

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

CARLA CAROLINA LOPES LAGES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA ESPÉCIE *Casearia*
*sylvestris***

**ALFENAS/MG
2016**

CARLA CAROLINA LOPES LAGES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA ESPÉCIE *Casearia
sylvestris***

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de Concentração: Química Orgânica
Orientadora: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa Ionta

**ALFENAS/MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Lages, Carla Carolina Lopes
Avaliação do potencial antitumoral da espécie *Casearia sylvestris*
/ Carla Carolina Lopes Lages. -- Alfenas/MG, 2016.
74 f.

Orientadora: Marisi Gomes Soares.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2016.
Bibliografia.

1. Neoplasias. 2. Bioprospecção. 3. Casearia. I. Soares, Marisi Gomes.
II. Título.

CDD-547

Carla Carolina Lopes Lages

“Avaliação do potencial antitumoral da espécie *Casearia sylvestris*”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química-Orgânica.

Aprovado em: 29.07.2016

Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



Dra. Vanessa Silva Contijo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:

Vanessa Silva Contijo

Profa. Dra. Andreia Pereira Matos
Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Assinatura:



Dedico a Deus em primeiro lugar pela força divina, aos meus pais Carlos e Tânia pelo apoio em realizar esse trabalho e aos meus irmãos Edgard e Victor pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade em desenvolver o trabalho.

Agradeço aos órgãos de Fomento Capes e FAPEMIG pela disponibilidade dos recursos envolvidos do desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a minha orientadora Marisi Gomes Soares, pela paciência, pelos ensinamentos, pela parceria em todos os momentos e, principalmente pela amizade e carinho.

Agradeço a minha co-orientadora Marisa Ionta, pelo auxílio e aprendizagem no trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Daniela Ap. Chagas pelos ensinamentos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e pela amizade.

Agradeço a Profa. Dra. Patrícia Sartorelli pela colaboração na parte química experimental do trabalho.

Agradeço ao colega de trabalho Guilherme Ferreira, pela colaboração nos Ensaio Biológicos.

Agradeço aos parceiros de bancada, Bruna, João, Laís, Tatiane e Welton pelo apoio e troca de experiências durante o desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

O câncer representa uma das principais causas de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) surgem, a cada ano, nove milhões de casos e cerca de cinco milhões de pessoas morrem em consequência da doença. Apesar do aprimoramento nos métodos de diagnóstico, muitos tipos de câncer ainda são diagnosticados em fase avançada, assim os tratamentos convencionais são apenas paliativos. Muitos medicamentos rotineiramente utilizados em tratamento quimioterápico são oriundos de produtos naturais e o Brasil dispõe de uma ampla diversidade de plantas, as quais são úteis como fonte de pesquisa para a identificação de novos compostos com atividade antitumoral. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antitumoral de nove espécies de plantas coletadas na Mata Atlântica da região sul de Minas Gerais, sendo elas: *Duguetia lanceolata* (folhas), *Trichilia emarginata* (folhas), *Miconia willdenoii* (folhas), *Allophylus racemosus* (folhas e galhos), *Metrodorea stipularis* (folhas), *Mollinedia widgrenii* (folhas), *Casearia arborea* (folhas), *Acacia polyphylla* (folhas) e a *Casearia sylvestris* (folhas). Os resultados mostraram que o extrato obtido a partir das folhas de *Casearia sylvestris* foi potencialmente ativo contra cinco linhagens diferentes de células derivadas de cânceres humanos: A549 (adenocarcinoma pulmonar), MCF7 (adenocarcinoma mamário), HepG2 (hepatocarcinoma), U251 MG (glioblastoma), HT144 (melanoma). Assim sendo, o extrato bruto dessa espécie foi fracionado por extração líquido-líquido a fim de selecionar as frações enriquecidas com substâncias bioativas. As frações acetato de etila e hexânica (substâncias de média e baixa polaridade) mostraram promissoras nos resultados dos ensaios bioguiados, sendo que a fração acetato foi selecionada para isolamento de substâncias com potencial antitumoral. Após Cromatografia em Coluna e Cromatografia Líquida foi possível o isolamento da casearina D. A mesma foi submetida aos testes biológicos e verificou-se que tem potencial antitumoral sobre as linhas de hepatocarcinoma e adenocarcinoma pulmonar.

Palavras-chave: Câncer, bioprospecção, *Casearia sylvestris*, antitumoral.

ABSTRACT

Cancer has emerged as a major cause of morbidity and mortality in recent times. According to the report from the World Health Organization (WHO), there were 9 million deaths with 5 million new cases of cancer for wear. Unfortunately, many cases are still diagnosed at advanced stages when treatment options are only palliative. Many medications routinely used in chemotherapy are derived from natural products, and Brazil has a wide diversity of plants, which are useful as a source of research for the identification of new compounds with antitumor activity. The aim of this study was to evaluate the anti-tumor potential of nine species of plants collected in the Atlantic Forest in the southern region of Minas Gerais, which are: *Duguetia lanceolata* (leaves), *Trichilia emarginata* (leaves), *Miconia willdenoii* (leaves), *Allophylus racemosus* (leaves and branches), *Metrodorea stipularis* (leaves), *Mollinedia widgrenii* (leaves) and *Casearia arborea* (leaves), *Acacia polyphylla* (leaves), *Casearia sylvestris* (leaves). The results showed that the extract obtained from *Casearia sylvestris* leaves were potentially active against five different strains derived from human cancer cells: A 549 (lung adenocarcinoma), MCF 7 (breast carcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), U251 MG (glioblastoma) HT 144 (melanoma). Thus, the crude extract of this species was fractionated by liquid-liquid extraction in order to select the fractions enriched with bioactive substances. The ethyl acetate fraction (medium polarity substance) showed a higher antitumor activity and was selected for isolation for the isolation of substances with antitumor potential. After column chromatography, liquid chromatography has been possible to isolate the casearin D. The same was subjected to biological tests and have found that antitumor potential on the lines of hepatocellular carcinoma and lung adenocarcinoma.

Keywords: Cancer, bioprospecting, *Casearia sylvestris*, antitumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias isoladas da espécie <i>Catharanthus roseus</i>	21
Figura 2 - Substância isolada da espécie <i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	21
Figura 3 - <i>Casearia sylvestris</i> , encontrada no cerrado brasileiro, assim como suas flores e frutos.	23
Figura 4 - Estrutura padrão das casearinas isoladas da <i>C. sylvestris</i>	25
Figura 5 - Conversão enzimática do sal tetrazólio (MTS) em formazano.....	31
Figura 6 - Imagem do Ensaio Colorimétrico MTS.....	32
Figura 7 - Fluxograma representativo do particionamento do extrato bruto etanólico.	33
Figura 8 - Imagem do particionamento	33
Figura 9 - Imagem da Cromatografia em Coluna.....	35
Figura 10 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (A549) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	43
Figura 11 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (MCF7) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	43
Figura 12 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HT144) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	44
Figura 13 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HepG2) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	44
Figura 14 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (U251 MG) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	44
Figura 15 - Viabilidade celular determinada a partir do ensaio de MTS em diferentes linhagens celulares derivadas de tumores humanos. HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (carcinoma de pulmão), MCF7 (carcinoma de mama), U251-MG (glioblastoma) e HT144 (melanoma). Extrato 10 corresponde ao extrato bruto etanólico das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	45

Figura 16 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células de diferentes linhagens tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	45
Figura 17 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HepG2) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	47
Figura 18 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HT144) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	48
Figura 19 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (U251MG) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	48
Figura 20 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (A549) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	49
Figura 21 - Perfil Cromatográfico do Extrato Bruto de <i>Casearia sylvestris</i>	51
Figura 22 - Perfil Cromatográfico do Extrato Bruto de <i>Casearia sylvestris</i>	51
Figura 23 - Perfil Cromatográfico da fração Acetato de Etila obtida do Extrato Bruto de <i>Casearia sylvestris</i>	52
Figura 24 - Perfil Cromatográfico da fração Acetato de Etila obtida do Extrato Bruto de <i>Casearia sylvestris</i> em 200 nm.....	52
Figura 25 - Perfil Cromatográfico da fração Acetato de Etila obtida do Extrato Bruto de <i>Casearia sylvestris</i>	53
Figura 26 - Curva de absorção do primeiro pico.....	53
Figura 27 - Curva de absorção do segundo pico.	54
Figura 28 - Curva de absorção do terceiro pico.	54
Figura 29 - Espectro de massas de alta resolução da substância isolada.....	55
Figura 30 - Fórmula estrutural da casearina D.	55
Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d ₅ a 300 MHz.....	56
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d ₅ obtido	

a 300 MHz.....	57
Figura 33 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d5 obtido a 300 MHz.....	57
Figura 34 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d5 obtido a 300 MHz.	58
Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina-d5 a 75 MHz.....	59
Figura 36 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina-d5 obtido a 75 MHz.	60
Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina-d5 obtido a 75 MHz.	60
Figura 38 - Espectro de absorção no IV da Casearina D.....	62
Figura 39 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (A549, HepG2, U251-MG, MCF-7) tratadas com Casearina D em diferentes concentrações por 48 horas.....	63
Figura 40 - Capacidade clonogênica da linhagem A549 após tratamento com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 horas. Após o término do tratamento o meio foi substituído por meio fresco e as células foram mantidas em estufa por 15 dias. (A) Houve redução significativa da formação de colônias em ambas as concentrações utilizadas. Os valores representados no gráfico referem-se à média do experimento realizado em triplicata e a barra de erros representa o erro padrão em relação à média. (B) Imagem ilustrativa das colônias coradas com Cristal Violeta 1%. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.	65
Figura 41 - Capacidade clonogênica da linhagem Hep G2 após tratamento com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 horas. Após o término do tratamento o meio foi substituído por meio fresco e as células foram mantidas em estufa por 15 dias. (A) Houve redução significativa da formação de colônias em ambas as concentrações utilizadas. Os valores representados no gráfico referem-se à média do experimento realizado em triplicata e a barra de erros representa o erro padrão em relação à média. (B) Imagem ilustrativa das colônias coradas com Cristal Violeta 1%.	

*** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. 66

Figura 42 - Análise de diferentes populações celulares distribuídas pelo ciclo celular através de quantificação de DNA por citometria de fluxo. As células foram tratadas por 24 horas com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 24 horas e coradas com solução de Iodeto de Propídeo. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. 67

Figura 43 - Análise de diferentes populações celulares distribuídas pelo ciclo celular através de quantificação de DNA por citometria de fluxo. As células foram tratadas por 24 horas com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 24 horas e coradas com solução de Iodeto de Propídeo. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. 68

Figura 44 - Perfil de expressão de ciclina D, ERK e ERK fosforilada determinado por western blotting. A α - tubulina foi utilizada como controle de carregamento e doxorubicina (DXR) foi utilizada como controle positivo. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casearinas isoladas da <i>C. sylvestris</i>	25
Tabela 2 - Extratos brutos obtidos das espécies vegetais coletadas.	29
Tabela 3 - Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i>	30
Tabela 4 - Exsiccatas depositadas no herbário da UNIFAL-MG.....	41
Tabela 5 - Extratos brutos etanólicos obtidos.....	42
Tabela 6 - Valores de IC50 das amostras tratadas com Extrato de <i>C. sylvestris</i> ($\mu\text{g/mL}$)..	46
Tabela 7 - Massa das frações obtidas do extrato bruto da <i>C. sylvestris</i>	46
Tabela 8 - Valores de IC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) determinados a partir dos resultados obtidos por MTS.	49
Tabela 9 - Massa das subfrações obtidas da coluna (F. acetato).	50
Tabela 10 - Deslocamento químico dos hidrogênios.....	58
Tabela 11 - Deslocamento químico dos carbonos.	61
Tabela 12 - Conteúdo de DNA (%) nas diferentes fases do ciclo celular de culturas da linhagem A549 submetidas ao tratamento com Casearina D (5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas. Os dados da tabela representam a média \pm DP.....	67
Tabela 13 - Conteúdo de DNA (%) nas diferentes fases do ciclo celular de culturas da linhagem HepG2 submetidas ao tratamento com Casearina D (5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas. Os dados da tabela representam a média \pm DP.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 - Adenocarcinoma pulmonar

ACN - Acetonitrila

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COX - Ciclooxigenase

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

Hep G2 - Hepatocarcinoma

HT144 - Melanoma

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MCF7 - Adenocarcinoma mamário

MTS - Sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBSA - Tampão fosfato-salino

QPN - Química dos Produtos Naturais

TBS - Tris-buffered saline

U251 MG - Glioblastoma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Câncer	16
2.2	Câncer de pulmão e Câncer de fígado.....	18
2.3	Contribuição da fitoquímica na busca de novos agentes neoplásicos.....	19
2.4	<i>Casearia sylvestris</i>	22
2.4.1	Propriedades farmacológicas da <i>Casearia sylvestris</i>	23
2.4.2	Atividade Antitumoral da <i>Casearia sylvestris</i>	24
3	JUSTIFICATIVA.....	27
4	OBJETIVO	28
4.2	Objetivo Geral	28
4.3	Objetivos específicos	28
5	METODOLOGIA	29
5.1	Coleta do material vegetal	29
5.2	Preparo do Extrato Bruto Etanólico	29
5.3	Teste de viabilidade celular dos extratos brutos	30
5.4	Particionamento do Extrato Bruto Etanólico	32
5.5	Teste de viabilidade Celular das Frações obtidas	34
5.6	Cromatografia em Coluna.....	34
5.7	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	35
5.8	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	36
5.9	Infravermelho (IV).....	36
5.10	Ensaio de capacidade clonogênica	36
5.11	Quantificação de DNA por citometria de fluxo.....	36
5.12	Ensaio de <i>Western blotting</i>	37
5.13	Análise Estatística	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
6.1	Coleta do Material Vegetal.....	41
6.2	Obtenção dos extratos brutos etanólicos.....	42
6.3	Teste de Viabilidade Celular dos extratos brutos obtidos.....	42
6.4	Particionamento do Extrato Bruto de <i>Casearia sylvestris</i>	46
6.5	Teste de Viabilidade Celular das Frações obtidas.....	46
6.6	Coluna Cromatográfica da Fração Acetato de Etila.....	49
6.7	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	51
6.8	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	56
6.9	Infravermelho (IV).....	62
6.10	Teste de Viabilidade Celular da Casearina D.....	63
6.11	Ensaio de capacidade clonogênica	64
6.12	Quantificação de DNA por citometria de fluxo.....	66
6.13	Ensaio de <i>Western blotting</i>	69
7	CONCLUSÃO	70
8	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer é o nome dado a uma série de neoplasias malignas que se caracterizam por apresentar células com alta capacidade de proliferação e invasão (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer representa uma das principais causas de morte no mundo. Estão previstos que os casos anuais aumentarão para 22 milhões nas próximas décadas, sendo que mais de 60% desses casos estarão concentrados na África, Ásia, América Central e América do Sul (OMS, 2014).

Apesar do aprimoramento nos métodos de diagnóstico, muitos tipos de câncer ainda são diagnosticados em fase avançada, principalmente nos países menos desenvolvidos (BRAY et al., 2012). Esse aspecto é crítico, pois nessa fase os tratamentos convencionais (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) são apenas paliativos. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que aproximadamente 596 mil novos casos de câncer sejam diagnosticados até 2016.

A busca por novos medicamentos antineoplásicos tem aumentado nas últimas décadas com o objetivo de melhorar as propostas terapêuticas e impedir o avanço da doença. É relevante identificar compostos que sejam mais efetivos e seletivos contra células tumorais. Sendo assim, os vegetais representam as maiores fontes de substâncias bioativas devido a grande diversidade estrutural de metabólitos secundários produzidos (BRANDÃO et al., 2010).

Os estudos fitoquímicos tem sido úteis na identificação de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, os quais conferem proteção às plantas contra insetos e herbívoros, contra a radiação ultravioleta e até mesmo contra doenças (SILVA; CARVALHO, 2004).

O Brasil apresenta uma flora muito rica em diversas espécies vegetais, o que contribui e facilita a busca por moléculas bioativas de espécies ainda não estudadas. A medicina popular tem grande importância na busca de novos fármacos, pois muitas vezes os estudos científicos são feitos para confirmar as propriedades farmacológicas já utilizadas por certa população. Na região sul de Minas Gerais há um predomínio da Mata Atlântica que é considerada a segunda maior floresta tropical do continente americano o que facilita novos estudos científicos. Pode-se considerar que os vegetais representam a fonte mais antiga de medicamentos para o homem (BRANDÃO et al., 2010).

O método de localizar, avaliar e explorar sistematicamente e legalmente um

determinado local é definido como bioprospecção. Sendo que o principal objetivo é gerar recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais visando o menor impacto ambiental possível. Indústrias químicas e farmacêuticas na busca crescente por novos compostos bioativos tem demonstrado grande interesse na biodiversidade de áreas pouco exploradas cientificamente (BOLZANI, 2012).

A Mata Atlântica apresenta grande biodisponibilidade, contudo tem sido pouco estudada. Esse aspecto associado ao fato de que o câncer ainda representa um problema de saúde pública estimulam a busca por novos compostos com atividade antineoplásica visando melhorar as propostas terapêuticas para o câncer.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica será citado o câncer, câncer de pulmão e fígado, além das suas origens e estatísticas no Brasil e no mundo. Também é importante ressaltar a importância da Fitoquímica na busca de substâncias com atividades biológicas, principalmente, antitumoral.

2.1 Câncer

O termo câncer é derivado do latim *cancer* e do grego *kárkinos* que significa “caranguejo” e deve ter sido empregado em analogia ao modo de crescimento do tumor (infiltrante) quando comparado às pernas do crustáceo que se fixa fortemente na areia (REDDY;ODHAV; BHOOLA, 2003).

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças denominadas neoplasias, as quais se caracterizam pelo crescimento desordenado de células que apresentam algum tipo de mutação genética. Essas células podem ser chamadas de células transformadas ou células que sofreram carcinogênese (ALMEIDA et al., 2005). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016), o câncer representa uma das principais causas de morte no mundo, atrás apenas de mortes relacionadas a doenças cardiovasculares.

Estima-se que em 2030, a carga global será de 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e casos por doenças infecciosas, principalmente, em países subdesenvolvidos (OMS, 2016).

De acordo com o INCA, no Brasil, estimam-se 596 mil casos novos de câncer entre 2016 e 2017. Sendo a taxa de incidência maior nos homens (214 mil novos casos) do que nas mulheres (206 mil novos casos). Os tipos de câncer que mais acometem os homens brasileiros são: os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Já nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e estômago.

