

UNIVERSIDADE PAULISTA- UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL DE
EXTRATOS DE PLANTAS AMAZÔNICAS E DA MATA
ATLÂNTICA: ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA
CULTURA DE CÉLULAS DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE BOCA

Joana de Mattos Ozi

SÃO PAULO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência do câncer da cavidade oral, no Brasil, é bastante alta, ocupando o quinto lugar entre todos os tumores malignos do organismo em indivíduos do gênero masculino, sendo que em alguns estados, como São Paulo, é a segunda localização de maior incidência entre todos os tipos de neoplasias malignas (INCA, 2007).

Ocorrem aproximadamente 270.000 novos casos de CEC anualmente e 145.000 óbitos no mundo, sendo o tipo mais comum de câncer em homens, na Índia. Nos Estados Unidos, a estimativa era de ocorrência de 35.000 novos casos para o ano de 2008 (JEMAL *et al.*, 2008). O Instituto Nacional do Câncer estimou em 14.160 novos casos de neoplasia maligna da cavidade oral para o ano de 2008, no Brasil, sendo o sétimo tipo de câncer mais comum (INCA, 2007).

O carcinoma espinocelular (CEC) é o tipo de câncer mais prevalente na boca, representando aproximadamente 95% dos tumores malignos da cavidade oral (BRUMINI, 1982; DIB *et al.*, 1990; MUIR e WEILAND, 1995; LO *et al.*, 2003; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

No Brasil, o carcinoma espinocelular da boca apresenta grande morbidade, pois aproximadamente 90% dos casos diagnosticados estão em fases avançadas, com reduzidas chances de cura e com altas taxas de

mutilação decorrentes da terapêutica (DIB *et al.*, 1990; LOSI-GUEMBAROVSKY *et al.*, 2009).

Acomete geralmente indivíduos do gênero masculino, com mais de 50 anos de idade, e as regiões mais acometidas são a língua e o assoalho bucal. Os principais fatores de risco associados ao câncer de boca são o fumo e o álcool (FRIEDLANDER *et al.*, 1998; DANTAS *et al.*, 2003; DEDIVITIS *et al.*, 2004; TREMBLAY *et al.*, 2006).

O estadiamento é clínico e baseado na inspeção, palpação e oroscopia indireta e direta. Métodos de imagem, como tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM), são de grande ajuda na determinação da extensão locorregional da doença, e o diagnóstico histológico confirmado são fundamentais. O estadiamento é um importante indicador de prognóstico do CEC da cavidade oral (SALVAJOLI *et al.*, 1999; SPENCER, FERGUSON e WIENSENFELD, 2002; DANTAS *et al.*, 2003). O método mais utilizado para estadiamento é TNM, estabelecido pela União Internacional Contra o Câncer (Anexo 1).

Apesar desta alta incidência, a sobrevida em cinco anos continua baixa, semelhante nas últimas décadas. Por isso o desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico precoce e tratamento destas neoplasias malignas é de grande importância (FORASTIERE, 2001; LO *et al.*, 2003; ECKERT *et al.*, 2006; GIBSON e FORASTIERE, 2006; DAVIES e WELCH, 2006; JEMAL *et al.*, 2007; WANG, PEYROLIER e BOURGUIGNON, 2007).

Buscando alternativas terapêuticas, muitas pesquisas dedicam-se a busca de novos medicamentos a partir de elementos da natureza. Considerando que

mais de 20% da biodiversidade mundial está localizada nas florestas brasileiras pode-se supor o enorme potencial terapêutico dessas espécies vegetais. Entretanto, pouco se sabe sobre o potencial químico e farmacológico destas plantas, incluindo as ocorrentes na Floresta Amazônica e Mata Atlântica. Baseado nesses fatos, o grupo do laboratório de extração da Universidade Paulista tem feito estudos com mais de 2.000 extratos vegetais, os quais vem sendo triados contra agentes bacterianos e tumorais, na busca de novos agentes quimioterápicos (SUFFREDINI *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2007A; SUFFREDINI *et al.*, 2007B).

O presente estudo dedica-se a verificar a atividade citotóxica de extratos vegetais de plantas da Amazônia e da Mata Atlântica, em cultura de células (KB-ADL#12) de carcinoma espinocelular de boca.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Com a finalidade de facilitar a leitura, a revisão da literatura foi feita em ordem cronológica, dividida nos seguintes tópicos: tratamentos atuais para o câncer de boca - cirurgia, radioterapia e quimioterapia - uso de extratos em câncer e uso de extratos em câncer de boca.

2.1 Tratamentos Atuais para o Câncer de Boca

Para Spencer, Ferguson e Wiensenfeld (2002) o tratamento do carcinoma espinocelular é cirúrgico e radioterápico, e a cirurgia envolve a excisão completa da lesão, com margem de segurança.

Dedivitis *et al.* (2004) realizaram um estudo no qual 80% de seus pacientes foram tratados com cirurgia e radioterapia. Ressaltando que o tratamento pode ser bem severo com sequelas crônicas e agudas, como mucosite, xerostomia, disfagia, perda de função, trismo e grandes deformidades, descrevem também que os objetivos do tratamento do CEC localmente invasivo são a cura da doença, preservação do órgão, atenuação das morbidades associadas com a terapia e melhora na qualidade de vida.

De acordo com Yao *et al.* (2007), a estratégia mais utilizada para o tratamento do câncer de boca é a ressecção cirúrgica da lesão. Em conjunto com a cirurgia, a associação de radioterapia também é indicada. Portanto, quanto mais inicial for a lesão, menos invasivo será o procedimento cirúrgico e, mesmo para os pacientes que obtêm a cura, existe ainda grande risco de um segundo tumor primário.

2.1.1 Cirurgia

Para Parise (2002), o tratamento do CEC é essencialmente cirúrgico, e o cirurgião de cabeça e pescoço pode intervir na lesão primária isoladamente, ou dependendo do acometimento de linfonodos metastáticos, realizar o esvaziamento cervical terapêutico, ou de forma eletiva em pescoços negativos. O tratamento cirúrgico deveria seguir os princípios da cirurgia oncológica em geral, nos quais o objetivo é o controle oncológico da lesão, atingido quando as margens cirúrgicas livres de doença.

Spencer, Ferguson e Wiensenfeld (2002) relatam que outro objetivo importante do tratamento cirúrgico é preservar as estruturas adjacentes que compõem a cavidade oral. Sempre que bem planejada a ressecção, o processo de reabilitação do paciente será mais adequado. O procedimento original para o esvaziamento cervical radical, tratamento do pescoço positivo, que foi descrito por Crile em 1905, envolvia a remoção de todos os linfonodos cervicais

profundos (I-V), assim como o nervo acessório, a veia jugular interna e o músculo esternocleidomastoídeo. Já nos pacientes com o pescoço negativo clinicamente, os linfonodos níveis I – III, os quais possuem maior risco de metástases regionais, o que indica o esvaziamento cervical seletivo, removendo apenas estes linfonodos superiores. Linfonodos positivos múltiplos, ou a presença de espalhamento do tumor na cápsula dos linfonodos são indicação absoluta para radioterapia.

Capote *et al.* (2007) sugerem que a incidência de metástases ocultas pode ser de 6 a 46%, em pescoços negativos clinicamente, e indicam o esvaziamento cervical seletivo nos pacientes com estágios I e II. Tal procedimento diminui a probabilidade de recorrências regionais, com melhora da expectativa de vida.

Lim *et al.* (2008) sugeriram que o tratamento cirúrgico pode ser o tratamento de escolha em pacientes com CEC da cavidade oral. Em seu estudo, avaliaram as taxas de sobrevida, padrões de recorrência e efeitos do tratamento cirúrgico de casos operados entre 1992 e 2004. Como resultado, dos casos operados, 69% apresentaram taxa de sobrevida em cinco anos, 83% dos pacientes ficaram livres de doença e 73% foram controlados locorregionalmente. Entretanto, 21% dos pacientes tiveram recorrências. Ressaltaram que o tratamento para casos iniciais de CEC continua controverso. Concluíram que somente a cirurgia pode atingir ótimas taxas de sobrevida, sendo uma forma de tratamento de escolha confiável e possível de ser praticada, ressaltando a importância de escolher pelo esvaziamento cervical, nos casos necessários.

Vatanian e Kowalski (2009) publicaram estudo que avaliou a aceitação de procedimentos cirúrgicos complexos e a qualidade de vida em pacientes com T3

e T4 de cabeça e pescoço, tratados cirurgicamente, com e sem radioterapia pós-operatória e tiveram no mínimo um ano de sobrevida livre de doença. De 273 pacientes, 59,3% considerou vida boa a excelente, 91% escolheria o mesmo tratamento se tivesse que fazer novamente e 95,6% relatou que não trocaria o tratamento cirúrgico por outro que fosse menos eficaz, porém, com uma melhor qualidade de vida. Concluindo que a maioria dos pacientes considerou o procedimento cirúrgico radical um tratamento aceitável.

Patel *et al.* (2009) consideram as metástases cervicais como fator mais importante para o prognóstico dos pacientes com CEC da cavidade oral, indicando esvaziamento cervical seletivo em todos os casos de tumores maiores do que 2 a 5 mm. Este procedimento aumentou a sobrevida em cinco anos para 59%.

2.1.2 Radioterapia

Lehnert (1999) sugeriu que a interação da radiação ionizante com o meio biológico se iniciava como um processo físico e passava aos estágios físico-químico e biológico na manifestação de seus efeitos, como a morte celular, perda da função do órgão, mutagênese e carcinogênese. Também relatou que a radiação é conhecida por causar pausas transitórias no ciclo celular, sendo que as células podem ser bloqueadas no final de G1, durante a fase S, ou em G2, entretanto, as células são mais sensíveis à radiação durante ou próximo à

mitose. As doses muito elevadas de radiação induzem à apoptose, ou morte celular programada, que se inicia após a degradação do DNA. A resposta dos tumores à radiação depende da sobrevivência das células tumorais clonogênicas influenciada por vários fatores biológicos, químicos e físicos. O tamanho do tumor é um fator crítico que influencia na curva de dose-resposta e na cura do tumor pela radioterapia.

Para o CEC da cavidade oral, as doses de radioterapia podem variar de 45 a 70Gy, dependendo da localização e do estadiamento (SALVAJOLI, MAIA E NOVAES, 1999).

Os efeitos colaterais observados durante e ao término da radioterapia para a região da cabeça e pescoço são: hiperemia da pele, pigmentação e descamação, queda de cabelo temporária, alopecia definitiva, ulcerações, trismo, mucosite, sialodente transitória, xerostomia, alteração no paladar, cáries de radiação e osteorradionecrose (DIB e CURI, 1999).

Para Abreu e Silva (2000), a radioterapia externa tem papel definido ao lado da cirurgia no tratamento do carcinoma espinocelular. A grande vantagem da radioterapia é a preservação da área acometida, sendo indicada em muitos casos. Existem alguns fatores que influenciam na decisão terapêutica, como: localização anatômica, envolvimento de tecidos adjacentes, evidência clínica de disseminação nodal regional, tipo histológico e grau, margens tumorais, *status* do paciente, fatores psicossociais, preferências pessoais do paciente e qualquer terapia prévia. Os tumores da cavidade oral são comumente irradiados com campos laterais opostos, usando aceleradores lineares de 4-6MV ou fontes de cobalto. O fracionamento clássico prescreve dose diária de 1,8 a 2Gy, cinco dias por semana, com dose final variando de 45-50Gy, para doença microscópica, até

70Gy no tratamento do tumor. Doses maiores não são recomendadas quando é realizada teleterapia exclusiva pelo risco de necrose tecidual, especialmente na mandíbula.

Salvajoli, Novaes e Prisco (2000) sugerem que, de acordo com a localização, morfologia da lesão, condições clínicas do paciente e recursos disponíveis, diferentes técnicas para irradiação podem ser utilizadas e indicam a braquiterapia, modalidade na qual a fonte emissora de radiação é colocada em contato direto com o tecido tumoral, apresentando a vantagem de proteger as áreas circunvizinhas.

Segundo Spencer, Ferguson e Wiensenfeld (2002), a radioterapia deve ser realizada após o tratamento cirúrgico, pois tecidos irradiados são muito mais lentos para cicatrizar, e o procedimento cirúrgico é mais difícil por se tratar de um tecido mais fibroso.

Yao *et al.* (2007) relatam que a radioterapia e a cirurgia têm sido as modalidades mais utilizadas para o tratamento de CEC, entretanto, indicam o uso de quimioterapia em conjunto com a radioterapia.

2.1.3 Quimioterapia

Para Kish *et al.* (1985), a terapia mais ativa em CEC de cabeça e pescoço deveria ser a associação de cisplatina com 5-FU. Estudaram dois grupos, com

doses diferentes de 5-FU, sendo o grupo I composto pelos que receberam dose de 1000 mg/m^2 e o grupo II, os que receberam dose de 600 mg/m^2 . O grupo I obteve 72% de resposta completa e o grupo II apenas 20%.

Brizel *et al.* (1998) estudaram dois grupos de 116 pacientes com tumores irressecáveis. O primeiro grupo foi tratado apenas com radioterapia, 7500Gy, e o outro com 7000 Gy de radioterapia, cisplatina e 5-FU. No grupo da conduta terapêutica associada, a taxa de sobrevida em três anos foi de 55%, e no grupo que teve apenas tratamento com radioterapia, a taxa foi 34%. Controle da doença regional foi de 70% na terapia combinada e de 44% no grupo de apenas radioterapia. Complicações severas ocorreram em três pacientes da radioterapia e cinco na terapia combinada. Concluíram que a combinação de tratamentos para câncer de cabeça e pescoço avançado é mais eficaz e sem diferenças significativas nos efeitos adversos das duas modalidades terapêuticas.

Kohno *et al.* (1999) observaram que, em pacientes com CEC avançado, com grande envolvimento linfonodal, a expectativa de vida era menor do que 1-2%. A quimioterapia tem sido utilizada nesses casos, para melhorar o prognóstico. Atualmente, a cisplatina e 5-FU têm sido utilizadas, separadas ou associadas. O uso produz uma resposta completa de 30-60% dos casos. Entretanto, os pacientes que foram tratados com esses quimioterápicos e têm recidiva do tumor, geralmente morrem da doença. Então, desenvolveram dois novos protocolos, o protocolo PEM (Cisplatina 60 mg/m^2 , Etoposídeo 40 mg/m^2 e Mitomicina 7 mg/m^2), e o protocolo CF (Cisplatina 8 mg/m^2 , 5-FU 300 mg/m^2 e Tegafur-uracil 400 mg/m^2). Foram avaliados 24 pacientes que tinham recidivas tumorais não ressecáveis. Destes, apenas três tiveram resposta completa, e sete tiveram resposta parcial.

Segundo Tabacof (2000), a utilização da quimioterapia tem apenas uma finalidade paliativa, com pouco impacto na sobrevida média, e apenas 20% dos pacientes sobrevivem em um ano. O interesse no uso da quimioterapia tem aumentado ultimamente devido alguns fatores, entre eles: novos agentes quimioterápicos, como taxanos, análogos de platina, que demonstram atividade antitumoral em uso isolado ou associado. Outro uso da quimioterapia seria como neoadjuvante antes do tratamento local com cirurgia ou radioterapia, com altas taxas de resposta. A cisplatina é um dos quimioterápicos mais importantes no tratamento do CEC de cabeça e pescoço. A dose mais utilizada é de 80 a 100mg/m² a cada três semanas. O tratamento com a cisplatina tem alcançado uma alta taxa de resposta em tumores de cabeça e pescoço, entretanto, seus efeitos colaterais, principalmente nefrotoxicidade, limitam a dose utilizada em humanos e, apesar de alguns resultados promissores, a quimioterapia não tem mostrado melhores resultados em câncer de cabeça e pescoço. O 5-fluorouracil é outro agente muito utilizado, do grupo dos antimetabólitos. Sua utilização em infusões prolongadas (1.000mg/m²/dia por 96 a 120 horas) é menos mielotóxica e mais tóxica para as mucosas.

Shin *et al.* (2001) realizaram estudo fase I em pacientes com CEC recorrente de cabeça e pescoço, associando anticorpo C225 (anticorpo direcionado contra fator de crescimento EGFr) com cisplatina, e sugeriram possível efeito sinérgico, com resposta em 67% dos pacientes e resposta completa em 22%. Concluíram que a infusão de C225 produz boa resposta antitumoral em tumores com alta taxa de fatores de crescimento (EGFr).

Para Spencer, Ferguson e Wiensenfeld, (2002), o tratamento quimioterápico tem seu papel estabelecido em pacientes com doença recidivada ou metastática.

Hopper-Borge *et al.* (2004) relataram que os taxanos constituem um novo grupo de agentes quimioterápicos, cujo mecanismo de ação consiste na ligação com a tubulina formadora dos microtúbulos, estabilizando-os. Entretanto, sua atividade é limitada por mecanismos adquiridos de resistência do organismo.

Alkureishi, Bree e Ross (2006) descreveram que o uso da cisplatina, geralmente feito segundo um protocolo de dois a quatro ciclos, pode levar ao aparecimento de resistência à cisplatina durante o tratamento, o que poderia explicar o motivo da sobrevida semelhante quando não utilizada a cisplatina. Comentaram também que com maiores concentrações de cisplatina, a resistência pode não ocorrer, porém, essas concentrações seriam muito tóxicas para humanos. Baseado nestes fatos, os autores sugeriram um novo protocolo denominado de RADPLAT. Este protocolo consiste na infusão de quatro ciclos intra-arterial de cisplatina em conjunto com o tratamento radioterápico, o que pode aumentar em até dez vezes a intensidade da dose (ALKUREISHI, BREE e ROSS, 2006).

Yao *et al.* (2007) afirmam que aproximadamente 1/3 de todos os pacientes com câncer de cabeça e pescoço podem ter metástases à distância, sugerindo o uso de quimioterápicos como adjuvantes. Os pacientes não tratados tiveram uma taxa de sobrevida de aproximadamente quatro meses.

Para Fossati, Ricardi e Orecchia (2009), o problema da quimioterapia é a toxicidade a longo prazo, sendo um imenso problema nos pacientes que sobrevivem ao câncer, afetando significativamente a qualidade de vida.

2.2 Uso de Extratos de Plantas em Câncer

2.2.1 Camptotecina

Wall e Wani (1995) relataram que, durante o período de 1950-1959, um programa envolveu a triagem de milhares de plantas, que procurava precursores da cortisona. Muitos extratos foram armazenados, sendo um deles preparado com a folha da *Camptotheca acuminata*, uma planta nativa da China. Em 1957, Jonathan Hartwell testou 1000 extratos, verificando atividade antitumoral. Um ano depois, observou um resultado muito satisfatório de *Camptotheca* frente às células tumorais.

Newman e Cragg (2007) descreveram os novos fármacos antitumorais introduzidos no mercado nos últimos 25 anos provenientes de fontes naturais. Foram listadas mais de 150 novas moléculas, muitas das quais sintetizadas com base em estruturas de produtos naturais, outras como derivados semi-sintéticos de produtos naturais, e outras descritas como mímicas de produtos naturais. Os

autores ressaltaram que, mesmo com o advento da química combinatória, capaz de sintetizar milhares de moléculas em um curto espaço de tempo (muito usada pelas indústrias farmacêuticas nos últimos 20 anos), somente um produto originado deste tipo de síntese foi introduzido no mercado. Isto demonstra que a pesquisa com produtos naturais ainda é a principal fonte de novos fármacos.

2.2.2 Taxol

Wall e Wani (1995) relataram a eficácia clínica do taxol na remissão parcial ou completa em câncer avançado de ovário, mama, pulmão e próstata. Este medicamento foi descoberto no *Research Triangle Institute* (RTI) há muitos anos, sendo que o processo inicial foi isolar o composto após a coleta da planta *Taxus brevifolia*, uma árvore conífera, de crescimento lento, encontrada apenas na costa Oeste dos Estados Unidos. A determinação da estrutura do taxol se mostrou uma tarefa extremamente difícil, devido a sua fórmula molecular. Em 1971 foi publicado o primeiro trabalho com a estrutura do taxol. Como resultado, o composto presente era limitado em relação a quantidade, com a extração e o processo para isolamento muito difíceis, além da quantidade de árvores ser muito limitada. Os testes de toxicidade em animais e a formulação foram realizados de 1982 a 1984. Estudos em fase clínica I e II foram realizados no período entre 1983 e 1986, gerando um grande interesse no taxol. Para obter o taxol de forma adequada, o *National Cancer Institute* (NCI) realizou uma

competição, que foi ganha pelo laboratório Bristol-Myers Squibb, em 1991. Entretanto, sua viabilidade foi questionada devido o uso de fonte natural. Felizmente foi encontrado um precursor para sua produção em grande escala, derivado da *Taxus baccata*. Após a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA), em outubro de 1994, o uso clínico do taxol foi iniciado, sendo hoje um dos medicamentos mais utilizados para tratamento de câncer de mama e ovário.

Shin *et al.* (2001) trataram os pacientes com recorrência de CEC ou com carcinoma metastático com paclitaxel, ifosfamida e carboplatin. No estudo, 59% dos pacientes responderam ao tratamento, sendo que a resposta completa ocorreu em 17%. Concluíram que o tratamento demonstrou atividade antitumoral alta nestes pacientes, e deverá ser confirmado em um novo estudo fase III.

Khuri *et al.* (2004) publicaram estudo com o objetivo de estabelecer a dose máxima tolerada de lonafarnibe, junto com Paclitaxel, em pacientes com neoplasias malignas de boca e pulmão, no qual a dose máxima tolerada foi de 100 mg de Lonafarnibe e 175 mg de Paclitaxel. A duração média de tratamento foi de oito ciclos. Dois, de cinco pacientes, que tinham tumor metastático resistentes a taxanos, tiveram respostas parciais com a associação, sugerindo novos estudos.

Bestoso *et al.* (2006) realizaram estudo com o objetivo de descobrir plantas que não pertencessem ao gênero *Taxus genus*, do Taxol, devido sua alta demanda comercial, que produzam Taxol. Verificaram que o extrato da semente de avelã, *C. avellana*, produzia Taxol ou taxanos, concluindo que esta espécie pode ser uma nova fonte comercial para a obtenção de Taxol.

Nicolaou, Chen e Dalby (2008) relataram os produtos naturais sintetizados pelo grupo, dentre eles, o taxol. De síntese extremamente difícil e com rendimento muito baixo, a síntese total parecia ser a única solução para sustentar a produção de taxol, cuja demanda crescia exponencialmente. Pesquisas realizadas com outras espécies do mesmo gênero, como *Taxus baccata*, apontaram novas possibilidades para o suprimento de taxol, uma vez que produzem compostos estruturalmente semelhantes, passíveis de serem usados em processos de semissíntese, otimizando a obtenção de taxol.

Taxol ganhou importância em função de seu mecanismo de ação, que diferentemente dos alcalóides da vinca, liga-se à tubulina já polimerizada em microtúbulos e impede que ela se despolimerize.

2.2.3 Vincristina e Vimblastina

Huang *et al.* (2004) relatam que os alcalóides da *Vinca*, incluindo a vincristina e vimblastina, têm sido muito utilizados como agentes antitumorais para o tratamento de leucemia, linfomas e alguns tumores sólidos. Explicam que diferentemente dos taxanos, estes alcalóides se ligam à tubulina solúvel, impedindo sua polimerização em microtúbulos. Sugerem que o efeito antitumoral destas drogas pode estar associado à sua interferência na função normal dos microtúbulos, bloqueando o ciclo celular na fase G₂M.

2.2.4 Triagem de diversos extratos

Nair, Panikkar e Panikkar (1991) verificaram a atividade antitumoral, em camundongos, do extrato de *Saffron (Crocus sativus)*, uma pimenta utilizada comumente na Índia, contra sarcoma, carcinoma de Ehrlich e linfoma. A administração oral de 200mg/Kg de peso do extrato aumentou a sobrevivência em 111%, 83,5% e 112,5%, respectivamente. Os estudos indicaram que o mecanismo de ação do extrato é pela alteração na síntese de DNA. Esses resultados indicaram o uso de *Saffron* como um potente agente antitumoral.

De acordo com Wall e Wani (1995), os produtos naturais têm impressionado cada vez mais os químicos e fitoquímicos, principalmente pelo fato da ampla diversidade dos componentes na natureza, em termos de propriedades estruturais físicas e biológicas. A maioria destes componentes tem metabolismos secundários com funções em plantas, os quais ainda não são completamente compreendidos. Atualmente, acreditam que esses componentes tenham uma ação na defesa nos efeitos das toxinas e dos carcinógenos.

Chen *et al.* (2003) observaram a eficácia da *Ginkgo biloba* para tumores malignos do trato aéreo superior em estágio médio e avançado. Foram tratados 86 pacientes com tumores malignos utilizando cápsulas de *G. Biloba*, e observaram melhora nos sintomas clínicos dos pacientes. O período de sobrevivência em 32 casos foi prolongado significativamente, e concluíram que as cápsulas de *G. Biloba* têm efeitos terapêuticos contra tumores malignos.

Cozzolino *et al.* (2005) observaram que *Astins*, isolada das raízes de uma planta medicinal *Aster tataricus*, induzia a apoptose em células do carcinoma papilífero da tireóide, mostrando importante atividade antitumoral.

Segundo Shoemaker (2006), o programa de triagem de drogas antitumorais do National Cancer Institute (NCI60) foi desenvolvido no final dos anos 80, com o objetivo de encontrar drogas contra o câncer, focando em tumores sólidos, de próstata, mama, cólon e pulmão. Relatou que neste Instituto existe uma das maiores coleções de produtos naturais, com mais de 75.000 amostras de plantas. A triagem com extratos iniciou em 1989, identificando extratos que tinham a capacidade de inibição do crescimento celular, mas de uma maneira geral, em todas as linhagens celulares, devido ao grande número de extratos. Nos anos 90, um número substancial de compostos foi selecionado para testes *in vivo*. Os compostos que mostraram atividade diferenciada nas linhagens celulares foram encaminhados para novos estudos. Relata também que a contribuição mais notável do NCI para a quimioterapia foi o desenvolvimento do bortozemibe (Velcade[®]), o qual foi aprovado pela FDA em 2003, para o tratamento de mieloma múltiplo.

Jiménez *et al.* (2006) avaliaram *in vitro* e *in vivo* a atividade antitumoral do extrato de *Calendula* ativado a Laser (LACE). Seus resultados mostraram uma inibição, *in vitro*, de 70 a 100%, contra proliferação celular tumoral testada em diversos tumores humanos. Na análise *in vivo*, o extrato apresentou atividade antitumoral contra crescimento tumoral em células de melanomas.

Suffredini *et al.* (2006) publicaram estudo *in vitro*, usando a linhagem PC3, onde foi realizada a triagem de extratos obtidos de plantas coletadas na Amazônia e na Mata Atlântica. Relataram que a triagem parece ser a forma mais

rápida para obtenção de produtos naturais ativos. A triagem foi realizada com 1220 extratos, obtidos de 352 espécies nativas. As plantas foram coletadas no período de 1997 a 2001. Atividade citotóxica contra as linhagens celulares foi observada em 17 extratos de plantas pertencentes às famílias *Annonaceae*, *Apocynaceae*, *Araceae*, *Capparaceae*, *Commelinaceae*, *Flacourtiaceae*, *Lecythidaceae*, *Leguminosae*, *Passifloraceae*, *Rutaceae*, e *Violaceae*.

Suffredini *et al.* (2007a) relataram a importância da introdução de novas drogas para o tratamento de câncer de mama, realizando um estudo em que foram testados 1220 extratos obtidos de 351 espécies da Amazônia e da Mata Atlântica, na linhagem celular MCF-7. Atividade citotóxica foi observada em 11 extratos.

Suffredini *et al.* (2007b) publicaram triagem de extratos com atividade antitumoral nas seguintes linhagens celulares: pulmão, NCI-H460, adenocarcinoma de cólon KM-12, câncer do sistema nervoso central SF-268 e de leucemia RPMI-8226. Foram testados 1220 extratos, de 351 espécies pertencentes a 74 famílias, coletadas entre 1997 e 2001. Dos mais de 1000 extratos, nove mostraram atividade nas células de câncer de pulmão, 29 de cólon, 14 do sistema nervoso central, 24 em leucemia.

Li *et al.* (2007) ressaltaram que o tratamento com proantocianidinas obtidas do extrato da casca de *Pinus koraiensis* (PKBPE) tem sido utilizado tradicionalmente na medicina chinesa por muitos anos, comprovando que nas doses de 158 e 250 mg/kg de peso, pode inibir o crescimento do carcinoma cervical de 47,68 a 58,94%.

Dongre *et al.* (2007) publicaram estudo com um grande número de plantas pertencentes à família *Hypericum*, conhecidas por terem fortes propriedades antitumorais. O extrato metanólico de *H. hookerianum* exibiu atividade contra várias células cancerígenas. Os resultados desse estudo indicaram que a administração desse extrato não só aumentou a sobrevivência dos animais com tumores, mas também alterou muitos parâmetros hematológicos durante a progressão do tumor, indicando uma natureza antitumoral potente do extrato.

Mandadi *et al.* (2007) estudaram o fracionamento em cinco limonóides das sementes da *grapefruit* vermelha do México, que já apresentaram inibição em culturas de células de câncer de pulmão, cólon, pulmão, boca, estômago e mama, conseguindo identificar as estruturas nos compostos.

Kuete *et al.* (2008) avaliaram a atividade antitumoral, antioxidante e antimicrobiana, além da composição fitoquímica e a toxicidade de extratos metanólicos dos diferentes órgãos da *Bersama engleriana* - raiz, folhas, galhos e tronco - que é utilizada tradicionalmente para o tratamento de diversas doenças. Observaram atividade antioxidante, antimicrobiana e sem sinais de toxicidade nas concentrações testadas, o que pode representar uma fonte futura de tratamento contra doenças infecciosas e contra o câncer.

De acordo com Nicolau, Chen e Dalby (2008), os produtos naturais possuem grande diversidade estrutural e funcional, sendo uma fonte única de inspiração para a química, biologia e medicina, sendo que a vasta disposição de metabólitos secundários na natureza é de grande valor para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas. Ressaltam que as drogas desenvolvidas a partir de produtos naturais são ubíquas na medicina moderna, principalmente nas áreas de infectologia, imunoterapia e quimioterapia.

2.2.5 Triagem de diversos extratos em carcinoma espinocelular de boca

Dai *et al.* (2001) estudaram uma erva medicinal chinesa, *Banzhilian*, derivada da planta *Scutellaria barbata*, e verificaram que apresentou atividade antitumoral em linhagens de CEC oral KB, carcinoma nasofaríngeo HONE-1, carcinoma coloretal HT29.

Huang *et al.* (2002) publicaram estudo com extrato de framboesas pretas secas e congeladas em CEC. Seus resultados mostraram que o extrato pode inibir NF-kB, sendo pelo menos parcialmente responsável pela inibição da proliferação celular *in vitro*. Afirmaram que existem investigações sendo realizadas para observar se ocorre o mesmo fato *in vivo*.

Prakash, Gupta e Dinda (2002) publicaram estudo utilizando *Clerodendron inerme*, via oral, que inibiu a formação do tumor em 80%, demonstrando seu potencial quimiopreventivo.

Chang *et al.* (2004) estudaram a atividade do componente isolado *Salvinal*, da *S. miltiorrhizae*, utilizada tradicionalmente na medicina chinesa para tratamento de *angina pectoris* e infarto agudo do miocárdio. O estudo foi realizado contra células tumorais de CEC, descrevendo o mecanismo de ação deste componente. As células foram incubadas por 24 horas em diferentes concentrações de *Salvinal*. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS, e fixadas com etanol 70%. Encontraram atividade contra as diversas linhagens de células tumorais.

