

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESTUDOS SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *SYMPHYOPAPPUS*

***CASARETTOI* ROBINSON (ASTERACEAE):**

**EVIDÊNCIAS PRELIMINARES QUANTO À PRESENÇA DE EFEITOS ANTITUMORAL,
ANTIMALÁRICO E ANTIOXIDANTE**

MARA REGINA NETTO BENETTI

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, janeiro de 2007.

Há duas maneiras de viver sua vida: uma, como se nada fosse um milagre; outra, como se tudo fosse um milagre.

Albert Einstein.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Gilberto Schwartzmann, por ter sido meu orientador e oportunizado participar de seu grupo de pesquisa. Também pelo exemplo de competência.

Às minhas colegas de laboratório e amigas, Andréa, Kátia, Luciana e Sandra que muito me ajudaram não só com os experimentos, mas também com companheirismo e disposição para conversar nos momentos difíceis.

Aos demais colegas do Centro de Pesquisas Clínicas (Ulbra), pela ajuda e ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Sérgio Bordignon, por sua disposição e seu indispensável conhecimento botânico.

Aos professores e funcionários da pós-graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos ensinamentos e pela formação científica proporcionados.

Ao Prof. José Cláudio Fonseca Moreira, por sua amizade e conselhos, fundamentais ao longo do desenvolvimento dessa tese e também pela oportunidade de realizar experimentos em seu laboratório.

Ao Marcos e ao Alfeu, pela ajuda nos experimentos e em especial à Martina, pela paciência, dedicação e por compartilhar ensinamentos.

À Prof. Adriana Coitinho, pelo incentivo e auxílio indispensáveis no último ano do trabalho.

Ao Prof. Rafael Linden e demais equipe da Feevale, pela oportunidade e ajuda na realização de experimentos.

Aos pesquisadores Dra. Antoniana Krettli, Dra. Tereza Santos e Dr. Paulo Bus, e demais equipe da Fiocruz, pelo trabalho em colaboração científica.

Ao Prof. Afonso Barth e ao Serviço de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela ajuda inestimável.

Ao Dr. Rein Bos, pela gentileza de doar a eupatoriopirina, e pelo exemplo de cooperação científica.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através da Bolsa de Doutorado.

Aos meus amigos, pela força e amizade que sempre precisei e a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para que eu pudesse realizar essa tese.

À minha sogra, meus cunhados e sobrinhas pela força e confiança e ao meu sogro, que, por seu exemplo de luta, me estimulou na pesquisa de descoberta de novas drogas.

A toda a minha família, pelo apoio e pela compreensão da minha ausência nas várias horas dedicadas ao estudo.

Ao meu pai, pelo apoio, interesse e orgulho demonstrados enquanto ainda pertencia a esse mundo.

À minha mãe, por nunca ter medido esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos e ser fonte de afeto, sabedoria e força. Também pelo apoio e paciência.

Ao meu marido André, com quem conversei, ri, chorei, compartilhei bons e maus momentos ao longo dessa tese e sem o qual talvez não conseguisse chegar ao final. Obrigada pelo carinho, compreensão e amor.

Ao grande presente que chegou durante esse caminho: meu filho João Pedro, pelo sorriso, olhar e companhia que me proporcionam momentos felizes e inesquecíveis e à minha filha Isabela que vivenciou comigo esses momentos finais e que já me traz inúmeras alegrias mesmo ainda não tendo chegado a esse mundo.

Ao Criador, por todas as oportunidades recebidas e infinito Amor.

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
APRESENTAÇÃO	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Biodiversidade	11
1.2. Fontes naturais de novos fármacos	11
1.2.1. Vegetais	14
1.2.1.1. Metabolismo secundário	14
1.2.2. Desenvolvimento de fármacos	16
1.2.2.1. Aquisição de compostos pela etnofarmacologia	18
1.2.2.2. Aquisição de compostos através da quimiosistemática..	18
1.2.2.3. Aquisição de compostos através da pesquisa de avaliação ecológica/racional	19
1.2.2.4. Principais etapas no desenvolvimento de novos fármacos	20
1.2.2.4.1. Fármacos anticâncer	22
1.2.2.4.2. Fármacos antimicrobianos e antiparasitários	24
1.2.2.4.3. Fármacos antioxidantes	26
1.3. Asteraceae (Compositae)	27
1.3.1. Distribuição e características	27
1.3.2. Espécies e utilização	28
1.3.3. <i>Symphyopappus casarettoi</i>	29

2.	OBJETIVOS	31
3.	ARTIGO 1	32
4.	ARTIGO 2	55
5.	ARTIGO 3	69
6.	DISCUSSÃO	78
7.	CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS	89
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9.	ANEXOS	106
	9.1. Lista de Figuras	106
	9.2. Lista de Tabelas	107