Durante o desenvolvimento normal sistemas complexos de controle genético regulam o equilíbrio entre divisão e morte celular em resposta a uma série de estímulos que regulam proliferação, diferenciação e morte celular. Alterações genéticas e

epigenéticas podem converter uma célula normal em uma célula transformada, as quais proliferam desordenadamente e são resistentes a apoptose (NICHOLSON, 2000).

O processo de transformação maligna se inicia quando mutações alteram a função de genes que regulam direta ou indiretamente a proliferação ou a sobrevivência celular, como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes que regulam positivamente o ciclo celular em resposta a estímulos fisiológicos. Algumas das mutações encontradas nestes genes resultam numa forma de proteína permanentemente ativa, de modo que a proliferação celular seja contínua e independente de estímulos externos. Essas formas modificadas dos proto-oncogenes são denominadas oncogenes. Os genes supressores de tumor inibem a proliferação e, portanto, previnem o crescimento celular desordenado. Assim sendo, as mutações que inativam esses genes contribuem diretamente para o desenvolvimento e progressão do tumor (REED, 2002).

A resistência a apoptose é comumente observada em células tumorais e pode ser decorrente de alterações do perfil de expressão e/ou ativação de diferentes proteínas. Em geral, o processo é acompanhado por clivagens proteolíticas mediadas por uma família de proteases dependentes de cisteína, chamadas caspases. Em humanos, 12 caspases foram identificadas, sendo que seis isoformas são críticas na determinação da apoptose. As caspases 8, 9 e 10 são iniciadoras e, quando ativadas, atuam na clivagem proteolítica das caspases executoras (3,6 e 7), as quais orquestram os eventos chaves para a formação dos corpos apoptóticos (WANG et al., 2013).

A apoptose pode ser desencadeada por duas principais vias: Extrínseca, que envolve a ativação de receptores de morte presentes na membrana plasmática; e a Intrínseca que está diretamente relacionada a perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c para o citosol (BONER, 2003).

A proteína p53 tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas por meio da apoptose. A maioria dos cânceres apresentam mutações na p53 ou defeitos na sua regulação conferindo a resistência a apoptose (AGARWAL et al., 1998).

A identificação de compostos com atividade pró-apoptótica em células tumorais é extremamente relevante na pesquisa contra o câncer. Nos últimos anos tem aumentado o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ativação, execução e regulação da apoptose, fato que melhora a possibilidade em identificar compostos que

possam atuar de maneira mais específica (BIRGE et al., 2009).

2.2 Câncer de pulmão e Câncer de fígado

No Brasil, o câncer de pulmão é o segundo tipo de câncer mais incidente em homens (o primeiro lugar é ocupado pelos tumores de próstata) nas regiões Centro-Oeste e Sul com 1090 e 5000 novos casos diagnosticados, respectivamente, já no Norte, Nordeste e Sudeste ocupa o terceiro lugar (DUARTE; PASCHOAL, 2005). Segundo o INCA, o câncer de pulmão é o mais comum entre os homens; entretanto a incidência de câncer de pulmão entre as mulheres vem aumentando nos últimos anos. Trata-se também da neoplasia maligna que mais faz vítimas, em 2016 será responsável por cerca de 28.220 mortes, sendo 17.330 homens e 10.890 mulheres (INCA, 2016).

O câncer de pulmão possui diferentes causas como: exposição a amianto e radônio, exposição ocupacional e ambiental e também fatores genéticos, contudo, o fator de risco mais relevante é o tabagismo, presente em 80% e 45% dos casos diagnosticados em homens e mulheres, respectivamente. A doença ainda é extremamente letal na atualidade com sobrevida média em cinco anos de cerca de 8,5% em países subdesenvolvidos (DUARTE; PASCHOAL, 2005).

A exposição excessiva ao tabaco está relacionada a 87% dos casos diagnosticados, por conseguinte, os tabagistas possuem 24 vezes mais chances de desenvolver a doença que os não tabagistas. Os ex-tabagistas, apresentam risco relativo menor que os tabagistas e maior do que os não tabagistas (CHENG et al., 2003; JEMAL et al., 2005; KIYOHARA, SHIRAKAWA, HOPKIN, 2002). Os principais carcinógenos presentes na fumaça do cigarro são hidrocarbonetos policíclicos (como benzopireno), nitrosaminas e as aminas aromáticas. São substâncias que ao passarem pelo metabolismo de primeira passagem (Fase I) são ativados em pró-carcinógenos, capazes de danificar o DNA (WEI et al., 1996).

O diagnóstico precoce para pacientes com câncer de pulmão é imprescindível para o bom prognóstico da doença e manutenção da qualidade de vida, portanto, os sinais e sintomas que sejam compatíveis com a doença devem ser imediatamente investigados. O estadiamento da doença bem como o prognóstico é realizado considerando diferentes fatores que incluem a classificação histológica do tumor e as

características genéticas que evidenciam o seu comportamento proliferativo/invasivo. O grau de estadiamento é fundamental para o prognóstico. Quanto mais avançado o estadiamento, menor seria a sobrevida em cinco anos. À presença dos marcadores tumorais (*Cmyc*, *Kras*, *c-erb B-2*) tem acarretado menor sobrevida aos pacientes (UEHARA; JAMNIK; SANTORO, 1998).

O câncer de fígado é considerado o oitavo tipo de câncer que mais acometem os homens no mundo e, infelizmente, muitos casos são diagnosticados no estágio avançado quando as opções de tratamento são apenas paliativos (BURN et al., 2010).

Estima-se 33 mil novos casos até 2030 em países desenvolvidos e 132 mil novos casos em países menos desenvolvidos (OMS, 2016).

No Brasil, estima-se 8.772 mil novos casos entre 2016 e 2017. Sendo 5.012 casos para os homens e 3.759 casos para as mulheres (INCA, 2016).

O consumo excessivo de álcool e os vírus da Hepatite B e C são importantes fatores de risco para o câncer de fígado. As terapias mais utilizadas para o tratamento de câncer de fígado em estágio avançado inclui o uso de inibidores de multiquinasas (COELHO et al., 1998).

2.3 Contribuição da fitoquímica na busca de novos agentes neoplásicos

Desde o descobrimento do Brasil os recursos naturais são explorados na maioria das vezes ilegalmente. A bioprospecção visa essa exploração de forma consciente para que o meio ambiente sofra os menores impactos ambientais possíveis. Como definição, bioprospecção é o método de explorar sistematicamente e legalmente a biodiversidade existente em determinado local com principal objetivo de buscar recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais. Dessa forma a bioprospecção tem credibilidade científica, política e econômica (BOLZANI, 2012).

A Mata Atlântica é considerada a segunda maior floresta tropical do continente americano e uma das maiores do mundo, segundo a UNESCO. Hoje restam apenas 8 % da vegetação da Mata Atlântica decorrente a ocupação e exploração desordenada do território desde a época da colonização no Brasil. As maiores extensões de florestas remanescentes em Minas Gerais são encontradas na Serra da Mantiqueira, essa região é considerada de grande importância biológica devida sua biodiversidade (SANTOS,

2013).

A fitoquímica, hoje também conhecida como química dos produtos naturais (QPN) é a área responsável por estudar os princípios ativos oriundos de vegetais. Esses princípios ativos são chamados de metabólitos secundários, os quais fazem parte do metabolismo dos vegetais, conferindo proteção contra ataques de insetos e herbívoros, contra a radiação ultravioleta e até mesmo contra doenças (SILVA; CARVALHO, 2004).

A utilização de diversas plantas na medicina popular representa uma investigação pré-clínica que não pode ser ignorada, pois cerca de 74% dos principais produtos medicinais obtidos de vegetais foram descobertos por indícios e uso na medicina popular. Sendo assim, o isolamento e a identificação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de vegetais ou organismos vivos representam grande importância na química dos produtos naturais (QPN) e nos avanços tecnológicos do país (BRAZ-FILHO, 2010).

Os vegetais representam importantes fontes de substâncias bioativas, as quais podem ser usadas em propostas terapêuticas devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Assim sendo, os vegetais representam a fonte mais antiga de medicamentos para o homem incluindo os fármacos utilizados no tratamento do câncer. Além disso, fornecem modelos para que os químicos sintéticos façam modificações estruturais necessárias para otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas das moléculas sintetizadas e/ou semisintetizadas (BOLZANI, 2012).

Grande parte dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de câncer é de origem natural, sendo os protótipos iniciais derivados de vegetais em sua maioria, micro- organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, a qual serve como fonte de pesquisas para a identificação de novas moléculas com potencial terapêutico (FUNARI; FERRO, 2005).

Dentre os fármacos oriundos de plantas utilizados no tratamento de alguns cânceres estão os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina (figura 1), que foram isolados das folhas da espécie vegetal *Catharanthus roseus* e o taxol (figura 2) que foi isolado da casca da espécie *Taxus brevifolia* Nutt.. Esses compostos interferem na dinâmica de polimerização dos microtúbulos, contudo por mecanismos distintos. A vimblastina e a vincristina impedem a polimerização dos dímeros de tubulina, enquanto

o taxol se liga aos microtúbulos, estabilizando-os e inibindo a despolimerização. Em ambos os casos, o processo de divisão celular é interrompido e esse fato é crítico na determinação do processo de morte celular. Apesar da grande utilização desses compostos no tratamento contra o câncer, se faz necessário a identificação de moléculas que apresentem menor toxicidade e maior seletividade contra células tumorais (BRANDÃO et al., 2010).

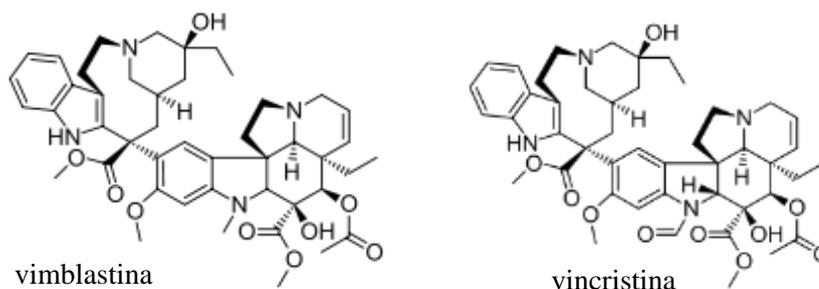


Figura 1- Substâncias isoladas da espécie *Catharanthus roseus*.

Fonte: BRANDÃO et al (2010, p. 1361)

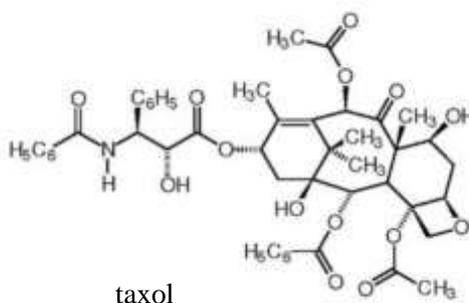


Figura 2- Substância isolada da espécie *Taxus brevifolia* Nutt.

Fonte: BRANDÃO et al (2010, p. 1361)

Na tentativa de buscar novos fármacos utilizando os alcaloides da vinca como inspiração foram desenvolvidos compostos semissintéticos como vinorelbina e a vindesina. Os quais possuem largo espectro de atividades antitumorais, sendo principalmente ativos no câncer de mama, melanoma e adenocarcinoma pulmonar. Quando comparados com a vincristina e a vimblastina são menos neurotóxicos e interrompem a mitose de forma dose- dependente sendo reversível com a retirada dos mesmos (CARVALHO, 2006).

Recentemente, o número de moléculas alvo para o tratamento de neoplasias tem crescido e outra classe de substância isolada de plantas com atividade antimitótica foi descoberta, a colchicina. Por sua vez a colchicina é isolada da espécie vegetal *Colchicum*

autumale L. e é usada clinicamente no tratamento de gota, mas até o momento não pode ser usada como terapia anticancerígena devida sua alta toxicidade. Alguns pesquisadores têm desenvolvido derivados semissintéticos da colchicina visando diminuir esses efeitos tóxicos, como por exemplo, a emodina que induz apoptose em diversos tipos de células cancerígenas humanas (pulmão, fígado, ovário e sangue) (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Ainda não foram descobertas terapias curativas para o tratamento de cânceres diagnosticados em fase avançada e a busca por novas moléculas mais potentes e menos tóxicas tem sido um interesse constante da comunidade científica (VIEIRA, 2005).

Sabendo que menos de 10% das espécies vegetais tiveram algum tipo de estudo fitoquímico ou de atividades biológicas, o estudo fitoquímico de espécies vegetais pode contribuir para a identificação de novos compostos com atividade antitumoral (BRAZ-FILHO, 2010).

2.4 *Casearia sylvestris*

A *C. sylvestris* (Figura 2), pertence à família *Flacourtiaceae*, a qual é constituída por 89 gêneros e 1300 espécies encontradas em diversas regiões temperadas e tropicais do mundo. Somente o gênero *Casearia*, possui mais de 1000 espécies conhecidas, destas, 70 espécies podem ser encontradas em território brasileiro (ABSY, SCAVONE, 1973).

A *C. sylvestris* SW trata-se de uma árvore que apresenta em torno de 4-6 metros de altura, com tronco de 20-30 centímetros de diâmetro. Suas folhas são um tanto assimétricas, brilhantes em cima. Suas flores são pequenas e numerosas, de coloração esverdeada. Os frutos são cápsulas septícidas, com sementes envolvidas por arilo vermelho. Esta árvore floresce nos meses de junho a agosto e seus frutos amadurecem a partir de setembro, prolongando-se até meados de novembro (ABSY, SCAVONE, 1973).

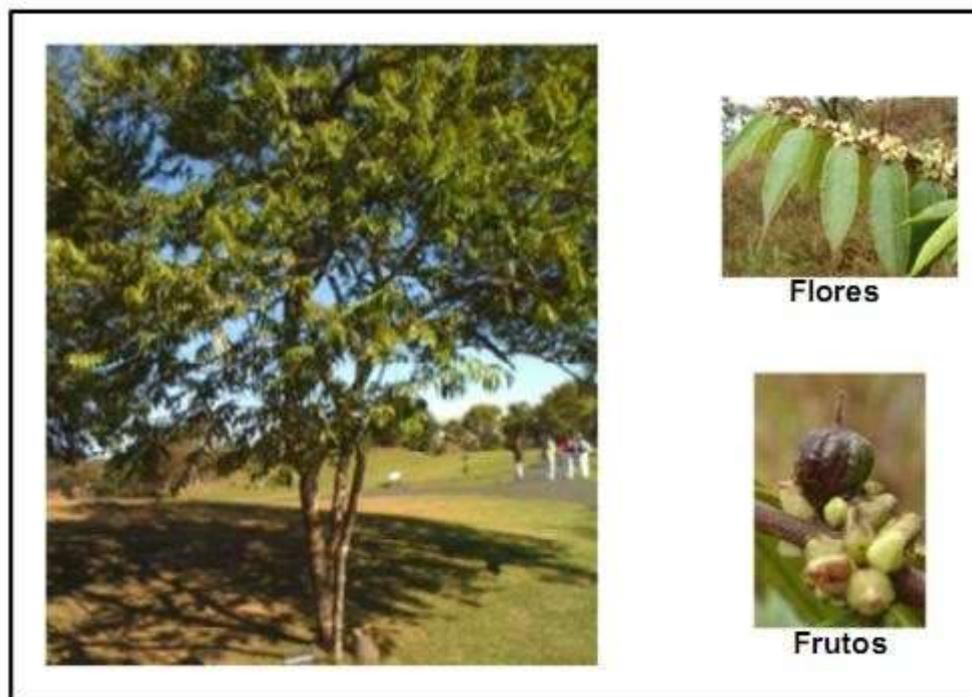


Figura 3- *Casearia sylvestris*, encontrada no cerrado brasileiro, assim como suas flores e frutos.

Fonte: TATAGIBA (2012, p.2)

Conhecida popularmente no Brasil como “guaçatonga”, um termo nativo originado da língua tupi-guarani, indicativo do uso antigo dessas espécies pelas comunidades indígenas brasileiras (ESTEVEZ et al., 2005).

2.4.1 Propriedades Farmacológicas da *Casearia sylvestris*

A *C. sylvestris* apresenta propriedades farmacológicas tais como: atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiplasmodial, antiofídica e antireumática (ALBANO et al., 2013).

A utilização de *C. sylvestris* como antiofídico tem como base uma explicação popular, a observação de que “os lagartos picados por cobras curam-se comendo as folhas desta planta” (CORREA, 1975).

O extrato etanólico das folhas da *C. sylvestris* tem propriedade antiúlcera. Segundo os estudos, reduz em até 42% o volume estomacal e não reage com o ácido clorídrico minimizando os impactos de pH (BASILE et al., 1990).

No modelo anti-inflamatório de carragena induzida, o óleo essencial extraído das folhas da *C. sylvestris* inibiu a formação de edema de pata. A substância atuou bloqueando a cascata de mediadores do ácido araquidônico e inibiu a ciclooxigenase (COX). Diferentemente, dos outros óleos essenciais, esse não interferiu na permeabilidade vascular (FERREIRA et al., 2011).

2.4.2 Atividade Antitumoral da *Casearia sylvestris*

No portal do Ministério da Saúde está disponível a relação nacional das 71 plantas medicinais de interesse do SUS, divulgada em fevereiro de 2009. Nesta relação estão plantas medicinais nacionais que apresentam potencial para gerar produtos e entre elas encontra-se a *C. sylvestris*. Esta lista tem como finalidade a orientação de estudos dessas plantas para geração de produtos a serem utilizados pela população (BRASIL, 2009b).

As folhas de *C. sylvestris* são utilizadas tradicionalmente como um agente anti-séptico, cicatrizante e como anestésico tópico, e são estudadas extensamente pela suas propriedades antiúlcera e antitumoral. Os extratos aquosos das folhas tem a capacidade de neutralização de venenos de serpentes e de abelhas, além de atividade antiplasmodial no tratamento de malária (YAMASHITA et al., 2005).

Devido à grande utilização de *C. sylvestris*, estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar quimicamente os princípios ativos responsáveis pelas várias ações terapêuticas atribuídas a esta planta. Entre estes estudos estão incluídos a análise da presença de casearinas, as quais apresentam promissora atividade antitumoral (MESQUITA et al., 2007).

O gênero *Casearia* tem se caracterizado pela ocorrência de substâncias de interesse como cumarinas, flavonóides e diversos diterpenos, especialmente clerodânicos. Os diterpenos clerodânicos mais comumente encontrados nas folhas de *C. sylvestris*, tratam-se das casearinas (Figura 4). Já foram isoladas e identificadas 20 tipos diferentes dessas moléculas na planta, as quais foram denominadas de acordo com as letras do alfabeto de A X, conforme apresentado na Tabela 1 (MORITA et al., 1991).