Aggarwal *et al.* (2004) relataram que NF-kB é um fator importante, ativo

na transformação celular, angiogênese, inflamação e metástases, sugerindo que seja um alvo ideal para o tratamento do câncer. Realizaram então, um estudo com *Curcumim*, que suprimiu a atividade mitocondrial de todas as linhagens celulares de CEC, induzindo apoptose. Seus resultados mostraram que o *Curcumim* pode inibir NF-κB, levando à supressão da proliferação e apoptose do carcinoma espinocelular da cavidade oral.

Duvoix *et al.* (2005) estudaram atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória do *Curcumin*, um componente natural extraído da *Curcuma longa L.* que permite a supressão, retardamento ou inversão da carcinogênese. Verificaram que tem importante atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, capaz de induzir apoptose em inúmeros sistemas celulares.

Rodrigo *et al.* (2006) isolaram cinco linhagens celulares de CEC de língua, para investigar a ação de um extrato com etanol de framboesas pretas secas e congeladas. Os achados deste estudo mostraram que o extrato diminui a proliferação celular, induzindo a apoptose. Esse estudo mostrou que as framboesas pretas secas e congeladas são bem toleradas por humanos e o seu extrato é um candidato promissor como agente quimiopreventivo.

Huang *et al.* (2006) relataram a atividade do extrato framboesas pretas secas e congeladas, *Rubus occidentalis*, demonstrando que o extrato é o maior responsável por inibir a ativação da AP-1, proteína responsável pela indução de diversas culturas celulares.

Mallery *et al.* (2007) desenvolveram a formulação de um novo gel, com aplicação local na mucosa oral, com framboesas pretas secas e congeladas, apontadas em outros estudos como quimiopreventivas. Concluíram que o gel é

apropriado para absorção dos tecidos da mucosa oral, sem efeitos adversos.

Xiao, Guo, Liu e Zhang (2007) publicaram estudo com aloe-emodin nas diferentes doses de- 2.5, 5, 10, 20 e 40 μL em células de CEC de boca, linhagem KB, demonstrando inibição de forma dose-dependente. Nas doses de 10-40 μL ocorreram parada no ciclo celular, fase G2, com diminuição na fase S. Na fase G1 não foi evidente nenhuma alteração. Estudo indicou ação antitumoral em câncer de boca, podendo ser usado como quimioterápico e como agente quimiopreventivo. Também observaram uma alteração significativa na atividade da fosfatase alcalina, porém, não foi observada fragmentação do DNA.

King *et al.* (2007) publicaram estudo com compostos naturais, as protoantocianidinas (PACs), muito concentradas em algumas frutas, que pertencem a classe dos flavonóides. Avaliaram o potencial de PAC para modular a proliferação celular de CEC *in vitro*, e concluíram que podem ativar múltiplos caminhos de apoptose, podendo providenciar um novo e mais eficiente tratamento para pacientes com câncer de boca.

Manikandan *et al.* (2008) avaliaram frações acetato de etila e metanólica da folha de *Azadirachta indica* em CEC de boca. As frações agiram inibindo a proliferação celular e angiogênese, ocasionando apoptose no modelo estudado. A fração etil-acetato foi mais eficiente, provavelmente devido a maior quantidade de constituintes fitoquímicos. Sugeriram estudos futuros para fracionamento.

Dai *et al.* (2008) estudaram quatro novos compostos a partir de estudos prévios com *Scutellaria barbata*, testados nas linhagens celulares de CEC da cavidade oral (KB), carcinoma nasofaríngeo (HONE-1), carcinoma coloretal (HT29), no qual a cisplatina e o etoposídeo apresentaram inibição semelhante

aos componentes isolados na linhagem KB.

Liang *et al.* (2008) publicaram estudo com extratos coletados *Cladiella australis*, *Clavularia viridis* e *Klyxum simplex*, nas seguintes linhagens de CEC da cavidade oral: SCC4, SCC9 e SCC25. As células foram cultivadas em meio DMEM, com 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina. Foram realizadas as análises de adesão celular, citotoxicidade, mudanças de morfologia, ciclo celular e apoptose. Para adesão celular, a concentração foi de 1.5×10^5 células. E para observar a viabilidade celular, 1.5×10^4 células. Os três extratos inibiram o crescimento e a adesão celular, induzindo a apoptose. O extrato da *Clavularia viridis* se mostrou mais ativo que os outros.

Hao *et al.* (2009) estudaram a *Salvia miltiorrhiza*, erva medicinal chinesa usada para reações inflamatórias cardíacas, hepáticas e doenças tumorais. Estudaram diversas linhagens celulares de CEC (JHU-06, 011, 013, 019, 022 E 029), linhagens de câncer de próstata, fígado, cólon, mama e leucemia. O estudo foi realizado em tumores de ratos, que foram observados em ressonância magnética, com imagens 3D. O tratamento com 5-FU inibiu o crescimento em 35%, com o extrato de sálvia em 41% *in vivo*. Concluíram que a dose de 80 mg/Kg/dia é uma quantidade possível para ser usada em animais, porém, para testes em humanos, mais estudos de toxicidade são necessários.

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

O objetivo geral da pesquisa é avaliar a atividade citotóxica de extratos vegetais de plantas da Amazônia e da Mata Atlântica, em cultura de células (KB-ADL#12) de carcinoma espinocelular de boca.

Objetivos específicos:

- 1- Avaliação inicial de 72 extratos quanto a citotoxicidade às células KB-ADL#12 e seleção dos extratos de maior atividade;
- 2- Realizar a partição líquido-líquido dos extratos ativos;
- 3- Avaliar a dose-resposta dos extratos ativos e seus resíduos;
- 4- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos ativos e seus resíduos;
- 5- Realizar análise cromatográfica de acompanhamento da obtenção de resíduos dos extratos ativos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Extração da Universidade Paulista, UNIP.

4.1. Extratos

Para o presente estudo foram utilizados 72 extratos previamente avaliados com ação citotóxica contra câncer de próstata, mama, pulmão, cólon, sistema nervoso central e de leucemia, triados de um total de 1220 extratos catalogados no Herbário UNIP e estocados no Laboratório de Extração (SUFFREDINI *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2007a; SUFFREDINI *et al.*, 2007b).

Estes extratos são identificados de forma numérica, sequencial, e os números dos extratos utilizados no nosso estudo foram: 26, 29, 37, 47, 63, 64, 84, 106, 108, 112, 118, 144, 149, 171, 178, 205, 206, 223, 257, 263, 284, 288, 342, 348, 364, 397, 407, 416, 489, 492, 495, 505, 621, 633, 689, 690, 694, 698, 707, 719, 758, 812, 813, 827, 828, 832, 870, 871, 882, 934, 968, 1007, 1017, 1079, 1094, 1097, 1098, 1106, 1109, 1110, 1114, 1117, 1128, 1140, 1144, 1151, 1152, 1164, 1228, 1230, 1247 e 1253 (Figura 1).

Tabela 4.1 - Relação das espécies fornecedoras dos extratos vegetais usados para avaliação da atividade citotóxica contra células KB-ADL-#12.

Material Coletado	Data Coleta	N. Extrato	Familia	Espécie	Parte da planta
P.Saraiva 123	19/04/97	26	Fabaceae Faboideae	Aldina reticulata R.S.Cowan	Folha
P.Saraiva 187	31/05/97	29	Clusiaceae	Calophyllum brasiliense Camb.	Caule

P.Saraiva 152	30/05/97	37	Fabaceae Mimosoideae	Pithecellobium sp.	Orgãos Aéreos
P.Saraiva 113	19/04/97	47	Caryocaraceae	Caryocar microcarpum Ducke	Folha
P.Saraiva 98	18/04/97	63	Hypericaceae	Vismia guianensis (Aubl.) Choisy	Caule
P.Saraiva 98	18/04/97	64	Hypericaceae	Vismia guianensis (Aubl.) Choisy	Caule
P.Saraiva 408	05/12/97	84	Olacaceae	Chaunochiton lorantoides Benth.	Caule
P.Saraiva 145	30/05/97	106	Ochnaceae	Blastomanthus sp.	Folha e Frutos
P.Saraiva 106	19/04/97	108	Sapindaceae	Toulicia pulvinata Radlk.	Folha e Frutos
P.Saraiva 149	30/05/97	112	Malpighiaceae	Byrsonima cf. sericea DC.	Caule
P.Saraiva 271	15/08/97	118	Connaraceae	Connarus perrottetii (DC.) Planch.	Folha e Caule
P.Saraiva 187	31/05/97	144	Clusiaceae	Calophyllum brasiliense Camb.	Folha
I.B.Suffredini 8		149	INDETERMINADA	INDETERMINADA	Caule
I.B.Suffredini 6	25/06/98	171	Fabaceae Caesalpinioideae	Macrolobium multijugum (DC.) Benth.	Folha
P.Saraiva 92	18/04/97	178	Meliaceae	Trichilia pleeana (A.Juss.) C.DC.	Orgãos Aéreos
I.B.Suffredini 26	27/06/98	205	Fabaceae Caesalpinioideae	Hymenaea courbaril L.	Caule
I.B.Suffredini 26	27/06/98	206	Fabaceae Caesalpinioideae	Hymenaea courbaril L.	Caule
I.B.Suffredini 28	27/06/98	223	Combretaceae	Combretum laurifolium Mart.	Orgãos Aéreos
P.Saraiva 117	19/04/97	257	Fabaceae Caesalpinioideae	Cynometra spruceana Benth.	Orgãos Aéreos
P.Saraiva 396	05/12/97	263	Fabaceae Caesalpinioideae	Macrolobium multijugum (DC.) Benth.	Caule
P.Saraiva 80	18/04/97	284	Violaceae	Amphirrhox longifolia Spreng.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3296	10/09/98	288	Capparaceae	Crataeva tapia L.	Orgãos Aéreos
P.Saraiva 123	19/04/97	342	Fabaceae Faboideae	Aldina reticulata R.S.Cowan	Caule
P.Saraiva 137	20/04/97	348	Fabaceae Caesalpinioideae	Macrolobium acaciifolium Benth.	Caule
P.Saraiva 122	19/04/97	364	Polygonaceae	Cimeria sp.	Orgãos Aéreos
P.Saraiva 82	18/04/97	397	Leg-Faboideae	Dioclea violaceae Mart. Ex. Benth.	Caule
P.Saraiva 129	20/04/97	407	Loranthaceae	Psittacanthus cucularis (Lam.) Blume	Caule
P.Saraiva 108	19/04/97	416	Fabaceae Faboideae	Taralea opositifolia Aubl.	Caule
P.Saraiva 107	19/04/97	489	Anacardiaceae	Tapirira guianensis Aubl.	Caule
Material Coletado	Data Coleta	N. Extrato	Familia	Espécie	Parte da planta

P.Saraiva 104	19/04/97	492	Bignoniaceae	Distictella magnoliifolia (H.B.K.) Sandwith	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3318	11/09/98	495	Malpighiaceae	Banisteriopsis sp.	Folhas e Caule
P.Saraiva 79	18/04/97	505	Lecythidaceae	Gustavia augusta L.	Caule
A.A.Oliveira 3295	09/09/98	621	Salicaceae	Laetia cobymbulosa Spruce ex Benth.	Caule
A.A.Oliveira 3353	22/01/99	633	Fabaceae Mimosoideae	Abarema auriculata (Benth.) Barneby & J.W.Grime	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3353	22/01/99	689	Fabaceae Mimosoideae	Abarema auriculata (Benth.) Barneby & J.W.Grime	Caule
A.A.Oliveira 3353	22/01/99	690	Fabaceae Mimosoideae	Abarema auriculata (Benth.) Barneby & J.W.Grime	Caule
A.A.Oliveira 3368	24/01/99	694	Myristicaceae	Virola theiodora (Spruce ex Benth.) Warb.	Caule
A.A.Oliveira 3402	03/04/99	698	Apocynaceae	Macoubea sprucei (Müll.Arg.) Markgr.	Caule
A.A.Oliveira 3400	03/04/99	707	Apocynaceae	Forsteronia acouci (Aubl.) A.DC.	Folha e Caule
A.A.Oliveira 3383	02/04/99	719	Salicaceae	Laetia suaveolens (Poepp.) Benth.	Folha e Caule
A.A.Oliveira 3420	29/07/99	758	Lamiaceae	Vitex sp.	Caule
A.A.Oliveira 3412	29/07/99	812	Flacourtiaceae	Homalium racemosum Jacq.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3432	30/07/99	813	Dilleniaceae	Doliocarpus guianensis (Aubl.) Gilg	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3481	30/09/99	827	Fabaceae Mimosoideae	Pentaclethra macroloba (Willd.) Kuntze	Caule
A.A.Oliveira 3481	30/09/99	828	Fabaceae Mimosoideae	Pentaclethra macroloba (Willd.) Kuntze	Caule
A.A.Oliveira 3423	29/07/99	832	Araceae	Phylodendron solimoesense A.C.Sm.	Raiz
A.A.Oliveira 3491	01/10/99	870	Ebenaceae	Diospyros guianensis (Aubl.) Gurke	Caule
A.A.Oliveira 3499	22/10/99	871	Linaceae	Roucheria punctata Ducke	Caule
A.A.Oliveira 3488	01/10/99	882	Rubiaceae	Pagamea coriacea Spruce ex. Benth.	Caule
A.A.Oliveira 3505	25/11/99	934	Caryocaraceae	Caryocar microcarpum Ducke	Pontas
A.A.Oliveira 3476	30/09/99	968	Commelinaceae	Commelina diffusa Burm.	Planta Toda
A.A.Oliveira 3523	22/01/00	1007	Olacaceae	Chaunochiton loranthoides Benth.	Caule
A.A.Oliveira 3522	22/01/00	1017	Fabaceae Faboideae	Aldina reticulata R.S.Cowan	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3560	25/02/00	1079	Connaraceae	Pseudoconnarus macrophyllus Radlk.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira 3562	25/02/00	1094	Annonaceae	Guatteria riparia R.E.Fries	Caule
A.A.Oliveira 3561	25/02/00	1097	Fabaceae Faboideae	Swartzia sericea J.Vogel var. sericea	Folhas
A.A.Oliveira 3561	25/02/00	1098	Fabaceae Faboideae	Swartzia sericea J.Vogel var. sericea	Folhas
A.A.Oliveira 3591	26/03/00	1106	Rutaceae	Adiscanthus fusciflorus Ducke	Caule
Material Coletado	Data Coleta	N. Extrato	Familia	Espécie	Parte da planta

A.A.Oliveira	3577	25/02/00	1109	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	Caule
A.A.Oliveira	3577	25/02/00	1110	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	Caule
A.A.Oliveira	3543	24/02/00	1114	Boraginaceae	<i>Cordia</i> cf. <i>exaltata</i> Lam.	Folhas
A.A.Oliveira	3525	22/01/00	1117	Lauraceae	<i>Ocotea cymbarum</i> Kunth	Caule
A.A.Oliveira	3538	24/02/00	1128	Bignoniaceae	<i>Distictella magnoliifolia</i> (H.B.K.) Sandwith	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3548	24/02/00	1140	Annonaceae	<i>Xylopiia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Caule
A.A.Oliveira	3539	24/02/00	1144	Sapindaceae	<i>Paullinia fissistipula</i> J.F.Macbr.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3582	25/02/00	1151	Simaroubaceae	<i>Picrolemma sprucei</i> Ducke	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3582	25/02/00	1152	Simaroubaceae	<i>Picrolemma sprucei</i> Ducke	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3563	25/02/00	1164	Passifloraceae	<i>Passiflora acuminata</i> DC.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3688	13/07/01	1228	Fabaceae Faboideae	<i>Swartzia laevicarpa</i> Anshoff	Caule
A.A.Oliveira	3687	13/07/01	1230	Gnetaceae	<i>Gnetum leyboldii</i> Tul.	Caule
I.B.Suffredini	53	30/09/01	1247	Myrtaceae	<i>Psidium densicomum</i> Mart. ex DC.	Orgãos Aéreos
I.B.Suffredini	42	29/09/01	1253	Annonaceae	<i>Unonopsis guatterioides</i> (A.DC.) R.E.Fr.	Folhas
A.A.Oliveira	3577	25/02/00	1109	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	Caule
A.A.Oliveira	3577	25/02/00	1110	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	Caule
A.A.Oliveira	3543	24/02/00	1114	Boraginaceae	<i>Cordia</i> cf. <i>exaltata</i> Lam.	Folhas
A.A.Oliveira	3525	22/01/00	1117	Lauraceae	<i>Ocotea cymbarum</i> Kunth	Caule
A.A.Oliveira	3538	24/02/00	1128	Bignoniaceae	<i>Distictella magnoliifolia</i> (H.B.K.) Sandwith	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3548	24/02/00	1140	Annonaceae	<i>Xylopiia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Caule
A.A.Oliveira	3539	24/02/00	1144	Sapindaceae	<i>Paullinia fissistipula</i> J.F.Macbr.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3582	25/02/00	1151	Simaroubaceae	<i>Picrolemma sprucei</i> Ducke	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3582	25/02/00	1152	Simaroubaceae	<i>Picrolemma sprucei</i> Ducke	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3563	25/02/00	1164	Passifloraceae	<i>Passiflora acuminata</i> DC.	Orgãos Aéreos
A.A.Oliveira	3688	13/07/01	1228	Fabaceae Faboideae	<i>Swartzia laevicarpa</i> Anshoff	Caule
A.A.Oliveira	3687	13/07/01	1230	Gnetaceae	<i>Gnetum leyboldii</i> Tul.	Caule
I.B.Suffredini	53	30/09/01	1247	Myrtaceae	<i>Psidium densicomum</i> Mart. ex DC.	Orgãos Aéreos
I.B.Suffredini	42	29/09/01	1253	Annonaceae	<i>Unonopsis guatterioides</i> (A.DC.) R.E.Fr.	Folhas

4.1.1 Do preparo do extrato

4.1.1.1 Coleta de Material Vegetal e Obtenção de Extratos

Plantas foram coletadas na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica em áreas sob jurisdição do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-MMA), com licença de coleta obtida junto a esse órgão, acrescida de licença para acesso a recursos genéticos obtida junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (Cgen-MMA).



Figura 1- Barco Escola da Natureza, da UNIP, com o qual é realizada a coleta das plantas na Floresta Amazônica. Foto: Mateus Luís Barradas Paciencia.

A coleta do material vegetal é feita de modo aleatório. Diferentes órgãos de cada espécie selecionada foram coletados, segundo a disponibilidade em massa, e foram acondicionados em sacos de algodão. O material foi limpo, de modo que contaminantes como insetos ou outros animais, outros órgãos da mesma planta, outras plantas, areia, terra, etc. fossem retirados. O material limpo foi seco em estufa de circulação de ar a 40°C e depois foi moído em moinho de martelo. Depois de moído, o material foi acondicionado em sacos plásticos, selados, identificados e mantidos em freezer até serem usados para se fazer os extratos. A extração utilizada foi a maceração. O material moído foi colocado em percoladores de vidro e a mistura de solventes composta por diclorometano e metanol, na proporção de 1:1, foi colocada de modo a se cobrir todo o pó de planta. O conjunto pó-mistura de solventes foi mantido em contato por 24 horas. O solvente foi removido por evaporação rotativa e o solvente seco foi armazenado em freezer. Em seguida, água destilada grau Milli-Q foi acrescentada ao pó e uma nova maceração foi feita por mais 24 horas (Figura 2). O extrato aquoso foi liofilizado e armazenado no freezer.

No campo, ainda são coletadas amostras das plantas para se fazer as exsiccatas, que serão depositadas no Herbário UNIP e servirão como ferramenta de identificação das espécies usadas nos ensaios.



Figura 2- Percoladores de vidro, com o conjunto pó-mistura de solventes.

4.1.1.2 Preparo dos Extratos e Substâncias Padrão Utilizados

Os extratos vegetais foram preparados a uma concentração de 40 mg/mL. Os extratos orgânicos foram diluídos com dimetilsulfóxido 50% e os extratos aquosos foram diluídos com água destilada grau Milli-Q. Após a diluição, os extratos foram mantidos sob refrigeração a -20°C até o uso.

Os extratos foram preparados a uma concentração 400 vezes maior do que a concentração final no poço da microplaca. Portanto, na microplaca, a maior concentração avaliada foi de 100 $\mu\text{g/mL}$, nos ensaios de triagem iniciais.

4.1.1.3 Preparo das Amostras e Substância Padrão

Uma massa determinada de extratos brutos que foram testados foram pesados em balança analítica, em tubos de criogenia de dois mL (Figura 3).

As amostras de extratos orgânicos e aquosos são preparadas na concentração de 40 mg/mL, empregando-se dimetilsulfóxido diluído 50% (DMSO50) como diluente do extrato orgânico e água destilada grau Milli-Q para os extratos aquosos. Os extratos foram colocados em vórtex (Quimis®) até que a diluição completa do extrato tenha sido alcançada (Figura 4). A Adriamicina foi diluída em uma concentração inicial de 0,01 M e a 5-FU na concentração de 1,856 M. Os extratos e as substâncias de referência diluídos permaneceram estocados em freezer (-20°C) até utilização.



Figura 3 - Balança analítica com tubo de criogenia de dois mL, onde o extrato bruto foi pesado na concentração de 40 mg/mL



Figura 4 - Tubo de criogenia, com extrato e solvente, colocados no vórtex até ocorrer a diluição completa do extrato.

4.1.1.4 Partição e Fracionamento

Foi realizada a partição líquido-líquido com os extratos orgânicos 633, 689, 719 e 1151, a partir dos quais foram obtidos três resíduos de cada: resíduo clorofórmio (apolar), resíduo butanólico (meia polaridade) e resíduo aquoso (polar).

Para este procedimento foi usada uma bureta de 50 mL e uma pipeta Pasteur com chupeta de silicone para adicionar os solventes à bureta (Hermex®) (Figura 5). Foi pesado 1 g de cada extrato em frascos âmbar identificados. Cada extrato foi diluído em três mL de metanol e dois mL de água (Figura 6). Cada extrato, de forma separada, foi adicionado à bureta, na qual foram adicionados 40 mL de clorofórmio por três vezes, separando assim o resíduo clorofórmico do aquoso (Figura 7). Depois, o resíduo clorofórmico foi mantido na capela (Braslab®), até que o solvente evaporasse. Neste momento, foram adicionados 40 mL de butanol na bureta, por três vezes, do resíduo aquoso obtido no procedimento anterior. Desta forma, foram obtidos mais dois resíduos: o aquoso e o butanólico.

Com os resíduos clorofórmicos dos extratos 689 e 719 foi realizado o fracionamento em Sephadex LH20, do qual foram obtidas as frações hexânica (HEX), diclorometânica (DCM) e metanólica (MeOH).



Figura 6 - Diluição dos extratos, em frasco âmbar.



Figura 5 - Adição dos solventes na bureta.



Figura 7 - Separação do resíduo clorofórmico e aquoso.

4.2 Cultura de Células

A linhagem celular utilizada, KB-ADL#12, de carcinoma espinocelular de boca, foi adquirida no *National Cancer Institute* (NCI, NIH, USA).

4.2.1 Aquisição de Linhagens de Células

A aquisição foi realizada diretamente do banco de células do *National Cancer Institute, National Institutes of Health*, dos Estados Unidos (NCI), escolhidas segundo levantamento bibliográfico prévio sobre cultivo, manutenção e utilização em ensaios *in vitro*. As células foram armazenadas em N₂ líquido, quando de sua chegada ao laboratório. O frasco de células de carcinoma espinocelular, linhagem KB-ADL-#12, foi descongelado e as células transferidas para um tubo de centrífuga de 50 mL (Corning®). O tubo foi levado à centrífuga (Eppendorf® 5810 R), regulada a 1000 rpm por cinco minutos. Depois da centrifugação, as células foram transferidas para um frasco de cultura de 150 mL (Corning®), e 30 mL de meio DMEM (Bio Wttaker®), com 20% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina (L-glu). O frasco foi colocado em incubadora (Forma Scientific®) com 5% de CO₂ e umidade relativa de 100% até atingirem confluência de 80%. Este processo foi repetido por mais três vezes. Na quarta passagem as células tumorais foram transferidas para um número maior de frascos de cultura, para que uma quantidade razoável de células fosse conseguida e o processo de congelamento de vários frascos reserva fosse realizado. As células cultivadas foram transferidas, com auxílio de tripsinização (tripsina-EDTA), para um tubo de centrífuga de 50 mL e centrifugação das células. A contagem das células obtidas foi feita e foi acrescentada a quantidade de meio completo com 20% de SFB de modo a se atingir a concentração de 1×10^7 células/mL, que representa a concentração adequada de congelamento. O processo de congelamento deve ser feito de forma lenta, para que as células tumorais não se rompam com a expansão do gelo internamente formado no

decorrer do procedimento. Durante a adição de meio completo com 20% de SFB e L-glu, deve-se adicionar 30% de DMSO ao meio, para que o processo de congelamento seja feito de modo a se preservar as células de um congelamento drástico. Um mL da suspensão celular foi distribuído em cada um dos tubos de criogenia de dois mL. Os tubos de criogenia foram devidamente identificados com o nome da linhagem celular e data do congelamento. O processo de congelamento lento foi o seguinte: geladeira (4°C) por duas horas, freezer doméstico (-10°C) por duas horas, freezer (-30°C) por cinco horas, freezer (-70°C) por 12 horas e transferência para N₂ líquido (Thermolyne Biocane 20®).

4.2.2 Descongelamento

Um frasco de criogenia com as células foi retirado do N₂ líquido e levado para o fluxo laminar (*Forma Scientific®*), onde um tubo de centrifuga de 50 mL, com 10 mL de meio de cultura com 20% de SFB estava preparado, juntamente com um béquer (*Vidrolabor®*) com álcool 70%. O frasco com o conteúdo celular congelado foi colocado entre as mãos do pesquisador até o total descongelamento da amostra. O frasco foi imediatamente mergulhado e deixado por um minuto no álcool 70%, dentro do fluxo laminar. Depois o frasco foi aberto e o seu conteúdo aspirado com uma pipeta e pipetador automático. O conteúdo celular foi transferido para o tubo de centrifuga e o tubo foi levado à centrifugação, a 100 rpm por cinco minutos. Depois de centrifugado, o material

foi transferido para um frasco de crescimento de cultura devidamente identificado com nome da linhagem, número da passagem, data do congelamento, quantidade de células a serem passadas semanalmente e nome de quem congelou.

4.2.3 Passagem semanal

A passagem das células foi realizada semanalmente. Para este procedimento, os frascos de cultura com células foram retirados da incubadora e levados para o fluxo laminar (Figuras 8 e 9). O meio de cultura antigo foi removido e as células aderidas foram lavadas com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e retirado. Cinco mL de tripsina EDTA foram adicionadas ao frasco com células e deixadas em contato até que as células se soltassem. As células soltas foram transferidas para um tubo de centrifuga e o tubo foi centrifugado por cinco minutos a 100 rpm, a fim de que um *pellet* de células se formasse no fundo do tubo. O sobrenadante foi desprezado e 10 mL de meio de cultura adicionado de 20% de SFB foram colocados no tubo de centrifuga com o *pellet* celular. Com o auxílio de uma pipeta, a suspensão foi homogeneizada e uma parte dela transferida para um frasco de crescimento celular com 30 mL de meio de cultura com 20% de SFB. O frasco foi levado à incubadora, onde permaneceu até confluência de 80%. Semanalmente, as células foram passadas em proporção de 1:40, ajustada quando da realização de ensaios.

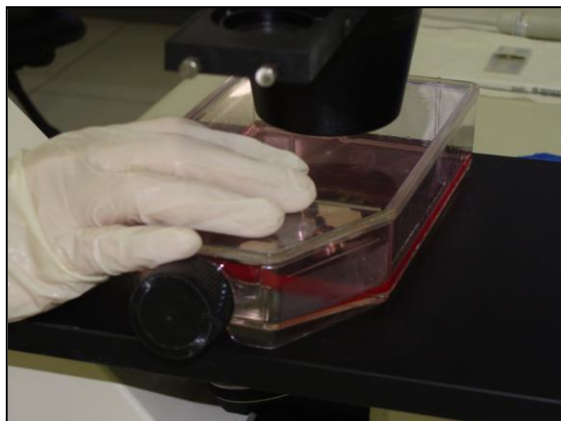


Figura 8 - Frasco de crescimento celular sendo observado ao microscópio óptico.

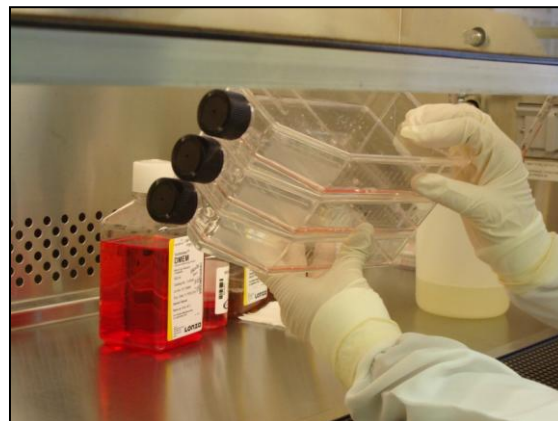


Figura 9 - Frascos de crescimento celular no fluxo laminar, início da passagem de células.

4.2.4 Contagem de células pela técnica da exclusão por azul de Tripán 10%

A contagem das células foi realizada antes dos experimentos. Os frascos de crescimento celular foram retirados da incubadora e as células tripsinizadas, usando as técnicas anteriormente descritas. As células foram centrifugadas em tubos de centrífuga de 50 mL, para a obtenção do *pellet* de células. Dez mL de meio de cultura com 20% de SFB foram adicionados ao *pellet* e a suspensão foi homogeneizada com pipeta e pipetador automático (*Eppendorf®*, *Easypet*). Cem μL desta suspensão foram transferidos para 900 μL de solução de azul de tripan 10%, que é um corante usado para excluir as células mortas da contagem celular ao microscópio (Figura 10). A mistura células mais azul de tripan foi

homogeneizada e parte desta mistura foi transferida para câmara de Neubauer (*OptikLabor®*). A câmara de Neubauer foi colocada em microscópio óptico (*Zeiss®, Axiostar*) e as células não coradas foram contadas em três dos quadrantes maiores (Figura 11).

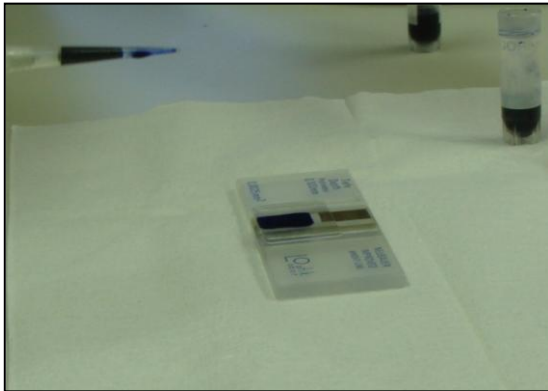


Figura 10 - Suspensão celular e solução de azul de tripan 10% sendo adicionados à câmara de Neubauer.

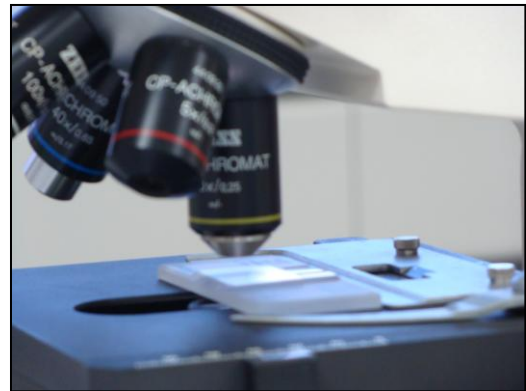


Figura 11 - Contagem das células viáveis no microscópio óptico.

