ecológico, Rio Grande do Sul: Instituto Souza Cruz, volume 1, 2002, página 278.
20. LORENZI, H; MATOS, F. J. A; Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas, Nova Odessa, volume 1, 2002, página 428.
21. SITE: http://www.biodiversidade.rs.gov.br/portal/index.php?acao=especies_ameacada_s&id=515&tipo=2 – Secretaria do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, acessado em dezembro de 2008.
22. VIEGAS Jr, C; REZENDE, A. de; SILVA, D. H. S; CASTRO-GAMBÔA, I; BOLZANI, V. S; Aspectos Químicos, Biológicos e Etnofarmacológicos do Gênero *Cassia*, Química Nova, volume 29, suplemento 6, 2006, página 1279.
23. PUPO, M. T; GALLO, M. B. C; VIEIRA, P. C; Biologia Química: Uma Estratégia Moderna para a Pesquisa em Produtos Naturais, Química Nova, volume 30, suplemento 6, 2007, página 1446.
24. HOPKINS, C.Y; Hydroxy acid in plant seed, Phytochemistry, volume 8, suplemento 1, 1969, página 161.
25. HOPKINS, C. Y; CHISHOLM, M. J; CODY, W. J; Fatty acid components of some Santalaceae seed oils, Plant Research Institute, artigo publicado na web, 2001.
26. GLEYE, J; Screening of Plants Used in South Brazilian Folk Medicine, Journal of Ethnopharmacology, volume 35, 1991, página 165.
27. VARGAS, V. M; GUIDOBONO, R. R; HENRIQUES, J. A; Genotoxicity of Plant Extracts, Instituto Oswaldo Cruz, volume 86, suplemento 2, 1991, página 67.

28. SOBOTTKA, A. M; Estudo Químico de *Baccharis ochracea Spreng.* e *Jodina rhombifolia Hook. et Arn.* e Efeito de seus Extratos Aquosos Sobre a Reprodução de Ratas, Dissertação de Mestrado – USP, 1996, página 20.
29. BEIRA, F. T. A; Evaluación de la Actividad Antineoplásica de Extractos de la Planta *Jodina rhombifolia Hook. et Arn.*, Tese de Doutorado – Universidade de Barcelona, 2000, página 17.
30. COLLINS, C. H; BRAGA, G. L; BONATO, P. S; Fundamentos de Cromatografia, Editora da UNICAMP, volume 1, 2006.
31. AQUINO NETO, F. R; NUNES, D. S; Cromatografia: Princípios Básicos e Técnicos Afins, Interciência, volume 1, 2003.
32. SEPHADEX® LH-20, High performance chromatography of steroids, terpenoids and low molecular weight peptides – protocolo do fabricante, Amersham Biosciences.
33. SEPHACRYL™ S-100/200/300/400/500 High Resolution - protocolo do fabricante, Amersham Biosciences, 1998.
34. ENÉAS FILHO, J; BARBOSA, G. K. C; SUDÉRIO, F. B; PRISCO, J. T; Isolation and Partial Pufication of β -Galactosidases From Cotyledons of Two Cowpea Cultivars, Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, volume 13, suplemento 3, 2001, página 251
35. SITE: <http://www.abcancer.org.br/portal/index.php?module=main> – Associação Brasileira de Câncer, acessado em fevereiro de 2009.
36. GONÇALVES, A. J; CARVALHO, L. H; SERDEIRA, K; NAKAI, M. Y; MALAVASI, T. R; Comparative Analysis of the Prevalence of the Glutathione S-transferase (GST) System in Malignant and Benign Thyroid Tumor Cells, São Paulo Med Journal, volume 125, suplemento 5, 2007, página 289.