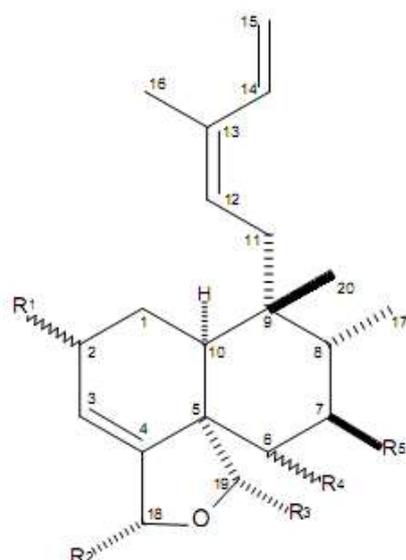


Figura 4- Estrutura padrão das casearinas isoladas da *C. sylvestris*

Fonte: FERREIRA et al (2011, p.1378)

Tabela 1 - Casearinas isoladas da *C. sylvestris*.

(continua)

Casearinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	OCH ₃ (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
B	OCH ₃ (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
C	OH (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (<i>α</i>)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
D	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
E	OH (<i>α</i>)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (<i>α</i>)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
F	OH (<i>α</i>)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
G	OCH ₃ (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
H	OH (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
I	OH (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
J	OCH ₃ (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
K	CH ₃ CO ₂ (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
L	OCH ₃ (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (<i>α</i>)	OH
M	OH (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (<i>α</i>)	OH
N	OCH ₃ (<i>α</i>)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (<i>α</i>)	n-C ₃ H ₇ CO ₂

Tabela 1 - Casearinas isoladas da *C. sylvestris*.

Casearinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	(conclusão)
					R ₅
O	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
P	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂
Q	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
R	= O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
S	OCH ₃ (α)	= O	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
V	OH (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H

Fonte: FERREIRA et al (2011, p.1378)

Estudos têm evidenciado a atividade citotóxica das casearinas sobre diversas linhagens celulares (incluindo células tumorais), sugerindo dessa forma, uma possível atividade antitumoral dessas moléculas isoladas da planta (BOLZANI et al. 1999; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et.al., 1991).

O grande interesse na *C. sylvestris* por parte da comunidade científica e, sobretudo da indústria farmacêutica, surgiu após o isolamento e identificação destes diterpenos clerodânicos. Itokawa e colaboradores (1988) relataram a possível ação destes diterpenos no tratamento do câncer.

Tem sido descrito que *C. sylvestris* apresenta proeminente atividade citotóxica contra células derivadas de cânceres humanos (ROJAS-SEPÚLVEDA et al., 2012; SARTORELLI et al., 2013); contudo existem poucos relatos sobre os mecanismos moleculares envolvidos com tal atividade.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença cada vez mais comum em todo mundo, no Brasil segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) cerca de 596 mil novos casos serão diagnosticados entre 2016 e 21017. Sendo que a maioria dessas neoplasias não possui tratamento eficaz quando diagnosticadas em fase avançada, então se faz necessário a busca por novas moléculas mais potentes contra células tumorais e menos tóxicas ao organismo.

Os vegetais são considerados fontes importantes de moléculas bioativas, devido a grande diversidade estrutural. Contudo a flora brasileira tem muitas espécies vegetais para serem estudadas e que podem apresentar grande potencial terapêutico, os quais devem ser explorados.

Alguns trabalhos já evidenciaram que a *Casearia sylvestris* tem grande potencial antitumoral, porém nenhum deles apresentou os mecanismos de ação das moléculas isoladas, as casearinas, e nas linhagens que serão testadas nesse trabalho.

4 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi dividido em objetivo geral e objetivos específicos.

4.2 Objetivo Geral

Identificar espécies vegetais da Mata Atlântica Mineira com potencial antitumoral.

4.3 Objetivos específicos

- a) Obter extratos brutos etanólicos das folhas de espécies vegetais coletadas na região do sul de Minas Gerais;
- b) Avaliar as atividades antiproliferativas dos extratos obtidos e selecionar o mais promissor;
- c) Fracionar o extrato bruto etanólico que apresentar melhor atividade antitumoral;
- d) Avaliar o potencial antitumoral do extrato bruto etanólico e suas frações: hidroalcolica, acetato de etila e hexânica;
- e) Isolamento e caracterização de substâncias com potencial antitumoral.

5 METODOLOGIA

A metodologia do trabalho envolve as partes químicas e biológicas desenvolvidas sinergicamente.

5.1 Coleta do material vegetal

Foram selecionadas e coletadas nove espécies diferentes da Mata Atlântica Remanescente na região Sul de Minas Gerais nas proximidades do município de Alfenas. O material coletado foi depositado no herbário e identificado por um profissional capacitado.

5.2 Preparo do Extrato Bruto Etanólico

Para o preparo do extrato bruto foram necessárias três etapas: secagem, moagem e maceração/remaceração. A secagem foi feita por 72 horas em estufa a 60 °C. As folhas secas foram moídas e trituradas por um moinho de facas. Depois todo o material vegetal ficou submerso em etanol P.A por sete dias (maceração), sendo que a cada dia o solvente era trocado (remaceração) para garantir uma melhor extração das substâncias. Por último todo o solvente foi rotaevaporado e obtiveram-se dez extratos brutos de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Extratos brutos obtidos das espécies vegetais coletadas.

Extrato Bruto	Família	Espécie
1	Annonaceae	<i>Duguetia lanceolata</i>
2	Meliaceae	<i>Trichilia emarginata</i>
3	Melastomaceae	<i>Miconia willdenoii</i>
4	Sapindaceae	<i>Allophylus racemosus</i> (folhas)
5	Sapindaceae	<i>Allophylus racemosus</i> (galhos)
6	Rutaceae	<i>Metrodorea stipularis</i>
7	Monimiaceae	<i>Mollinedia widgrenii</i>
8	Flacourtiaceae	<i>Casearia Arborea</i>
9	Fabaceae	<i>Acacia polyphylla</i>
10	Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>

Fonte: O AUTOR (2016)

5.3 Teste de viabilidade celular dos extratos brutos

Os estudos relacionados à atividade antitumoral dos extratos brutos etanólicos foram realizados no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) sob orientação da Profa. Dra. Marisa Ionta.

Os testes foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos de acordo com a Tabela 3. As linhagens A549 e HepG2 foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro. As linhagens MCF-7 e HT144 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli (Instituto de Ciências Biomédicas, USP/SP); enquanto a linhagem U251MG foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira (Instituto de Ciências da Natureza/UNIFAL-MG). As culturas foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, EUA) suplementado com 1 % de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil) com temperatura (37°C) e atmosfera controlada (95% de ar e 5 % de CO₂).

Tabela 3 - Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios *in vitro*.

Sigla	Nome
A549	adenocarcinoma pulmonar
MCF7	adenocarcinoma mamário
HepG2	hepatocarcinoma
U251 MG	glioblastoma
HT144	melanoma

Fonte: O AUTOR (2016)

As células foram semeadas em placas de 96 poços (inóculo de 1×10^4 células/poço). Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48h com os dez extratos brutos diferentes. Os extratos brutos foram solubilizados em DMSO para a obtenção da solução-estoque (20 mg.mL^{-1}).

Inicialmente, os dez extratos brutos etanólicos a uma concentração de $40 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a observação do perfil de atividade dos mesmos (*screening*). Depois foi realizada curva dose-resposta do extrato mais ativo. Diferentes concentrações ($5 - 40 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram testadas sobre as linhagens A549, HT144, HepG2 e U251 MG. A concentração final de DMSO não ultrapassou 5 % (v/v) e não alterou a viabilidade celular

que foi determinada por MTS. Os experimentos foram conduzidos em triplicadas e os valores de IC_{50} (*Inhibitory concentration*) foram calculados por curvas de regressão utilizando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico (MTS) utilizando o Kit CellTiter 96™ da Promega®. Este ensaio é baseado na conversão do sal tetrazólio (amarelo) em formazano (púrpura) via enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas (Figuras 5 e 6). O formazano produzido apresenta um padrão de coloração que é detectado em leitor de placa de ELISA a 490 nm. A taxa de absorbância é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os valores de absorbância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância das amostras que não expostas ao composto estudado. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os valores de IC_{50} (*Inhibitory concentration*) foram calculados usando GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

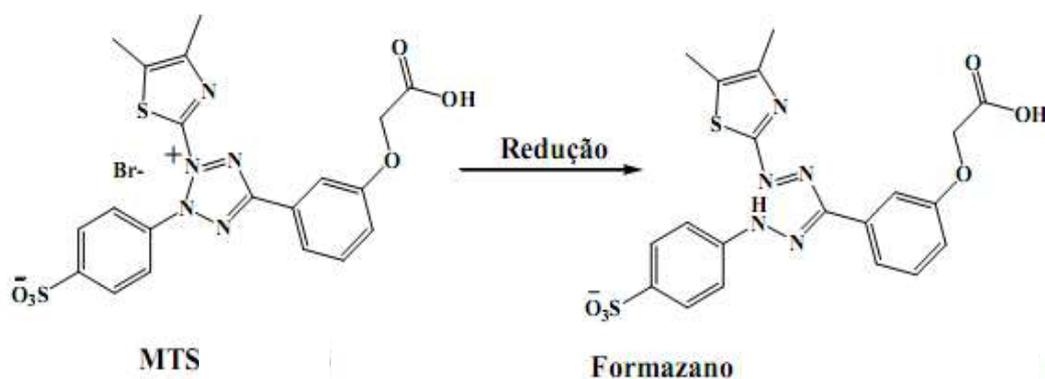


Figura 5- Conversão enzimática do sal tetrazólio (MTS) em formazano.

Fonte: O AUTOR (2016)

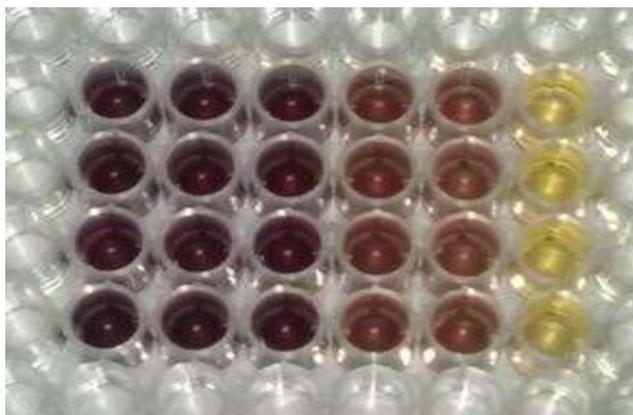


Figura 6- Imagem do Ensaio Colorimétrico MTS.

Fonte: O AUTOR (2016)

5.4 Particionamento do Extrato Bruto Etanólico

Dentre os dez extratos brutos estudados, o que apresentou atividade antitumoral satisfatória foi submetido ao particionamento (Figura 7 e 8) por meio da extração líquido-líquido com o objetivo de separar substâncias com polaridades semelhantes. Inicialmente o extrato bruto etanólico foi solubilizado em 150 mL de etanol P.A e 300 mL de água destilada formando assim a fração hidroalcolólica. Ao final do procedimento todas as frações foram rotaevaporadas e armazenadas de forma adequada para evitar sua degradação.



Figura 7- Fluxograma representativo do particionamento do extrato bruto etanólico.

Fonte: O AUTOR (2016)



Figura 8- Imagem do particionamento

Fonte: O AUTOR (2016)

5.5 Teste de viabilidade Celular das Frações obtidas

Os diferentes tipos de células (A549, HT144, HepG2 e U251 MG) foram semeadas em placas de 96 poços (inóculo de 1×10^4 células/poço). Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48h em diferentes concentrações (5 – 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) das frações hidroalcolica, acetato de etila e hexânica.

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico (MTS) utilizando o Kit CellTiter 96TM da Promega®. A concentração final de DMSO não ultrapassou, 5 % (v/v) e não alterou a viabilidade celular que foi determinada por MTS. Os experimentos foram conduzidos em triplicadas e os valores de IC_{50} (*Inhibitory concentration*) foram calculados por curvas de regressão utilizando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5.6 Cromatografia em Coluna

Com o objetivo de isolar grupos menores de substâncias com polaridades próximas foi feita uma cromatografia em coluna da fração que apresentou o resultado mais responsivo na viabilidade celular. Dessa maneira utilizou-se uma coluna de vidro de 35 cm de comprimento e 40 mm de diâmetro interno, que foi empacotada com 14 cm de sílica *flash* (40-60 μm). Regulou-se o fluxo do solvente em 5cm/min e foram coletados frascos com 30 mL cada. A massa da fração utilizada para fazer a pastilha foi de 3,0 g. O gradiente de solvente escolhido foi: 6:4 (hexano:acetato de etila), 3:7 (hexano:acetato de etila), 100 % acetato de etila e por último 100% de etanol.



Figura 9 - Imagem da Cromatografia em Coluna

Fonte: O AUTOR (2016)

5.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato bruto etanólico da *Casearia sylvestris* foi injetado no CLAE-DAD, na coluna analítica C18. O volume de injeção foi de 20 μL e o fluxo regulado para 1mL/min. O método escolhido foi gradiente de 70 a 100% de acetonitrila (ACN) por 10 minutos e isocrático 100% ACN até 30 minutos.

A fração acetato de etila também foi injetada no CLAE-DAD com o mesmo método escolhido, para analisar o perfil cromatográfico.

Na sequência, a sub-fração com maior massa foi injetada no CLAE-DAD com o mesmo método analítico desenvolvido, para depois ser injetada na coluna C18 preparativa com o objetivo de isolar uma substância pura.

A substância isolada foi injetada ao CLAE-MS, na coluna semi-micro C18 com o objetivo de identificar a possível estrutura. O volume de injeção foi de 5 μL e o fluxo regulado para 0,3 mL/min. O método escolhido foi gradiente de 5 a 100% de ACN por 28 min.

5.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C e ^1H) a 300 MHz da substância isolada da fração acetato de etila foram obtidos em espectrômetro Bruker. O solvente utilizado foi piridina deuterada.

5.9 Infravermelho (IV)

A substância isolada foi submetida ao Infravermelho para avaliação dos grupos funcionais presentes na molécula.

5.10 Ensaio de capacidade clonogênica

Células das linhagens A549 e HepG2 foram semeadas (inóculo de 500 células/placa) em placas de Petri com 35mm de diâmetro, de forma que 24h após o plaqueamento as culturas exibam células aderidas, porém isoladas. Após tratadas por 24 horas com a substância isolada nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, as células foram mantidas em meio fresco por mais 15 dias em estufa a 37°C, contendo 5% de CO_2 . Após o período de incubação as células foram lavadas com PBSA, fixadas por 30 minutos com Metanol P.A (Sigma Aldrich LTDA, Brasil), deixadas até completa secagem e coradas com Cristal Violeta 1% por 5 minutos, sendo lavadas em seguida com água destilada. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de lupa.

5.11 Quantificação de DNA por citometria de fluxo

As células foram coletadas por digestão enzimática e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm) e na sequência as células foram fixadas com etanol gelado (70% em PBSA-Tampão fosfato-salino) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células serão coradas por 1 hora em uma solução

contendo PBSA, RNase (10 mg/mL) e Iodeto de Propídio (30 mg/mL). As amostras serão analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, GE).

5.12 Ensaio de *Western blotting*

Western blotting (WB) também conhecido como protein blotting ou immunoblotting, é um poderoso e importante método em biologia molecular utilizado para imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

As células foram homogeneizadas em tampão de RIPA (NaCl 150 mM, 1,0% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato, 0,1% de SDS e 50 mM de Tris pH 8,0) contendo ambos os inibidores de fosfatase (Sigma) e protease. Os lisados foram centrifugados (10000 x g) durante 10 min a 4 ° C. Os sobrenadantes foram recuperados, as proteínas totais foram quantificados (kit BCA, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EUA) e ressuspensas em tampão de amostra de Laemmli contendo 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2- mercaptoetanol e 0,001% de azul de bromofenol. Uma alíquota de 50 ug de proteína foi separada por SDS-PAGE (12%) e transferida (100 V, 250 mA durante 2 horas) sobre uma membrana de PVDF (Amersham Bioscience). O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com solução contendo de leite desnatado (5%) em TBS (Tris-buffered saline) e Tween-20. Os anticorpos primários utilizados foram: ERK fosforilada (Tyr204) (Santa Cruz-- 01:50), ERK 1 (Santa Cruz-- 1: 1000), ciclina D1 (Sigma - 1: 2) e α -tubulina (sigma-1: 1000), os quais ficaram em contato com a membrana por 12 horas a 4 ° C. Após a lavagem com TBS-Tween, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado a peroxidase) durante 2 h à temperatura ambiente. Bandas imunorreactivas foram visualizadas com o kit de detecção por quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. A quantificação das bandas imunorreactivas foi realizada utilizando um programa público (Image J).

5.13 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm do desvio padrão. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e reproduzidos por mais 2 vezes (triplicatas biológicas). Diferenças significativas foram determinadas de acordo com o ANOVA e pós-teste de Tukey usando o GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como resultado do trabalho foi isolada a casearina D do extrato bruto etanólico da *Casearia sylvestris* por meio de testes antitumorais bioguiados.

6.1 Coleta do Material Vegetal

Segue abaixo a Tabela 4 com os dados das exsicatas depositadas no herbário da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Tabela 4 - Exsicatas depositadas no herbário da UNIFAL-MG. (continua)

Família	Espécie	Número da exsicata
		Nº 1864 - Coletada em Alfenas - Fazenda Sr. Emanuel
		Nº 1915
Fabaceae	<i>Acacia polyphylla</i>	Nº 2001 - Coletada em Pouso Alegre
		Nº 2149 - Coletada em Alfenas no Jequitibá
		Nº 2478 - Coletada Pousada do Porto
Sapindaceae	<i>Allophylus racemosus</i>	Nº 2628 - Coletada no Frgamento M
Salicaceae	<i>Casearia arborea</i>	Nº 1775
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	Nº 2324
Annonaceae	<i>Duguetia lanceolata</i>	Nº 2596
Rutaceae	<i>Metrodorea stipularis</i>	Nº 1938

Tabela 4 - Exsicatas depositadas no herbário da UNIFAL-MG. (conclusão)

Família	Espécie	Número da exsicata
<u>Melastomataceae</u>	<i>Miconia willdenowii</i>	Nº 2299
Monimiaceae	<i>Mollinedia widgrenii</i>	Nº 2128
Meliaceae	<i>Trichilia emarginata</i>	Nº 1127

Fonte: O AUTOR (2016)

6.2 Obtenção dos extratos brutos etanólicos

A partir das partes aéreas (galhos e folhas) coletadas das espécies vegetais selecionadas da região sul de Minas Gerais foram obtidos dez extratos brutos etanólicos conforme a metodologia citada na seção 5.2 . Esses extratos estão relacionados na Tabela 5.