O número de células obtido foi dividido por três e colocou-se o fator de diluição da câmara mais as diluições feitas para a contagem, que é 10^5 células. Com este cálculo foi obtida a quantidade existente de células disponíveis para o experimento:

- 150 células nos três quadrantes utilizados (Contagem celular = $150 / 3 = 50$)

Foram adicionados ao resultado da divisão os valores correspondentes ao fator da câmara de Neubauer e das diluições feitas para a contagem, que é de 10^5 , resultando em uma contagem de 5×10^6 células / mL.

O número de células necessário para o experimento foi calculado em função das duas densidades determinadas para os experimentos, que foram de 27.500 e 60.000 células por poço. Cada poço recebeu 100 μL de meio de cultura acrescido de 20% de SFB como veículo para as células tumorais. Portanto, a densidade celular foi de 27.500 células / 100 μL de meio e 60.000 células / 100 μL de meio. A partir da quantidade de microplacas necessárias para cada experimento, calculou-se a quantidade de células necessárias. Por exemplo: partindo-se da densidade celular de 27.500 células / 100 μL , e da necessidade de se fazer 20 mL de meio com esta quantidade de células, aplicou-se a seguinte regra de três:

$$27.500 \text{ células} \quad 0,1 \text{ mL}$$

$$x \quad 20 \text{ mL}$$

$$x=550000 \text{ células, ou } 5 \times 10^5 \text{ células.}$$

Sabendo-se que na suspensão do tubo havia 5×10^6 células/mL;

Sabendo-se que 5×10^5 células são necessárias para preparar 20 mL de meio para o experimento:

Portanto; Se tem 5×10^6 células em 1 mL, 5×10^5 células terão em X

$$5 \times 10^6 \text{ células} \quad 1 \text{ mL}$$

$$5 \times 10^5 \text{ células} \quad x$$

$x=0,1 \text{ mL}$, que é a quantidade de meio necessária para se preparar 20 mL de meio, com células a uma densidade celular de 27.500 células / mL. Para isso, adiciona-se 0,1 mL da suspensão de células a 19,90 mL de meio de cultura com 20% de SFB.

4.3 Procedimentos

Foram realizados cinco ensaios, o primeiro com o total de 72 extratos. No segundo ensaio foram retestados os 35 extratos. Após o segundo ensaio, foi realizado o teste de contaminação. No terceiro ensaio, 18 extratos foram avaliados. Após a triagem com esses três ensaios, quatro extratos foram submetidos ao quarto ensaio, sendo assim retestados em dose-resposta. No quinto ensaio, os três resíduos de cada extrato foram triados. Levando a um sexto ensaio, com três resíduos mais ativos, retestados em dose-resposta.

4.3.1 Delineamento do Ensaio de Validação do Experimento

Para se chegar na quantidade de células necessárias para a realização dos experimentos, foram feitos experimentos relativos à densidade celular por poço, de modo que as diferentes concentrações celulares fossem testadas e a coloração destes poços fosse medida em espectrômetro de ultravioleta apropriado para microplacas. As densidades celulares por poço testadas foram: 5.000, 7.500, 10.000, 15.000, 20.000, 60.000, 100.000, 150.000, 200.000. As densidades celulares selecionadas devem fornecer atividade óptica entre 0,200 e 0,800 Abs (absorbância).

4.3.2 Atividade Citotóxica dos Extratos

Este procedimento foi realizado três vezes, segundo a metodologia descrita por Monks *et al.* (1991), para possibilitar a constatação da tendência de inibição dos extratos.

O meio de cultura DMEM acrescido de 20% de SFB foi usado em todo o procedimento realizado com estas células. Quatro dias anteriores ao experimento, as células foram colocadas em cultura, nos frascos de crescimento, e foram deixadas na incubadora, com 100% de umidade relativa e 5% de CO₂. No 4^o dia, as células foram reunidas em tubo de centrífuga e contadas, utilizando-se técnicas de tripsinização e de contagem por exclusão por azul de tripan 10%. Com a contagem celular obtida, microplacas de 96 poços (Costar®) foram preparadas nas duas concentrações estabelecidas, de 27.500 e 60.000 células por poço. As microplacas foram inoculadas e levadas à incubadora por 24 horas (Figuras 12 e 13).



Figura 12 - Inoculação da microplaca de 96 poços.



Figura 13 - Microplacas na incubadora, sob condições favoráveis ao crescimento celular.

No 5º dia de experimento, os extratos vegetais foram adicionados às placas. Este procedimento foi executado do seguinte modo: dez µL de cada um dos extratos foram adicionados a 1990 µL de meio de cultura com 20% de SFB e 0,2% de gentamicina. A mistura foi homogeneizada e 100 µL desta foram transferidos para um poço da microplaca (Figura 14 e 15). Cada extrato foi avaliado em sextuplicata, devido à conformação da placa, que possibilita a transferência de cada extrato para seis poços.



Figura 14 - Extrato sendo adicionado e homogeneizado nos tubos de vidro com meio DMEM.

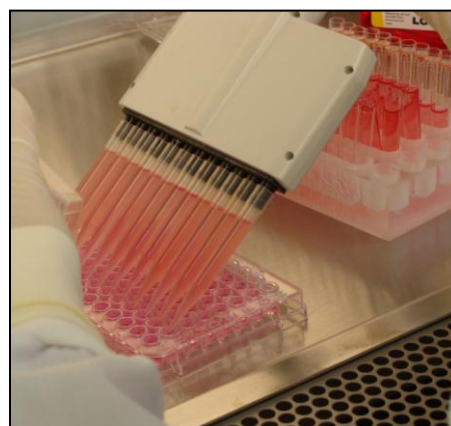


Figura 15 - Adição dos extratos diluídos na microplaca inoculada previamente com células KB.

Após a adição dos extratos, as microplacas foram levadas à incubadora por 48 horas. No 7º dia de experimento, as microplacas foram retiradas da incubadora e 50 µL de ácido tricloroacético 50% foram adicionados a cada um dos poços da placa. As placas foram mantidas em geladeira, a 4°C, por uma hora. Após esta hora, o ácido tricloroacético 50% foi removido da microplaca, que foi lavada com água corrente por quatro vezes, de modo que as células viáveis permanecessem aderidas à placa, e as células mortas fossem removidas. A microplaca foi colocada para secar naturalmente por 24 horas. No

8º dia de experimento, a microplaca foi corada com sulforrodamina B, corante que age sobre as células vivas aderidas (Figura 16). Para isso, preparou-se uma solução de sulforrodamina B 4% em ácido acético 1%. Portanto, 100 µL desta solução foram transferidos para cada um dos poços da placa e deixados em contato com as células aderidas por 10 minutos. Ao final deste tempo, a microplaca foi lavada quatro vezes em um lavador de microplacas com ácido acético 1% (Figura 17). A microplaca foi deixada para secar por 24 horas (Figura 18). A partir do 9º dia de experimento, a leitura da microplaca foi realizada. Para isso, o corante remanescente ligado às células aderidas foi diluído com 100 µL de tampão Tris. A microplaca foi deixada sob agitação em um misturador automático (*Belco Glass®, Mini Orbital Shaker*) por 15 minutos. A leitura dos resultados foi feita na sequência, em leitor de microplacas (*Bio-Tek Instruments®, Universal Microplate Reader ELX800*), no comprimento de ondas de 515 nm (Figura19).



Figura 16 - Adição de 100 µl de corante à microplaca.

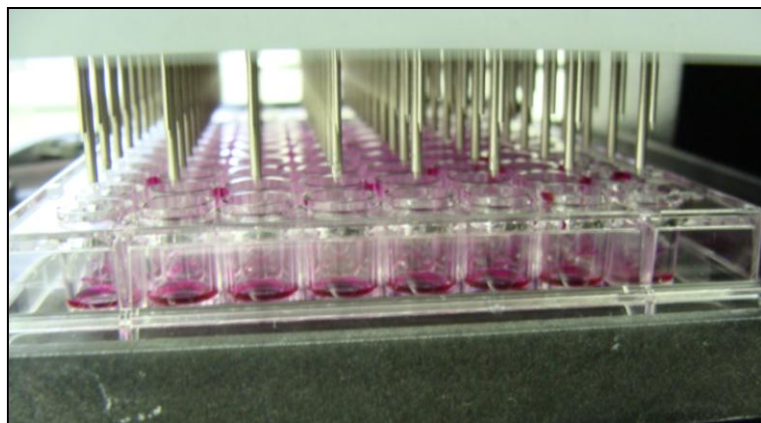


Figura 17 - Lavagem da microplaca, após 10 minutos.

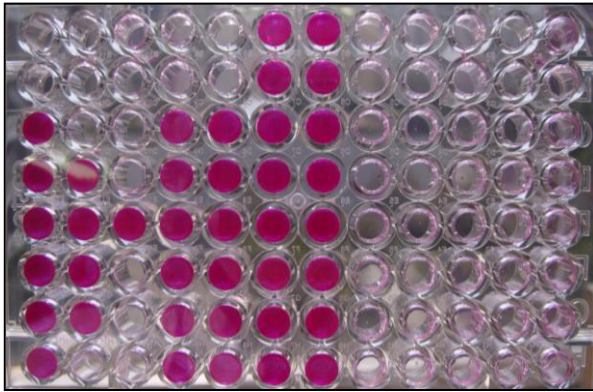


Figura 18 - Microplaca corada e seca, na qual é possível observar os poços corados, com maior crescimento celular.



Figura 19 - Leitura dos resultados, em 515 nm, no leitor de microplacas.

4.3.2.1 Atividade Citotóxica- Curva Dose-resposta

O meio de cultura DMEM acrescido de 20% de SFB foi usado em todo o procedimento realizado com as células. Quatro dias anteriores ao experimento, as células foram colocadas em cultura, nos frascos de crescimento, e foram deixadas na incubadora, com 100% de umidade relativa e 5% de CO₂. No 4^o dia, as células foram reunidas em tubo de centrifuga e contadas, utilizando-se técnicas de tripsinização e de contagem por exclusão por azul de tripan 10%. Com a contagem celular obtida, microplacas de 96 poços foram preparadas as duas concentrações estabelecidas, de 27.500 e 60.000 células por poço. As microplacas foram inoculadas e levadas à incubadora por 24 horas. No 5^o dia de experimento, os extratos vegetais ou resíduos foram adicionados às placas. Este procedimento foi executado do seguinte modo: seis tubos de vidro foram usados. No primeiro, dez µL do extrato foram adicionados a 1990 µL de meio de cultura e

homogeneizado. Deste tubo, foram retirados 200 μL da solução, que foram transferidos para o segundo tubo que contém 1800 μL de meio de cultura. Assim foi feito sucessivamente até o sexto tubo. Desta forma, cada tubo de vidro apresentou as seguintes concentrações de extratos e resíduos: 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ e 0,001 $\mu\text{g/ml}$. A Adriamicina foi usada nas seguintes concentrações: $2,5 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-6}$, $2,5 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-8}$, $2,5 \times 10^{-9}$, $2,5 \times 10^{-10}$ M e a 5-FU nas concentrações de: $4,64 \times 10^{-3}$, $4,64 \times 10^{-4}$, $4,64 \times 10^{-5}$ e $4,64 \times 10^{-6}$ M. As misturas foram homogeneizadas e 100 μL destas foram transferidos para cada poço da microplaca correspondente à análise da amostra. Cada concentração de extrato ou resíduo foi avaliada sete vezes ($n=7$), uma em cada poço, devido à conformação da placa. Após a adição dos extratos, as microplacas foram levadas à incubadora por 48 horas. No 7º dia de experimento, as microplacas foram retiradas da incubadora e 50 μL de ácido tricloroacético 50% foram adicionados a cada um dos poços da placa. As placas foram mantidas em geladeira, a 4°C, por uma hora. Após esta hora, o ácido tricloroacético 50% foi removido da microplaca, que foi lavada com água corrente por quatro vezes, de modo que as células viáveis permanecessem aderidas à placa e as células mortas fossem removidas. A microplaca foi colocada para secar naturalmente por 24 horas. No 8º dia de experimento, a microplaca foi corada com SRB, corante que age sobre as células vivas aderidas. Para isso, preparou-se uma solução de SRB 4% em ácido acético 1%. Portanto, 100 μL desta solução foram transferidos para cada um dos poços da placa e deixados em contato com as células aderidas por 10 minutos. Ao final deste tempo, a microplaca foi lavada quatro vezes em um lavador de microplacas com ácido acético 1%. A microplaca foi deixada para secar por 24 horas. A partir do 9º dia

de experimento, a leitura da microplaca pode ser feita. Para isso, o corante remanescente ligado às células aderidas foi resuspenso com 100 µL de tampão Tris. A microplaca foi deixada sob agitação em um misturador automático por 15 minutos. A leitura dos resultados foi feita na sequência, em leitor de microplacas, no comprimento de ondas de 515 nm.

4.3.3 Ensaio de Contaminação

Os extratos mais ativos foram submetidos ao ensaio de contaminação, no qual se utilizou uma microplaca de 96 poços. Destes, 1/3 dos poços tinham apenas meio DMEM e o extrato, 1/3 dos poços com meio DMEM, antibiótico (Gentamicina®) e extratos e 1/3 dos poços com meio DMEM, antifúngico (Fluconazol®) e os extratos. A microplaca permaneceu na incubadora, com 100% de umidade relativa e 5% de CO₂ por quatro dias. Após este período, verificou-se qual extrato apresentou turvação no meio, o que poderia sugerir uma possível contaminação, observando se o mesmo ocorria com o antibiótico e/ou com o antifúngico. Os extratos que apresentaram turvação do meio foram imediatamente descartados. Aqueles que apresentaram turvação com o antibiótico, mas não com o antifúngico, provavelmente têm fungos associados, e os extratos que turvaram com o antifúngico, mas o mesmo não ocorreu com o antibiótico, possuem provável contaminação bacteriana.

4.4 Análise Estatística

Os modelos estatísticos utilizados, segundo Sokal & Rohlf (1995), para avaliação de todos os ensaios realizados foram a análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*) e análise de Tukey. Análise de variância de dois fatores (*ANOVA Two-way*) foi utilizada para avaliação da influência dos diferentes dias de ensaio, na triagem inicial, e na comparação da atividade dos extratos ativos com a Adriamicina. Valores de densidade óptica obtidos como medidas para a avaliação da inibição de crescimento das células tumorais foram comparados entre os diferentes extratos, as substâncias de referência usadas na avaliação e os controles experimentais (leitura da densidade óptica emitida por poços contendo apenas meio de cultura de células, antes (T_0) e durante o experimento. Valores médios significativamente inferiores aos verificados para os controles foram considerados para selecionar extratos com efeito inibitório do crescimento das células tumorais, em baterias de testes experimentais subsequentes, permitindo a triagem dos extratos segundo um critério de “eficiência de inibição”.

A análise de variância permite testar se há diferenças significativas entre os valores médios de densidade óptica lidos para tratamentos experimentais e controles (médias obtidas a partir de, no mínimo, seis réplicas – *i.e.*, poços, para cada tratamento), mas não mostra entre quais casos se pronunciam as possíveis diferenças. Para tanto, recorreu-se ao teste de comparações múltiplas de Tukey (ZAR, 1999), efetuado para os fatores cujas diferenças foram evidenciadas, para

um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Todas as análises foram efetuadas utilizando-se o programa *Statistica 6.0* (*StatSoft Incorporation 2001*).

Delineamento experimental

4.4.1 Análise da Triagem

Na primeira bateria de análises, aqui referida como Ensaio 1, foi avaliado se existiam diferenças entre os valores de densidade óptica obtidos para 64 extratos vegetais em estado bruto (dos 72 extratos do primeiro experimento, sem os extratos que apresentaram contaminação durante o procedimento experimental), três tipos de substâncias-referência Adriamicina® (Adriamicina), dimetilsulfóxido (DMSO) e 5-fluorouracil® (5-FU), sendo esta última testada em cinco concentrações distintas) e dois tipos de controle (denominados de MeioCel “T₀”, meio com células sem tratamento que cresceu apenas 24 horas, e de “MeioCel”, meio com células sem tratamento, crescimento 72 horas), em uma densidade celular de 27.500 células por poço (cel/poço). Valores médios significativamente inferiores aos verificados para os controles foram considerados para selecionar extratos com efeito inibitório do crescimento das células tumorais.

Na segunda análise, ou Ensaio 2, foi realizada a análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*) com 35 extratos, três substâncias-referência (ADRIA, DMSO e 5-FU) e dois tipos de controle (denominados de MeioCel “T₀” que cresceu apenas 24 horas e de “MeioCel”, meio com células sem tratamento, crescimento 72 horas), nas concentrações de 27.500 cel/poço e 60.000 cel/poço.

A terceira análise, Ensaio 3, foi a análise de um fator (*ANOVA One-way*), na qual foram analisados os 18 extratos, uma droga de referência (Adriamicina) dois tipos de controle (denominados de “MeioCel” “T₀” que cresceu apenas 24 horas e de “MeioCel”, meio com células sem tratamento, crescimento 72 horas), nas concentrações de 27.500 cel/poço e 60.000 cel/poço.

Para avaliar o comportamento da eficácia dos 18 extratos ao longo dos três ensaios (1, 2 e 3) realizados para a densidade celular de 27.500 cel/poço, recorreu-se a análise de dois fatores (*ANOVA Two-way*), considerando-se os “ensaios” e “tratamentos+controles” (extratos e referência+controles) como os dois fatores da análise. Tal análise permitiria avaliar a “influência do dia” sobre o experimento, ou seja, a influência do erro experimental associado ao dia em que fora realizado o experimento. Em conjunto, foi realizado o teste de Tukey, que permitiu comparar os diferentes valores de densidade óptica.

A mesma análise de dois fatores (*ANOVA Two-way*) foi realizada para os ensaios 2 e 3, com a densidade celular de 60.000 cel/poço, considerando-se os “ensaios” e “tratamentos+controles” como os dois fatores da análise, e o teste de Tukey, que permitiu comparar os diferentes valores de densidade óptica.

4.4.2 Análise da Curva Dose-Resposta dos Extratos Ativos

A análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*) foi realizada para o Ensaio 4, no qual foram analisadas as cinco concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) de cada um dos quatro extratos (633, 689, 719 e 1151), nas densidades celulares de 27.500 e 60.000 e 100.000 cel/poço. Também foi realizada análise de Tukey, para verificar as diferenças entre as diferentes concentrações e referência. Esta análise foi realizada para verificar se a ação dos extratos que apresentaram maior tendência à inibição continuavam inibindo o crescimento em concentrações menores.

4.4.3 Análise da Triagem dos Resíduos

No Ensaio 5 foi avaliado se existiam diferenças entre os valores de densidade óptica obtidos para os resíduos clorofórmico, butanólico e aquoso dos extratos 633, 689, 719 e 1151, um tipo de substância-referência Adriamicina® (Adriamicina), e dois tipos de controle (denominados de MeioCel “T₀”, meio com células sem tratamento que cresceu apenas 24 horas, e de “MeioCel”, meio com células sem tratamento, crescimento 72 horas), nas densidades celulares de

27.500 e 60.000 células por poço (cel/poço). Valores médios significativamente inferiores aos verificados para os controles foram considerados para selecionar resíduos com efeito inibitório do crescimento das células tumorais.

4.4.2 Análise Curva Dose-Resposta dos Resíduos Ativos

A análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*) foi realizada para o Ensaio 6, no qual foram analisadas as cinco concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) de cada um dos resíduos com atividade positiva no Ensaio 5, nas densidades celulares de 27.500 e 60.000 e 100.000 cel/poço. Também foi realizada análise de Tukey, para verificar as diferenças entre as diferentes concentrações e referência. Esta análise foi realizada para verificar se a ação dos resíduos que apresentaram maior tendência à inibição continuavam inibindo o crescimento em concentrações menores.

4.5 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com os extratos 633, 689, 719 e 1151 e seus resíduos, obtidos a partir da partição líquido-líquido, e com as frações dos resíduos clorofórmicos dos extratos 689 e 719. Cada amostra foi aplicada em quatro cromatofolhas (*Merck*®), numeradas de 1 a 4 (Figura 20). Estas foram eluídas com três misturas de solventes (Figura 21). O primeiro sistema de solvente usado foi hexano: acetato de etila (4:1). O segundo, acetato de etila: clorofórmio (1:1). O terceiro, acetato de etila: clorofórmio: metanol (2:2:1) (Figura 22). As cromatofolhas foram observadas em luz UV, nos comprimentos de 254 nm e 365 nm, para verificar se os resíduos e frações apresentavam moléculas com grupos cromóforos, os quais fluorescem com radiação UV (Figuras 23 e 24). Após o contato com o solvente, todas as cromatofolhas foram reveladas com ácido sulfúrico 25%, seguido de aquecimento (Figuras 25 e 26).

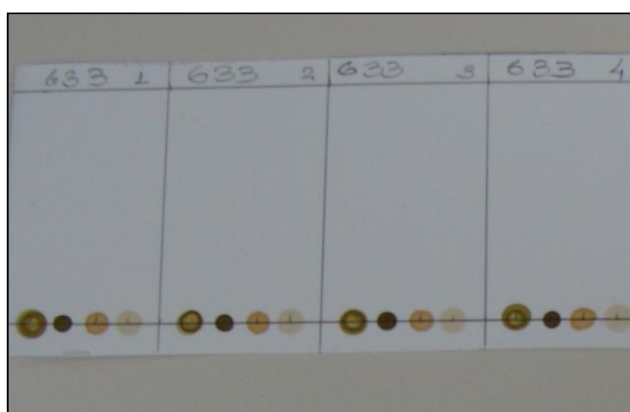


Figura 20 - Cromatofolhas com aplicação dos resíduos e extratos.

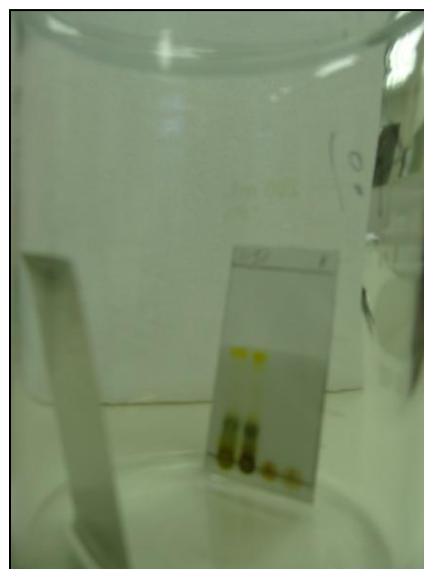


Figura 21 - Cromatofolha em contato com a mistura de solventes.

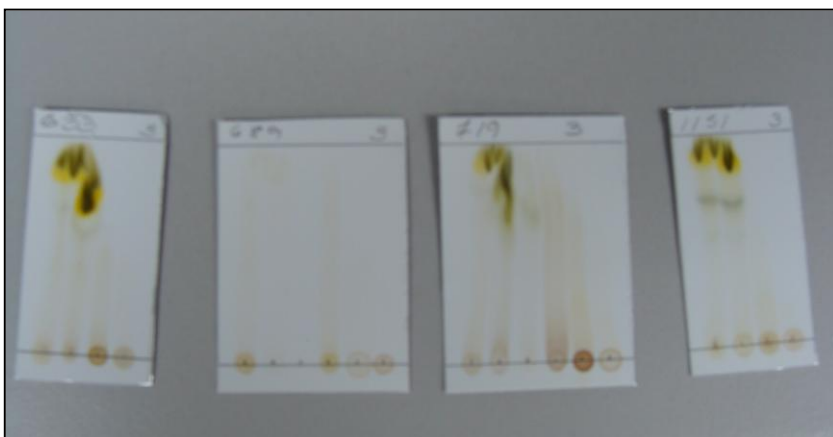
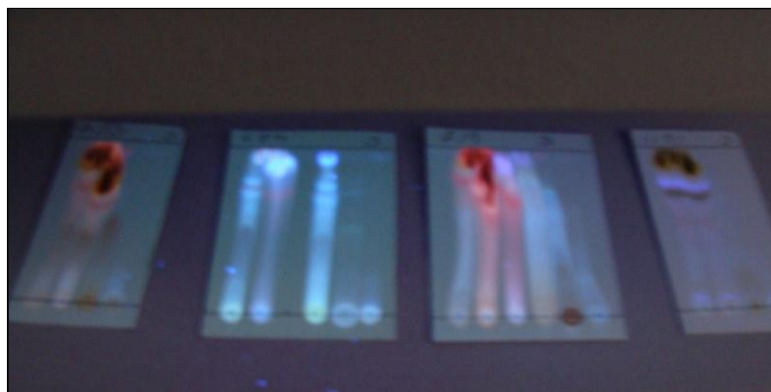
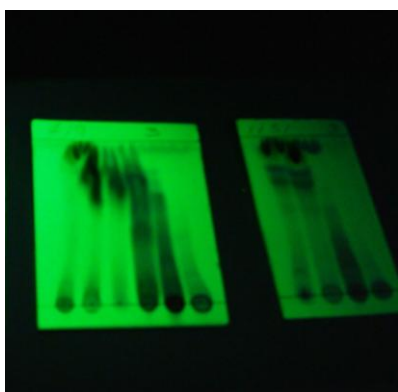


Figura 22 - Cromatofolhas após contato com a mistura de solventes.



Figuras 23 e 24 - Cromatofolhas após serem eluídas na mistura de solventes, submetidas à leitura sob luz UV de 254 e 365 nm.

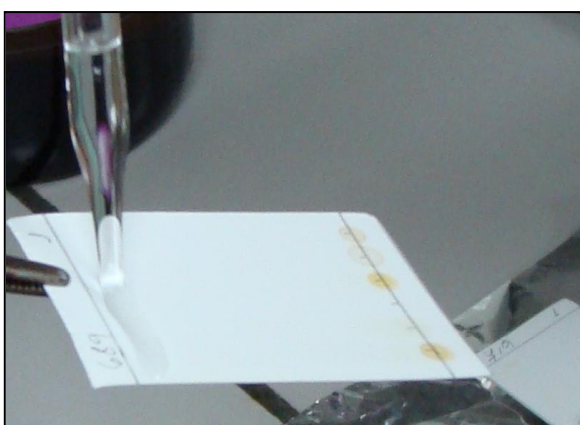


Figura 25 - Aplicação de ácido sulfúrico 25%, para revelar a cromatografia.

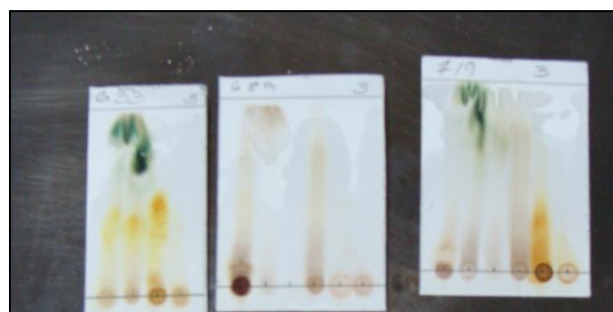


Figura 26 - Cromatofolhas após revelação com ácido sulfúrico 25%.

4.6 Atividade Antioxidante

As cromatofolhas com numeradas com o número 4, foram usadas para verificar atividade antioxidante com β - caroteno, segundo a técnica de Pratt e Miller (1984). Foi preparada a solução de β - caroteno com 4,5 mg de β - caroteno, 15 mL de clorofórmio, uma gota de ácido linoléico e 30 mL de etanol. Todo procedimento foi realizado com o mínimo de luz possível, para que não houvesse degradação da solução, que é extremamente sensível à luz. A solução foi borrifada nas cromatofolhas, e após 30 minutos, os resultados foram observados (Figura 27).

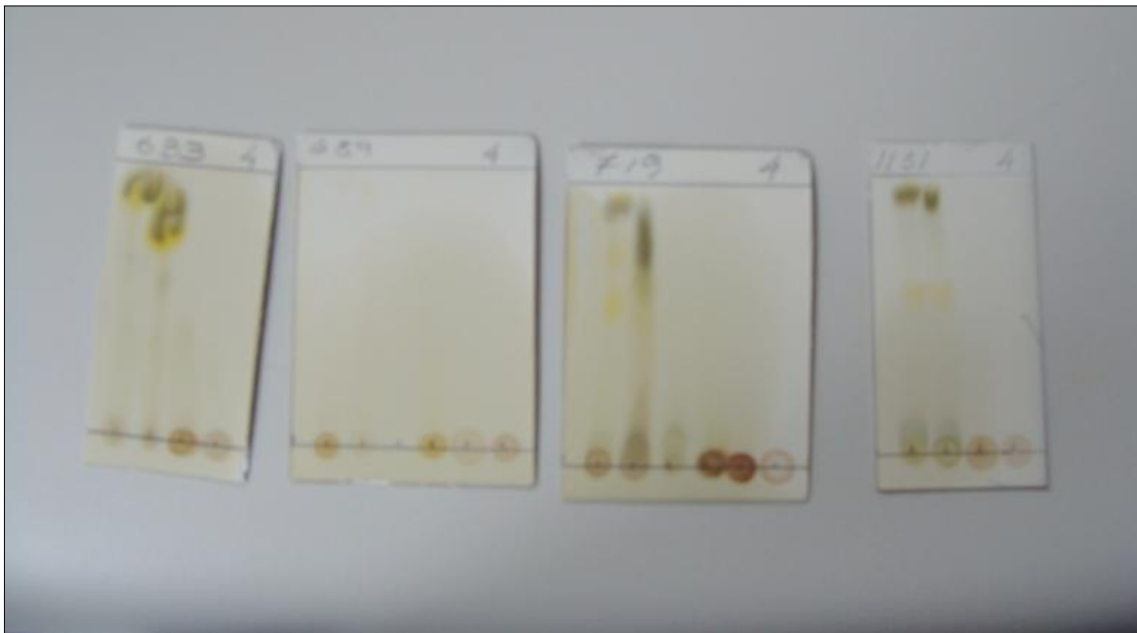


Figura 27 - Cromatofolhas após nebulização com β - caroteno.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da Densidade Celular

Determinou-se que as concentrações de 60.000 células e 100.00 células por poço forneciam uma atividade óptica adequada, que deve ser lida entre 0,200 e 0,800. Embora ambas densidades apresentaram boas condições de leitura, a densidade de 60.000 células por poço foi selecionada. Foi utilizada também a densidade de 27.500 células por poço, por ser aproximadamente a metade de densidade celular de 60.000 células por poço, que resultou em uma atividade óptica de aproximadamente 0,254. De modo a se avaliar a eficácia da atividade citotóxica dos extratos e frações, foi decidido que a densidade celular de 100.000 cel/poço também seria usada em alguns experimentos, com os extratos selecionados e seus resíduos.