37. ITHARAT, A; HOUGHTON, P; ENO-AMOOQUAYE, E; BURKE, P. J; SAMPSON, J. H; RAMAN, A; In Vitro Cytotoxic Activity of Thai Medicinal Plants Used Traditionally to Treat Cancer, Journal of Ethnopharmacology, volume 90, suplemento 1, 2004, página 33.
38. SITE: <http://www.institutodamama.org.br/site/> - Instituto da Mama do Rio Grande do Sul, acessado em fevereiro de 2009.
39. SITE: <http://www.cancerdemama.com.br/> - Instituto Neo Mama - acessado em fevereiro de 2009.
40. SLOVACEK, L; SLOVACKOVA, B; JEBAVY, L; MACINGOVA, Z; Psychosocial, Health and Demographic Characteristics of Quality of Life Among Patients With Acute Myeloid Leukemia and Malignant Lymphoma Who Underwent Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation, São Paulo Med Journal, volume 125, suplemento 6, 2007, página 359.
41. DUARTE, R. D; FURTADO, A. A; LERMEN JR, A; BORGES, L; CARVALHO, E. M; NEVES, H. Z; DUARTE FILHO, D. L; DUARTE, D. L; Lesões Mamárias Incomuns: Ensaio Iconográfico, Instituto Brasileiro de Radiologia, volume 38, suplemento 5, 2005, página 371.
42. SCHNEIDER, L; Expressão Gênica e Protéica de P53 e P21 em Fibroadenoma e Tecido Mamário Normal Adjacente, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007, página 10.
43. MACHNIEWICZ, P. H; FAUCZ, F. R. Associação de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Volume 31, suplemento 6, 2003, página 31.
44. YAMAMOTO, K; ICHIJO, H; KORSMEYER, S. J; Bcl-2 is Phosphorylated and Inactivated by a JNK1/Jun N-terminal Protein Kinase Pathway Normally

Activated at G(2)/M, Molecular and Cellular Biology, volume 19, 1999, página 8469.

45. MORANTES, J; PRIETO, C; LINHARES, E; RINCON, J; ARISTIZÁBAL, F; Análisis fitoquímico y de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. Revista da Academia Colombiana de Ciências, volume 31, suplemento 121, 2007, página 473.

46. SITE: <http://www.nce.ufrj.br/bcrj/default.asp> - Cell Bank Rio de Janeiro – acessado em março de 2009.

47. TODARO, G. J; GREEN, H; Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, The Journal of Cell Biology, volume 17, 1963, página 229.

48. LE BIVIC, A; HIRN, M; REGGIO, H; HT-29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation, Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 85, suplemento 1, 1988, página 136.

49. PONTAROLO, R; ABRAHÃO, W. S. M; FÁVERO, M. L. D; CORREA JR, C; STREMEL, D. P; Qualidade Microbiológica das Plantas Medicinais Produzidas no Estado do Paraná, Revista Brasileira de Farmacognosia, volume 14, suplemento 1, 2004, página 29.

50. DENNY, C; ZACHARIAS, M. E; KOHN, L. K; FOGLIO, M. A; CARVALHO, J. E; Atividade Antiproliferativa dos Extratos e da Fração Orgânica Obtidos das Folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae), Brazilian Journal of Pharmacognosy, volume 17, suplemento 4, 2007, página 598.

51. MILES, C.J.; DELFINO, J.J. Determination of aldicarb and its derivatives in groundwater by high-performance liquid chromatography with UV detection. Journal of Chromatography. v.299, p.275-280, 1998.

52. DEGANI, A. L; CASS, Q. B; VIERA, P. C; Cromatografia: Um Breve Ensaio, Química Nova, volume 7, 1998, página 21.
53. PARK, Y. K; ALENCAR, S. M; SCAMPARINI, A. R. P; AGUIAR, C. L; Própolis Produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências Fitoquímicas de sua Origem Vegetal, Ciência Rural, volume 32, suplemento 6, 2002, página 997.
54. MARÓSTICA, M. R; Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais, Tese de doutorado, UEC, 2006, página 16.
55. GRAHAM, J. G; QUINN, M. L; FABRICANT, D.S; FARNSWORTH, N.R; Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell, Journal of Ethnopharmacology, volume 73, 2000, página 347.
56. HEWITT, R; FORERO, A; LUNCSFORD, P. J; MARTIN, F. L; Enhanced Micronucleus Formation and Modulation of Bcl-2:Bax in MCF-7 Cells after Exposure to Binary Mixtures, Environmental Health Perspectives, volume 115, suplemento1, 2007, página 129.

Anexo

Anexo 1:



BCRJ: CR119

Cell Line: MCF-7

Tissue: EPITHELIUM

Organ: BREAST

Cell Type: EPITHELIAL

Morphology: EPITHELIAL

Scientific Name: HOMO SAPIENS

Vulgar Name: HUMAN

Sex: FEMALE

Miscellaneous Info: CAUCASIAN, 69 YEAR OLD

Products: Keratin

Culture Medium:

RPML 1640 medium supplemented with 20% of fetal calf serum. Standard trypsinization techniques. Split ratio from 1:5 to 1:8 is recommended.