Tabela 5 - Extratos brutos etanólicos obtidos.

Extrato Bruto	Espécie	Partes Aéreas	Massa (g)
1	<i>Duguetia lanceolata</i>	folhas	39,1
2	<i>Trichilia emarginata</i>	folhas	30,9
3	<i>Miconia willdenoii</i>	folhas	41,4
4	<i>Allophylus racemosus</i>	folhas	14,2
5	<i>Allophylus racemosus</i>	galhos	4,0
6	<i>Metrodorea stipularis</i>	folhas	207,3
7	<i>Mollinedia widgrenii</i>	folhas	9,4
8	<i>Casearia Arborea</i>	folhas	7,2
9	<i>Acacia polyphylla</i>	folhas	11,6
10	<i>Casearia sylvestris</i>	folhas	11,1

Fonte: O AUTOR (2016)

6.3 Teste de Viabilidade Celular dos extratos brutos obtidos

Os dez extratos foram testados em cinco linhagens celulares derivadas de tumores humanos (A549, MCF7, HT144, Hep G2 e U251MG). De acordo com os resultados

apresentados nas figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, o extrato 10 apresentou uma grande atividade citotóxica em relação aos demais extratos. Assim sendo, o extrato bruto etanólico de *C. sylvestris* foi selecionado para dar continuidade aos estudos.

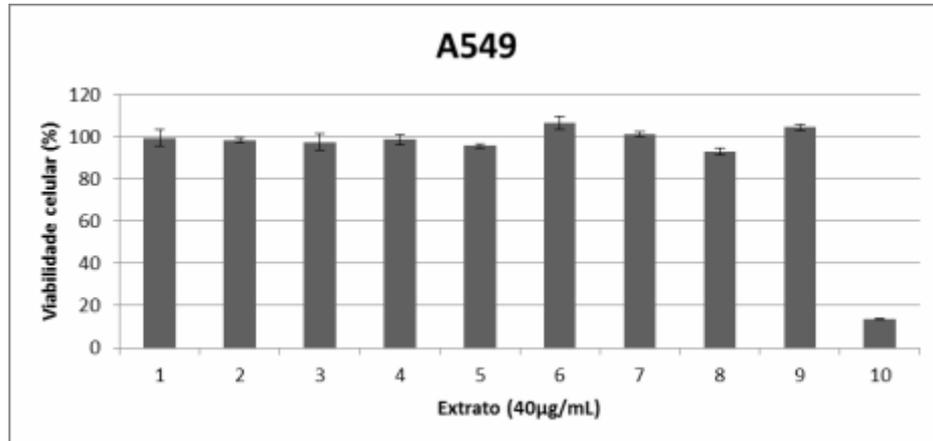


Figura 10 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (A549) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* a 40 µg.mL⁻¹.

Fonte: O AUTOR (2016)

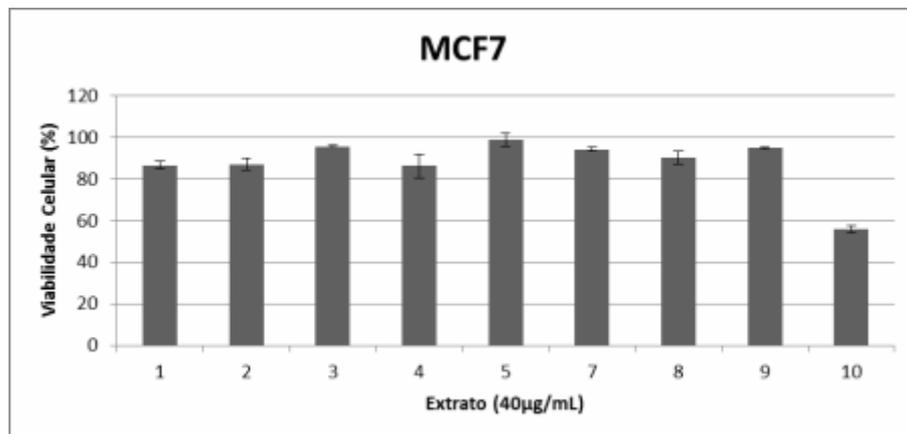


Figura 11 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (MCF7) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* a 40 µg.mL⁻¹.

Fonte: O AUTOR (2016)

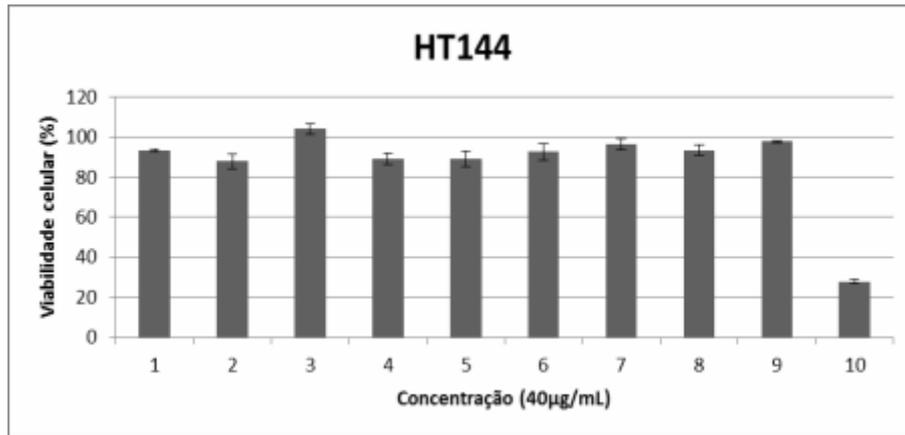


Figura 12 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HT144) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* a $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O AUTOR (2016)

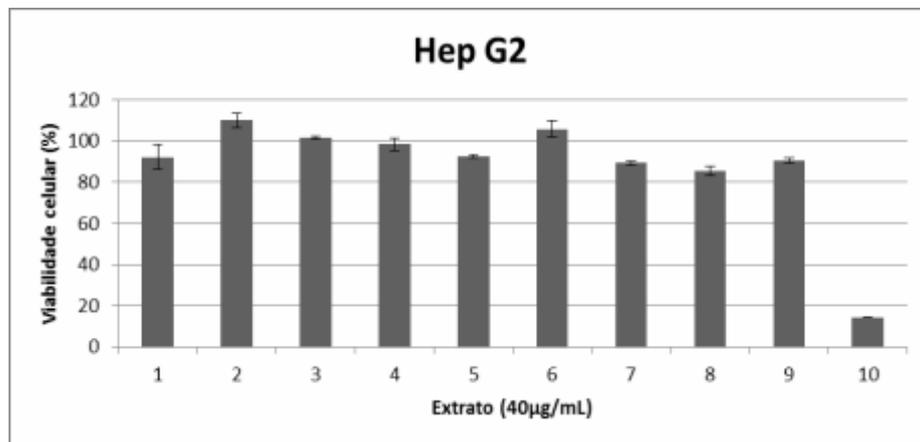


Figura 13 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HepG2) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* a $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O AUTOR (2016)

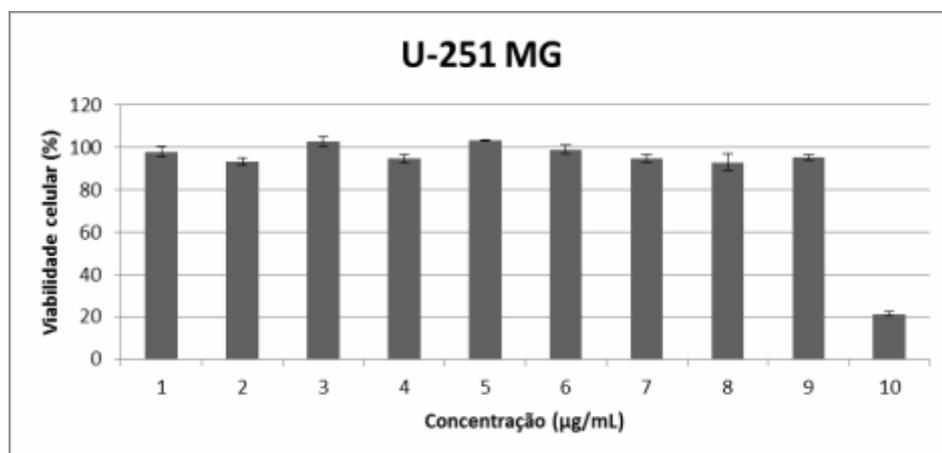


Figura 14 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (U251 MG) tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* a $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O AUTOR (2016)

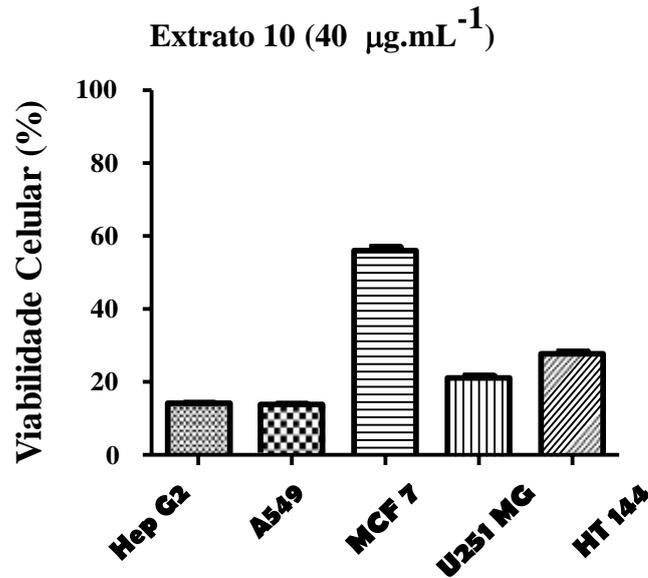


Figura 15 - Viabilidade celular determinada a partir do ensaio de MTS em diferentes linhagens celulares derivadas de tumores humanos. HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (carcinoma de pulmão), MCF7 (carcinoma de mama), U251-MG (glioblastoma) e HT144 (melanoma). Extrato 10 corresponde ao extrato bruto etanólico das folhas de *Casearia sylvestris*.

Fonte: O AUTOR (2016)

Analisando a atividade do extrato 10 frente às cinco linhagens, pode-se observar que nas seguintes linhagens: A549, HepG2, HT144 e U251MG foram as mais responsivas ao tratamento. Dessa forma, curvas dose-respostas foram feitas para a determinação do IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento) de acordo com a figura 16.

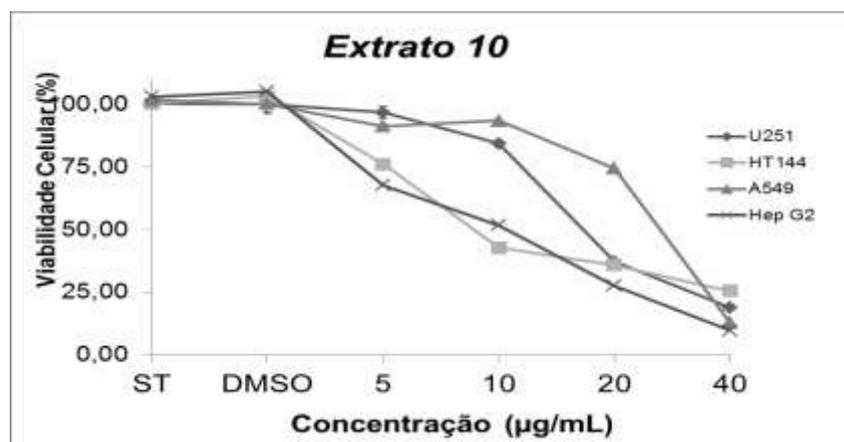


Figura 16 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células de diferentes linhagens tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* em diferentes concentrações por 48 horas.

Fonte: O AUTOR (2016)

Os resultados mostraram que as linhagens HT144, HepG2 e U251MG apresentam considerável redução na viabilidade celular. De acordo com a tabela 6 a linhagem celular que apresentou menor IC₅₀ foi a Hep G2, seguido da HT144, U-251 MG e A549.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ das amostras tratadas com Extrato de *C. sylvestris* (µg/mL).

	U251MG	HT144	A549	HepG2
<i>C.Sylvestris</i>	17,78 ± 0,76	10,96 ± 1,04	25,63 ± 0,90	9,94 ± 0,35
Cisplatina	9,54 ± 0,84	9,63 ± 0,66	6,52 ± 0,57	7,50 ± 0,52

Cisplatina foi utilizada como controle positivo

Fonte: O AUTOR (2016)

Sendo assim, foram escolhidas as linhagens HepG2 e A549 para dar sequência nos estudos.

6.4 Particionamento do extrato bruto de *Casearia sylvestris*

De acordo com os testes de citotoxicidade. O extrato bruto etanólico de *C. sylvestris* (extrato 10), apresentou maior atividade frente às cinco linhagens tumorais e, portanto, foi selecionado para o particionamento por extração líquido- líquido descrita na seção 5.4. Dessa forma, foi possível agrupar substâncias com polaridades semelhantes (de baixa a alta polaridade) e facilitar o isolamento de substâncias bioativas. As frações foram submetidas à novos testes com o objetivo de identificar a fração mais enriquecida com substâncias ativas frente as células tumorais A549, Hep G2, HT144 e U251 MG. Segue os dados das frações obtidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Massa das frações obtidas do extrato bruto da *C. sylvestris*.

Frações	Massa (g)
Hidroalcolica	1,7
Acetato	3,0
Hexânica	6,4

Fonte: O AUTOR (2016)

6.5 Teste de Viabilidade Celular das Frações obtidas

O extrato bruto etanólico de *C. sylvestris* foi particionado como descrito na seção 5.1.3 e obteve-se três frações (hidroalcoólica, acetato de etila e hexânica), essas frações foram testadas com o objetivo de se investigar qual grupo que apresentava possíveis substâncias com atividade antitumoral que poderiam ser isoladas posteriormente. Então foram submetidas a um teste de viabilidade celular nas mesmas concentrações testadas com o extrato bruto etanólico (5 a 40 $\mu\text{g/mL}$) para que pudesse ser traçada a curva dose-resposta, onde se observa que quanto maior a concentração das frações, maior será a inibição frente às células tumorais. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTS como descrito na seção 5.2.4 e o IC_{50} calculado pelo software GraphPad Prism®. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 17, 18, 19 e 20.

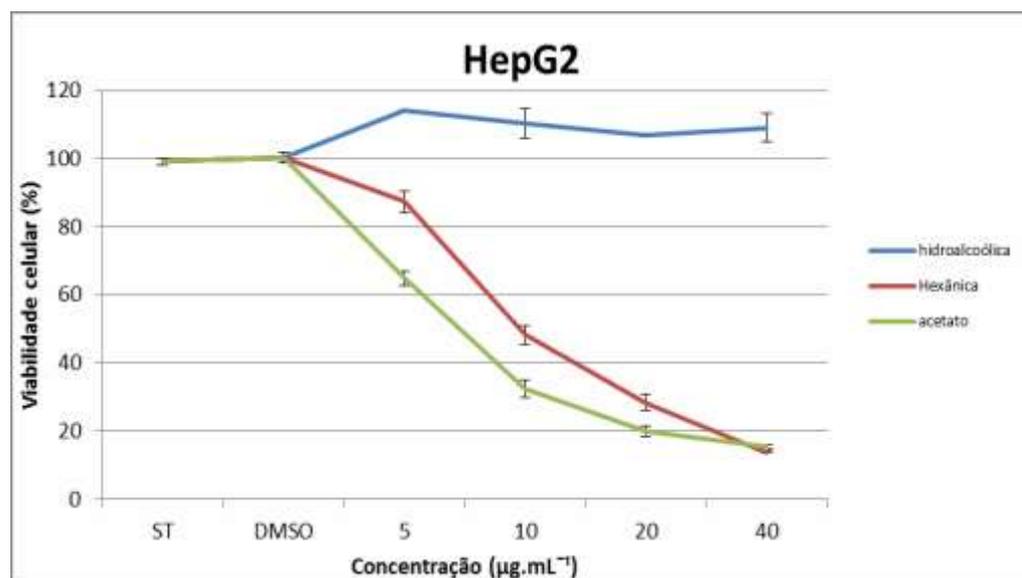


Figura 17 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HepG2) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* em diferentes concentrações por 48 horas.

Fonte: O AUTOR (2016)

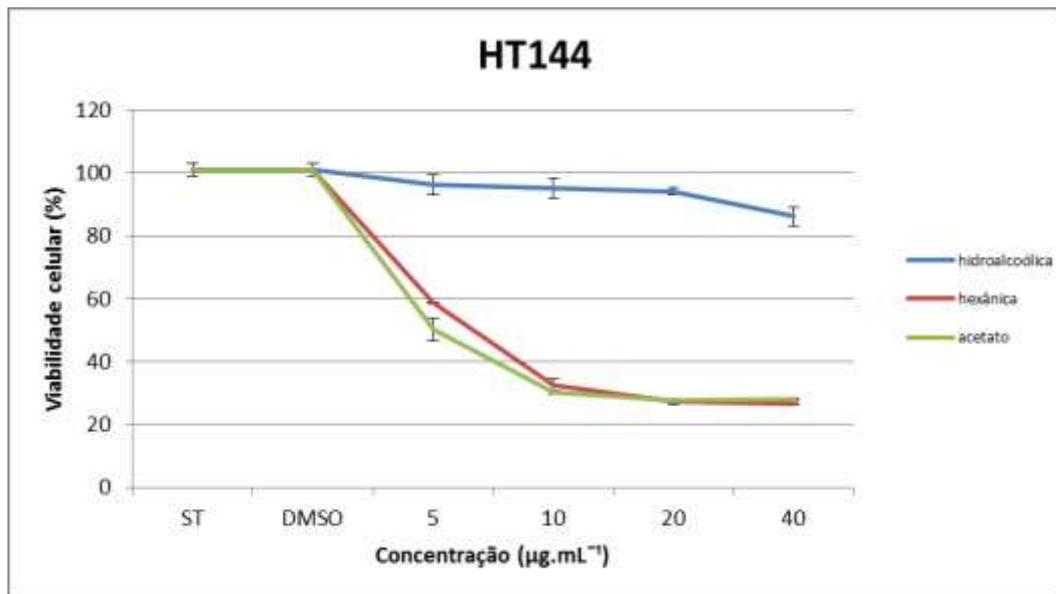


Figura 18 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (HT144) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* em diferentes concentrações por 48 horas.