RESUMO

Plantas da família Asteraceae de diversos gêneros têm demonstrado relevantes propriedades biológicas. O gênero *Eupatorium* tem sido estudado em todo o mundo e muitos compostos biologicamente ativos já foram isolados de espécies desse gênero. Entre as atividades biológicas descritas para extratos ou compostos desse gênero, merecem destaque as relacionadas à proliferação celular: citotóxica, citostática, antitumoral e antileucêmica. Destacam-se também a atividade antibacteriana, antifúngica, antimalárica e antioxidante. Esse trabalho teve por objetivo verificar a presença de atividade biológica em extratos brutos e semi-purificados de *Symphopappus casarettoi* Robinson (sin. *Eupatorium casarettoi* (B.L. Rob) Steyerl), uma planta nativa do Sul do Brasil e cujas propriedades biológicas e compostos químicos nunca haviam sido pesquisados. O extrato etanólico de inflorescências de *S. casarettoi* demonstrou atividade antiproliferativa significativa em cinco linhagens celulares derivadas de tumores humanos. O fracionamento com solventes de polaridade crescente sugeriu que tal atividade antiproliferativa ocorreu devido a compostos presentes na fração clorofórmica. Desta forma, preparou-se uma fração enriquecida de lactonas sesquiterpênicas, a qual demonstrou atividade antiproliferativa com doses mais baixas. Três de quatro manchas cromatográficas obtidas a partir dessa fração foram consideradas ativas, com valores de IC_{50} entre 24.33 ± 3.65 to 1.87 ± 0.32 $\mu\text{g/ml}$ nas cinco linhagens tumorais e em fibroblastos humanos normais. Adicionalmente, não foi observada atividade antiproliferativa em linfócitos humanos. A análise por citometria de fluxo da mancha de cromatografia C2, sugeriu um mecanismo de ação diferente entre os tipos celulares testados. Não foram observadas atividades antibacteriana e antifúngica nos testes com o extrato etanólico de *S. casarettoi*. Atividade antimalárica foi observada *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* e *in vivo*, com a dose de 250 mg/kg em camundongos infectados com *P. berghei*. A fração clorofórmica foi a que demonstrou melhor atividade e a hexânica demonstrou uma fraca atividade. Adicionalmente, a fração metanólica de *S. casarettoi* demonstrou um potencial antioxidante maior, quando comparado às outras frações em ensaios *in vitro*. Já nos testes *ex vivo*, tanto a fração metanólica, quanto o extrato etanólico atenuaram a morte celular e protegeram contra dano lipídico induzido por ferro. Embora haja a necessidade de estudos adicionais com o intuito de isolar e identificar os compostos bioativos, podemos sugerir que substâncias pertencentes ao grupo das lactonas sesquiterpênicas sejam responsáveis pelas atividades antiproliferativa e antimalárica, e que compostos fenólicos respondam pelas atividades antioxidantes observadas, como descrito previamente para outras espécies do gênero *Eupatorium*.

ABSTRACT

Species of the Asteraceae family of many genera have demonstrated a wide array of biological properties. The *Eupatorium* genus has been studied worldwide and a considerable number of bioactive natural products have been isolated from species of this genus. Among the biological activities reported, special attention was given to the inhibition of cell proliferation, including cytotoxicity, cytostasis and antitumor effects. In addition, antibacterial, antifungal, antimalarial and antioxidant activities have also been described. The aim of this work is to study for the first time the biological properties of crude and partially purified extracts of *Symphiopappus casarettoi* Robinson (syn. *Eupatorium casarettoi* (B.L. Rob) Steyerl), a plant native to South Brazil. Notably, the inflorescence ethanolic extract of *S. casarettoi* showed significant inhibitory activity against five cell lines derived from human tumors. Fractionation with solvents in increasing polarity demonstrated that the antiproliferative activity was due compounds found in chloroformic fraction. This last fraction was separated to get the enriched sesquiterpene lactones fraction, which inhibited cell proliferation with lower dosage. Three of four chromatographic spots from sesquiterpene enriched fraction were considered active with IC_{50} values ranging from 24.33 ± 3.65 to 1.87 ± 0.32 $\mu\text{g/ml}$ in five human cancer cell lines tested and normal human fibroblasts. Additionally, no cytotoxic activity was found in human lymphocytes. The flow cytometry analysis of C2 chromatographic spot suggested a different mechanism of action of the active compound. We did not observe antibacterial and antifungal activities in the ethanolic extract of *S. casarettoi*. Antimalarial activity was observed *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo*, at 250 mg/kg in mice infected with *P. berghei*. The chloroformic fraction again was the most active one and the hexanic fraction had a weak activity. In addition, methanolic fraction showed a higher antioxidant potential compared to the other fractions in the *in vitro* assays. In the *ex vivo* tests, the ethanolic extract and the methanolic fraction attenuated cell death and effectively protected against lipid damage induced by iron. Despite the needs of additional studies to isolate and identify the bioactive compounds, we suggest that substances of the lactone sesquiterpenic class are probably responsible for the antiproliferative and antimalarial activities, while phenolic compounds are responding for the antioxidant activities. These biological properties should be further evaluated.