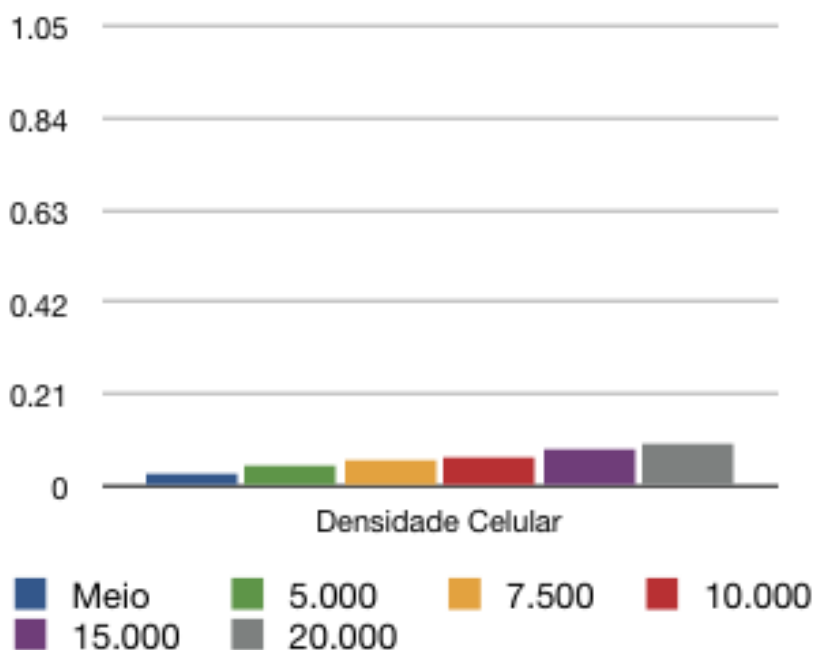


Gráfico 5.1a – Análise de diferentes densidades celulares de 5.000 cel/poço, 7.500 cel/poço, 10.000 cel/poço, 15.000 cel/poço e 20.000 cel/poço; após crescimento celular em 24 horas.

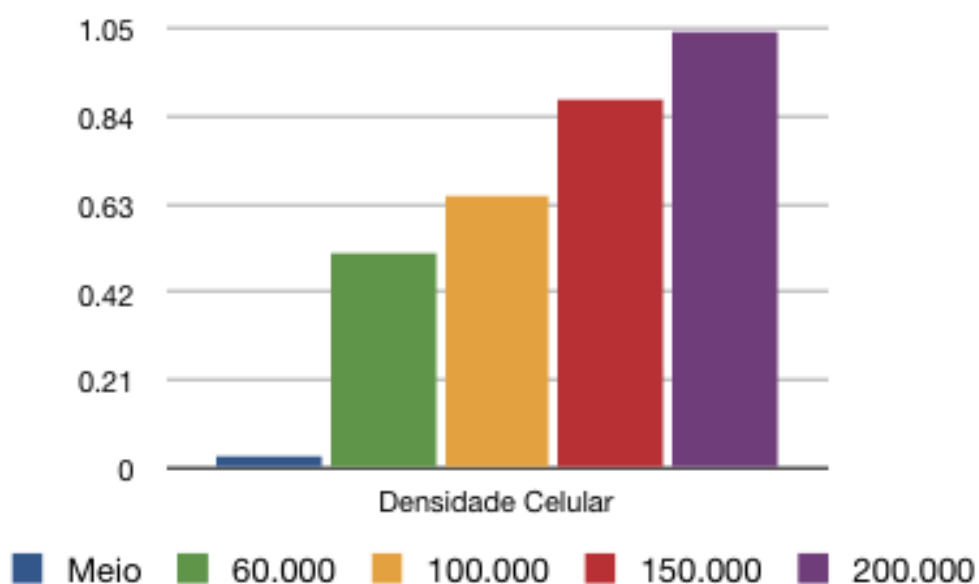


Gráfico 5.1b - Análise de diferentes densidades celulares de 60.000 cel/poço, 100.000 cel/poço, 150.000 cel/poço e 200.000 cel/poço; após crescimento celular em 24 horas.

5.2 Atividade Citotóxica dos Extratos

Foram realizados três ensaios com densidade celular 27.500 células por poço e dois com densidade celular 60.000 células por poço, para identificação dos extratos mais ativos, entre os 72 previamente selecionados. No primeiro ensaio foram avaliados os extratos com maior atividade. Estes extratos foram selecionados para o ensaio seguinte. O segundo ensaio foi realizado com a densidade de 27.500 e 60.000 cel/poço. Os extratos que apresentaram melhores resultados foram selecionados para o terceiro ensaio. No terceiro ensaio foram testados os melhores extratos, com o qual foi possível selecionar os melhores resultados. Estes extratos que apresentaram maior tendência à inibição foram selecionados para a avaliação da dose-resposta e para a triagem de suas frações (quarto e quinto ensaios). As frações que apresentaram melhores resultados foram retestadas como dose-reposta nas duas densidades celulares (sexto ensaio) (Figura 28).

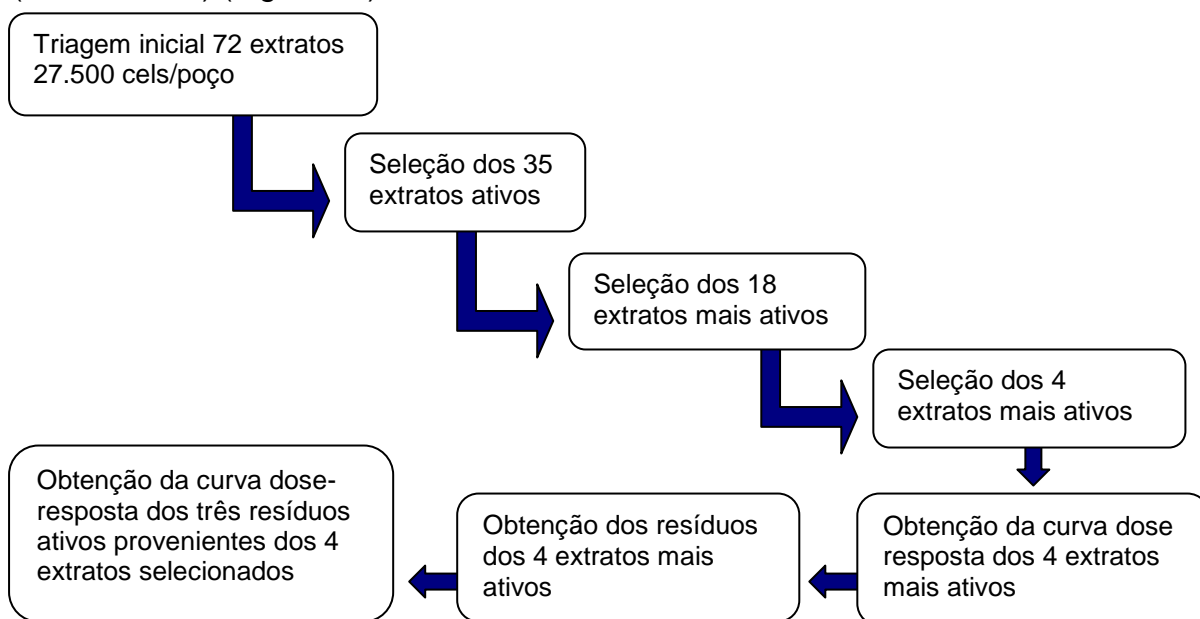


Figura 28- Diagrama com seqüência dos ensaios.

5.2.1 Atividade Citotóxica - Triagem dos Extratos

Para os três ensaios com densidade celular 27.500 células por poço e dois com densidade celular 60.000 células por poço, cujo objetivo foi identificar os extratos mais ativos entre os 72 previamente selecionados, foram utilizados, além dos extratos, substâncias padrão Adriamicina® (Adriamicina) e 5-fluoruracila® (5-FU), do controle de crescimento sem tratamento e do controle de crescimento em 24 horas (T_0). Os resultados obtidos no primeiro ensaio foram analisados por análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*), e apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos e controle T_0 ($F_{(72,373)}=21,270$ $p<0,0001$). Trinta e cinco extratos se mostraram diferentes do controle de crescimento celular sem tratamento (MeioCel), e foram selecionados para o ensaio seguinte (Gráfico 5.2a; Tabela 5.2a).

Tabela 5.2a – Ensaio 1, médias da densidade óptica, por meio de teste de Tukey, utilizadas para a seleção dos 72 extratos, referências e controles.

Variável	Média (Abs)
MeioCel	0,526
T_0	0,229
Adriamicina	0,135
5-FU	0,306
Extrato 144	0,317
Extrato 1228	0,004

Legenda: T_0 - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

MeioCel - controle de crescimento sem tratamento em 72 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

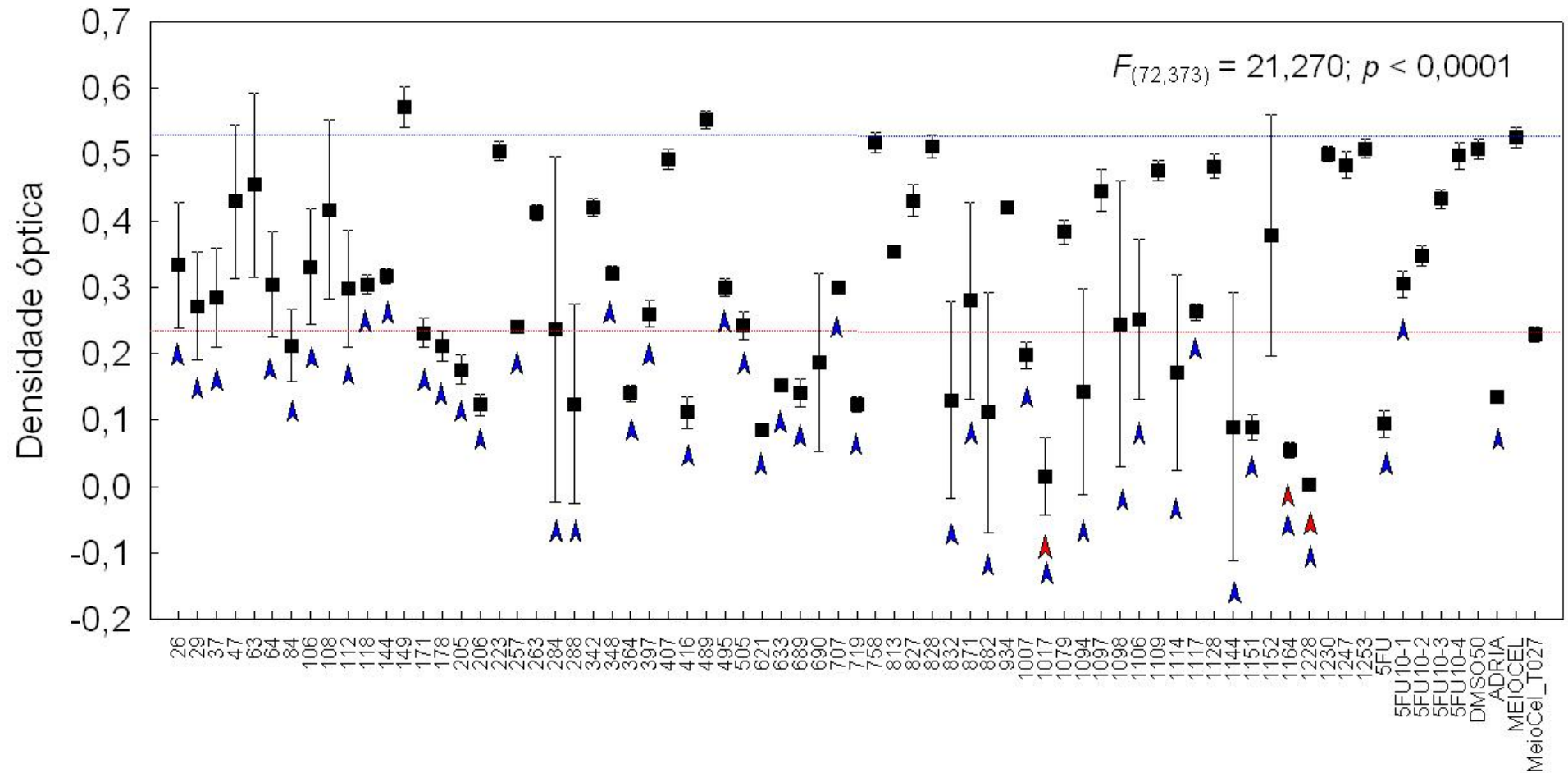


Gráfico 5.2a - Ensaio 1 - Variação da densidade óptica dos 72 extratos e referências, na densidade celular de 27.500 cel/poço (ANOVA *One-way*). Estão representados por setas, os extratos e/ou referências com valores de densidade óptica inferiores aos obtidos para MeioCel (seta azul) e T_0 (seta vermelha), cujas médias estão marcadas por linhas pontilhadas, azul ou vermelha. Nível de significância de 5%.

No segundo ensaio foi realizada a análise com os 35 extratos, Adriamicina e controle T₀. Análise de variância de uma entrada foi realizada e foi verificado que, dos 35 extratos testados, 18 apresentaram diferenças significantes em relação ao controle de crescimento sem tratamento ($F_{(39,205)}=12,847$; $p<0,001$ para a análise feita com densidade celular de 27.500 células por poço e $F_{(41,214)}=14,664$; $p<0,0001$ para a análise feita com densidade celular de 60.000 células por poço). Estes 18 extratos foram selecionados para serem analisados novamente (Gráficos 5.2b e 5.2c).

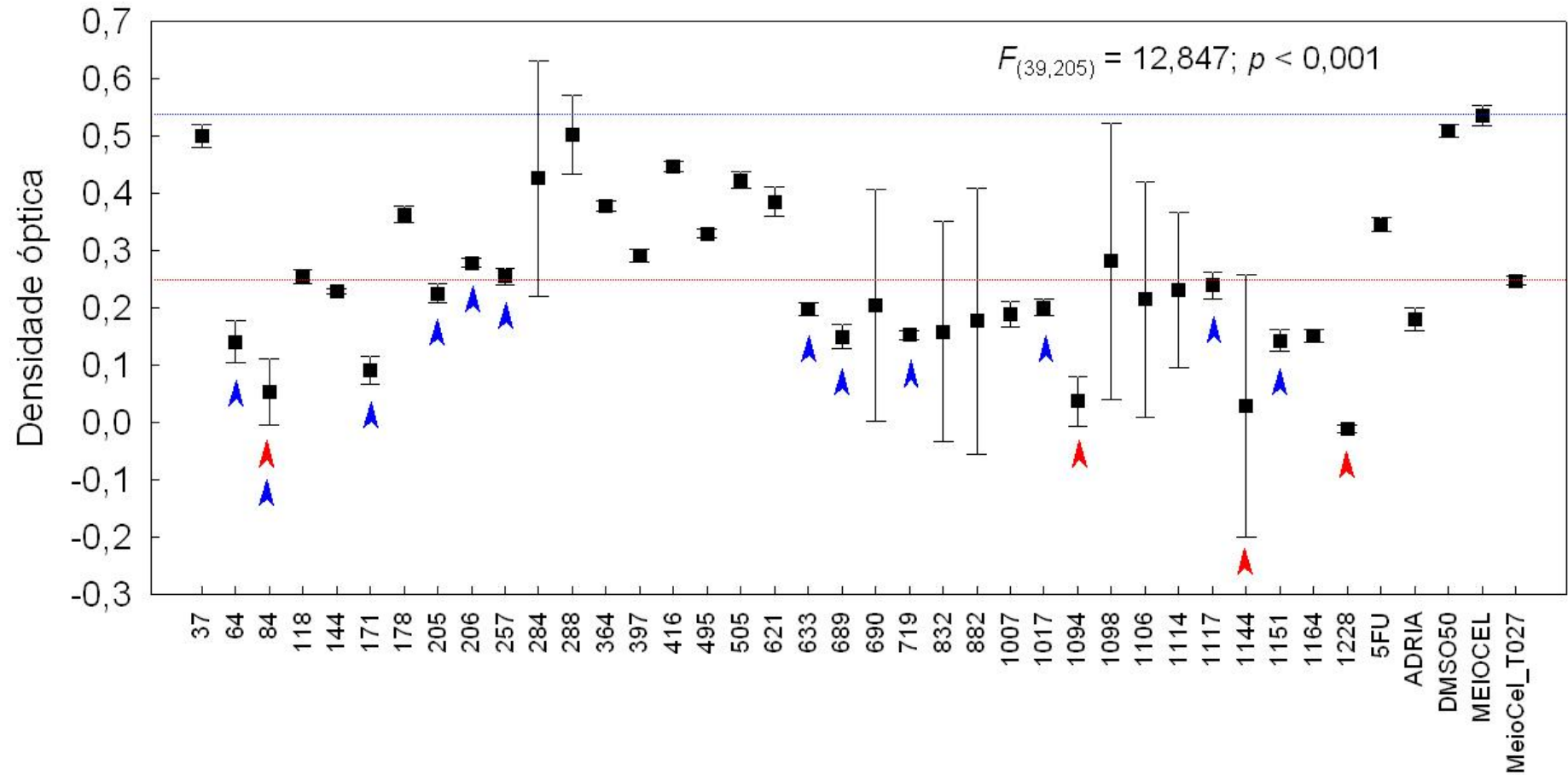


Gráfico 5.2b - Ensaio 2 - Variação da densidade óptica dos 35 extratos e referências, na densidade celular de 27.500 cel/poço (ANOVA *One-way*). Estão representados por setas, os extratos e/ou referências, cujos valores de densidade óptica são inferiores aos valores obtidos para MeioCel (seta azul) e T_0 (seta vermelha), para um nível de significância de 5%.

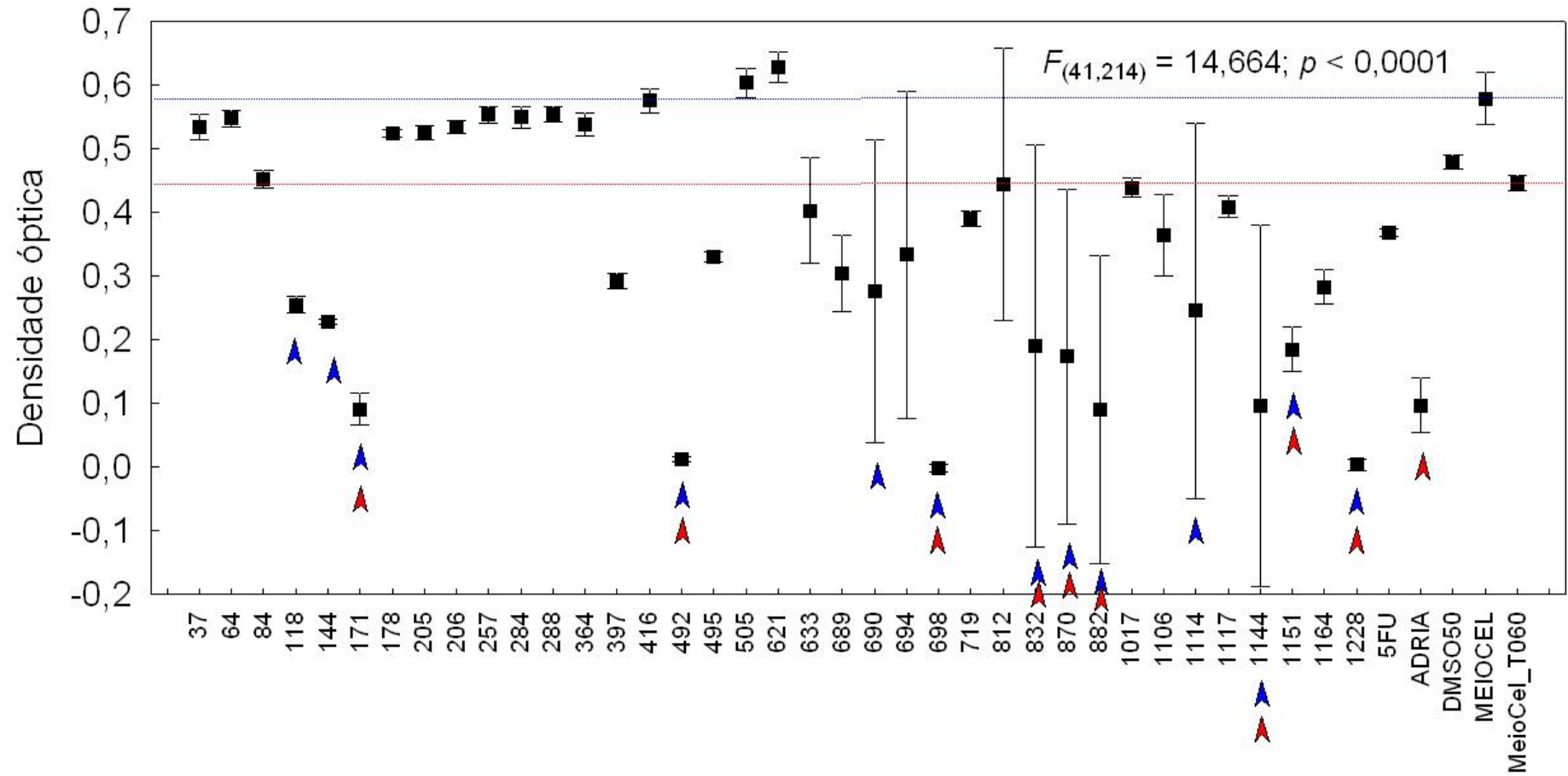


Gráfico 5.2c - Ensaio 2 - Variação da densidade óptica dos 35 extratos e referências, na densidade celular de 60.000 cel/poço (ANOVA One-way). Estão representados por setas, os extratos e/ou referências, com valores de densidade óptica inferiores aos obtidos para MeioCel (seta azul) e T₀ (seta vermelha), $\alpha = 0,005$.

Estes 18 extratos foram ensaiados novamente, juntamente com Adriamicina e frente ao controle T₀. Diferenças significantes entre nove extratos foram encontradas, em relação ao MeioCel, no ensaio utilizando densidade celular de 27.500 células por poço (Gráfico 5.2d, $F_{(20,107)}=145,074$; $p<0,0001$ e Tabela 5.2b). Para refinar a escolha dos extratos de modo ainda mais rigoroso foi utilizado o ensaio com densidade celular de 60.000 (Gráfico 5.2e, $F_{(20,107)}=585,674$; $p<0,0001$) para se selecionar apenas os extratos 633, 689, 719 e 1151 (Tabela 5.2c).

Tabela 5.2b – Ensaio 3, médias da densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, dos quatro extratos mais ativos, referências e controles, na densidade celular de 27.500 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
MeioCel	0,664
T ₀	0,303
Adriamicina	0,023
Extrato 633	0,206
Extrato 689	0,040
Extrato 719	0,109
Extrato 1151	0,005

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

MeioCel - controle de crescimento sem tratamento em 72 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Tabela 5.2c – Ensaio 3, médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, dos quatro extratos mais ativos, referências e controles, na densidade celular de 60.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
MeioCel	0,700
T ₀	0,475
Adriamicina	0,015
Extrato 633	0,154
Extrato 689	0,025
Extrato 719	0,125
Extrato 1151	0,002

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

MeioCel - controle de crescimento sem tratamento em 72 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

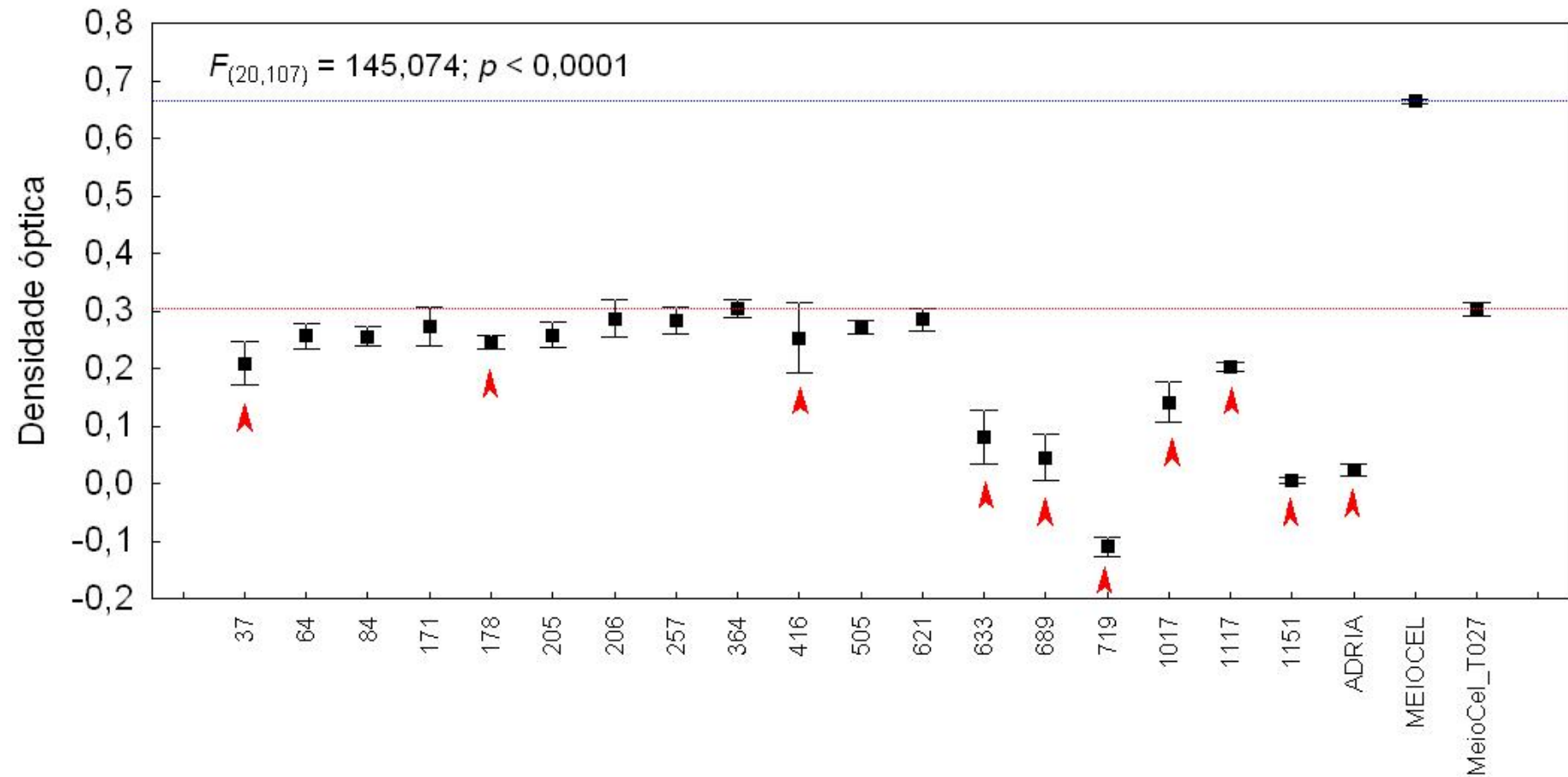


Gráfico 5.2d - Ensaio 3 - Variação da densidade óptica dos 18 extratos e referência, na densidade celular de 27.500 cel/poço (ANOVA *One-way*). Estão representados por setas, os extratos e/ou referências, cujos valores de densidade óptica foram inferiores aos obtidos para MeioCel (seta azul) e T₀ (seta vermelha), para um nível de significância de 5%.

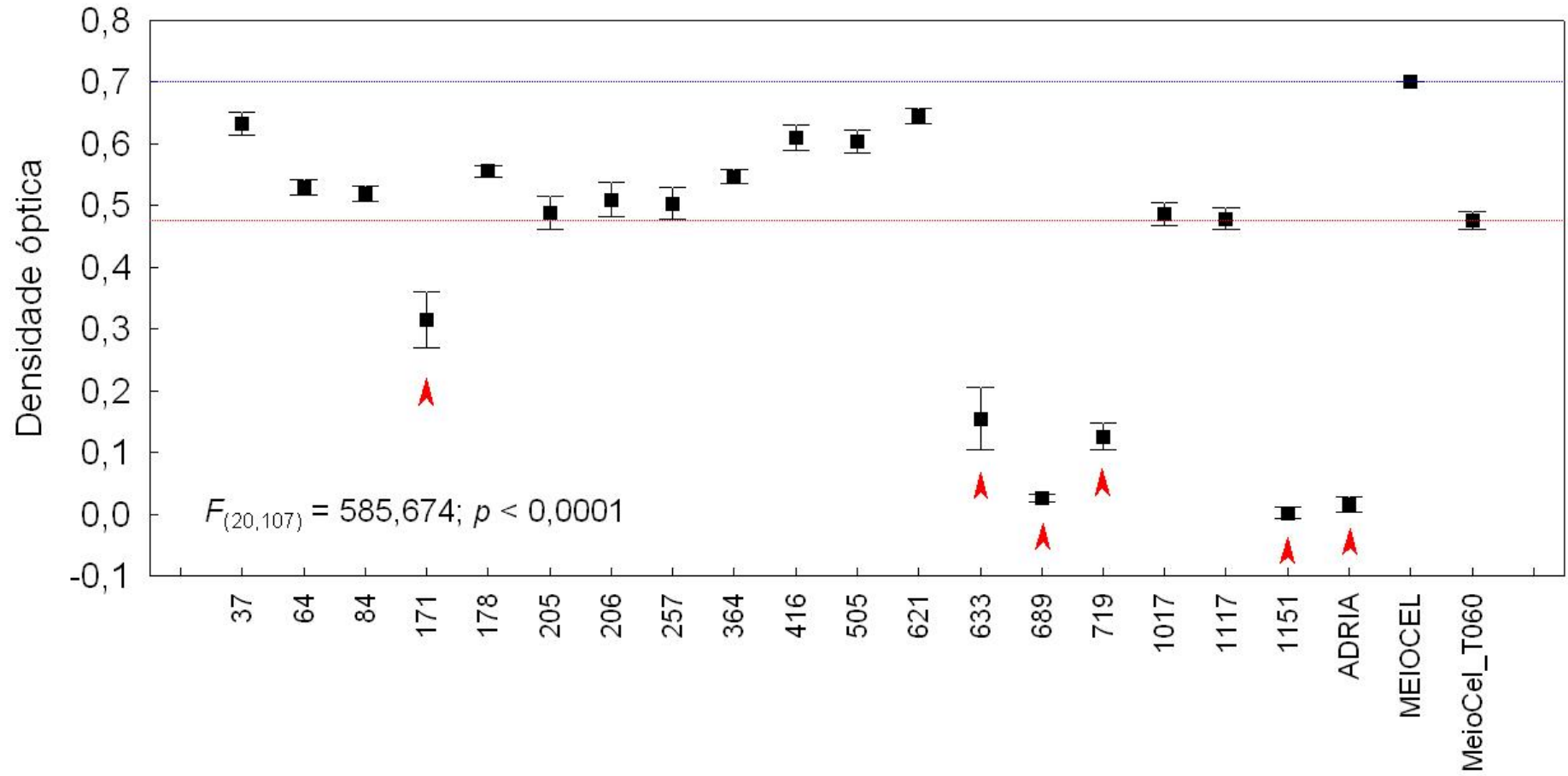


Gráfico 5.2e - Ensaio 3 - Variação da densidade óptica dos 18 extratos e referência, na densidade celular de 60.000 células por poço (ANOVA). Estão representados por setas azuis e vermelhas, os extratos e/ou referências, os valores de densidade óptica inferiores aos valores obtidos para MeioCel (seta azul) e T0 (seta vermelha), nível de significância de 5%.

Foi verificada a influência da análise dos 18 extratos em três dias diferentes, para a densidade celular de 27.500 cel/poço, através da análise de variância de duas entradas (*ANOVA Two-way*). Foi verificado que houve uma diferença significativa no resultado dos extratos, em particular, observada no ensaio do 2º dia, tanto para a densidade celular de 27.500 células por poço (Gráfico 5.2f; $F_{(40,330)}=68,049$; $p<0,0001$) como para a densidade celular 60.000 células por poço (Gráfico 5.2g; $F_{(20,216)}=71,924$; $p<0,0001$). Foram detectadas diferenças entre todos os fatores considerados na análise. Assim, houve diferença entre o primeiro fator, caracterizado pelos dias de experimento ou “ensaios” ($F_{(2,330)} = 244,92$ $p<0,0001$), entre o segundo fator, “tratamentos + controles” ($F_{(40,330)} = 243,22$; $p<0,0001$) e, por fim, entre a interação desses dois fatores ($F_{(40,330)} = 68,049$ $p<0,0001$). Considerando-se os valores brutos de atividade óptica dos 18 grupos de tratamento dos três ensaios, vistos nos gráficos 5.2h e 5.2i, fica evidente que o ensaio 2 apresenta uma diferença significativa entre os resultados, em relação aos outros dois ensaios (Gráfico 5.2h; $F_{(2,330)}=244,92$; $p<0,001$), também as diferenças entre um segundo fator. O teste de Tukey permitiu verificar que nove extratos vegetais apresentaram valores de densidade óptica inferiores ao controle T_0 (Gráfico 5.2d) e que a diferença verificada para os ensaios deveu-se aos maiores valores de densidade óptica obtidos no dia 2 (Ensaio2, Gráfico 5.2h).