Fonte: O AUTOR (2016)

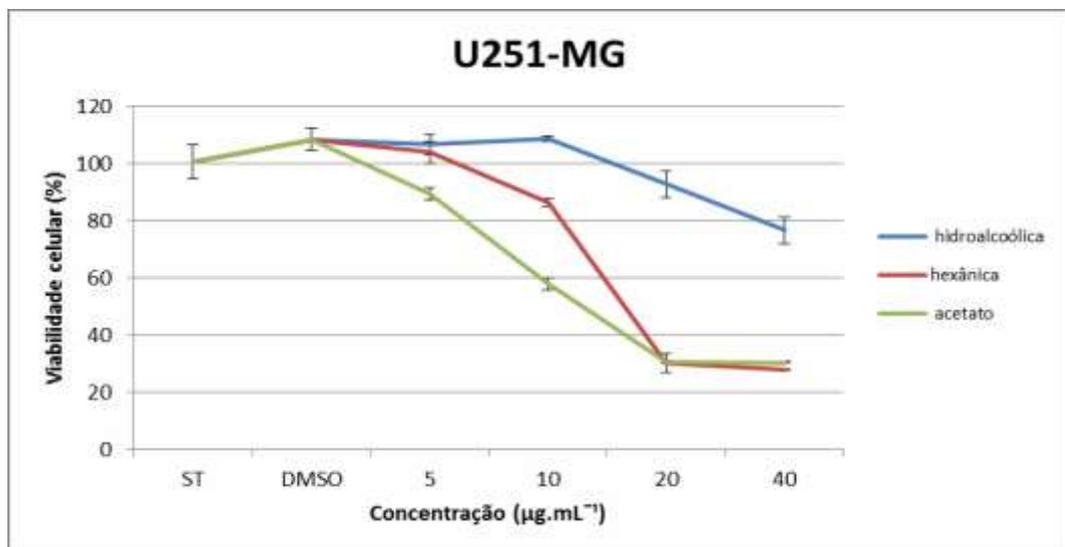


Figura 19 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (U251MG) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* em diferentes concentrações por 48 horas.

Fonte: O AUTOR (2016)

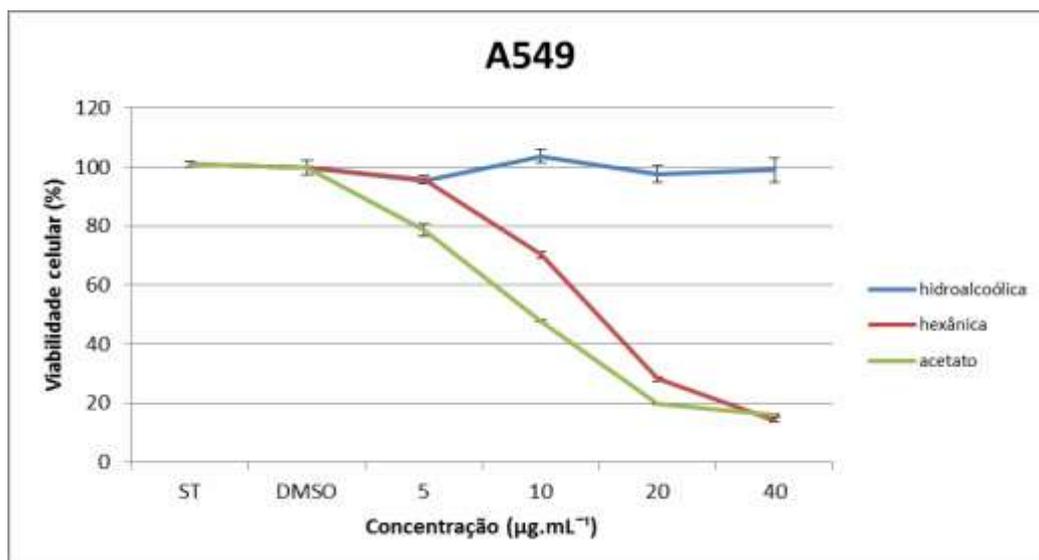


Figura 20 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (A549) tratadas com as frações obtidas do extrato bruto etanólico das folhas de *C. sylvestris* em diferentes concentrações por 48 horas.

Fonte: O AUTOR (2016)

Analisando a Tabela 8, que traz os valores IC_{50} para cada fração testada, pode-se observar que a fração mais responsiva foi a acetato de etila (média polaridade), a qual será selecionada para o isolamento de moléculas bioativas por meio do método de Coluna Cromatográfica e, posteriormente Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os ensaios biomonitorados facilitam e auxiliam no isolamento dessas moléculas, mas não podemos dispensar as técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

Tabela 8 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) determinados a partir dos resultados obtidos por MTS.

Fração	U251-MG	Hep G2	HT 144	A549
Hidroalcoólica	> 40,00	> 40,00	> 40,00	> 40,00
Acetato	14,47±1,36	6,97±0,48	3,35±1,05	10,11±0,57
Hexânica	17,56±1,68	11,48±0,63	5,92±0,97	14,37±0,47

Fonte: O AUTOR (2016)

6.6 Coluna Cromatográfica da Fração Acetato de Etila

A fração acetato de etila do extrato bruto de *C. sylvestris* apresentou resultado satisfatório nos ensaios antitumorais. Sendo assim, passou por um processo de separação em

coluna cromatográfica do tipo *Flash* descrito na seção 5.6 a fim de isolar substâncias de interesse ou grupos menores de substâncias que posteriormente poderiam ser isoladas, identificadas e testadas novamente. Foram obtidas 23 frações (E1-E23) a partir da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e revelação em luz UV de 254 e 365 nm, as quais estão relacionadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Massa das subfrações obtidas da coluna (F. acetato).

Subfrações	Massa (mg)
E1	205,1
E2	122,3
E3	115,9
E4	65,8
E5	71,3
E6	54,9
E7	27,1
E8	24,0
E9	150,8
E10	35,7
E11	65,8
E12	34,2
E13	23,5
E14	114,2
E15	239,0
E16	58,9
E17	12,9
E18	32,1
E19	45,6
E20	19,5
E21	12,4
E22	11,8
E23	12,4

Fonte: O AUTOR (2016)

6.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato bruto etanólico da *Casearia sylvestris* foi injetado no CLAE-DAD no método analítico, conforme descrito na seção 5.7 para analisar o perfil cromatográfico. A figura 21 representa o perfil cromatográfico do extrato bruto de *C. sylvestris*, onde pode-se observar que os picos dos cromatogramas (Figuras 22) estão concentrados entre 15 e 25 minutos, o que leva a concluir que a maior parte das substâncias presentes no extrato bruto tem de média polaridade.

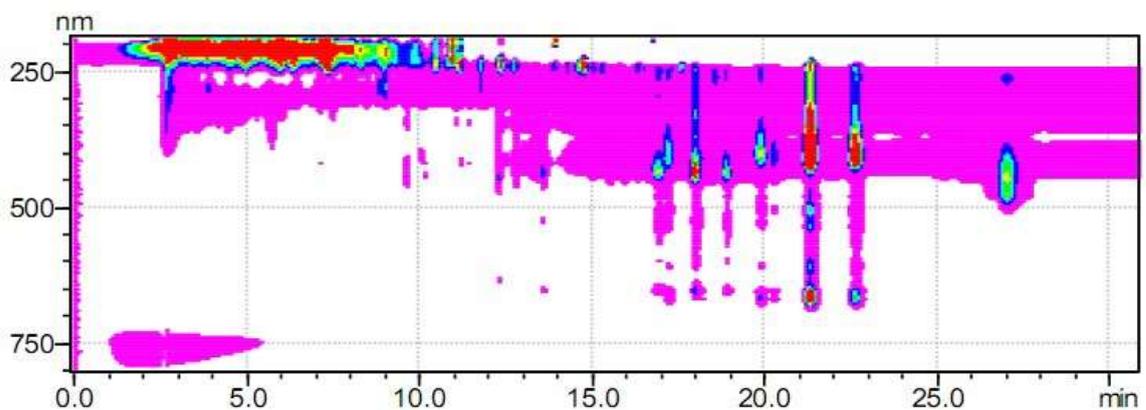


Figura 21 - Perfil Cromatográfico do Extrato Bruto de *Casearia sylvestris*.
Fonte: O AUTOR (2016)

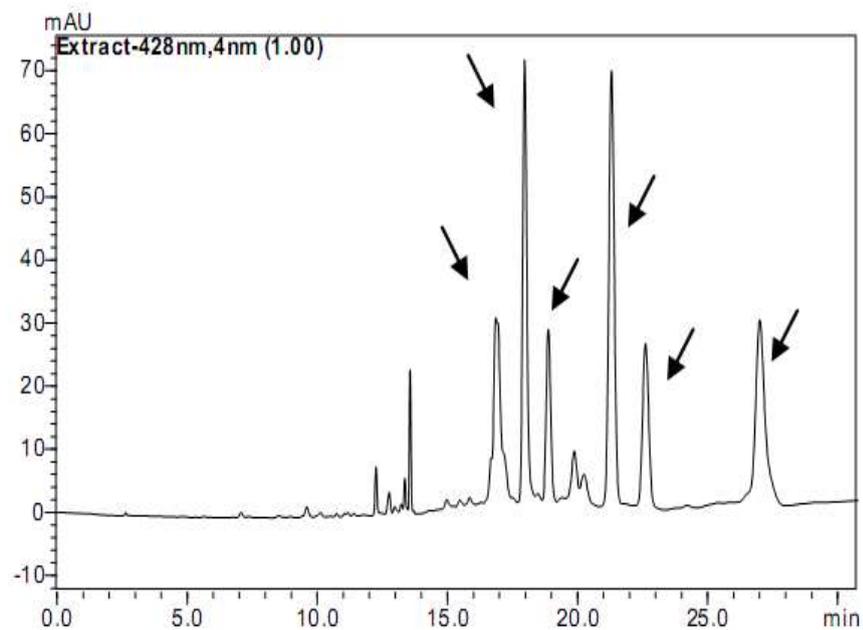


Figura 22 - Perfil Cromatográfico do Extrato Bruto de *Casearia sylvestris*.
Fonte: O AUTOR (2016)

A fração acetato de etila também foi injetada no CLAE no método analítico, conforme descrito na seção 5.7 para avaliar o perfil cromatográfico, e possível isolamento de biomoléculas ativas. A figura 23 representa o cromatograma obtido.

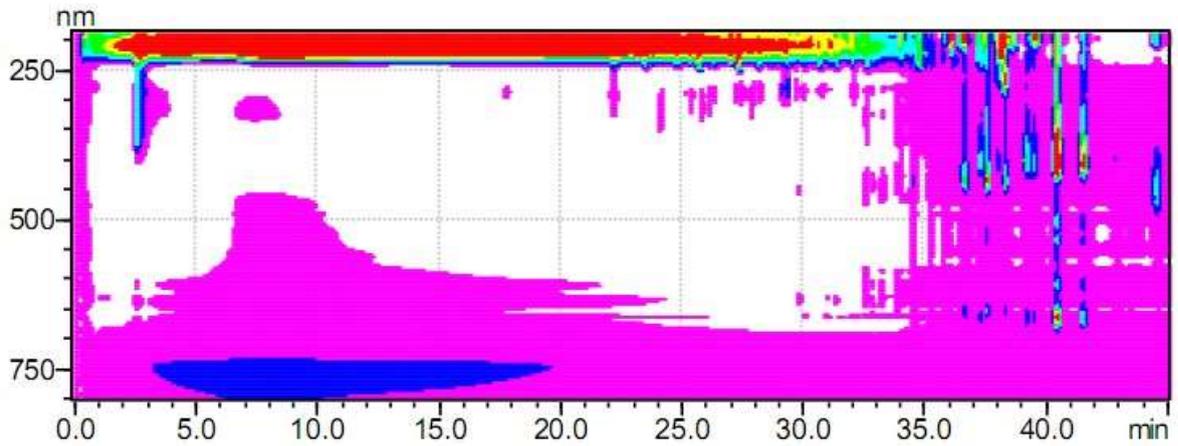


Figura 23 - Perfil Cromatográfico da fração Acetato de Etila obtida do Extrato Bruto de *Casearia sylvestris*.
Fonte: O AUTOR (2016)

De acordo com a literatura (ITOKAWA, 1990) as casearinas apresentam absorção na faixa de 232-235 nm devido ao grupo cromóforo (dienos) nos carbonos C12/C14. Dessa maneira foi selecionado o comprimento de onda de 200 nm para uma avaliação mais eficaz.

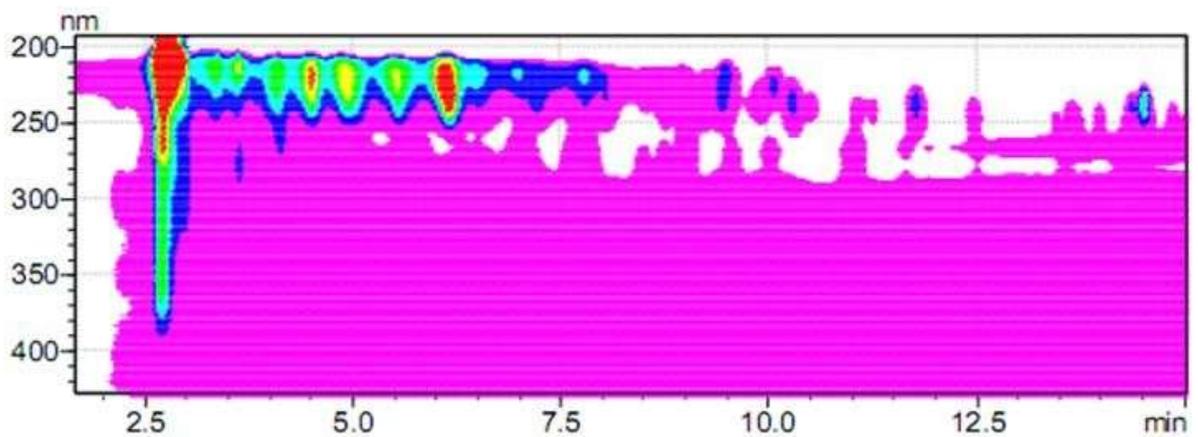


Figura 24 - Perfil Cromatográfico da fração Acetato de Etila obtida do Extrato Bruto de *Casearia sylvestris* em 200 nm.
Fonte: O AUTOR (2016)

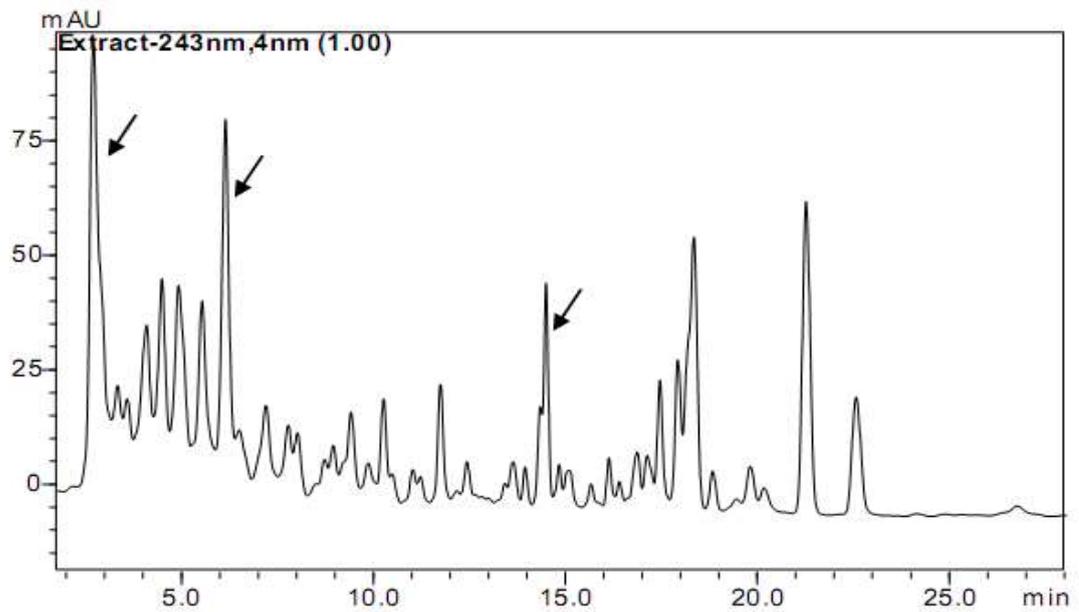


Figura 25 - Perfil Cromatográfico da fração Acetato de Etila obtida do Extrato Bruto de *Casearia sylvestris*.

Fonte: O AUTOR (2016)

A fração acetato de etila foi injetada novamente no CLAE, mas no método preparativo, de modo que fossem isolados os três maiores picos.

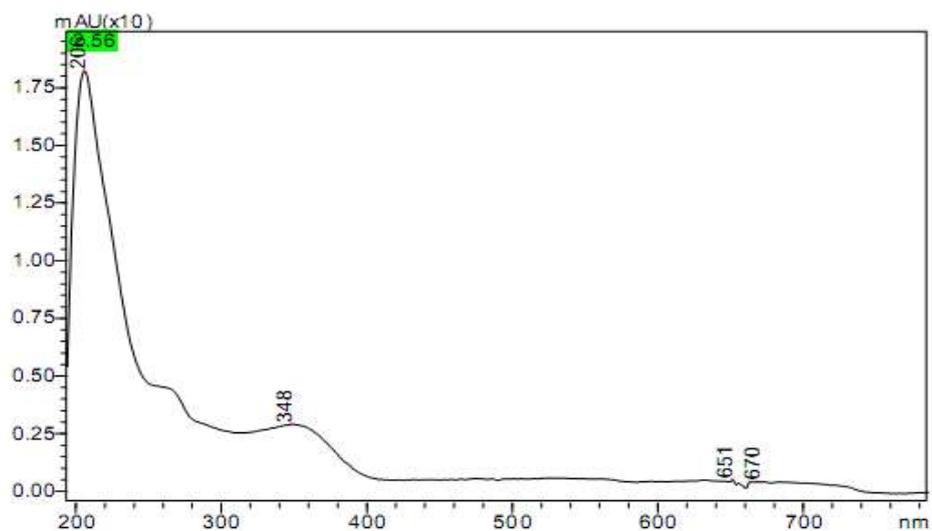


Figura 26 - Curva de absorção do primeiro pico.