Consigner: Dr. Ricardo Bretani Ludwick Institute for Cancer Research São Paulo - SP

Reference: J.Nat. Canc. Inst., 51:1409, 1973 Cancer Res., 53:5882, 1993

Additional Info: This cell line was isolated from pleural effusion from 69 year female Caucasian. Cells exhibit some features of differentiated mammary epithelium including oestradiol synthesis and formation of domes. Cells may carry B or C type retrovirus and is considered to represent a category 2 pathogen. Cells express both wildtype and variant oestrogen receptors as well as progesterone receptors. Restricted distribution. Only to be distributed with formal authorization of Dr. Bretani.

ATCC: Biosafety: 01

Fonte: RJCB Collection⁴⁶

Anexo 2:



BCRJ: CR056

Cell Line: NIH/3T3-RAS

Tissue: EMBRYO

Organ:

Cell Type: FIBROBLAST

Morphology: FIBROBLAST

Pathology: NORMAL

Scientific Name: RATTUS NORVEGICUS

Vulgar Name: RAT; NIH SWISS ALBINO

Sex:

Miscellaneous Info:

Virus Resistance:

Tumor Formation:

Products:

Dependency Isoenzymes:

Culture Medium: Dulbecco's MEM 90%, fetal bovine serum 10%. Subculture procedure: standard trypsinization techniques. A split ratio of 1:3 to 1:6 is recommended.

Consigner: Dr. Luisa Villa, Instituto Ludwig de Pesquisa do Cancer, Sao Paulo; through Dr. Jose Paulo Leite, Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Reference: J. Virol. 4: 549-553, 1969.

Additional Info: This is the standard NIH/3T3 cell line (BCRJ-CR055) transfected with ras oncogene.

ATCC: CRL 1658 **Biosafety:** 01

Fonte: RJCB Collection⁴⁶

Anexo 3:



RJCB Collection

Rio de Janeiro - Cell Bank

BCRJ:	CR095
Cell Line:	HT-29
Organ:	COLON
Cell Type:	EPITHELIAL
Morphology:	EPITHELIAL
Pathology:	ADENOCARCINOMA
Scientific	HOMO SAPIENS
Vulgar Name:	HUMAN; CAUCASIAN
Sex:	FEMALE
Miscellaneous;	44 YEAR-OLD
Tumor Formation:	IN STEROID TREATED HAMSTERS
Isoenzymes:	Me2, 1; PGM3, 1-2; PGM1, 1-2; ES D, 1; AK1, 1; GLO-1, 1-2; G6PD,
Culture Medium:	DMEM medium 90%, fetal bovine serum 10%. Subculture procedure: standart tripsinization techniques. A split ratio from 1:3 to 1:5 is recommended.
Consigner:	Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
Reference:	J. Clin. Pathol. 48(2): 143-6, 1995 Br. J. Cancer, 71(4): 744-52, 1995
Additional Info:	The HT-29 cell was isolated from a primary tumor in 1964 by J.Fogh using the explant culture method and medium F12 with 15% fetal bovine serum. More recently, established cultures have been propagated in McCoyÆs 5a medium with the same serum suplement. May be distributed to scientific institutions; not to distributed for any commercial use.
ATCC:	HTB38 Biosafety: 01

Fonte: RJCB Collection⁴⁶

Anexo 4:



BCRJ:	CR035
Cell Line:	KB
Organ:	MOUTH
Cell Type:	EPITHELIAL
Morphology:	EPITHELIAL
Scientific N:	HOMO SAPIENS
Vulgar Name:	HUMAN; CAUCASIAN
Sex:	Male
Miscellaneous Info:	ADULT; HELA MARKERS
Succeptibility:	POLIOVIRUS-1; ADENOVIRUS-3
Products:	Keratin
Dependency	G6PD-A
Isoenzymes:	
Culture Medium:	Dulbecco's MEM 90%, fetal bovine serum 10%. Subculture procedure: standard trypsinization techniques. A split ratio 1:4 to 1:6 is recommended.
Consigner:	Dr. Jose Paulo Leite, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
Reference:	Proc. Exp. Biol. Med. 94: 661-, 1957; Science 133: 1559-, 1961. Derived from a mouth carcinoma of an adult male caucasian. The cells have been used for a variety of studies including cancer chemotherapy screening, cell nutrition and metabolism, tumorigenicity and virus suceptibility. The cells carry HeLa markers chromosomes. It was one of the early sucessful attempts to isolate and serially propagate a human cell line directly in monolayer culture.
ATCC:	CCL 17 Biosafety: 01