Para avaliar o comportamento da eficácia dos 18 extratos ao longo dos dois ensaios (2 e 3) realizados para a densidade celular de 60.000 cel/poço, recorreu-se a *ANOVA Two-way*, considerando-se os “ensaios” e “tratamentos+controles” como os dois fatores da análise. Tal análise permitiu avaliar a “influência do dia” sobre o experimento, ou seja, a influência do erro

experimental associado ao dia em que fora realizado o experimento. Foram detectadas diferenças entre todos os fatores considerados na análise. Assim, houve diferença entre o primeiro fator, “tratamentos + controles” ($F_{(20,216)}=561,82$; $p<0,0001$), entre o segundo fator, caracterizado pelos dias de experimento ou “ensaios” ($F_{(1,216)}=38,03$; $p<0,0001$) e, por fim, entre a interação desses dois fatores ($F_{(20,216)}=71,92$; $p<0,0001$), demonstrando que diferenças entre um determinado tratamento (incluindo-se aqui os controles) sofre influência do dia de experimento (Gráfico 5.2g). O teste de Tukey permitiu verificar que 10 extratos vegetais apresentaram valores de densidade óptica inferiores ao controle T_0 (Gráfico 5.2e) e que a diferença verificada para os ensaios deveu-se aos maiores valores de densidade óptica obtidos no dia 2 (Ensaio2, Gráfico 5.2i).

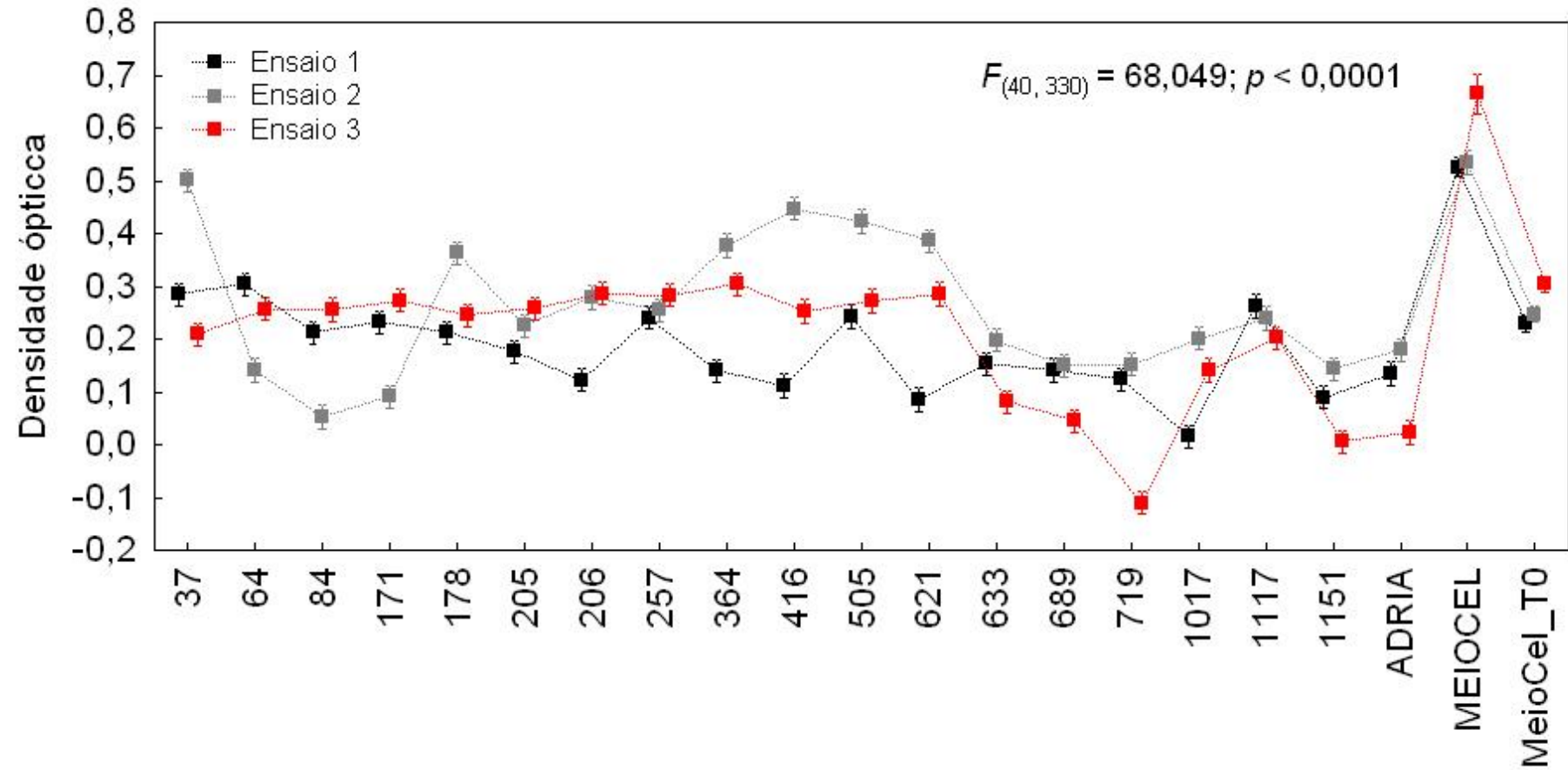


Gráfico 5.2f - Variação da densidade óptica dos 18 extratos, referência e controles, na densidade celular de 27.500 células por poço, em diferentes ensaios, 1, 2 e 3 (ANOVA-*Two way*), para nível de significância de 5%.

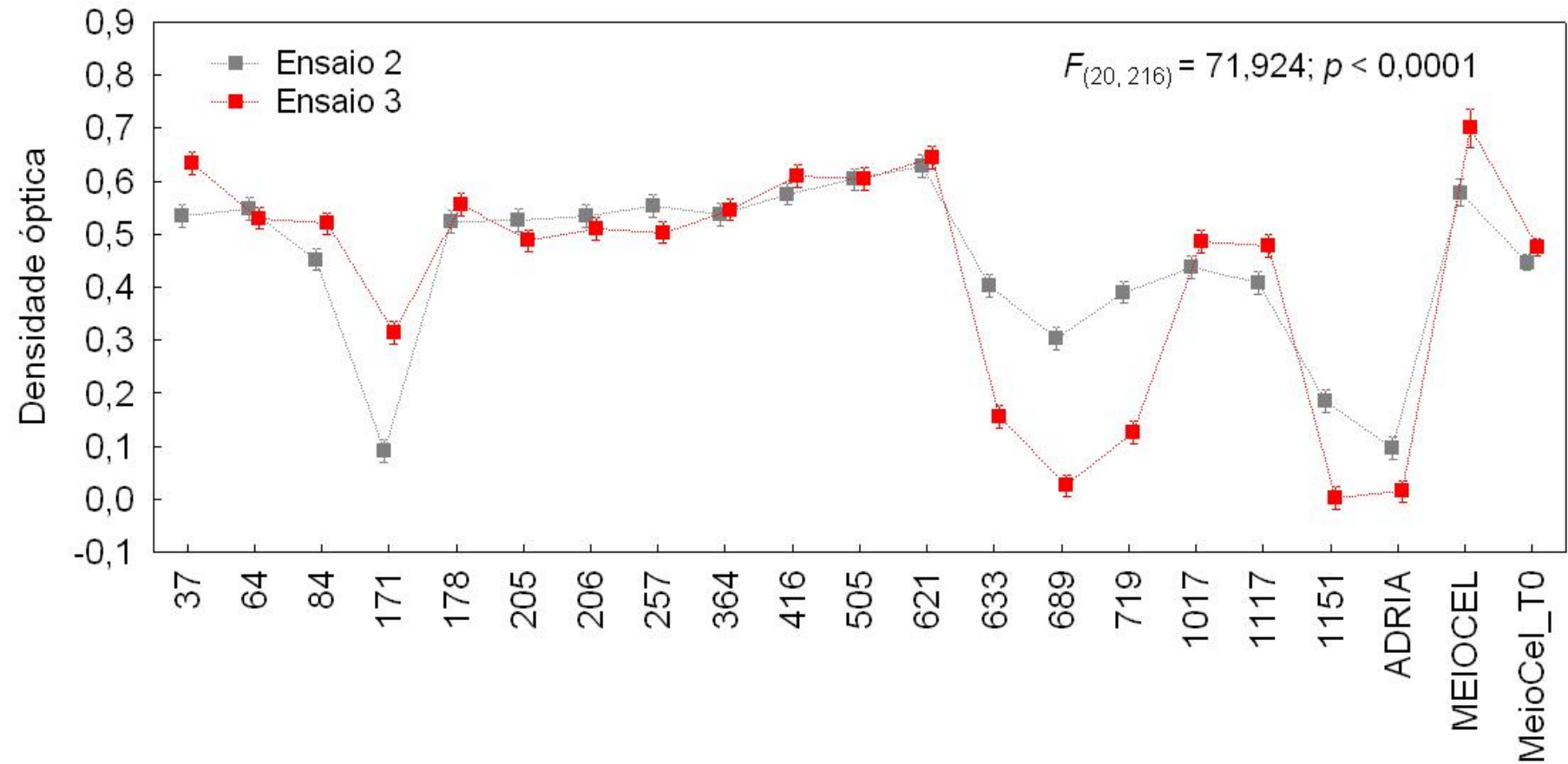


Gráfico 5.2g - Variação da densidade óptica dos 18 extratos, referência e controles, na densidade celular de 60.000 células por poço, em diferentes ensaios, 2 e 3 (ANOVA-Two way), $\alpha=0,005$.

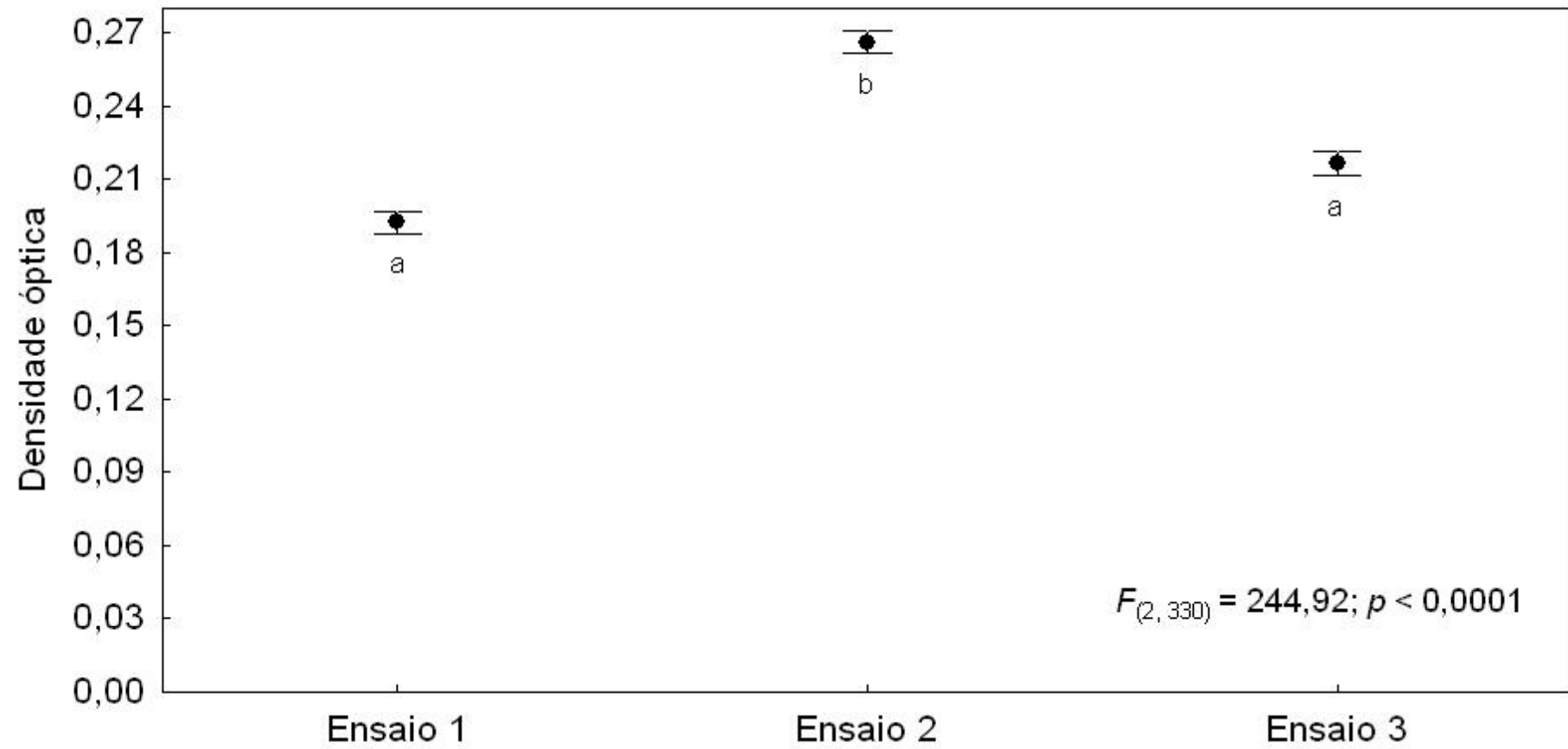


Gráfico 5.2h - Variação do grupo dos 18 extratos, referência e controles, nos ensaios 1, 2 e 3, na densidade celular de 27.500 células por poço. Onde os grupos com letras iguais (a) resultaram em leituras iguais e o grupo com letra diferente (b) com densidade diferente. Nível de significância de 5%.

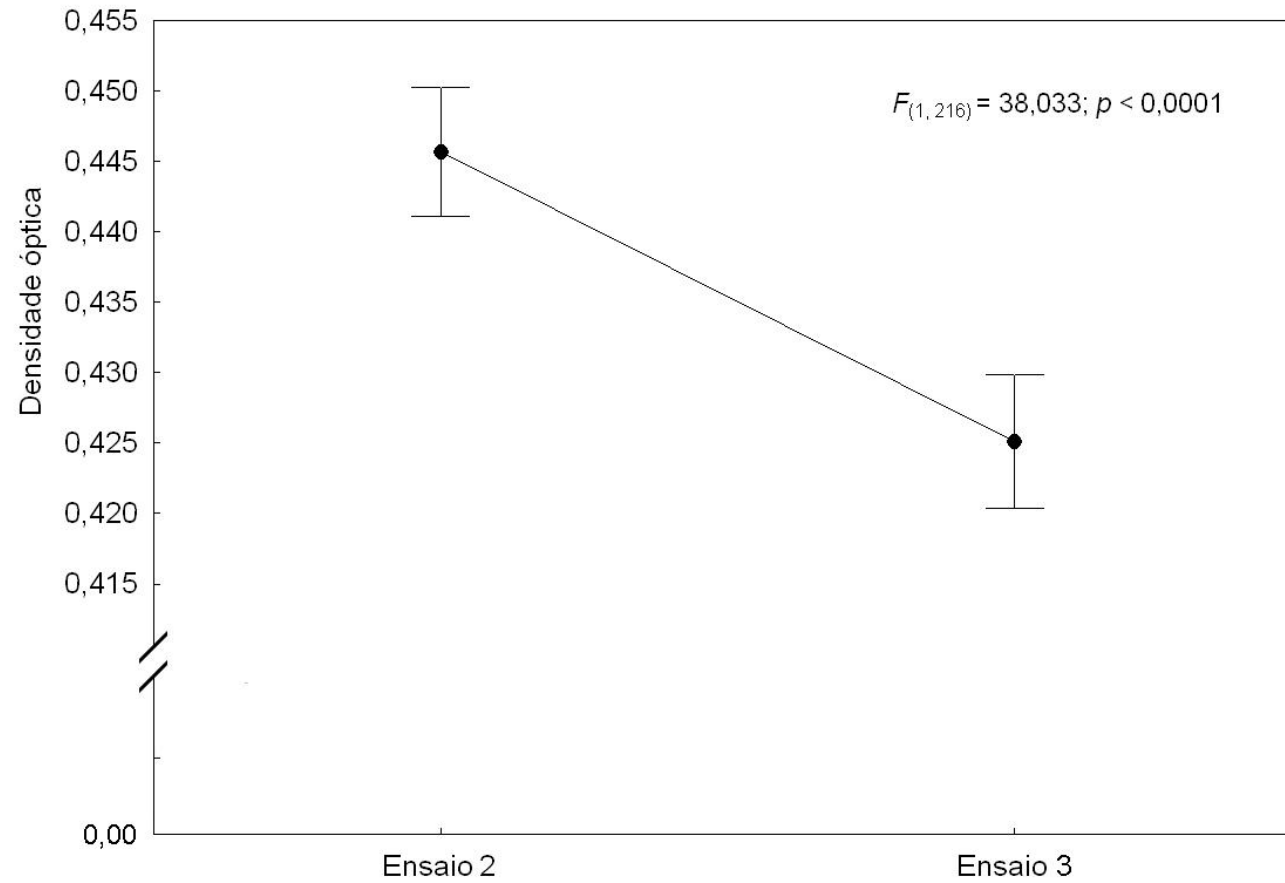


Gráfico 5.2i - Variação do grupo dos 18 extratos, referência e controles, nos ensaios 2 e 3, na densidade celular de 60.000 células por poço. Nível de significância de 5%.

Alguns extratos aquosos apresentaram uma atividade citotóxica extremamente representativa. Ao serem observados com maior critério foi verificado que estes extratos apresentaram crescimento fúngico nas microplacas, o que possivelmente influenciou nos resultados de citotoxicidade. Em uma análise para se verificar o quanto estes extratos inibiram o crescimento celular, comparou-se a atividade geral dos extratos não contaminados com a atividade geral dos extratos contaminados, e a diferença foi significativa tanto no ensaio feito com densidade celular de 27.500 células por poço (Gráfico 5.2j; $F_{(1,430)}=128,68$; $p<0,0001$) como no ensaio feito com densidade celular de 60.000 células por poço (Gráfico 5.2i; $F_{(1,216)}=38,033$; $p<0,0001$) e acaba induzindo os resultados a falsos positivos. Devido a este fator, os extratos contaminados foram descartados.

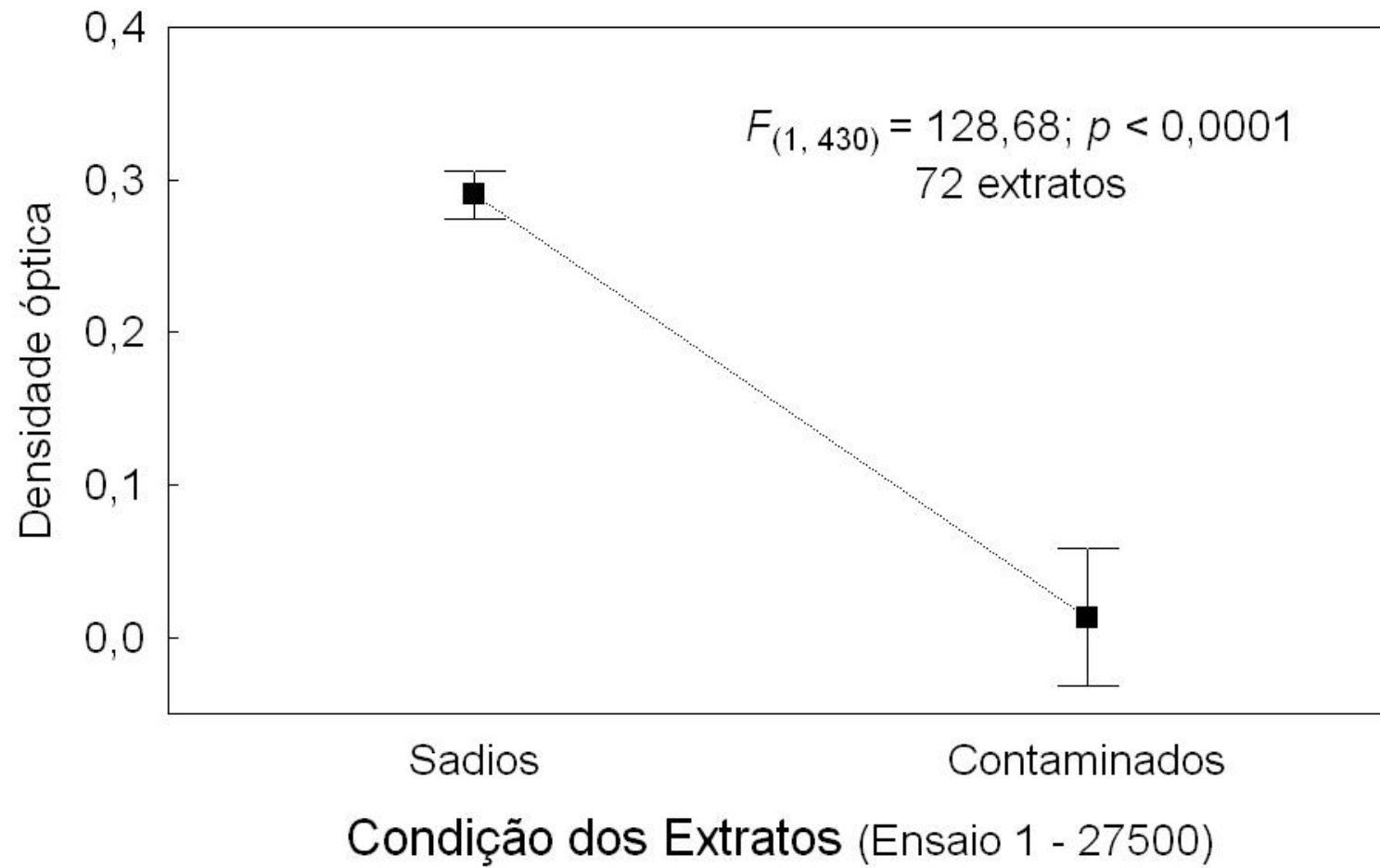


Gráfico 5.2j - Ensaio 4 - Variação da densidade óptica do grupo dos extratos sadios (64 extratos) e do grupo dos extratos contaminados (8 extratos), na densidade celular de 27.500 células por poço (ANOVA *One-way*).

5.3 Atividade Citotóxica - Curva Dose-resposta dos Extratos Ativos

Após a triagem inicial dos extratos, os quatro extratos - 633, 689, 719 e 1151 - foram avaliados quanto à curva dose-resposta. Com a análise de variância de uma entrada (*ANOVA One-way*) foram analisadas as cinco concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) de cada um dos quatro extratos, nas densidades celulares de 27.500 e 60.000 e 100.000 cel/poço. Também foi realizada análise de Tukey, para verificar as diferenças entre as diferentes concentrações e referência.

O extrato 633, avaliado na concentração de 100 µg/mL, apresentou diferença em relação ao controle T_0 na densidade celular de 27.500 cel/poço (Gráfico 5.2k; Tabela 5.3a).

Tabela 5.3a – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com a concentração de 100 µL do extrato 633 e controle, utilizadas para avaliação da atividade citotóxica.

Variável	Média (Abs)
T_0	0,246
633 100 µg/mL	0,206

Legenda: T_0 - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

O extrato 689, avaliado na concentração de 100 µg/mL, na densidade celular de 60.000 cel/poço apresentou diferença em relação ao controle T_0 , assim como a Adriamicina também apresentou diferença em relação ao controle (Tabela 5.3b). O extrato 689, avaliado na densidade celular de 100.000 cel/poço,

na concentração de 100 µg/mL, apresentou diferença em relação ao controle T₀, e a Adriamicina também apresentou diferença em relação ao controle (Gráfico 5.2I; Tabela 5.3c).

Tabela 5.3b – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com a concentração de 100 µL do extrato 689, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 60.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,470
Adriamicina	0,050
689 100 µg/mL	0,123

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Tabela 5.3c – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com a concentração de 100 µL do extrato 689, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 100.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,594
Adriamicina	0,048
689 100 µg/mL	0,073

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Quando observado o extrato 719, na concentração de 100 µg/mL, densidade celular de 27.500 cel/poço, houve diferença em relação ao controle T₀, assim como Adriamicina também apresentou diferença em relação ao controle (Tabela 5.3d).

Tabela 5.3d – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com a concentração de 100 µL do extrato 719, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 27.500 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,246
Adriamicina	0,102
719 100 µg/mL	0,028

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

O extrato 719, analisado na densidade celular de 60.000 cel/poço, para a mesma concentração de 100 µg/mL, apresentou diferença em relação ao controle T₀, assim como a Adriamicina, que também demonstrou resultados diferentes de T₀ em relação ao controle (Tabela 5.3e).

Tabela 5.3e – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com a concentração de 100 µL do extrato 719, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 60.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,469
Adriamicina	0,032
719 100 µg/mL	0,287

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

O extrato 719, avaliado na maior densidade celular, de 100.000 cel/poço, na concentração de 100 µg/mL, apresentou-se diferente em relação ao controle T₀, assim como a Adriamicina (Gráfico 5.2m; Tabela 5.3f).

Tabela 5.3f – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com a concentração de 100 µL do extrato 719, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 100.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,594
Adriamicina	0,081
719 100 µg/mL	0,235

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

O extrato 1151, nas concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL, e a Adriamicina apresentaram diferença em relação ao controle T₀, na densidade celular de 27.500 cel/poço (Tabela 5.3g).

Tabela 5.3g – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com as concentrações de 1, 10 e 100 µL do extrato 1151, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 27.500 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,246
Adriamicina	0,028
1151 100 µg/mL	0,015
1151 10 µg/mL	0,039
1151 1 µg/mL	0,144

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Na densidade celular de 60.000 cel/poço, para as concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, apresentou diferença em relação ao controle T₀ e a Adriamicina também (Tabela 5.3h).

Tabela 5.3h – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com as concentrações de 10 e 100 µL do extrato 1151, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 60.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,469
Adriamicina	0,028
1151 100 µg/mL	0,024
1151 10 µg/mL	0,139

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Na densidade celular, de 100.000 cel/poço, para as concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, apresentou diferença em relação ao controle T₀, da mesma forma que a Adriamicina (Gráfico 5.2n; Tabela 5.3i).

Tabela 5.3i – Médias de densidade óptica, obtidas por meio de teste de Tukey, com as concentrações de 10 e 100 µL do extrato 1151, referência e controle, utilizadas para avaliação da sua atividade citotóxica, na densidade celular de 100.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,594
Adriamicina	0,086
1151 100 µg/mL	0,028
1151 10 µg/mL	0,154

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

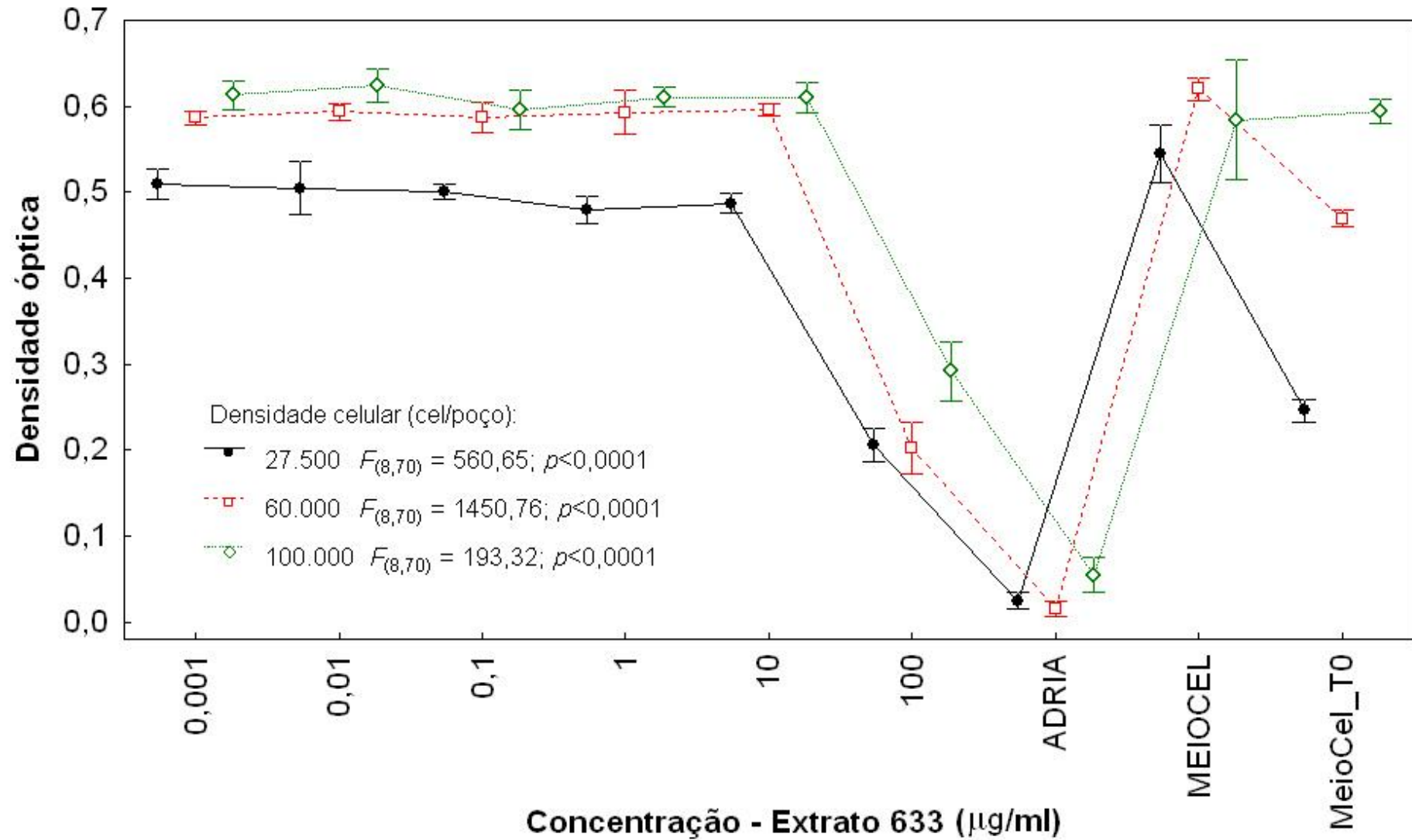


Gráfico5.2k - Ensaio 4 - Curva dose-resposta do extrato 633 (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) com as diferentes densidades, 27.500, 60.000 e 100.000 cel/poço. Para valor de significância de 5%.