Fonte: O AUTOR (2016)

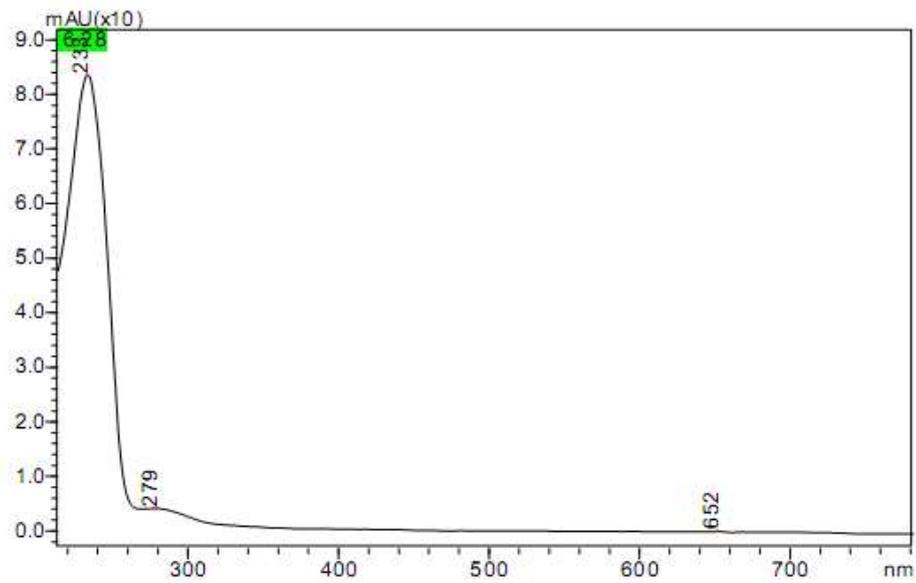


Figura 27 - Curva de absorção do segundo pico.

Fonte: O AUTOR (2016)

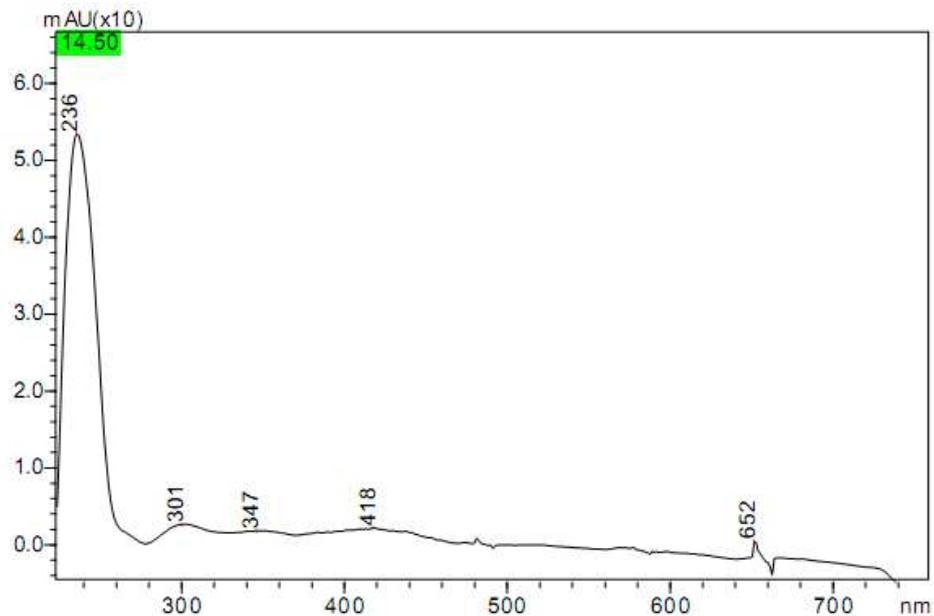


Figura 28 - Curva de absorção do terceiro pico.

Fonte: O AUTOR (2016)

Foi selecionado, para isolamento, o segundo pico com absorção máxima em 233 nm, pois de acordo com Itokawa as casearinas apresentam absorção na faixa de 232-235 nm.

Após o isolamento, a substância foi injetada no CLAE-MS para verificação da massa molecular.

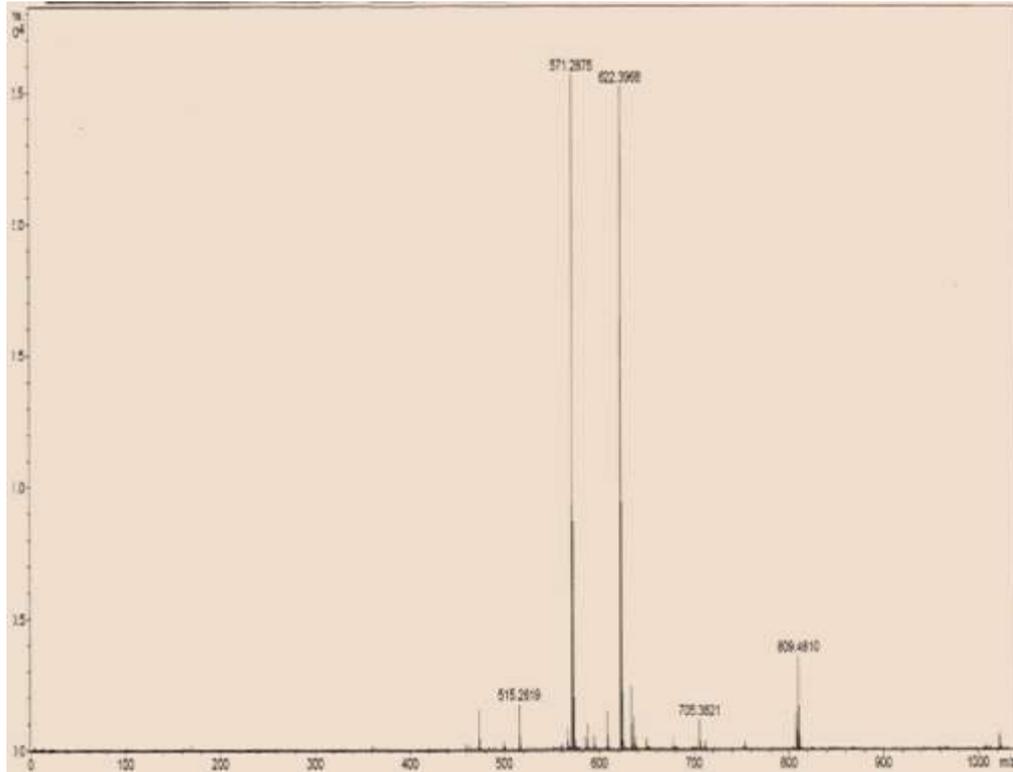


Figura 29 - Espectro de massas de alta resolução da substância isolada.

Fonte: O AUTOR (2016)

O espectro de massas de alta resolução da substância isolada no modo positivo apresentou pico relativo ao íon $[M+Na]^+$ com valor de m/z de 571,2875, confirmando a fórmula molecular da casearina D ($C_{30}H_{44}O_9$).

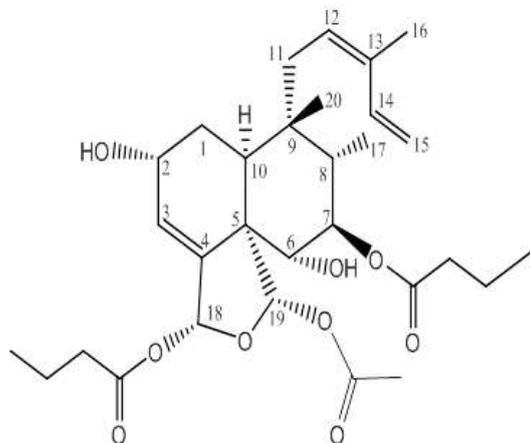


Figura 30 - Fórmula estrutural da casearina D.

Fonte: O AUTOR (2016)

6.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Apenas uma das substâncias isoladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (método preparativo), foi submetida à análise de RMN ^{13}C e ^1H , devido a massa obtida para caracterização da molécula. Seguem os espectros obtidos:

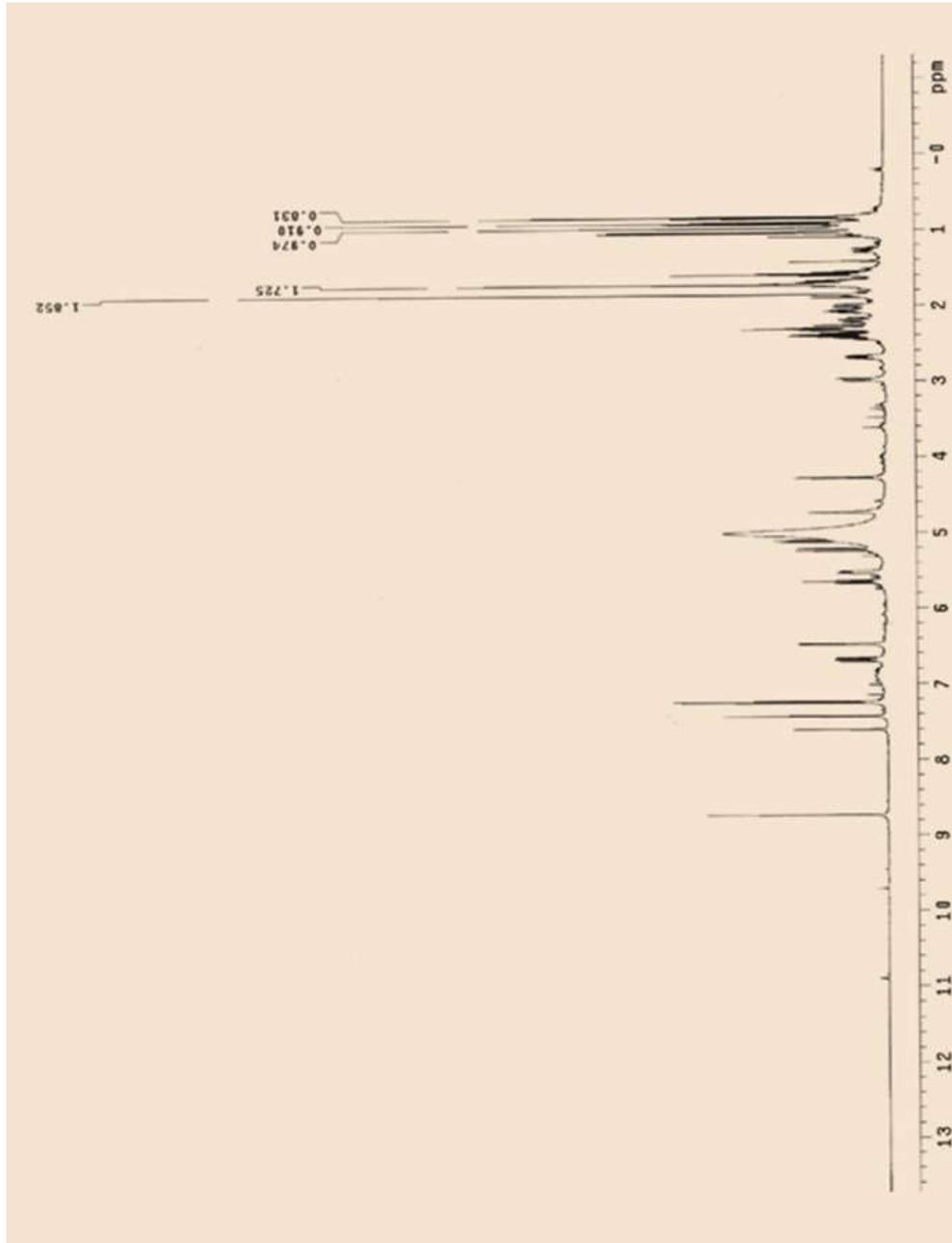


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d₅ a 300 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

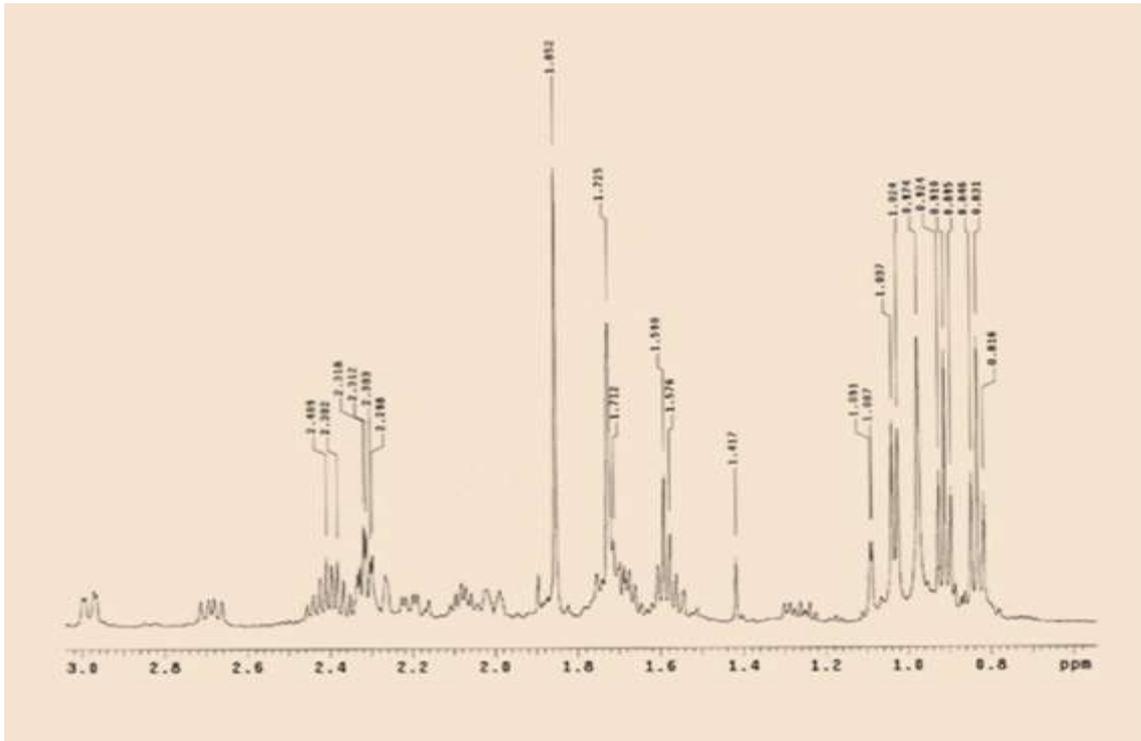


Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d5 obtido a 300 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

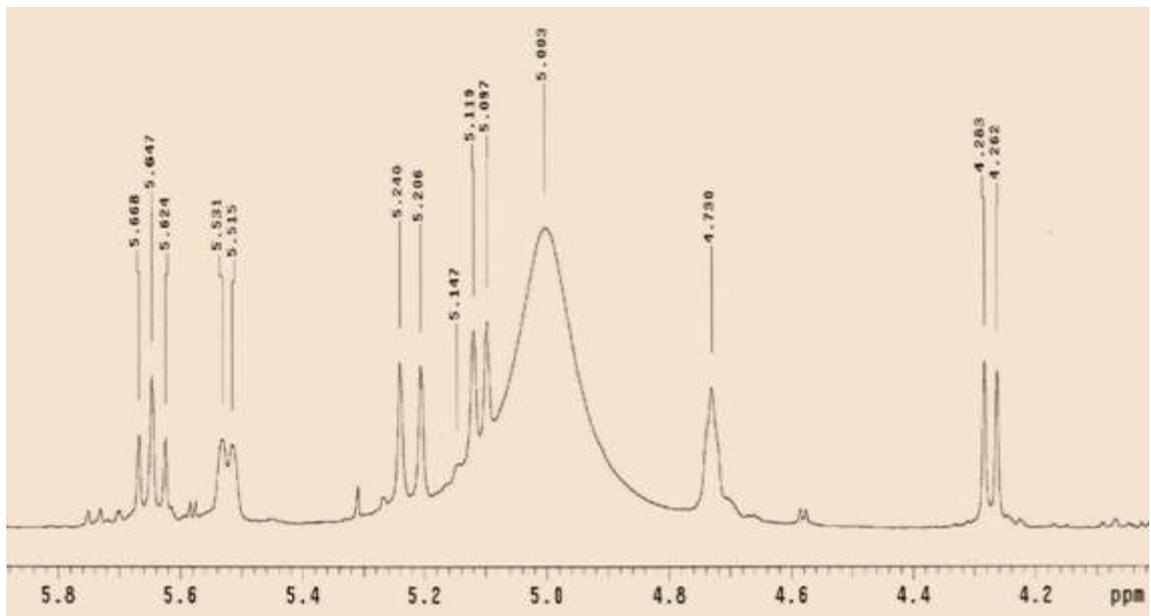


Figura 33 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d5 obtido a 300 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

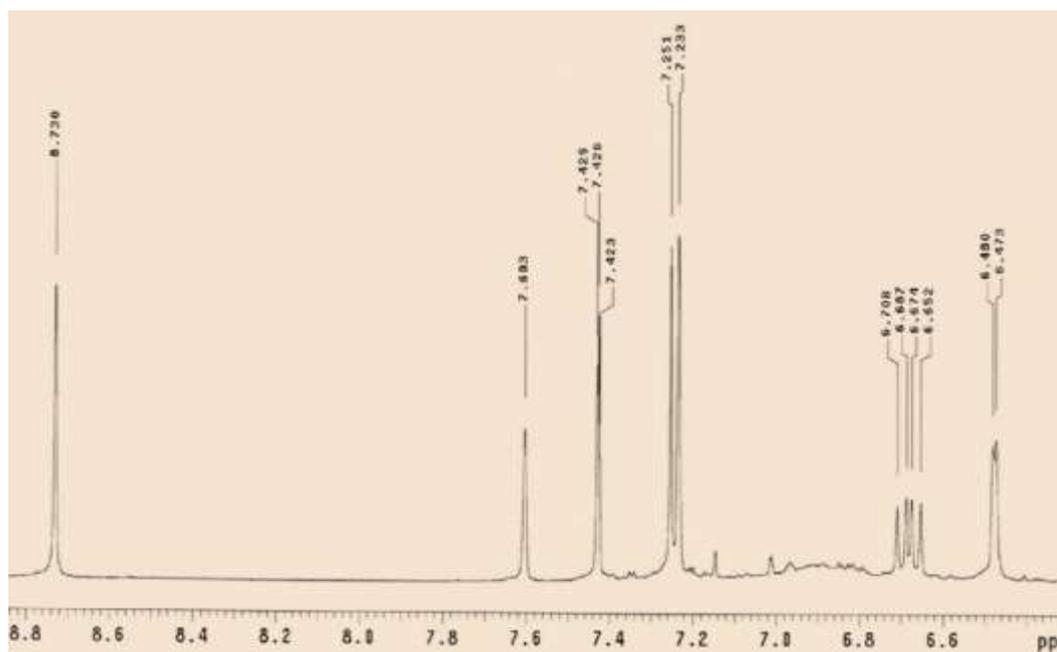


Figura 34 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d₅ obtido a 300 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

Tabela 10 - Deslocamento químico dos hidrogênios.

Carbono	δ ^1H (ppm)	(continua)
		δ ^1H (ppm) Literatura
1	2,20 dd	2,21 dd
2	4,73 sl	4,89 sl
3	6,48 d	6,52 d
6	4,27 d	4,23 d
7	5,65 t	5,89 t
8	nd	Nd
10	2,99 dd	3,16 dd
11	2,01 m e 2,69 dd	.05 m e 2,52 dd
12	5,52 d	5,37 d
14	6,68 dd	6,69 dd
15	5,11 d e 5,22 d	5,12 d e 5,17 d
16	1,73 s	1,78 s

Tabela 10 - Deslocamento químico dos hidrogênios.

Carbono	δ ^1H (ppm)	(conclusão)
		δ ^1H (ppm) Literatura
17	1,03 d	1,15 d
18	7,43 t	7,40 t
19	7,24 s	7,21 s
20	0,97 s	0,95 s

nd = valor não determinado

Fonte: ITOKAWA (1988)

Por meio do espectro de RMN de ^1H pode-se identificar os acoplamentos *cis/trans* dos hidrogênios da ligação dupla terminal monossubstituída (H-15a; δ 5,11 d / H-15b; δ 5,22 d) com o hidrogênio vicinal (H-14; δ 6,68 dd), além de outro sinal atribuído ao hidrogênio da ligação dupla trissubstituída do dieno conjugado (H-12; δ 5,52 d). Os dois hidrogênios em δ 7,24 (s; H-19) e 7,43 (t; H-18) indicaram a existência do sistema diacetálico no anel C.

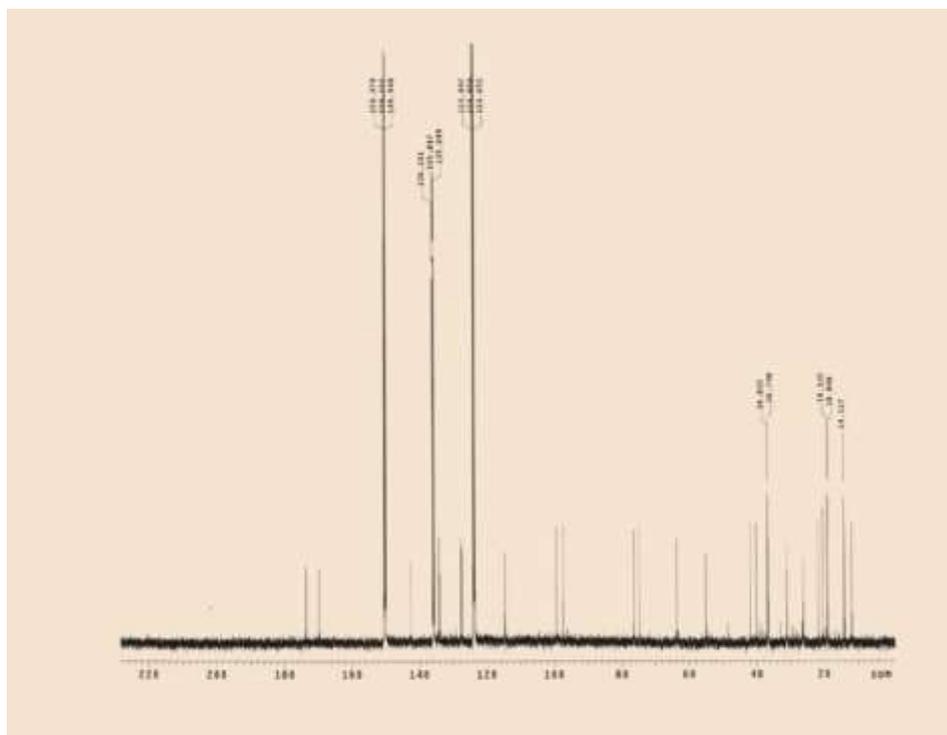


Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina- d_5 a 75 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

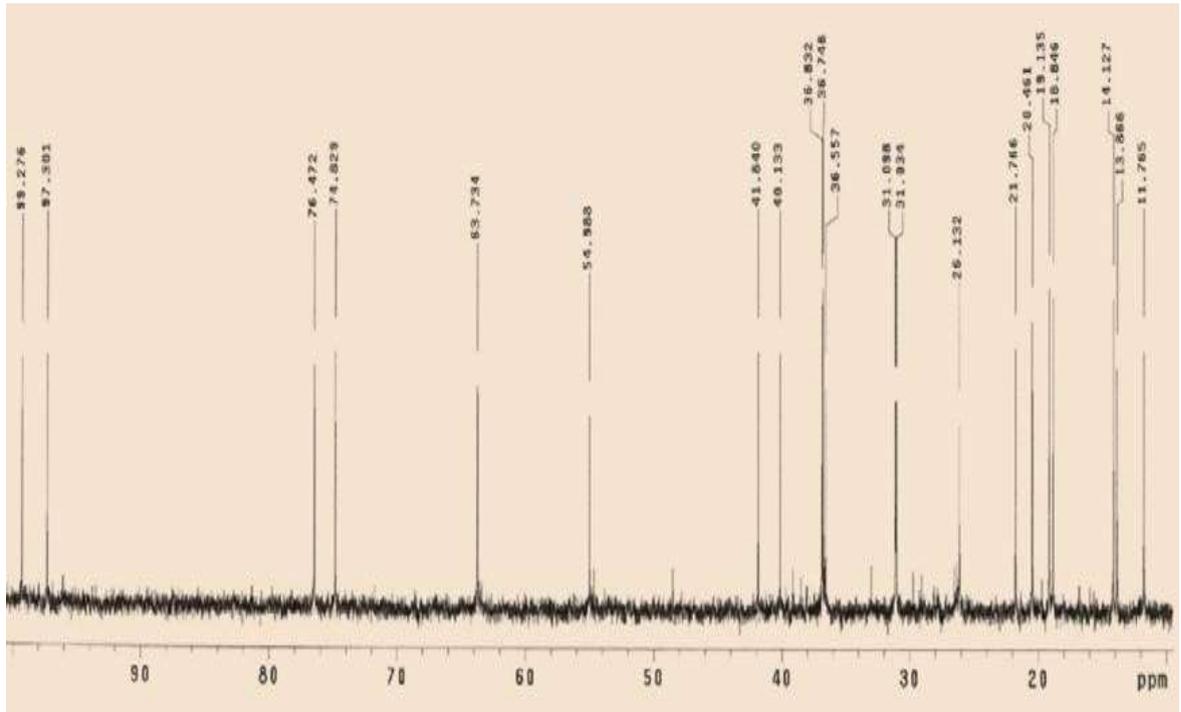


Figura 36 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina-d5 obtido a 75 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

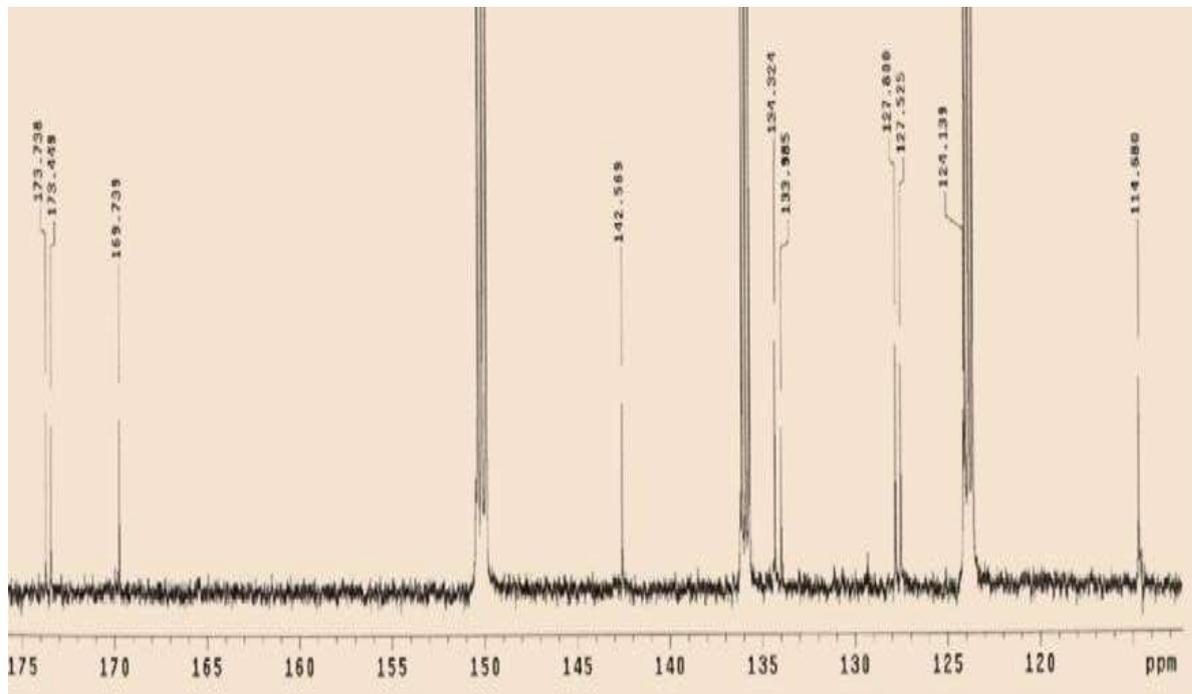


Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina-d5 obtido a 75 MHz.

Fonte: O AUTOR (2016)

Tabela 11 - Deslocamento químico dos carbonos.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Literatura
1	31,1	35,25
2	63,7	62,36
3	127,5	127,42
4	142,6	140,60
5	55,0	53,51
6	74,8	72,99
7	76,5	75,05
8	41,8	42,70
9	40,1	39,20
10	36,6	36,02
11	31,0	30,18
12	127,8	127,30
13	134,3	133,28
14	134,0	133,95
15	114,7	115,00
16	20,5	20,45
17	11,8	11,72
18	97,3	95,88
19	99,3	98,05
20	26,1	25,65

Fonte: ITOKAWA (1988)

O espectro de RMN de ^{13}C desta substância demonstrou, em geral, 29 a 30 sinais, semelhantes aos relatados na literatura (ITOKAWA, 1990). Sendo que a ligação dupla em C-3 e C-4, característica das casearinas, foi observada em δ 127,5 e 142,6 respectivamente.

O deslocamento químico em δ 63,7 (d; C-2) e em δ 74,8 (d; C-6) foi atribuído aos carbonos ligados às hidroxilas.

Os sinais em δ 97,3 (d; C-18) e em δ 99,3 (d; C-19) indicam a existência do anel diacetalico. Já os sinais em δ 169,7; δ 173,5 e δ 173,7 sugerem a presença de grupos acetato e butanoato de etila como substituintes.

6.9 Infravermelho (IV)

O espectro de absorção no IV pôde confirmar os grupos funcionais presentes na molécula da casearina D. Dessa maneira, a banda de absorção em 1.742 cm^{-1} evidenciou a presença dos ésteres (1 grupo acetato e 2 butanoatos) e a banda larga em 3.435 cm^{-1} foi atribuída aos grupos hidroxilas.

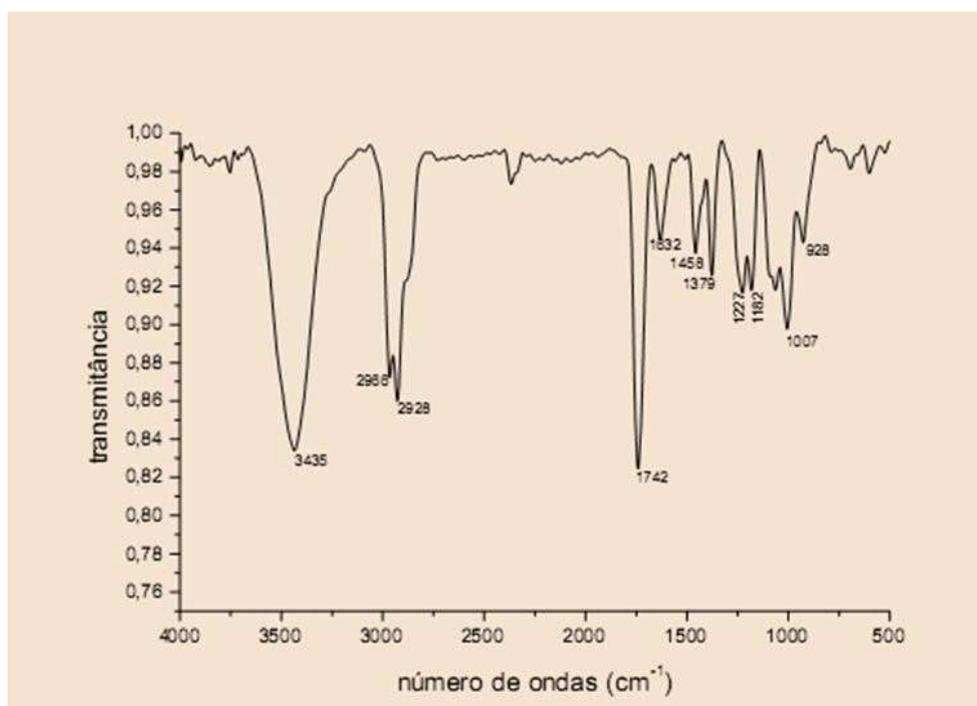


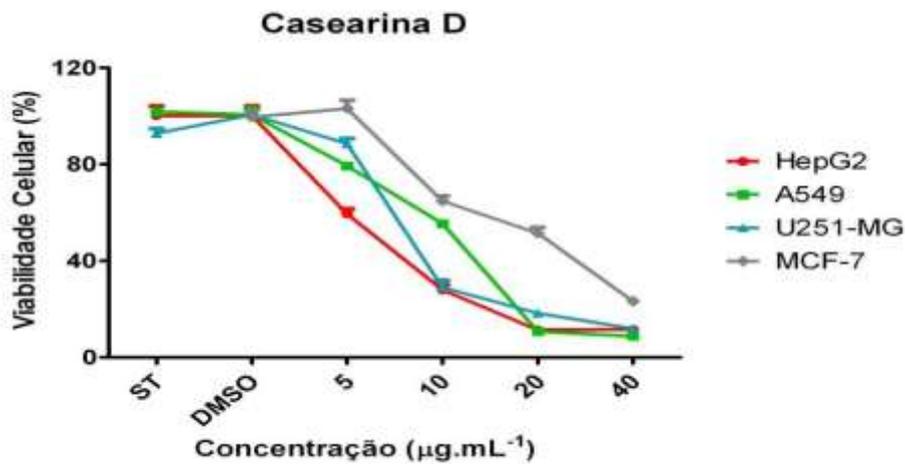
Figura 38 - Espectro de absorção no IV da Casearina D.

Fonte: O AUTOR (2016)

6.10 Teste de Viabilidade Celular da Casearina D

A substância isolada e caracterizada, casearina D, foi submetida aos ensaios de viabilidade celular nas seguintes linhagens celulares: HepG2, A549, U251 MG e MCF7.

Analisando os resultados obtidos, a casearina D demonstrou drástica redução da viabilidade celular por ensaio de MTS (Figura 37). Após 48 horas de tratamento, houve redução de aproximadamente 51 e 82% da viabilidade celular de culturas tratadas com 20 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.



	IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Hep G2	6.04 ± 0.31
A549	10.07 ± 0.44
U251-MG	8.31 ± 0.59
MCF-7	19.24 ± 1.66

Figura 39 - Viabilidade celular (%) determinada por meio do ensaio MTS em culturas de células (A549, HepG2, U251-MG, MCF-7) tratadas com Casearina D em diferentes concentrações por 48 horas.

Fonte: O AUTOR (2016)

De acordo com o IC_{50} , foram escolhidas as linhagens de célula derivada do Hepatocarcinoma (HepG2) e Adenocarcinoma pulmonar para dar continuidade no estudo.

Bou et al. (2015) avaliaram o efeito citotóxico do extrato hexânico de *C. sylvestris* sobre as linhagens tumorais humanas A2058 (melanoma), HL-60 (leucemia), HCT (colon), MCF-7 (mama) e HeLa (carcinoma cervical). Foram isoladas 1-5 moléculas bioativas, denominadas casearina A, B, G, J e X. Com base nos valores de IC_{50} , obtidos por ensaio de MTT, as casearinas A, B e J mostraram-se mais eficientes em reduzir a viabilidade celular em todas as linhagens testadas.

6.11 Ensaio de capacidade clonogênica

A capacidade de células cancerosa em formar colônias é essencial para a propagação de um tumor maligno para órgãos distantes (Ec e Welch, 2007). No presente estudo, a casearina D reduziu significativamente a capacidade proliferativa das células HepG2 e A549 e, conseqüentemente, a capacidade clonogênica dessas células.

Houve redução ($p < 0,001$) na formação de colônias de A549 após tratamento com 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 horas. A análise mostrou inibição de 55,00% em culturas tratadas com 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, contudo, o tratamento com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi ainda mais drástico e impediu a sobrevivência celular (Figura 40).