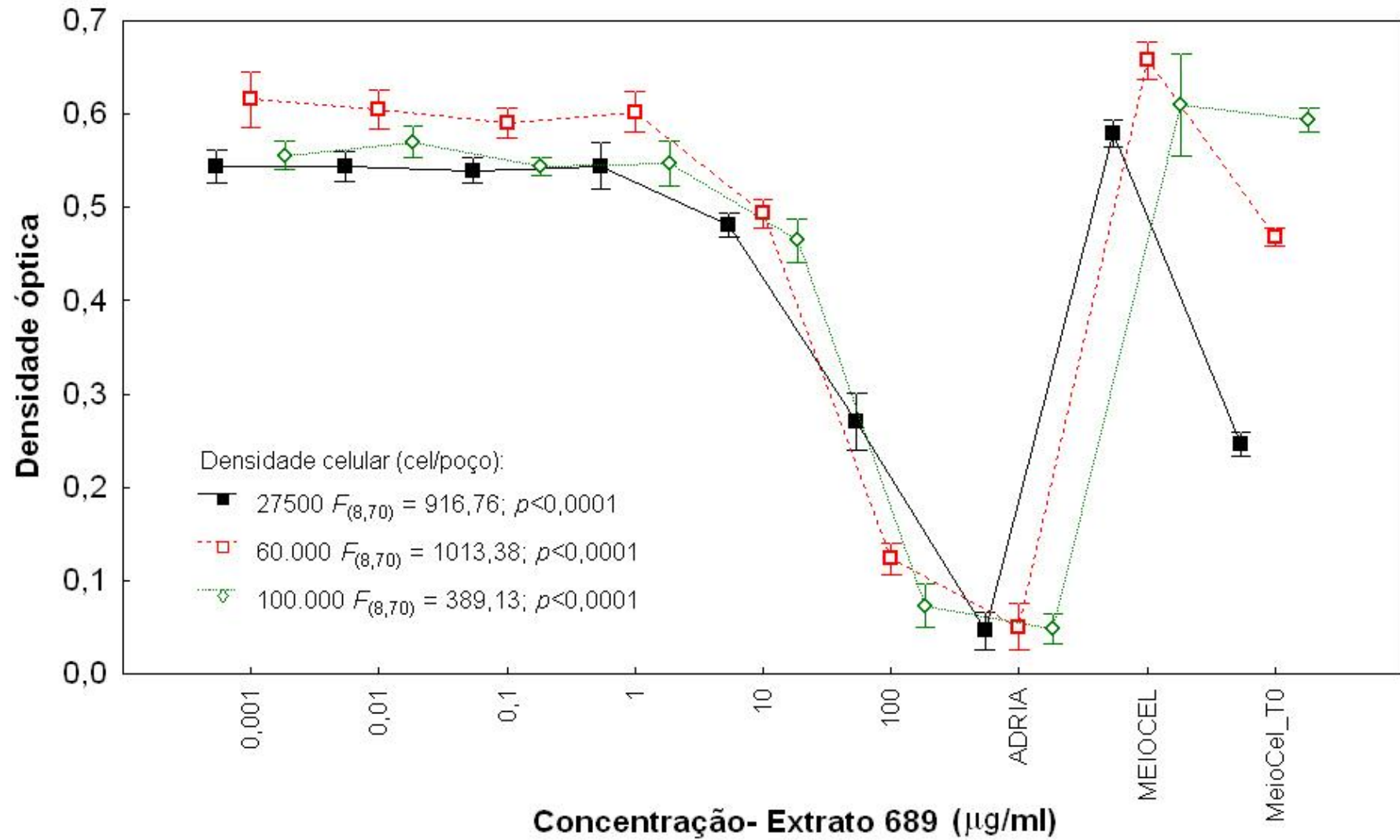


Gráfico5.21 - Curva dose-resposta do extrato 689 (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) para as três densidades celulares- 27.500, 60.000 e 100.000 cel/poço. Valor de significância de 5%.

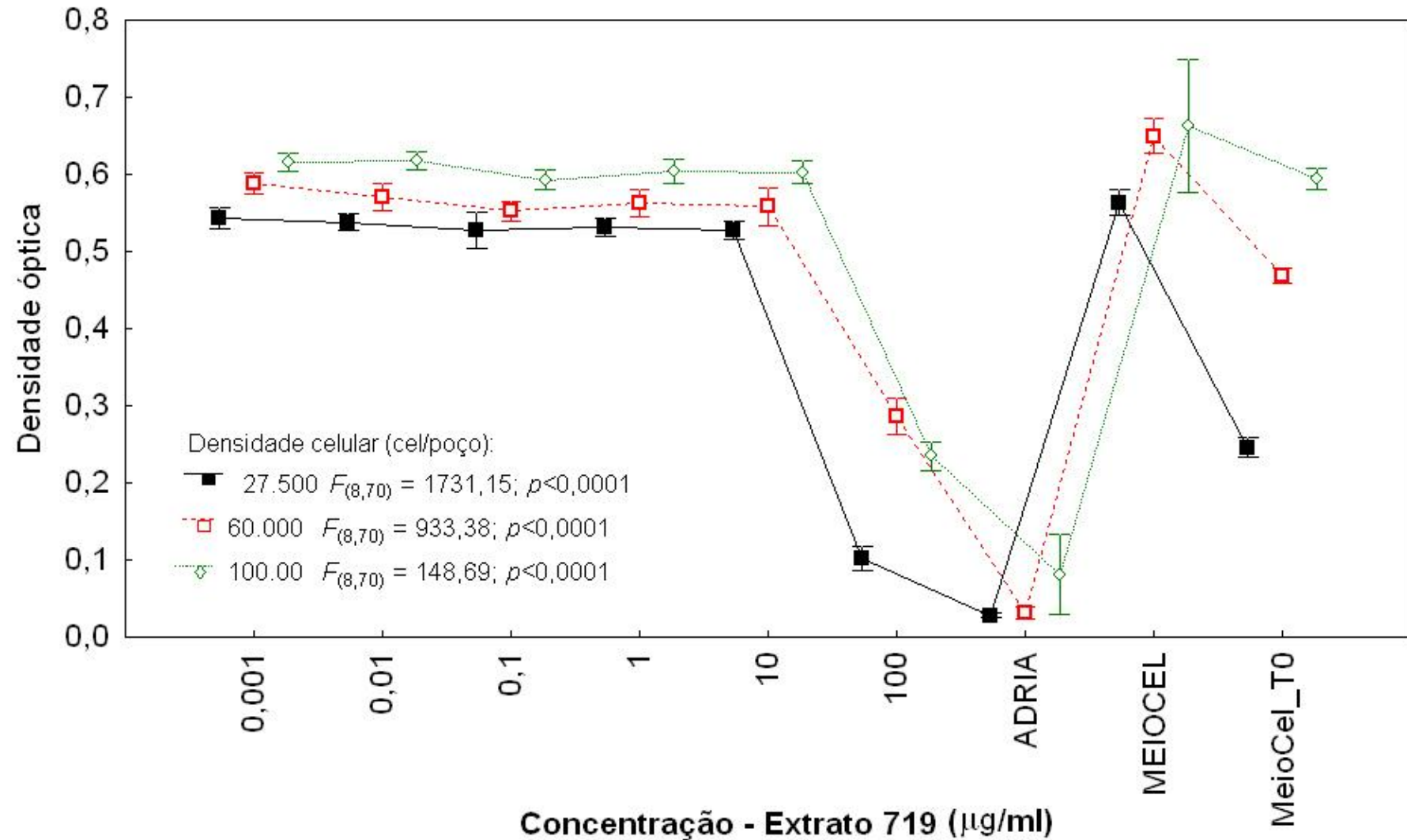


Gráfico5.2m - Curva dose-resposta do extrato 719 (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) em diferentes densidades, 27.500, 60.000 e 100.000 cel/poço. Para valor de significância de 5%.

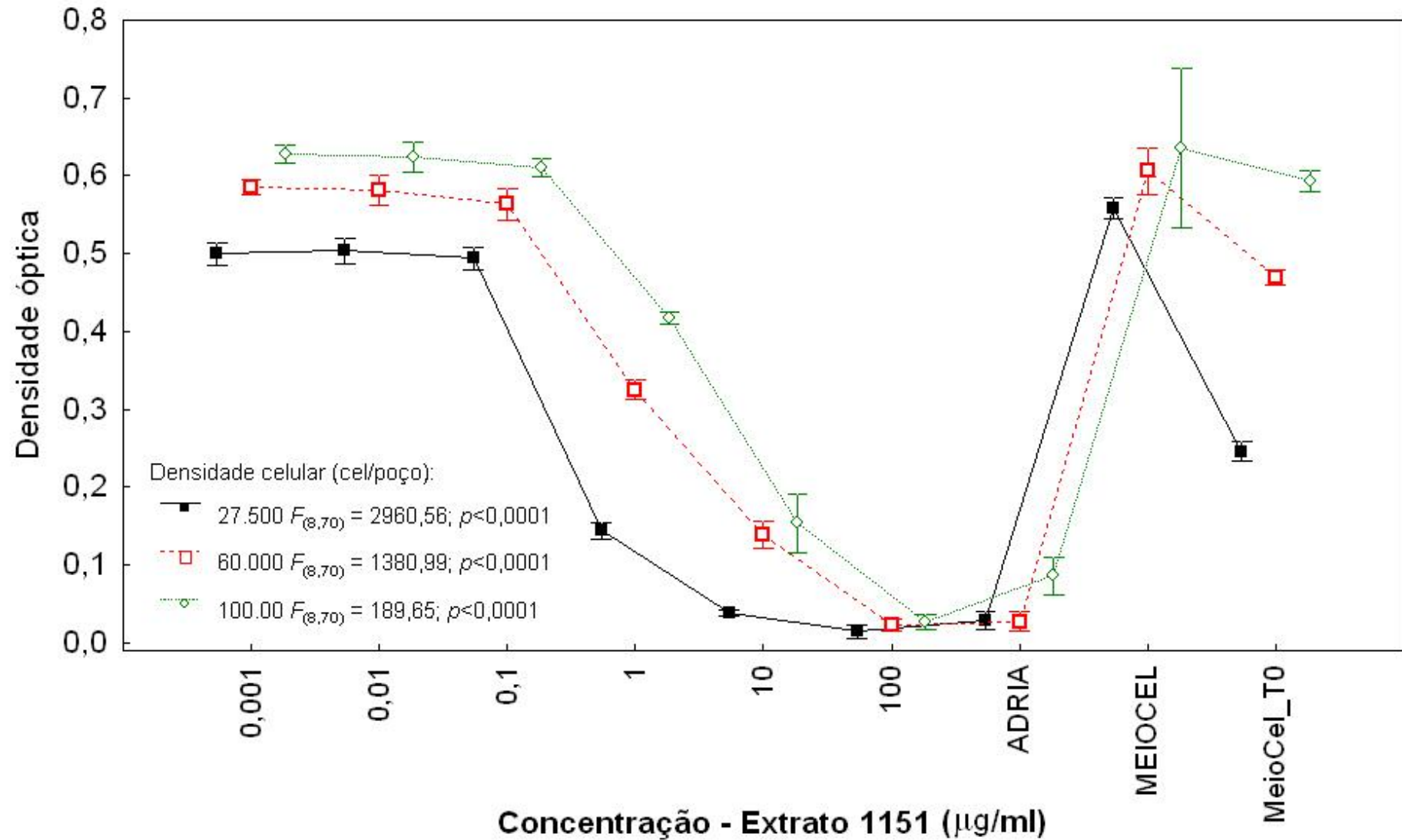


Gráfico5.2n - Curva dose-resposta do extrato 1151 (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) com diferentes concentrações, 27.500, 60.000 e 100.000 cel/poço. Onde $\alpha = 0,005$.

Foi realizada uma análise (*ANOVA One-way*) dos extratos 633, 689, 719, 1151 e da Adriamicina, nas diferentes concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL. Constatou-se que o extrato 1151 teve maior atividade que a Adriamicina na concentração de 1 µg/mL (Gráfico 5.2o).

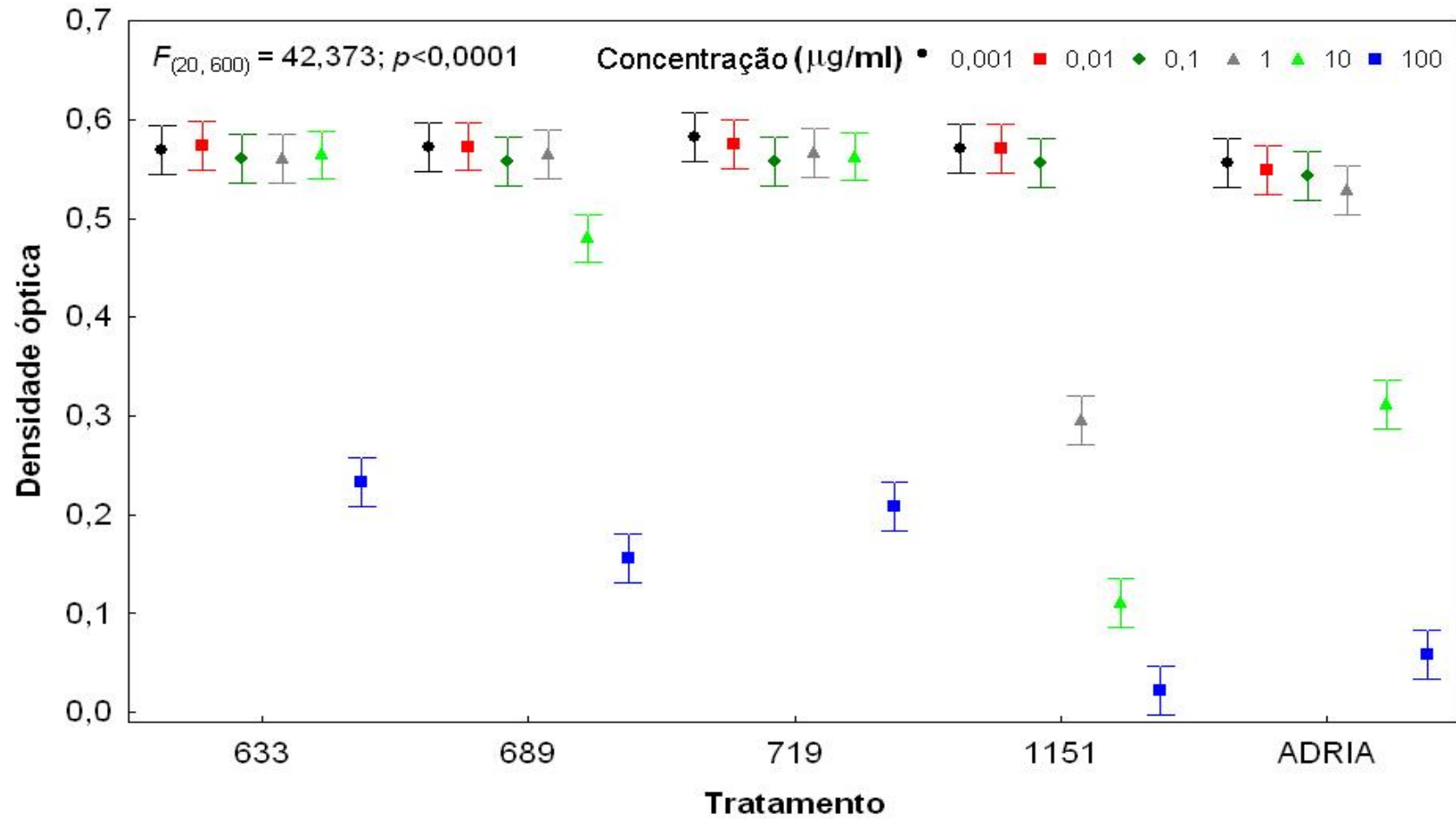


Gráfico5.2o - Análise com os extratos 633, 689, 719, 1151 e Adriamicina (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) nas densidades celulares 27.500, 60.000 e 100.000 cel/poço. Valor de significância de 5%.

5.4 Atividade Citotóxica -Triagem dos Resíduos

A triagem seguinte foi realizada com as frações obtidas a partir dos extratos 633, 689, 719 e 1151, por meio de análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*). Foi realizado um ensaio com três densidades celulares, de 27.500 células por poço, 60.000 células por poço e 100.000 células por poço, para identificação dos resíduos mais ativos. Para estes ensaios foram utilizados, além dos resíduos, substâncias padrão Adriamicina, e o controle de crescimento sem tratamento (MeioCel) e controle de crescimento em 24 horas (T_0). Resultados obtidos no ensaio com a densidade de 27.500 cel/poço, apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos e controle T_0 ($F_{(13,90)}=546,69$; $p<0,0001$). Para a densidade celular de 60.000 cel/poço, também foram obtidos resultados significativos, com diferença entre os tratamentos e os controles ($F_{(13,90)}=277,82$; $p<0,0001$). E os resultados do ensaio com a densidade de 100.000 cel/poço apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos e controle T_0 ($F_{(13,90)}=215,66$; $p<0,0001$). Três resíduos se mostraram diferentes do controle de crescimento celular sem tratamento (MeioCel), e foram selecionados para o ensaio curva dose-resposta das frações (Gráfico 5.2p).

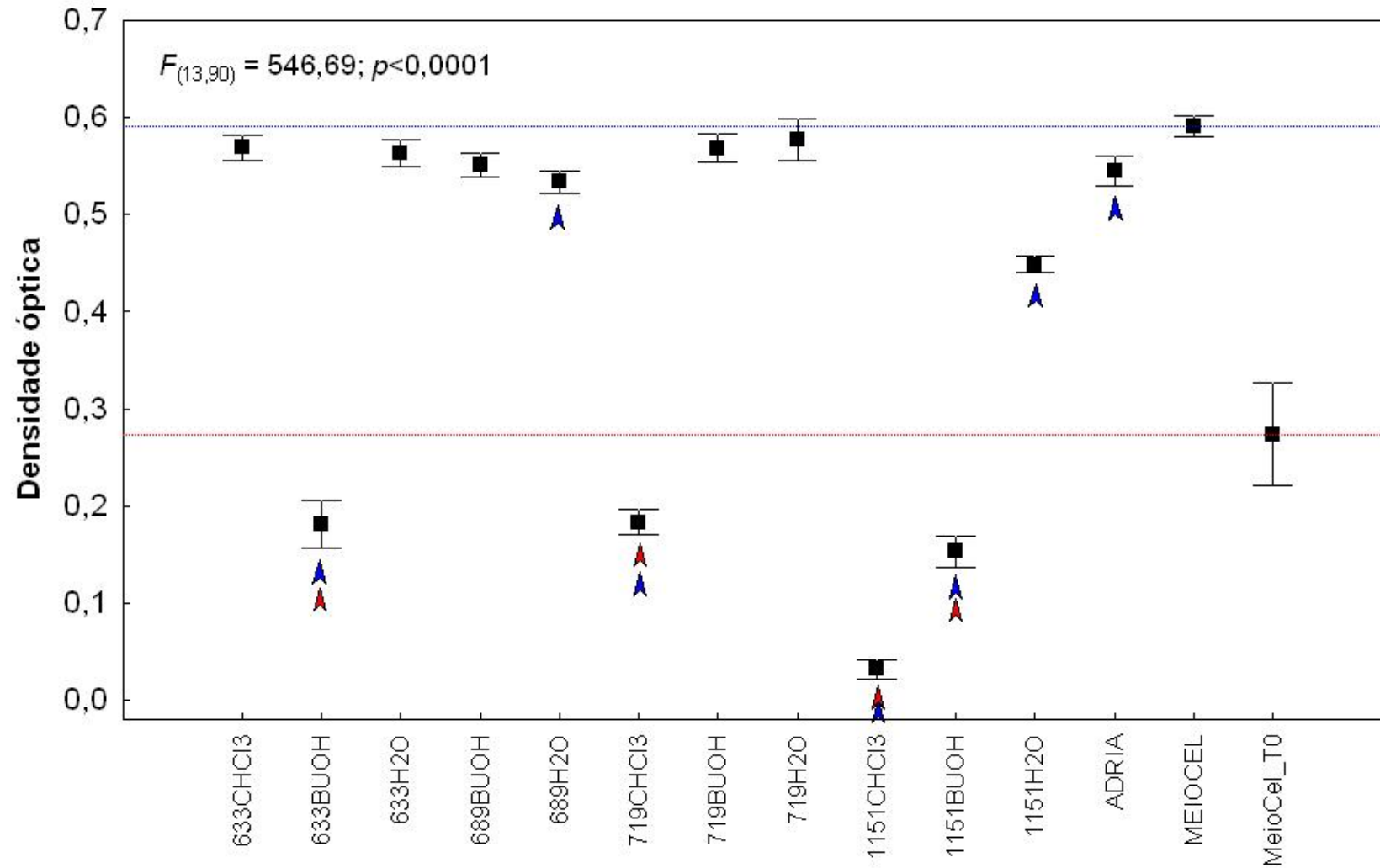


Gráfico5.2p - Ensaio 5 - Variação da densidade óptica dos resíduos dos extratos 633, 689, 719 e 1151, das referências, na densidade celular de 27.500 cel/poço (ANOVA *One-way*). Estão representados por setas os extratos e/ou referências com valores de densidade óptica inferiores aos obtidos para MeioCel (seta azul) e T₀ (seta vermelha), cujas médias estão marcadas por linhas pontilhadas, azul ou vermelha. Nível de significância de 5%.

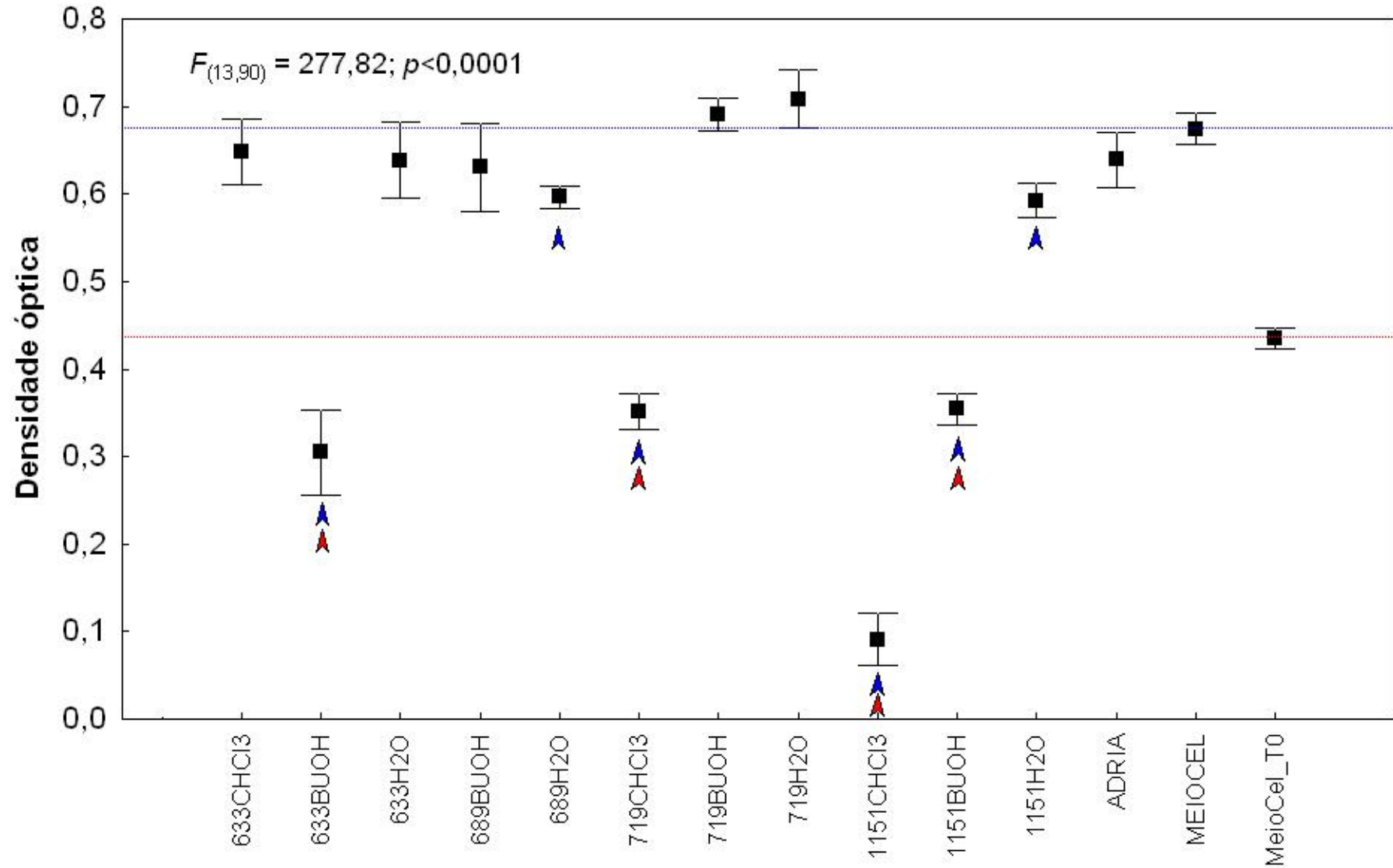


Gráfico5.2q - Ensaio 5 - Variação da densidade óptica dos resíduos dos extratos 633, 689, 719 e 1151, das referências, na densidade celular de 60.000 cel/poço (ANOVA *One-way*). Estão representados por setas os extratos e/ou referências com valores de densidade óptica inferiores aos obtidos para MeioCel (seta azul) e T₀ (seta vermelha), cujas médias estão marcadas por linhas pontilhadas, azul ou vermelha, para nível de significância de 5%.

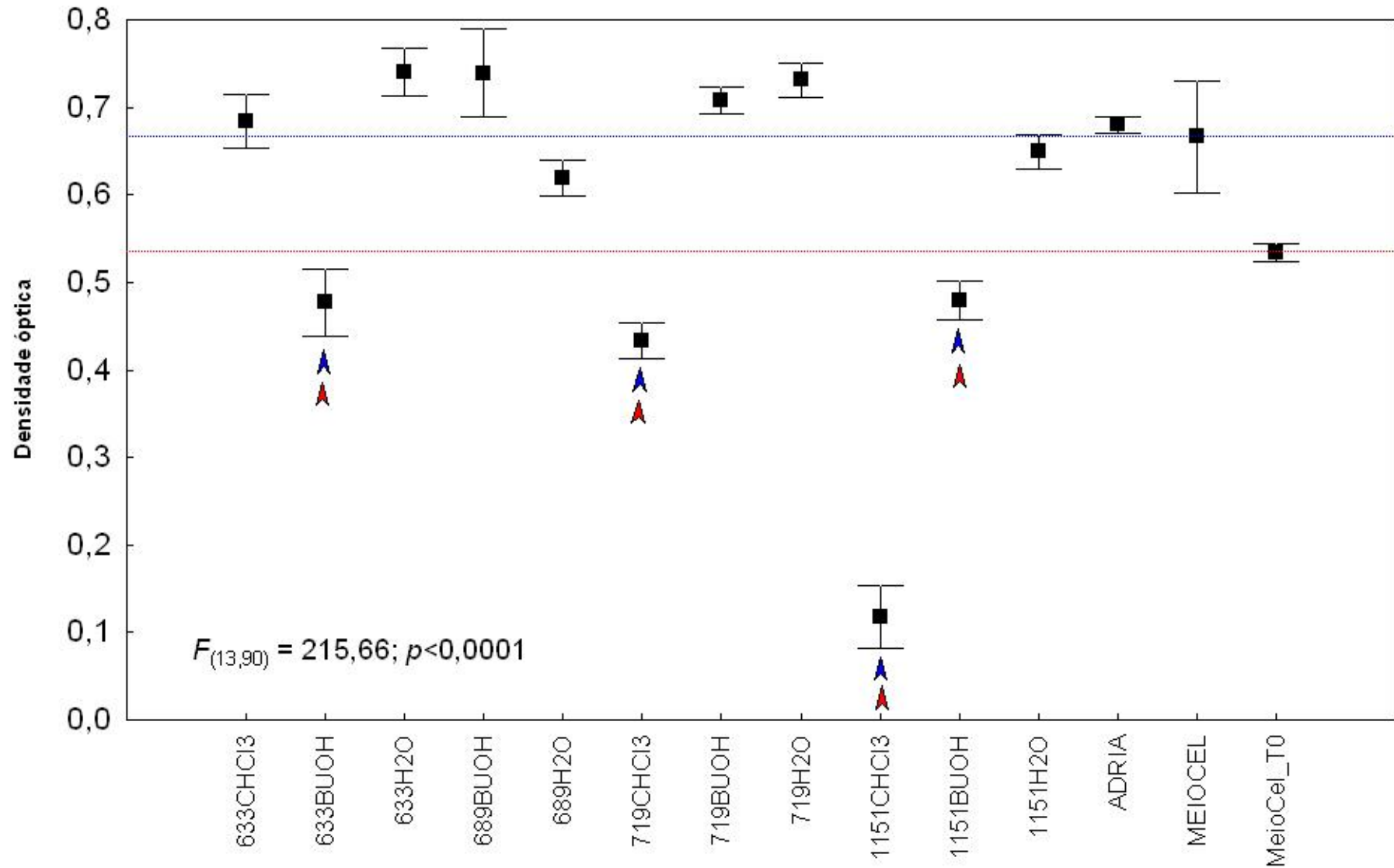


Gráfico5.2r - Ensaio 5 - Variação da densidade óptica dos resíduos dos extratos 633, 689, 719 e 1151, das referências, na densidade celular de 100.000 cel/poço (ANOVA *One-way*). Estão representados por setas os extratos e/ou referências com valores de densidade óptica inferiores aos obtidos para MeioCel (seta azul) e T₀ (seta vermelha), cujas médias estão marcadas por linhas pontilhadas, azul ou vermelha ($\alpha = 0,005$).

5.5 Atividade Citotóxica Curva Dose-resposta dos Resíduos

Com a análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*), foram analisadas as cinco concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) de cada um dos resíduos triados com maior atividade, nas concentrações de 27.500 e 60.000 cel/poço. Também foi realizada análise de Tukey, para verificar as diferenças entre as diferentes concentrações e referência.

As frações triadas com atividade positiva - 719 CHCl₃, 1151 CHCl₃ e 1151 BUOH - foram analisadas, e foi constatado que o resíduo 1151 CHCl₃ teve maior atividade, semelhante a Adriamicina nas concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL.

O extrato 719 (719 CHCl₃), nas diferentes densidades celulares, as concentrações de 10 e 100 µg/mL inibiram o crescimento celular nas densidades celulares de 27.500, porém não foram tão efetivos quanto a Adriamicina (Tabela 5.5a).

Tabela 5.5a – Médias da densidade óptica, utilizadas para avaliação da atividade do resíduo 719 CHCl₃, com as concentrações de 10 e 100 µg/mL, referência e controle, na densidade celular de 27.500 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,144
Adriamicina	0,077
719 CHCl ₃ 100 µg/mL	0,115
719 CHCl ₃ 10 µg/mL	0,304

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

O extrato 1151 (1151 BUOH), por meio de análise de Tukey, somente a concentração de 100 µg/mL foi diferente do controle T₀, com atividade menor que a Adriamicina (Tabelas 5.5b e 5.5c)

Tabela 5.5b – Médias da densidade óptica, utilizadas para avaliação da atividade da concentração de 100 µg/mL do resíduo 1151 BUOH, referência e controle, na densidade celular de 27.500 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,144
Adriamicina	0,038
1151 BUOH 100 µg/mL	0,044

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Tabela 5.5c – Médias da densidade óptica, utilizadas para avaliação da atividade da concentração de 100 µg/mL do resíduo 1151 BUOH, referência e controle, na densidade celular de 60.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,344
Adriamicina	0,163
1151 BUOH 100 µg/mL	0,238

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Com a análise do resíduo clorofórmico do extrato 1151 (1151 CHCl₃), nas duas densidades celulares, as concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL foram muito diferentes do controle T₀ na densidade celular de 27.500 cel/poço, tão efetivos quanto a Adriamicina, com resultados inferiores diferentes do T₀ (Tabela 5.5d), e na densidade de 60.000 cel/poço (Tabela 5.5e).