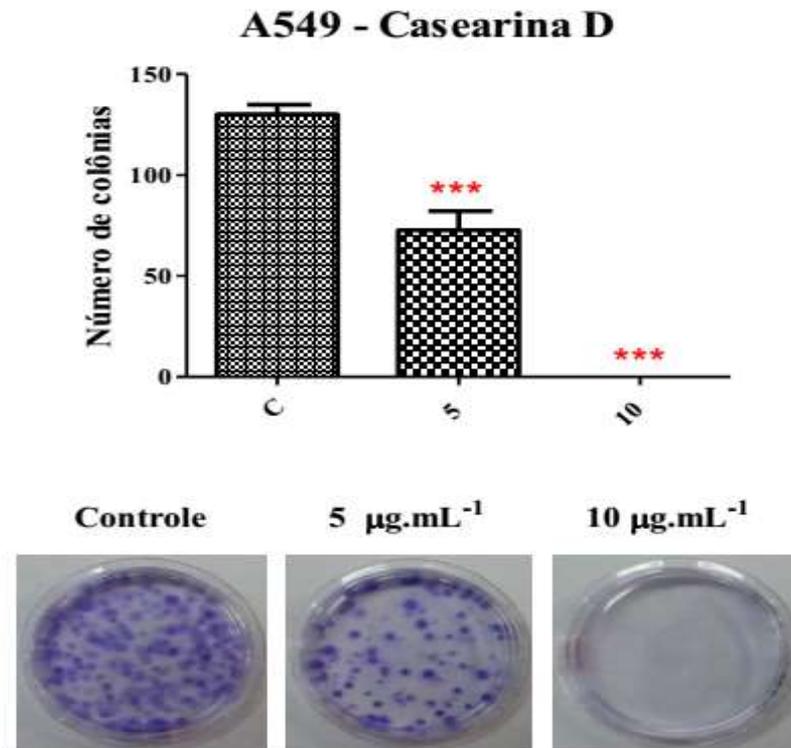


Figura 40 - Capacidade clonogênica da linhagem A549 após tratamento com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 µg.mL⁻¹ por 24 horas. Após o término do tratamento o meio foi substituído por meio fresco e as células foram mantidas em estufa por 15 dias. (A) Houve redução significativa da formação de colônias em ambas as concentrações utilizadas. Os valores representados no gráfico referem-se à média do experimento realizado em triplicata e a barra de erros representa o erro padrão em relação à média. (B) Imagem ilustrativa das colônias coradas com Cristal Violeta 1%. ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O AUTOR (2016)

Houve redução ($p < 0,001$) na formação de colônias de Hep G2 após tratamento com 5 e 10 µg.mL⁻¹ por 24 horas. A análise mostrou inibição de 85,00% em culturas tratadas com 5µg.mL⁻¹, contudo, o tratamento com 10 µg.mL⁻¹ foi ainda mais drástico e impediu a sobrevivência celular (Figura 41).

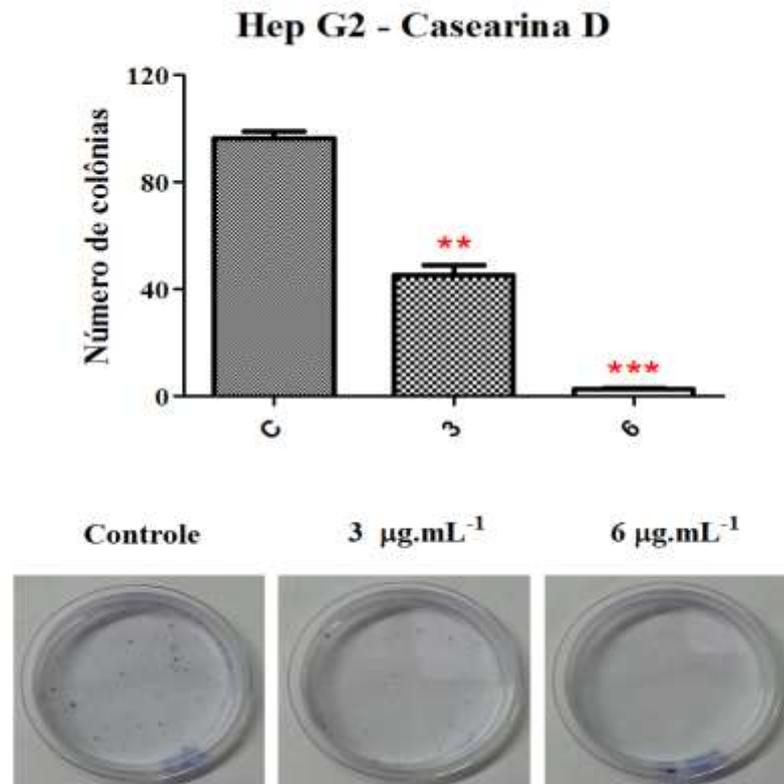


Figura 41 - Capacidade clonogênica da linhagem Hep G2 após tratamento com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 µg.mL⁻¹ por 24 horas. Após o término do tratamento o meio foi substituído por meio fresco e as células foram mantidas em estufa por 15 dias. (A) Houve redução significativa da formação de colônias em ambas as concentrações utilizadas. Os valores representados no gráfico referem-se à média do experimento realizado em triplicata e a barra de erros representa o erro padrão em relação à média. (B) Imagem ilustrativa das colônias coradas com Cristal Violeta 1%. ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O AUTOR (2016)

6.12 Quantificação de DNA por citometria de fluxo

Considerando os resultados obtidos, foi realizada a análise das diferentes populações distribuídas no ciclo celular por citometria de fluxo. Os resultados (Figura 41)

nos demonstraram que houve aumento significativo da população G0/G1 com concomitante redução das populações S e G2/M em culturas tratadas com casearina D em ambas as concentrações. O tratamento por 24 horas com casearina D a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 12) levou a um aumento de 23% de células em G0/G1 e diminuição de 17% e 5% da população em S e G2/M, respectivamente.

Desta forma, os resultados indicam que o tratamento com casearina D pode levar a bloqueio da transição G1/S em células da linhagem A549.

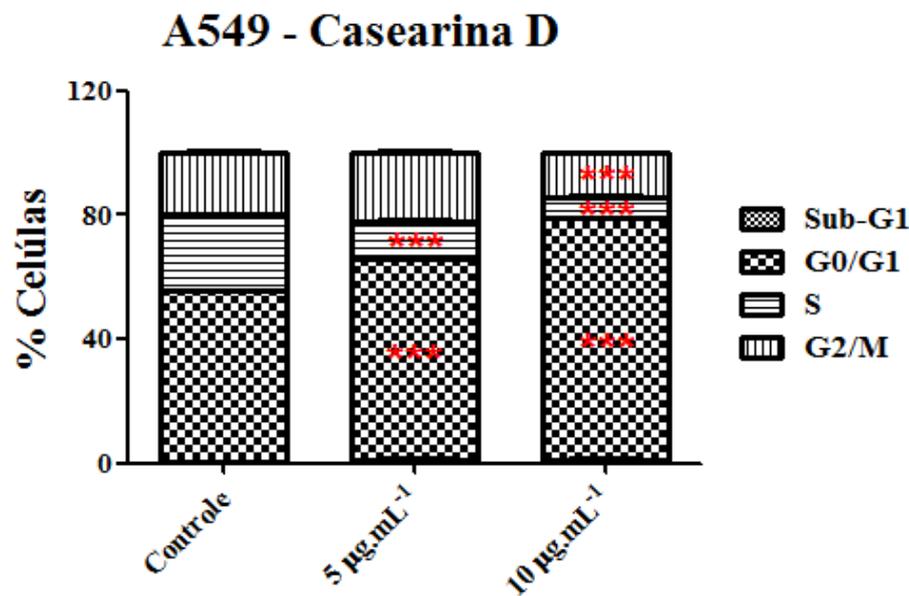


Figura 42 - Análise de diferentes populações celulares distribuídas pelo ciclo celular através de quantificação de DNA por citometria de fluxo. As células foram tratadas por 24 horas com Casearina D nas concentrações de 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 horas e coradas com solução de Iodeto de Propídeo. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O AUTOR (2016)

Tabela 12 - Conteúdo de DNA (%) nas diferentes fases do ciclo celular de culturas da linhagem A549 submetidas ao tratamento com Casearina D (5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas. Os dados da tabela representam a média \pm DP.

	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Controle	0,50 \pm 0,16	54,83 \pm 0,40	24,83 \pm 0,56	19,84 \pm 0,72
5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,29 \pm 0,06	64,59 \pm 0,77***	11,88 \pm 1,12***	22,24 \pm 0,72
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,23 \pm 0,47	77,58 \pm 0,08***	7,01 \pm 0,65***	14,19 \pm 0,23***

Fonte: O AUTOR (2016)

Desta forma, em conjunto, os nossos resultados indicam promissora atividade

antiproliferativa de Casearina D frente à linhagem A549. Essa atividade observada pode ser devido a bloqueio do ciclo celular na transição G1/S, todavia, outros estudos devem ser realizados, a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa da molécula.

Os ensaios de citometria de fluxo também foi realizado na linhagem HepG2, afim de estudar os efeitos da casearina D sobre o ciclo celular.

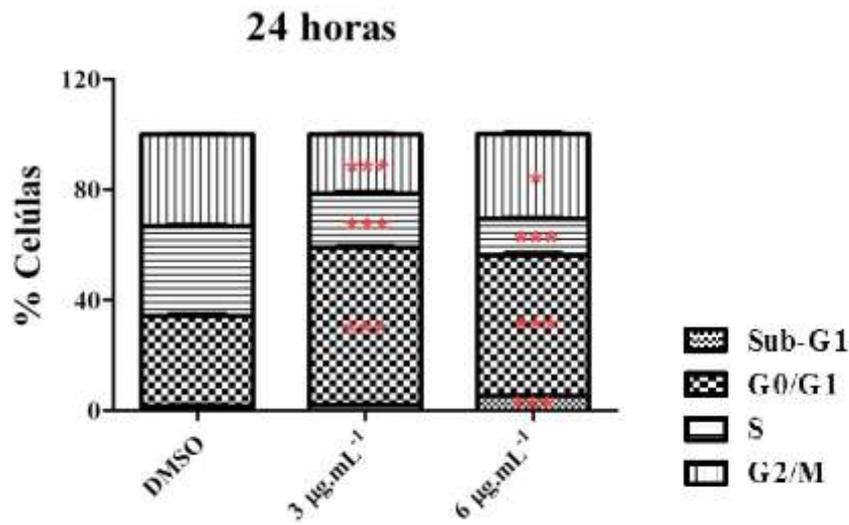


Figura 43 - Análise de diferentes populações celulares distribuídas pelo ciclo celular através de quantificação de DNA por citometria de fluxo. As células foram tratadas por 24 horas com Casearina D nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 horas e coradas com solução de Iodeto de Propídeo. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O AUTOR (2016)

Tabela 13 - Conteúdo de DNA (%) nas diferentes fases do ciclo celular de culturas da linhagem HepG2 submetidas ao tratamento com Casearina D (5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas. Os dados da tabela representam a média \pm DP.

	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Controle	1,54 \pm 0,60	32,71 \pm 1,23	32,49 \pm 0,62	33,23 \pm 0,36
3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,98 \pm 0,21	56,92 \pm 0,96***	19,63 \pm 1,09***	21,43 \pm 0,48
6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5,38 \pm 0,05	50,84 \pm 1,38***	13,24 \pm 0,71***	30,62 \pm 1,19***

Fonte: O AUTOR (2016)

Observou-se um aumento significativo na população G0 / G1, com uma concomitante diminuição tanto da fase S e G2 / M populações quando casearin D foi utilizado em três $\mu\text{g mL}^{-1}$ Perfil semelhante foi observado para as culturas tratadas com 6

$\mu\text{g mL}^{-1}$ de casearina D, no entanto, neste estado, há aumento significativo tanto SubG1 e G2 / M populações (Figura 40).

6.13 Ensaio de *Western Blotting*

Nessa etapa, foi avaliado o perfil de expressão de ciclina D1 e de ERK (total e fosforilada). De acordo com os resultados apresentados na figura 44 houve uma redução de expressão da proteína pERK (proteína da via de proliferação), conseqüentemente, a redução da ciclina D1 que é uma proteína presente na fase G1 e responsável pelos eventos que levará a progressão da fase G1/S.

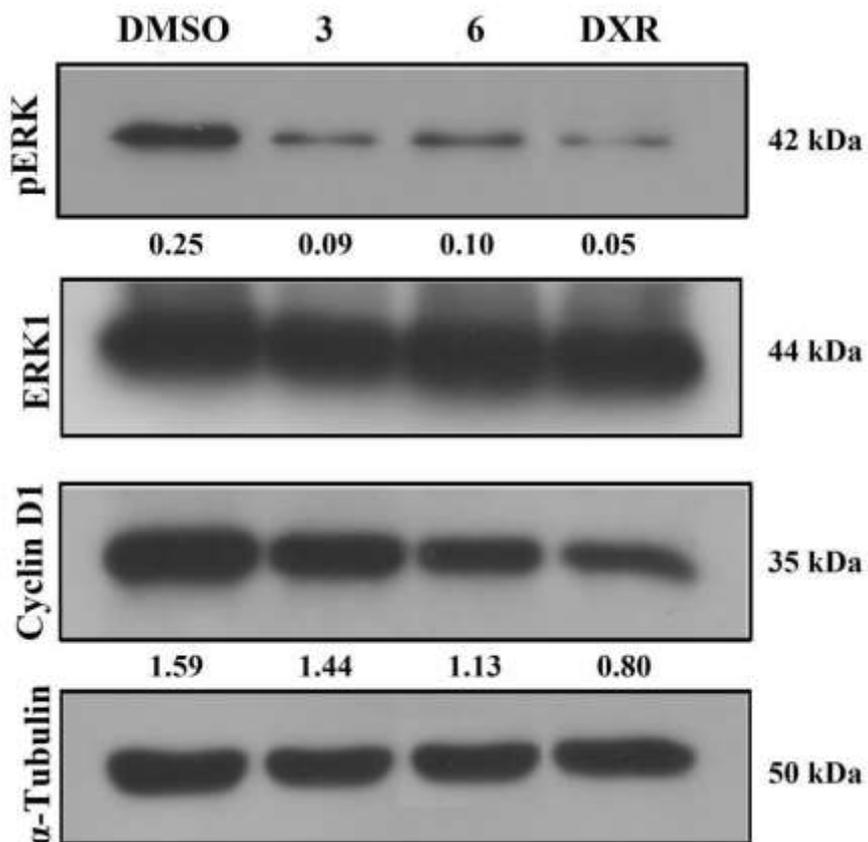


Figura 44 - Perfil de expressão de ciclina D, ERK e ERK fosforilada determinado por western blotting. A α -tubulina foi utilizada como controle de carregamento e doxorrubicina (DXR) foi utilizada como controle positivo.

Fonte: O AUTOR (2016)

7 CONCLUSÃO

O extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* possui substâncias bioativas (casearinas) responsáveis pela redução na viabilidade celular das seguintes linhagens derivadas de cânceres humanos: A549, HepG2, MCF7, U251 MG.

A casearina D foi isolada da fração acetato de etila e demonstrou proeminente atividade antitumoral nas linhagens de células A549 e HepG2.

O conjunto de ensaios bioguiados demonstrou que a casearina D inibe formação de colônias nas duas linhagens testadas, ocorre então um bloqueio da transição de fase G1/S, que pode ser explicado pelo menos em parte pela diminuição da expressão de ERK fosforilada bem como de ciclina D1. A Casearin D representa, portanto, um protótipo promissor para futuros estudos na terapia do câncer de fígado.

8 REFERÊNCIAS

ABSY, M.L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *C. sylvestris* Swartz. Boletim de Zoologia e Biologia Marinha, v. 30, p. 641-676, 1973.

AGARWAL, M. L. et al.;

R. The p53 network. **Journal Biol. Chem.**, vol. 273, p. 1-4, 1998.

ALBANO, M. N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 3, p. 612-7, 2013.

ALMEIDA, V. L.; et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-celular Específicos e Ciclo-celular Não Específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

BASILE, A. A et al. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J Ethnopharmacol**, v. 30, p. 185-197, 1990.

BONER, C. The Bcl-2 protein Family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunology**, vol. 39, p. 615-647, 2003.

BIRGE, R. B. et al. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. **Cell Communication & Signaling**, v. 10, p. 13-30, 2009.

BOLZANI et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 1837-1846, 2012.

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

BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer, 2011. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>> acesso em 28 maio 2016

BRAY, F.; et al. FORMAN, D. Global câncer transitions according to the Human Development Index (2008 – 2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, vol.13, 2012.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da Fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, vol. 23, p. 229-239, 2010.

COELHO, F. R. G.; IYAYASU, H.; KOWALSKI, L. P. **Bases da Oncologia**. 1 ed, São Paulo, Livraria e Editora Marina, p. 21, 1998.

CHENG, Y. L. et al. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer. **Eur J Cardiothorac Surg**. v 23, p 221-8, 2003.

DUARTE, R. L; PASCHOAL, M. E. M. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **J Bras Pneumol**. v 32, p 56-65, 2005.

ESTEVES, I.; et al. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FERREIRA, P. M. P et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: A medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373–1384, 2011.

FUNARI, C. S.; FERRO V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p. 178-182, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer Cell**, 100 (1): 57-70, 2000.

HUANG, D. M.; et al. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 503, p. 17-24, 2004.

ITOKAWA, H.; et al.

MOTIDOME, M. New antitumor principles casearins A-F for *C. sylvestris* (Flacortinaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38 (12), p. 3384- 3388, 1990.

ITOKAWA, H.; et al. E. Antitumor principles from *C. sylvestris* Sw (Flarcotinaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36 (4), p. 1585-1588, 1988.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin.**, v. 55, n. 1, p. 10-30, 2005.

KIYOHARA, C.; SHIRAKAWA, T.; HOPKIN, J. M. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of lung cancer. **Environ Health Prevent Med.**, v. 7, p. 47-59, 2002.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MORITA, H.; et al.
MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *C. sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.39 (3), p. 693-697, 1991.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as sources of a new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-816, 2000.

OOMMEN, S.; et al. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v.485, p. 97-103, 2004.

REDDY L., ODHAV B., BHOOLA K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99(1), p.1-13, 2003.

REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.1, p. 111-121, 2002.

ROJAS-SEPÚLVEDA, A. M. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9506-19, 2012.

SANTOS, A. S. R. Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da

vida. Disponível em <<http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>> acesso em 21 junho 2016

SILVA M. C.; CARVALHO J. C. T.; Plantas Medicinais, Fitoterápicos, Antiinflamatórios. Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas. **Tecmedd**, p 480, 2004.

UEHARA, C.; JAMNIK, S.; SANTORO, I. L. Câncer de pulmão. **Medicina, Ribeirão Preto**. v. 31, p. 266-276, 1998.

Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R. Bioactive Natural Products; **The Netherlands**, vol. 33, p. 433-492, 2005.

WANG, T.; CHEN, Z. W.; STREUTKER, C. J. Melanosis coli sparing adenomatous polyps: novel findings using cleaved caspase-3 immunohistochemistry. **Histopathology**, v. 62, n. 5, p. 819-821, 2013.

WEI, Q. et al. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. **Cancer Res.**, v. 56, p. 4103-7, 1996.

TATAGIBA, F. Guacatonga (*Casearia sylvestris*), disponível em <<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/guacatonga>> acesso em 12 maio 2016

Organização Mundial da Saúde (OMS), disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>> acesso em 19 maio 2016

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2.014, disponível em <<http://www.inca.gov.br>> acesso em 16 maio 2016