Tabela 5.5d – Médias da densidade óptica, utilizadas para avaliação da atividade das concentrações de , 10 e100 µg/mL do resíduo 1151 CHCl₃, referência e controle, na densidade celular de 27.500 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,144
Adriamicina	0,047
1151 CHCl ₃ 100 µg/mL	0,047
1151 CHCl ₃ 10 µg/mL	0,059
1151 CHCl ₃ 1 µg/mL	0,073

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

Tabela 5.5e – Médias da densidade óptica, utilizadas para avaliação da atividade das concentrações de , 10 e100 µg/mL do resíduo 1151 CHCl₃, referência e controle, na densidade celular de 60.000 cel/poço.

Variável	Média (Abs)
T ₀	0,344
Adriamicina	0,200
1151 CHCl ₃ 100 µg/mL	0,101
1151 CHCl ₃ 10 µg/mL	0,156
1151 CHCl ₃ 1 µg/mL	0,250

Legenda: T₀ - controle de crescimento sem tratamento em 24 horas.

Abs- Absorbância ou densidade celular.

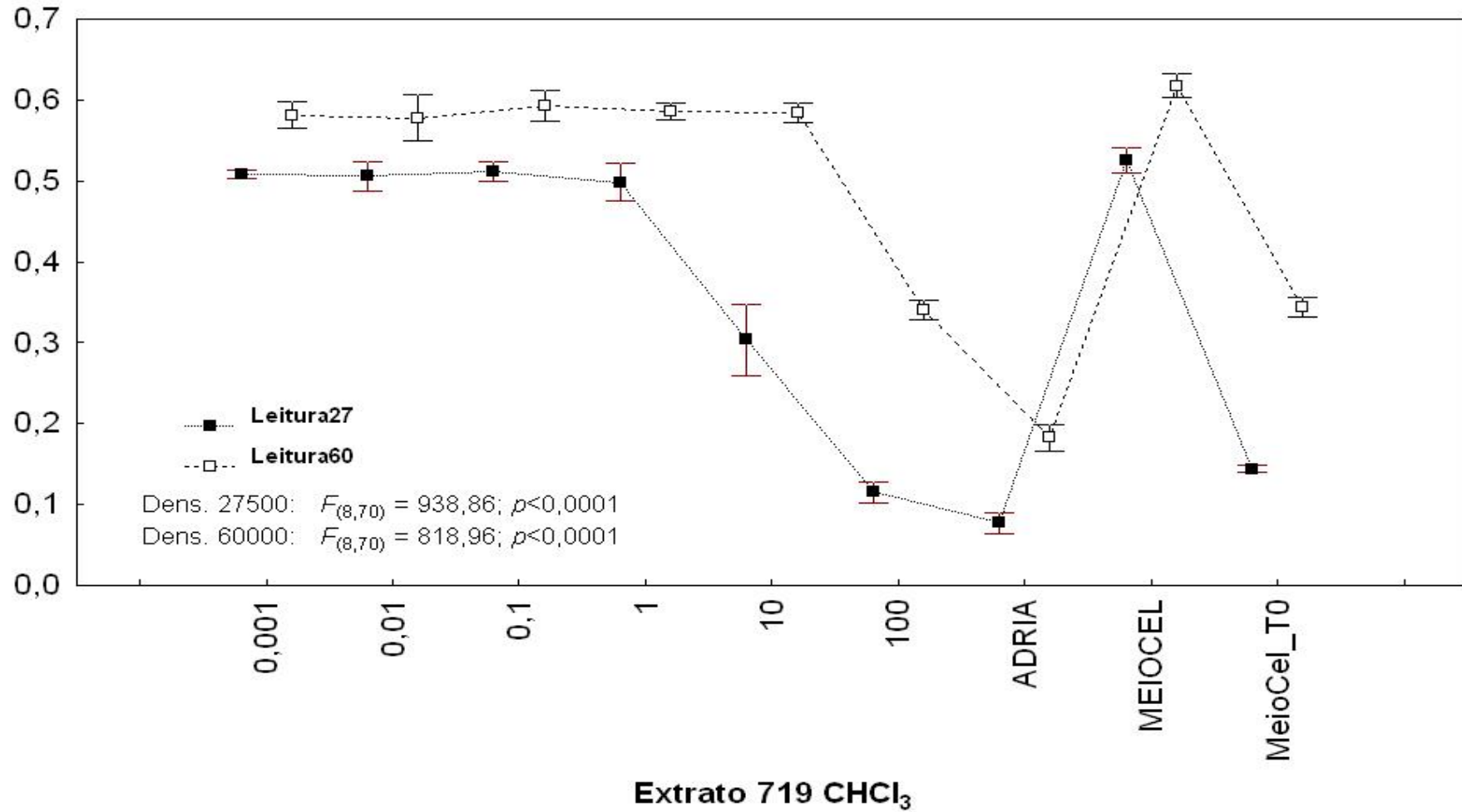


Gráfico5.2s - Análise com o resíduo clorofórmico do extrato 719, Adriamicina e controles (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) nas densidades celulares 27.500, 60.000 cel/poço.

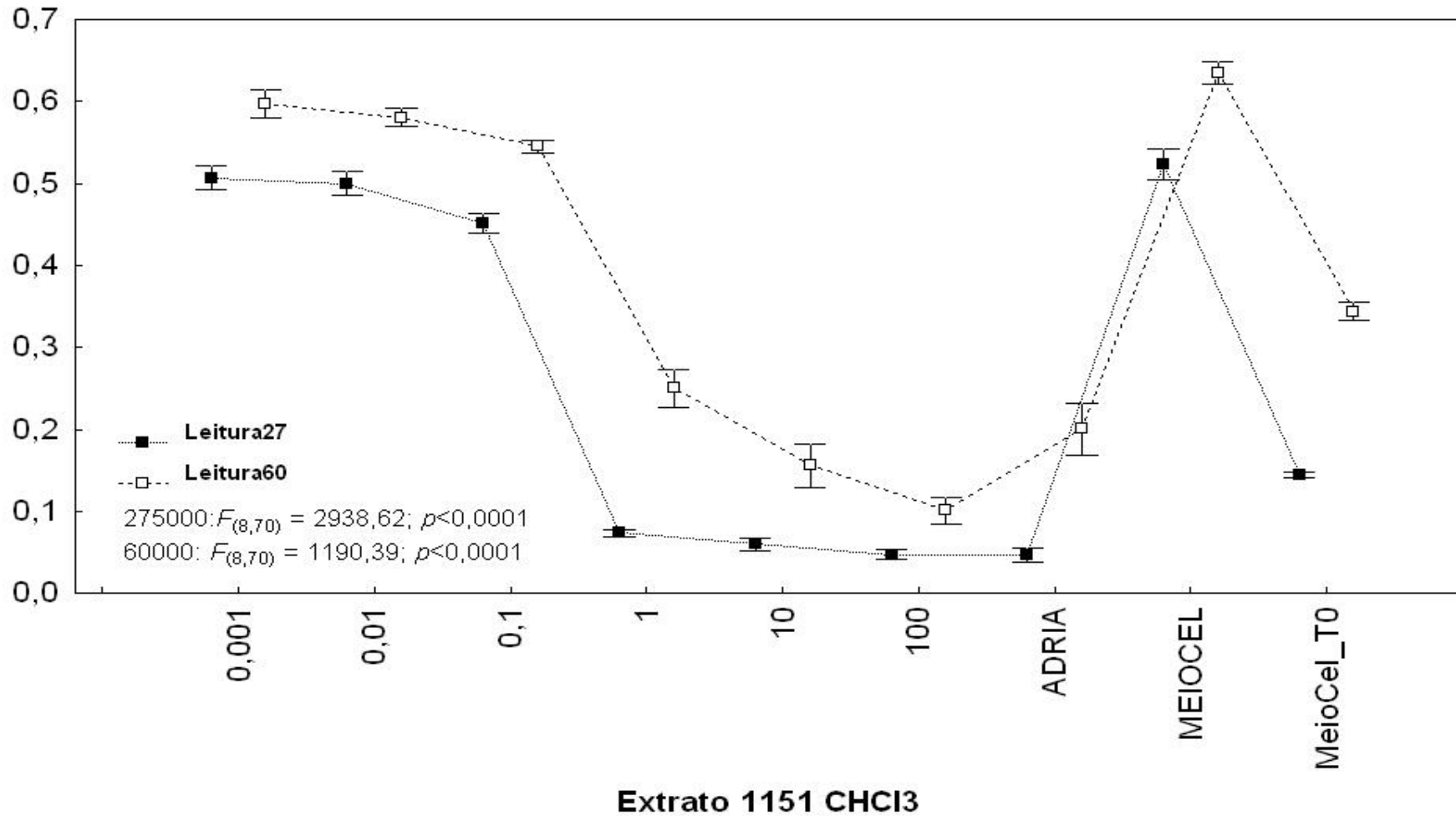


Gráfico5.2t - Análise com o resíduo clorofórmico do extrato 1151, Adriamicina e controles (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) nas densidades celulares 27.500, 60.000 cel/poço.

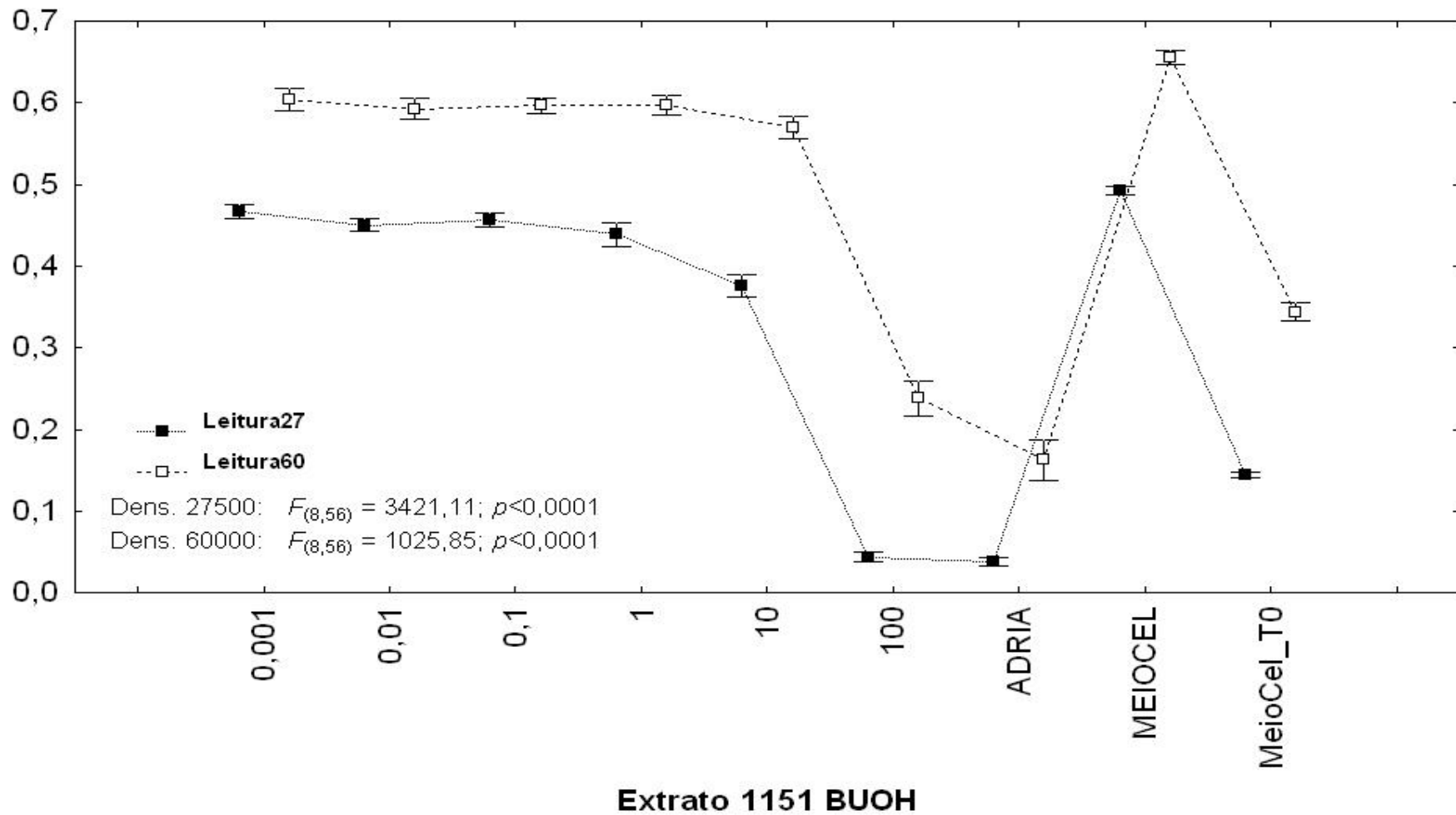


Gráfico5.2u - Análise com o resíduo butanólico do extrato 1151, Adriamicina e controles (ANOVA *One-way*), com a variação das diferentes concentrações (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL) nas densidades celulares 27.500, 60.000 cel/poço.

5.3 Cromatografia

Após análise cromatográfica foi possível observar que os extratos brutos apresentavam inúmeros compostos. Quando eluídos nas diferentes misturas foi possível observar que o extrato 633 apresentava mais compostos na mistura mais polar, e os extratos 689, 719 e 1151, na mistura de meia polaridade.

O extrato 633 apresentou maior quantidade de compostos no resíduo clorofórmico, nas três misturas.

O extrato 689 apresentou maior quantidade de compostos na fração hexânica do resíduo clorofórmico, apenas nas misturas de meia polaridade e polar.

O extrato 719, na mistura polar, apresentou inúmeros compostos em todas as frações e resíduos, exceto no resíduo aquoso. No sistema cromatográfico composto por clorofórmio e acetato de etila (1:1), foi verificada a presença de grande número de compostos em todas as frações do resíduo clorofórmico.

No extrato 1151, apenas o resíduo clorofórmico apresentou grande quantidade de compostos, em todos os sistemas de solventes.

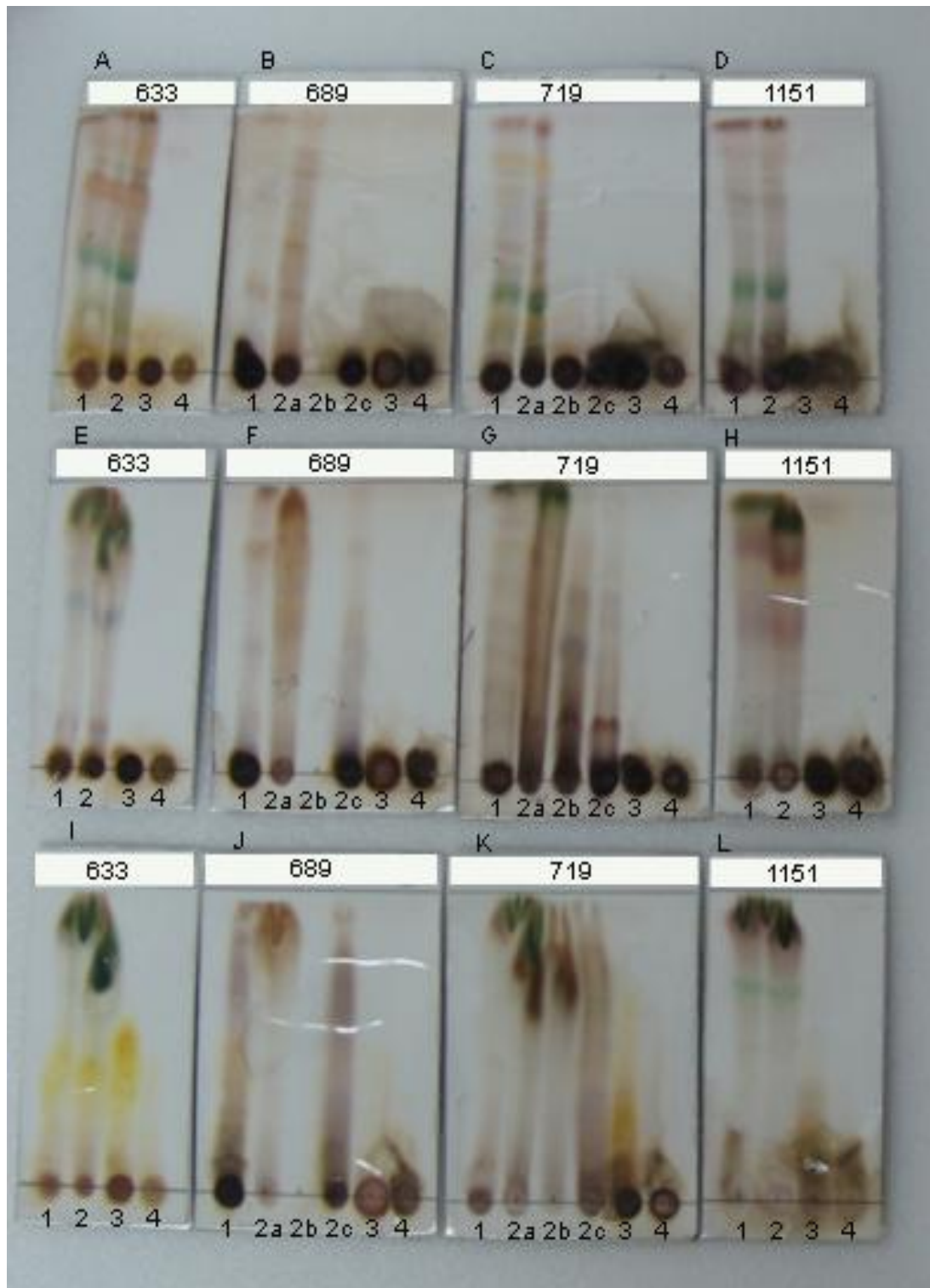


Figura 29 - Cromatofolhas dos extratos 633, 689, 719, 1151 e seus resíduos (clorofórmico, butanólico e aquoso), submetidos a diferentes sistemas cromatográficos.

Legenda: A, B, C e D extratos e resíduos eluídos na mistura de solventes hexano: acetato de etila (4:1). E, F, G e H os extratos e resíduos foram eluídos em clorofórmio: acetato de etila (1:1). I, J, K e L extratos e resíduos eluídos em clorofórmio: acetato de etila: metanol (2:2:1). 1- Extrato bruto; 2- Resíduo clorofórmico (frações 2a-hexano, 2b-diclorometano, 2c-MeOH); 3- Resíduo butanólico; 4-Resíduo aquoso.

5.4 Atividade Antioxidante

Os resíduos clorofórmicos obtidos dos extratos 719 e 1151 apresentaram manchas condizentes com uma atividade antioxidante potencial, observadas com o reativo do β -caroteno (Figura 30).

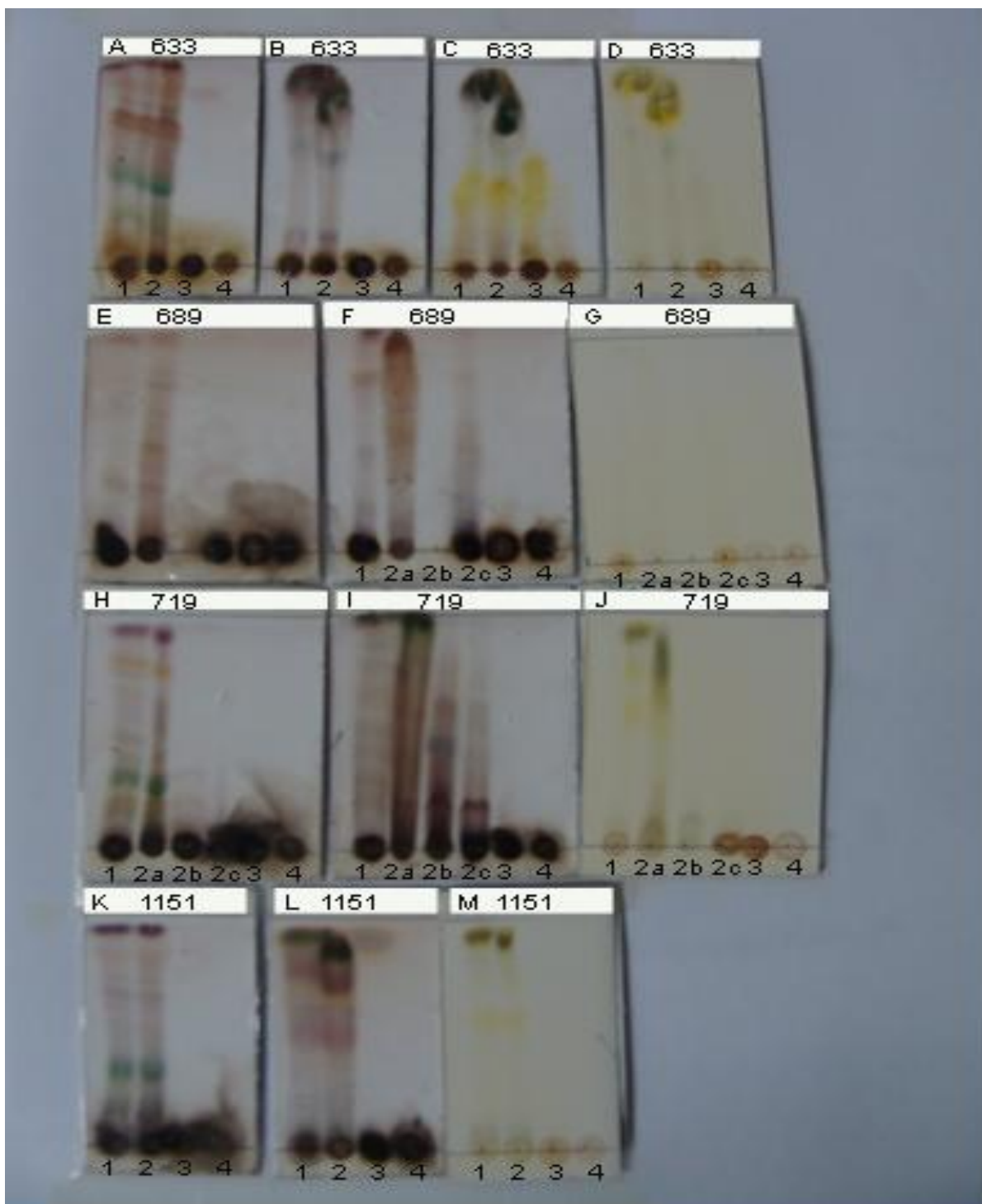


Figura 30 - Cromatografia em camada delgada, obtida para os extratos 633, 689, 719, 1151 e seus resíduos clorofórmico, butanólico e aquoso para verificação da atividade antioxidante, usando a técnica do β -caroteno.

Legenda: A, E, H e K extratos e resíduos eluídos na mistura de solventes hexano: acetato de etila (4:1). B, F, I e L os extratos e resíduos foram eluídos em clorofórmio: acetato de etila (1:1). C extrato e resíduos eluídos em clorofórmio: acetato de etila: metanol (2:2:1). D, G, J e M extratos e resíduos submetidos a análise da atividade antioxidante. 1- Extrato bruto; 2- Resíduo clorofórmico (frações 2a-hexano, 2b-diclorometano, 2c-MeOH); 3- Resíduo butanólico; 4- Resíduo aquoso.

6. DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular de boca é a principal neoplasia maligna da região de cabeça e pescoço. O tratamento geralmente é feito com ressecção cirúrgica, complementado por radioterapia. O uso de drogas quimioterápicas ainda não é totalmente definido para estas neoplasias, sendo utilizado apenas como complementares ou com poucas perspectivas de cura. Atualmente, muitos estudos tem sido realizados para a obtenção de novos tratamentos, que possam melhorar o prognóstico desses pacientes, diminuindo as conseqüências mutilantes do tratamento cirúrgico, o que leva à necessidade urgente de se introduzir novos medicamentos no mercado.

Novos medicamentos são obtidos através de síntese química ou da descoberta da ocorrência de compostos bioativos em organismos vivos, como plantas, animais e micro-organismos. Esta segunda possibilidade tem sido o maior celeiro de novos fármacos, mesmo após o advento da análise combinatória (técnica usada principalmente pela indústria farmacêutica para obtenção de milhares de novos compostos sintéticos em um curto espaço de tempo). Moléculas isoladas de organismos vivos possuem uma particularidade importante: o fato de terem sido biossintetizadas, sua estrutura espacial é mais compatível com sítios alvo localizados em organismos vivos, tanto humanos como animais. Além disso, a variedade de espécies vegetais e animais existentes fazem remeter às possibilidades de se encontrar moléculas com esqueletos diferentes, que venham a apresentar mecanismos de ação diversos daqueles observados nos fármacos já disponíveis no mercado.

O Brasil é o país que concentra o maior número de espécies animais e vegetais, sendo que 20% de todas as espécies ocorrem em seu território. O País torna-se, portanto, um potencial celeiro de novas descobertas. A conservação de florestas tropicais como as encontradas no Brasil é de fundamental importância para que a biodiversidade não diminua. Torna-se, portanto, imprescindível a pesquisa em torno da biodiversidade, que visa acumular conhecimentos relativos ao potencial farmacológico e fitoquímico das espécies vegetais que ocorrem nas florestas brasileiras. Programas de triagem em grande escala têm sido implementados na Universidade Paulista – UNIP, desde 1997. Dentro deste programa, extratos vegetais são obtidos e armazenados para serem testados em diferentes modelos biológicos (*in vitro*). A partir da identificação do extrato ativo, parte-se para a identificação do composto responsável pela atividade encontrada. Com esta filosofia, o grupo já testou mais de 2.000 extratos contra células tumorais humanas, bactérias, leveduras e alguns foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante.

A literatura relata um número crescente de informações a respeito de extratos vegetais ou de produtos naturais estudados quanto à efetividade na ação antitumoral, em particular, contra CEC de boca. Porém, estudos deste porte feitos com plantas brasileiras praticamente são inexistentes, fato que estimulou o início do presente trabalho (DAI *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2004; AGGARWAL *et al.*, 2004; DUVOIX *et al.*, 2005; RODRIGO *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2006; MALLERY *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2009).

Os 72 extratos usados na triagem da ação citotóxica contra células KB-ADL-#12, neste trabalho, foram selecionados de ensaios prévios contra outras

células tumorais humanas (SUFFREDINI *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2007a; SUFFREDINI *et al.*, 2007b) de um total de 1.220 extratos vegetais.

Conforme expresso na metodologia, previamente ao estudo da atividade citotóxica dos extratos, foram avaliadas diferentes densidades celulares, com o objetivo de encontrar a melhor densidade para realizar posteriormente a leitura óptica dos resultados.

6.1 Análise do Delineamento da Densidade Celular

Após o ensaio de validação do experimento que objetivou a determinação da densidade celular a ser empregada, foi verificado que as densidades celulares de 27.500, 60.000 e 100.000 células por poço apresentavam leitura de densidade óptica entre 0,200 e 0,800, faixa considerada satisfatória, em termos de sensibilidade do equipamento em função das necessidades experimentais, e que permite uma análise segura de variações de crescimento celular em função dos tratamentos feitos. Deste modo, a densidade celular por poço de 60.000, que apresentou atividade óptica por volta de 0,500 foi selecionada para ser usada na avaliação dos extratos mais ativos. Porém, para a triagem inicial dos 72 extratos foi decidido que uma densidade celular menor do que a de 60.000, que também tivesse leitura de atividade óptica dentro da faixa aceita, seria empregada. Deste modo, a densidade celular de 27.500 foi usada nos primeiros experimentos.

A partir da seleção dos extratos ativos usando densidade celular de 27.500, foram utilizadas as densidades celulares de 27.500, 60.000 e 100.000 células por poço para avaliar a atividade citotóxica dos extratos e seus resíduos e para a obtenção da curva dose-resposta de cada um deles. Deste modo, foi possível que diferentes concentrações de extratos ou resíduos fossem avaliados frente a diferentes concentrações celulares.

6.2 Análise dos Resultados da Atividade citotóxica

Para o ensaio 1, foram utilizados, além dos extratos, as substâncias padrão Adriamicina (ADRIA) e 5-fluoruracila (5-FU), controle de crescimento sem tratamento e o controle de crescimento em 24 horas (T_0). Os resultados obtidos no primeiro ensaio foram analisados por análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*) e apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos e controle T_0 . Para selecionar os 35 extratos com maior atividade para os ensaios seguintes, foi realizado o teste de Tukey, e os extratos que apresentaram médias inferiores ao MeioCel foram selecionados. Quanto as referências, a 5-FU apenas na maior concentração inibiu crescimento, já a Adriamicina demonstrou-se com maior atividade citotóxica em todas as concentrações. Dos 72 extratos testados, 41 se mostraram ativos, porém, dos 41 extratos, seis apresentaram contaminação microbiana e foram descartados no

decorrer de todos os ensaios. Os 35 extratos restantes foram selecionados para o ensaio seguinte.

Verificou-se que muitos extratos aquosos apresentaram uma atividade citotóxica extremamente representativa. Ao observar mais detalhadamente, foi verificado que estes extratos apresentaram crescimento fúngico nas microplacas, o que possivelmente influenciou nos resultados de citotoxicidade. Para verificar quanto os extratos contaminados inibiram o crescimento celular em comparação aos extratos que não apresentaram contaminação, observou-se que a atividade geral dos extratos contaminados em relação à atividade geral dos extratos não contaminados, apresentou diferença significativa tanto no ensaio com densidade celular de 27.500 células por poço como no ensaio com densidade celular de 60.000 células por poço, o que induziria os resultados a falsos positivos (Gráfico 5.2j). Devido a este fator, os extratos contaminados foram descartados.

O segundo ensaio foi feito com os 35 extratos restantes para verificar a tendência de inibição dos extratos selecionados no ensaio 1, nas concentrações de 27.500 e 60.000 cel/poço. A partir dos resultados dos ensaios 1 e 2, os extratos que demonstraram maior tendência à inibição foram submetidos à avaliação de crescimento microbiano, a fim de se garantir que a atividade citotóxica observada nestes extratos estava efetivamente relacionada apenas aos extratos, e não a possíveis contaminações. Foi verificado que dos 20 extratos com maior atividade, dois apresentaram crescimento microbiano e foram descartados. Análise de variância de um fator (ANOVA One-way) foi realizada, e verificamos que 18 extratos inibiram o crescimento, ou seja, apresentaram diferenças significantes em relação ao controle de crescimento

sem tratamento. Para esta análise foi utilizada, como critério eliminatório, a resposta observada nos ensaios com as duas densidades celulares.

Os 18 extratos selecionados foram ensaiados novamente, juntamente com Adriamicina e frente ao controle T_0 , na menor densidade celular. Diferenças significantes entre nove extratos e os controles foram encontradas, em relação ao MeioCel. Destes nove extratos, quatro apresentaram forte tendência à inibição, verificada por meio de comparação entre as médias dos controles MeioCel e T_0 e a média dos quatro extratos (Gráfico 5.2d). Para refinar a escolha dos extratos de modo ainda mais rigoroso, foi utilizado o ensaio com densidade celular de 60.000, no qual foi possível observar a mesma tendência à inibição destes quatro extratos, verificada por meio de comparação entre as médias dos controles MeioCel e T_0 e a média dos quatro extratos (Gráfico 5.2e). Deste modo, foram selecionados os extratos 633, 689, 719 e 1151, obtidos de *Laetia suaveolens* (*Salicaceae*, extrato número 719), *Picrolemma sprucei* (*Simaroubaceae*, extrato número 1151) e *Abarema auriculata* (*Fabaceae*, extratos número 633 e 689).

Por meio do método de análise de variância de dois fatores (*ANOVA Two-way*) foi possível verificar a influência da análise dos 18 extratos em três dias diferentes, para a densidade celular de 27.500 cel/poço. Observou-se que houve uma diferença significativa no resultado dos extratos, em particular, observada no ensaio do 2º dia, tanto para a densidade celular de 27.500 células por poço (Gráfico 5.f) como para a densidade celular 60.000 células por poço. Foram detectadas diferenças entre todos os fatores considerados na análise. Assim, houve diferença entre o primeiro fator, caracterizado pelos dias de experimento ou “ensaios”, entre o segundo fator, “tratamentos + controles” e, por fim, entre a

interação desses dois fatores (Gráfico 5.g). Considerando-se os valores brutos de atividade óptica dos 18 grupos de tratamento dos três ensaios, vistos nos gráficos 5.2h e 5.2i, fica evidente que o ensaio 2 apresenta uma diferença significativa entre os resultados, em relação aos outros dois ensaios. O teste de Tukey permitiu verificar que nove extratos vegetais apresentaram valores de densidade óptica inferiores ao controle T_0 e que a diferença verificada para os ensaios deveu-se aos maiores valores de densidade óptica obtidos no dia 2 (Ensaio2).

Para avaliar o comportamento da eficácia dos 18 extratos ao longo dos dois ensaios (2 e 3) realizados para a densidade celular de 60.000 cel/poço, recorreu-se *ANOVA Two-way*, considerando-se os “ensaios” e “tratamentos+controles” como os dois fatores da análise. Tal análise permitiu avaliar a “influência do dia” sobre o experimento, ou seja, a influência do erro experimental associado ao dia em que fora realizado o experimento. Foram detectadas diferenças entre todos os fatores considerados na análise. Assim, houve diferença entre o primeiro fator, “tratamentos + controles”, entre o segundo fator, caracterizado pelos dias de experimento ou “ensaios” e, por fim, entre a interação desses dois fatores, demonstrando que diferenças entre um determinado tratamento (incluindo-se aqui os controles) sofrem influência do dia de experimento (Gráfico 5.h). O teste de Tukey permitiu verificar que 10 extratos vegetais apresentaram valores de densidade óptica inferiores ao controle T_0 e que a diferença verificada para os ensaios deveu-se aos maiores valores de densidade óptica obtidos no dia 2 (Ensaio2).

Foram avaliadas seis concentrações de cada um dos quatro extratos com maior atividade citotóxica (633, 689, 719 e 1151), nas densidades celulares de

27.500 e 60.000 e 100.000 cel/poço. O estudo analisou pelo método de análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*), seguida de teste Tukey, para verificar as diferenças entre as diferentes concentrações e referência. No teste de Tukey, avaliando-se as diferentes concentrações do extrato 633 e diferentes densidades celulares, apenas a concentração de 100 µg/mL foi diferente do controle T_0 na densidade celular de 27.500 cel/poço.

No teste de Tukey realizado para o extrato 689 levou-se em consideração as diferentes concentrações do extrato e diferentes densidades celulares. Somente na maior concentração, de 100 µg/mL, na densidade celular de 60.000 cel/poço, observou-se diferença em relação ao controle T_0 , quando inibiu o crescimento celular da mesma forma que a Adriamicina, embora a Adriamicina esteja mais diluída do que os extratos. Na mesma concentração de 100 µg/mL, testada na densidade celular de 100.000 cel/poço, o extrato apresentou diferença em relação ao controle T_0 , inibindo o crescimento da mesma forma que a Adriamicina. Constatou-se que em maiores densidades celulares, a mesma concentração de 100 µg/mL, apresentou maior inibição de crescimento celular.

O mesmo teste foi usado para avaliar os dados obtidos no ensaio com o extrato 719, com as diferentes concentrações deste extrato. Observou-se que somente na maior concentração, de 100 µg/mL, na densidade celular de 27.500 cel/poço, houve diferença em relação ao controle T_0 , porém, de modo não tão eficaz quanto a Adriamicina. No ensaio realizado com densidade celular de 60.000 cel/poço, a mesma concentração de extrato de 100 µg/mL apresentou diferença em relação ao controle T_0 , inibindo o crescimento celular, porém, não tão eficaz quanto a Adriamicina. No ensaio feito com a maior densidade celular, de 100.000 cel/poço, a concentração de 100 µg/mL apresentou diferença em

relação ao controle T_0 , inibindo o crescimento, porém, não tão eficaz quanto a Adriamicina. Observamos que a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ inibiu de modo mais eficaz o crescimento na maior densidade e um pouco menos na densidade menor.

O extrato 1151 foi testado do mesmo modo para a obtenção da curva dose-resposta. Foi observado que o extrato apresentou diferenças em relação ao controle T_0 nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, na densidade celular de 27.500 cel/poço, inibindo o crescimento celular e, na maior concentração foi tão eficaz quanto a Adriamicina. No ensaio com densidade celular de 60.000 cel/poço foi observada diferença em relação ao controle T_0 para as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, inibindo o crescimento, sendo tão eficaz quanto a Adriamicina na maior concentração ($p=1,000$). Já no ensaio feito com a maior densidade celular, de 100.000 cel/poço, observou-se que para as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, houve diferença em relação ao controle T_0 , que inibiu o crescimento da mesma forma que a Adriamicina. Essas análises realizadas com o extrato 1151 comprovam a forte atividade citotóxica deste extrato, semelhante a Adriamicina, em todas as densidades celulares.

Por meio da análise comparativa entre os valores obtidos do ensaio para a obtenção da relação dose-resposta dos quatro extratos mais ativos: 633, 689, 719, 1151 e da Adriamicina, foi possível constatar que o extrato 1151 teve maior atividade que a Adriamicina na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Este fato é um excelente resultado, tendo em vista que estamos avaliando o extrato bruto 1151 em relação a uma substância isolada (Adriamicina).

Os extratos ativos foram submetidos ao processo de partição líquido-líquido. Deste processo foram originados três resíduos de cada extrato: um

clorofórmico, um butanólico e um aquoso, que possuem diferentes polaridades. O resíduo clorofórmico concentra substâncias de baixa polaridade, enquanto o resíduo butanólico concentra substâncias de polaridade intermediária e o resíduo aquoso, as substâncias de maior polaridade.

Estes resíduos foram testados no modelo biológico usando densidades celulares de 27.500 e 60.000 células por poço. Os resultados mostram que o resíduo clorofórmico originado do extrato 719 e os resíduos clorofórmico e butanólico originados do extrato 1151 apresentaram atividade contra as células nas duas densidades celulares.

Por meio da cromatografia em camada delgada, os resíduos e seus extratos brutos foram avaliados, qualitativamente, verificou-se a eficácia do processo de separação, em termos de número de manchas apresentado pelas diferentes amostras. O processo de separação sugerido apresentou-se eficaz em relação à separação dos compostos por polaridade. Este resultado pode ser evidentemente observado em função das respostas biológicas observadas, por meio de análise (*ANOVA One-way*), com os 12 tratamentos (resíduos dos extratos ativos e Adriamicina) e dois controles (MeioCel e T_0), nas concentrações de 27.500, 60.000 e 100.000 cel/poço.

Quando os quatro extratos selecionados foram retestados em curva dose-resposta, os extratos 633 e 689 não apresentaram mais forte tendência à inibição de crescimento celular. Dessa maneira, os extratos 719 e 1151 foram eleitos com maior capacidade de inibição de crescimento, assim como os seus resíduos.

Os resultados obtidos na triagem dos resíduos, pelo método “análise de variância de um fator” (*ANOVA One-way*), apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos e o controle (Gráfico 5.2q). Destes resultados, três resíduos foram selecionados, os resíduos 719 CHCl₃, 11511 CHCl₃ e 1151 BUOH e o resíduo 633 BUOH, que também apresentou atividade, não foi submetido à curva dose-resposta, devido a perda de atividade do extrato bruto 633.

Os resultados apontam que levando em consideração as diferentes concentrações do resíduo clorofórmico do extrato 719 (719 CHCl₃), nas diferentes densidades celulares, as concentrações de 10 e 100 µg/mL inibiram o crescimento celular, porém não foram tão efetivos quanto a Adriamicina. Já com a densidade de 60.000 cel/poço nenhuma concentração deste resíduo foi capaz de inibir o crescimento celular.

Quando avaliadas as diferentes concentrações do resíduo butanólico do extrato 1151 (1151 BUOH), por meio de análise de Tukey, somente a concentração de 100 µg/mL foi diferente do controle T₀, com atividade menor que a Adriamicina, entretanto, na densidade de 60.000 cel/poço nenhuma concentração foi diferente do T₀. Com esses resultados foi possível concluir que o resíduo butanólico do extrato 1151 inibiu o crescimento celular apenas na sua maior concentração (27.500 cel/poço), e com menor intensidade que a Adriamicina.

Com a análise do resíduo clorofórmico do extrato 1151 (1151 CHCl₃), verificamos que as concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL foram muito diferentes do controle T₀ na densidade celular de 27.500 cel/poço, tão efetivos quanto a Adriamicina, com resultados inferiores diferentes do T₀. Com a densidade de

60.000 cel/poço o mesmo resíduo apresentou maior inibição que a droga de referência nas duas maiores concentrações. Dessa forma, foi possível constatar que o resíduo clorofórmico do extrato 1151 inibiu o crescimento celular da mesma forma que a Adriamicina, independentemente da densidade celular.

O objetivo do presente trabalho não foi chegar ao isolamento dos compostos majoritários de cada extrato, nem fazer uma avaliação mais abrangente das possíveis classes químicas presentes em cada extrato ou resíduo, uma vez que primeiramente deveria ser realizada a triagem dos 72 extratos. Os próximos passos devem ser o fracionamento completo dos extratos com maior atividade, até a obtenção de compostos majoritários, que serão realizados em estudos futuros.

Diante dos resultados favoráveis dos extratos 719 e 1151, buscamos na literatura informações das atividades biológicas ou farmacológicas observadas para as espécies pertencentes aos mesmos grupos botânicos.

O extrato 719 foi obtido das folhas e caule de *Laetia suaveolens*, planta pertencente a família das *Salicaceae*. Antigamente, esta espécie era considerada uma *Flacourtiaceae*. A revisão da literatura feita para *Laetia* aponta poucos estudos divulgados para o gênero, em termos fitoquímicos e/ou farmacológicos. Henry *et al.*, em 2006, relataram compostos isolados das folhas de *Laetia thamnina*, os quais apresentaram atividade contra células de tumor de próstata, embora tivessem sido testados contra células de cólon e de mama também. Estudos realizados com *Laetia procera* também evidenciaram a presença de diterpenos, que apresentaram atividade contra células de tumor de mama (JULLIAN *et al.*, 2005).

O extrato 1151 foi obtido dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*, pertencente à família das *Simaroubaceae*. Foram encontrados dois trabalhos realizados com extratos oriundos desta espécie. Silva *et al.*, em 2009, isolaram quassinósídeos e derivados semissintéticos e os testaram contra células tumorais humanas *in vitro*, apresentando forte atividade contra a linhagem leucêmica HL-60. Em termos da família *Simaroubaceae*, muitas espécies já foram estudadas e relatadas por Mi *et al.* (2005). Neste artigo, os autores avaliaram novos compostos isolados e ativos contra modelos de citotoxicidade contra células tumorais humanas *in vitro* e contra o modelo de fibras *in vivo*, usando células KB, observando atividade inibitória de crescimento. Trabalhos posteriores feitos com a mesma espécie usada por Mi *et al.* (2005), *Alvaradoa haitiensis*, relataram avaliações positivas de citotoxicidade *in vitro* contra células de tumor murinas (PHIFER *et al.*, 2007). Estudos feitos por Rivero-Cruz *et al.* (2005) apontaram muitos compostos isolados de *Simarouba glauca*, por meio de fracionamento, sendo os compostos pertencentes às classes de alcaloides, triterpenoides, cumarinas e triglicerídeos mais ativos contra células de carcinoma epidermoide de boca (KB).

Concluindo, destacamos os resultados obtidos no presente estudo, revelando intensa atividade citotóxica dos extratos 719 e 1151, fato que abre perspectivas promissoras para novos projetos com o intuito de realizar o isolamento biomonitorado dos compostos ativos presentes nestes extratos.

As próximas etapas do grupo de pesquisas incluem o isolamento dos compostos ativos e avaliação do potencial citotóxico de cada substância, passando para modelos experimentais *in vivo*, com o objetivo, talvez audacioso,

de no futuro não muito distante, obter-se novos medicamentos com maior ação antineoplásica.

7. CONCLUSÕES

1- Dos 72 extratos triados contra a linhagem KB-ADL#12 de carcinoma espinocelular de boca, os extratos 633, 689 e 719 e 1151 apresentaram maior atividade citotóxica e foram estudados detalhadamente. Dentre esses, os extratos 719 (*Laetia suaveolens*) 1151 (*Picrolemma sprucei*) demonstraram intensa atividade citotóxica mesmo em baixas concentrações. O extrato 1151 apresentou atividade citotóxica superior ao da droga de referência (Adriamicina).

2- Foram obtidos resíduos clorofórmicos, butanólicos e aquosos dos extratos ativos, dos quais os resíduos 719 CHCl₃, 1151 CHCl₃ e 1151 BUOH apresentaram importante atividade citotóxica contra a linhagem KB de boca.

3- Após a obtenção da curva dose-resposta dos extratos ativos, o extrato 1151, assim como seu resíduo clorofórmico, resultaram na maior atividade nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL, significativamente citotóxicas.

4- Os extratos 719 e 1151 demonstraram atividade antioxidante, assim como suas frações mais apolares.

5- A análise cromatográfica mostrou que os extratos e resíduos com maior tendência à inibição de crescimento possuem grande quantidade de

compostos, que necessitam estudos subseqüentes para auxiliar o fracionamento até a obtenção do composto ativo de cada extrato.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.E.V.; SILVA, J.L.F. **Teleterapia**. In: Parise, O. Câncer de Boca: Aspectos Básicos e Terapêuticos. São Paulo: Sarvier, 2000. cap.21, p.153-9.
- ANDRADE-NETO, V.F. *et al.* ***In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants.*** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(3):359-65.
- AGGARWAL, S. *et al.* ***Inhibition Of Growth And Survival Of Human Head And Neck Squamous Cell Carcinoma Cells By Curcumin Via Modulation Of Nuclear Factor-Kb Signaling.*** Int J Cancer. 2004; 111: 679-692.
- ALKUREISHI, L.W.T; BREE, R.; ROSS, G. L. ***RADPLAT: An Alternative to Surgery?*** The Onologist. 2006;11:469-480.
- BESTOSO, F. *et al.* ***In vitro cell cultures obtained from different explants of Corylus avellana produce Taxol and taxanes.*** BMC Biotechnol. 2006; 6(6):45.
- BILDE, A. *et al.* ***Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas.*** J Oral Pathol Med. 2009; 38: 72–78.
- BRIZEL, D.M. *et al.* ***Hyperfractionated Irradiation With Or Without Concurrent Chemotherapy For Locally Advanced Head And Neck Cancer.*** N Engl J Med. 1998; 338:1798-1804.
- BRUMINI, R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos (1976-1980).** Ministério da Saúde. 1982.
- CAPOTE, A. *et al.* ***Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma - does it influence recurrence and survival?*** Head and Neck. 2007; 29:3-11.
- CARNEIRO, C.S. *et al.* ***Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) methanolic extract reduces angiogenesis in mice.*** Experimental and Toxicologic Pathology. 2007; 58: 427-431.
- CHANG, J.Y. *et al.* ***Salvinal, a Novel Microtubule Inhibitor Isolated from Salvia miltiorrhizae Bunge (Danshen), with Antimitotic Activity in Multidrug-Sensitive and -Resistant Human Tumor Cells.*** Mol. Pharmacol. 2004; 65: 77-84.
- CHEN, H. *et al.* ***L1EPO, a Novel Podophyllotoxin Derivative Overcomes P Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in K562/A02 Cell Line.*** Biol Pharm Bull. 2009; 32(4):609-613.
- CHEN, H.S. *et al.* ***Clinical study on treatment of patients with upper digestive tract malignant tumors of middle and late stage with Ginkgo biloba exocarp polysaccharides capsule preparation.*** Zhong Xi Yi Ji He Xue Bao. 2003; 1(3):189-91.
- COZZOLINO, R. *et al.* ***Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumor cells via caspase-mediated induction of apoptosis.*** Carcinogenesis. 2005; 26(4):733-9.

- DAI, S.J. *et al.* **Four New neo-Clerodane Diterpenoid Alkaloids from *Scutellaria barbata* with Cytotoxic Activities.** *Chem Pharm Bull.* 2006; 54(6):869-872.
- DAI, S.J. *et al.* **New neo-Clerodane Diterpenoid Alkaloids from *Scutellaria barbata* with Cytotoxic Activities.** *Chem Pharm Bull.* 2008; 56(2): 207-209.
- DANTAS, D.D.L. *et al.* **Clinical-Pathological Parameters in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue.** *Braz Dent J.* 2003; 12(1):22-25.
- DAVIES, L.; WELCH, H.G. **Epidemiology of head and neck cancer in the United States.** *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 135(3):451-7.
- DEDIVITIS, R.A. *et al.* **Características clínicoepidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe.** *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2004; 70(1): 35-40.
- DIB, L.L. *et al.* **Determinantes de sobrevida em câncer de boca: fatores sócio-demográficos e anatômicos.** *Rev. Bras. Cir. Cabeça e Pescoço.* 1990; 14(1-3):1-9.
- DIB, L.L.; CURI, M.M. **Complicações Orais na Oncologia.** *In: Salvajoli, J.V.; Souhami, L.; Faria, S.L. Radioterapia em Oncologia.* 1^a ed. Rio de Janeiro. MEDSI. 1999. cap 41, p. 1145-64.
- DONGRE, S.H.; BADAMI, S.; NATESAN, S.H.R.C. **Antitumor Activity of the Methanol Extract of *Hypericum hookerianum* Stem Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice.** *J Pharmacol Sci.* 2007; 103(4):354-9.
- DUVOIX, A. *et al.* **Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin.** *Cancer Lett.* 2005; 223(2):181-90.
- ECKERT, A.W. *et al.* **Survival and prognosis of oral squamous cell carcinomas.** *Journal of crânio-Maxillofac Surgery.* 2006;34(SI1):182.
- FORASTIERE, A. *et al.* **Head and Neck câncer.** *New Engl J Med.* 2001; 345:1890-1900.
- FOSSATI, P.; RICARDI, U.; ORECCHIA, R. **Pediatric medulloblastoma: Toxicity of current treatment and potencial role of protontherapy.** *Cancer Treatment Reviews.* 2009; 35:79-96.
- FRIEDLANDER, P.L. *et al.* **Squamous cell carcinoma of the tongue in yung patients: a matched-pair analysis.** *Head Neck.* 1998; 20:363-368.
- GIBSON, M.K.; FORASTIERE, A. **Reassessment of the role of induction chemotherapy for head and neck câncer.** *Lancet Oncol.* 2006;7:565-574.
- HAO, Y. *et al.* **Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways.** *Int J Cancer.* 2008; 124:2200-2209.
- HENRY, G.E. *et al.* **Kaurene diterpenes from *Laetia thamnina* inhibit the growth of human cancer cells in vitro.** *Cancer Lett.* 2006; 244(2):190-4. Epub 2006, Jan 31.
- HONG, W.K. **Epidermal Growth Factor Receptor-Target Therapy with C225 and Cisplatin in Patients with Head And Neck Cancer.** *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 1204-1213.

HOPPER-BORGE, E. *et al.* **Analysis of the Drug Resistance Profile of Multidrug Resistance Protein 7 (ABCC10) Resistance to Docetaxel.** *Cancer Research.* 2004; 64:4927-4930.

HSU, S.; SINGH, B.; SCHSTER, G. **Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention.** *Oral Oncology.* 2004; 40:461-473.

HUANG, C. *et al.* **Inhibition of Benzo(a)pyrene Diol-Epoxy-induced Transactivation of Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B by Black Raspberry Extracts.** *Cancer Research.* 2002; 62: 6857-6863.

HUANG, C. *et al.* **Black Raspberry Extracts Inhibit Benzo(a)Pyrene Diol-Epoxy- Induced Activator Protein 1 Activation and VEGF Transcription by Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway.** *Cancer Res.* 2006; 66(9):581-587.

HUANG, Y. *et al.* **Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF- κ B pathway in human tumor cells.** *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(3):271-7

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Incidência de Câncer no Brasil: Estimativa para 2008.** Rio de Janeiro: INCA, 2007.

JEMAL, A. *et al.* **Cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.* 2007;57(1):43-66.

JEMAL, A. *et al.* **Cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71-96.

JENNIFER, E. *et al.* **Phase II study of the antiangiogenesis agent thalidomide in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Cancer.* 2001; 92:2364-73.

JIMÉNEZ-MEDINA, E. *et al.* **A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation.** *BMC Cancer.* 2005; 5(6):119.

JULLIAN, V. *et al.* **New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities.** *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(22):5065-70.

KHURI, F.R. *et al.* **Phase I Study of the Farnesyltransferase Inhibitor Lonafarnib with Paclitaxel in Solid Tumors.** *Clin Cancer Research.* 2004; 10:2968-2976.

KING, M. *et al.* **Oral squamous cell carcinoma proliferative phenotype is modulated by proanthocyanidins: a potential prevention and treatment alternative for oral cancer.** *BMC Complement Altern Med.* 2007; 19:7-22.

KISH, J.A. *et al.* **A Randomized Trial Of Cisplatin (CACP) + 5-Fluorouracil (5-FU) Infusion And CACP + 5-FU Bolus For Recurrent And Advanced Squamous Cell Carcinoma Of The Head And Neck.** *Cancer.* 1985; 56: 2740-2744.

- KOHNO, N. *et al.* **Prognosis After Salvage Chemotherapy for Locally Unresectable Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.** *Japanese J of Clinical Oncology.* 1999; 29(10):462-6.
- KUETE, V. *et al.* **Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae).** *J Ethnopharmacol.* 2008; 115: 494-501.
- LAO, C.D. *et al.* **Dose escalation of a curcuminoid formulation.** *BMC Complement Altern Med.* 2006; 17:6-10.
- LEHNERT, S. **Radiobiologia.** In: Salvajoli, J.V.; Souhami, L.; Faria, S.L. *Radioterapia em Oncologia.* 1^a ed. Rio de Janeiro. MEDSI. 1999. cap 5, p. 91-118.
- Li, K. *et al.* **Antitumor activity of the procyanidins from *Pinus koraiensis* bark on mice bearing U14 cervical cancer.** *Yakugaku Zasshi.* 2007; 127(7):1145-51.
- LIANG, C.H. *et al.* **Extracts from *Cladiella australis*, *Clavularia viridis* and *Klyxum simplex* (Soft Corals) are Capable of Inhibiting the Growth of Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells.** *Mar Drugs.* 2008; 6:595-606.
- LIM, Y.C.; CHOI, E.C. **Surgery alone for squamous cell carcinoma of the oral cavity: survival rates, recurrence patterns, and salvage treatment.** *Acta Oto-Laryngologica.* 2008; 128: 1132-1137.
- LO, W.L. *et al.* **Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan After Surgical Therapy: Factors Affecting Survival.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61:751-758.
- LOIZZO, M.R. *et al.* **Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae).** *Phytother Res.* 2007; 21(1):32-6.
- LOSI-GUEMBAROVSKY, R. *et al.* **Oral Carcinoma epidemiology in Paraná State, Southern Brazil.** *Cad Saúde Pública.* 2009;25(2):393-400.
- MALLERY, S.R. *et al.* **Formulation and In-Vitro and In-Vivo Evaluation of a Mucoadhesive Gel Containing Freeze Dried Black Raspberries: Implications for Oral Cancer Chemoprevention.** *Pharm Res.* 2007; 24(4): 728-737.
- MANDADI, K.K. *et al.* **Red Mexican Grapefruit: A Novel Source for Bioactive Limonoids and their Antioxidant Activity.** *Z Naturforsch.* 2007; 62:179-188.
- MANIKANDAN, P. *et al.* **Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model.** *Food and Chemical Toxicology.* 2008; 46:2332-2343
- MANOHARAN, S. *et al.* **Evaluation of anticarcinogenic effects of *Clerodendron inerme* on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis.** *Singapore Med J.* 2006;47(12):1038-1043.
- MI, Q. *et al.* **Apoptotic anticancer effect of alvaradoin E isolated from *Alvaradoa haitiensis*.** *Anticancer Res.* 2005; 25(2A):779-87.
- MITHANI, S.K. *et al.* **Molecular genetics of premalignant oral lesions.** *Oral Diseases.* 2006; 13(2): 126-133.

- MONKS, A. *et al.* **Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines.** *J. Nat. Cancer Inst.* 1991 83:757-766.
- MUIR, C.; WEILAND, L. **Upper aerodigestive tract cancers.** *Cancer.* 1995; 75(1):147-53.
- NAIR, S.C.; PANNIKAR, B.; PANIKKAR, K.R. **Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*).** *Cancer Lett.* 1991; 57(2):109-14.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural Products of New Drugs over the Last 25 Years.** *J Nat Prod.* 2007; 70:461-477.
- NICOLAOU, K.C.; CHEN, J.S.; DALBY, S.M. **From nature to the laboratory and into clinic.** *Bioorg Med Chem.* 2008; doi:10.1016/j.bmc.2002.10.089
- PARISE, O. **Cirurgia do Câncer de Boca.** *In:* Parise, O. Câncer de Boca: Aspectos Básicos e Terapêuticos. São Paulo. Sarvier. 2000. cap 18, p. 126-33.
- PATEL, C. J.R. *et al.* **Prognostic factors in the surgical treatment of patients with oral carcinoma.** *ANZ J Surg.* 2009; 79(1-2):19-22.
- PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan SA. 2005.
- PHIFER, S.S. *et al.* **Alvaradoins E-N, antitumor and cytotoxic anthracenone C-glycosides from the leaves of *Alvaradoa haitiensis*.** *J Nat Prod.* 2007; 70(6):954-61.
- PRAKASH, J.; GUPTA, S.K.; DINDA, A.K. ***Withania somnifera* Root Extract Prevents DMBA-Induced Squamous Cell Carcinoma of Skin in Swiss Albino Mice.** *Nutricion and Cancer.* 2002; 42(1):91-97.
- PRATT, D.E.; MILLER, E.E. **A flavonoid Antioxidant in Spanish Peanuts (*Arachia hypogova*).** *J Am Oil Chem Soc.* 1984, 61 (6): 1064-1067.
- RIVERO-CRUZ, J.F. *et al.* **Cytotoxic constituents of the twigs of *Simarouba glauca* collected from a plot in Southern Florida.** *Phytother Res.* 2005; 19(2):136-40.
- RODRIGO, K.A. *et al.* **Suppression of the tumorigenic phenotype in human oral squamous cell carcinoma cells by an ethanol extract derived from freeze-dried black raspberries.** *Nutr Cancer.* 2006, 54:58-68
- SALVAJOLI, J.V.; MAIA, M.A.C.; NOVAES, P.E.R.S. **Câncer de Cabeça e Pescoço.** *In:* Salvajoli, J.V.; Souhami, L.; Faria, S.L. Radioterapia em Oncologia. 1ª ed. Rio de Janeiro. MEDSI. 1999. cap 17, p. 335-8
- SALVAJOLI, J.V.; NOVAES, P.E.R.S.; PRISCO, F.E. **Braquiterapia.** *In:* Parise, O.: Câncer de Boca: Aspectos Básicos e Terapêuticos. São Paulo. Sarvier. 2000. cap 22, p. 160-72.
- SAMPAIO, M.C.C. *et al.* **Análise do carcinoma bucal.** Casuística do Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa). *Rev. Bras. Cancerologia.* 1985; 31(2): 125-130.
- SHIN, D.M. *et al.* **Phase II Study of paclitaxel, ifosfamide, and carboplatin in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma.** *Cancer.* 2001; 91-1316-1323.

- SHIN, D.M. *et al.* **Combined Interferon-Alfa, 13-cis -Retinoic Acid, and Alpha-Tocopherol in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Novel Bioadjuvant Phase II Trial.** *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3010-3017.
- SHOEMAKER, R.H. **The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen.** *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:813-823.
- SILVA, E.C. *et al.* **Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae).** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1):48-56
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry.** 3 ed. W H Freeman and Company, NY. 1995.
- SPENCER, K.R.; FERGUSON, J.W.; WIENSENFELD, D. **Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma.** *Australian Dental Journal.* 2002; 47(4):284-289.
- SUBRAMANIAN, S. *et al.* **Cost-effectiveness of oral câncer screening: results from a cluster randomized controlled trial in Índia.** *Bull World Health Organ.* 2009;87:200-206.
- SUFFREDINI, I.B. *et al.* **Prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts.** *Pharmazie.* 2006; 61(8):722-4.
- SUFFREDINI, I.B. *et al.* **In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia.** *Fitoterapia* 2007b; 78(3):223-6.
- SUFFREDINI, I.B. *et al.* **In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts.** *Pharmazie.* 2007a; 62: 789-800.
- TABACOF, J. **Quimioterapia.** In: Parise, O.: *Câncer de Boca: Aspectos Básicos e Terapêuticos.* São Paulo. Sarvier . 2000. cap 23, p. 173-8.
- TNM *Classification of Malignant Tumours – Oral Cavity.* 4. ed. Geneva. UICC, 1987. P. 11-14.
- TREMBLAY, S. *et al.* **Young Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132:958-966
- VATANIAN, J.G.; KOWALSKI, L.P. **Acceptance of Major Surgical Procedures and Quality of Life Among Long-term Survivors of Advance Head and Neck Cancer.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 135(4):376-379.
- WALL, M.E.; WANI, M.C. **Camptothecin and Taxol: Discovery to Clinic-Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture.** *Cancer Research.* 1995; 55:753-760.
- WANG, S.J.; PEYROLIER, K.; BOURGUIGNON, L.Y. **The Influence of Hyaluronan-CD44 Interaction On Topoisomerase ii Activity AND Etoposide Cytotoxicity in Head and Neck Cancer.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 133: 281-288.
- XIAO, B. *et al.* **Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells.** *Oral Oncology.* 2007;

43:905-910.

YAO, M. *et al.* **Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Oral Oncology*. 2007; 43:213-223.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis.** 4 ed. Prentice Hall, NY. 1999.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W.G. **ARF promotes MDM2 degradation and atabilizes p53: ARF-INK4a lócus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways.** *Cell*. 1998; 92:725-734.

ANEXO I- CLASSIFICAÇÃO TNM DOS TUMORES MALIGNOS, SEGUNDO A UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER (1987)

Para o tumor primário (T)

TX: sem condições clínicas para o estadiamento

T0: sem evidência de tumor primário

Tis: carcinoma *in situ*

T1: tumor \leq 2 cm

T2: tumor $>$ 2 cm e \leq 4 cm

T3: tumor $>$ 4 cm

T4: tumor invade estruturas adjacentes

Para linfonodos (N)

NX: sem condições para o estadiamento

N0: sem linfonodos regionais metastáticos

N1: metástase em um único linfonodo \leq 3 cm

N2: 2a- metástase em um só linfonodo ipsilateral, $>$ 3 cm e $<$ 6 cm

2b- metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum $>$ 6 cm

2c- metástase em linfonodo bilateral ou contralateral, nenhum $>$ 6 cm

N3: metástase em linfonodo $>$ 6

Para metástases à distância (M)

MX: sem condições para o estadiamento

M0: sem metástase à distância

M1: com metástase à distância

Agrupamento por estádios clínicos:

Estádio 0: Tis, N0, M0

Estádio I: T1, N0, M0

Estádio II: T2, N0, M0

Estádio III: T3, N0, M0

T1, T2, T3, N1, M0

Estádio IV: T4, N0 ou N1, M0

Qualquer T, N2 ou N3, M0

Qualquer T, qualquer N, M1

ANEXO II- CERTIFICADO DO CÔMITE DE ÉTICA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)