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Artigos Científicos publicados, submetidos ou a submeter, Discussão, Conclusões, e Referências Bibliográficas. Na Introdução está o embasamento teórico desse trabalho. Os Materiais e Métodos e Resultados, assim como as Referências Bibliográficas específicas, encontram-se em cada artigo. A Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos. A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da tese. A seção Referências Bibliográficas lista as referências citadas na Introdução e Discussão da tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiversidade

Os ambientes mais ricos em termos de quantidades de espécies parecem ser as florestas tropicais, os recifes de corais, os grandes lagos tropicais e as profundezas do mar (Primack e Rodrigues, 2001; Schwartzmann et al., 2001).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. Atualmente, aproximadamente 248.500 espécies de plantas foram descritas, mas muitas certamente ainda aguardam a descoberta científica. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55 000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350 000 e 550 000. As oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização médica aumentam com a diversidade das espécies (Nodari e Guerra, 1999, Mans et al., 2000).

A biodiversidade inclui diversidade genética, crucial para a resposta evolutiva, sendo de fundamental importância entre e dentro das espécies (Ricklefs, 2003). Conseqüência da diversidade genética é a diversidade de moléculas presentes nos organismos. Muitas vezes, mesmas espécies ocorrendo em localizações geográficas distintas podem apresentar substâncias diferentes. Determinadas classes de compostos apresentam grande variação entre espécies de um mesmo gênero.

1.2. Fontes naturais de novos fármacos

Ao longo dos anos, a humanidade recorreu à natureza para satisfazer necessidades tais como alimentação, vestuário, utensílios, transportes, fertilizantes, sabores e fragrâncias e remédios. Plantas são utilizadas há centenas de anos por diversas culturas nos cuidados com a saúde (da Rocha et al., 2001; Schwartzmann G, 2001; Ferraz et al., 2005).

Os produtos naturais têm provado consistentemente seu valor como fonte de diversidade química para o desenvolvimento de novos fármacos (Cragg et al., 1997; Harvey et al., 1998; Dolle e Nelson, 1999; Jones et al., 2006). Essa mudança no rumo da aquisição de fármacos é devida à compreensão de que a natureza, quando comparada com as técnicas de química combinatória, fornece compostos candidatos que têm propriedades melhores (em termos de absorção e metabolismo) e maior diversidade química (levando a estudos de estrutura-atividade) (Harvey, 1999). Quando identificados, esses compostos podem ser otimizados pela química combinatória ou, em países economicamente menos privilegiados, pela química clínica tradicional.

Atualmente, os produtos naturais desempenham um papel altamente significativo nos processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Isso é particularmente evidente nas áreas de câncer e doenças infecciosas, onde mais de 60% e 75% desses fármacos, respectivamente, são de origem natural (Schwartzmann e Workman, 1992; Schwartzmann et al., 2002; Newman et al., 2003). Segundo Newman et al., 2003, de 1981 a 2002 tem aumentado a utilidade de produtos naturais como fontes de novas estruturas, mas não necessariamente da droga final. Das 868 novas entidades químicas aprovadas por agências reguladoras (como por exemplo, a Food and Drug Administration) durante esse período, 471 são proteínas ou peptídeos grandes isolados de organismos ou linhagens celulares, produtos naturais, derivados de produtos naturais com modificação semi-

sintética, sintéticas com farmacóforo derivado de um produto natural ou produtos naturais mimetizados.

Reconhecidamente, as estratégias de desenvolvimento baseadas em compostos candidatos derivados da natureza, podem apresentar um número considerável de obstáculos que não acontecem pela síntese racional. Tais problemas podem ser: inacessibilidade aos locais de coleta, lento desenvolvimento e alto custo para chegar aos componentes ativos devido às dificuldades no isolamento e produção do ingrediente farmacologicamente ativo e disputas sérias entre governos no que diz respeito à propriedade intelectual. Mesmo assim, o “screening” de produtos naturais parece ter maior probabilidade de sucesso se comparado ao “screening” de compostos racionalmente escolhidos.

É preciso expandir o estudo da natureza como fonte de agentes ativos novos que podem servir como modelos ou “esqueletos” para elaborar fármacos eficazes, muito necessárias nos dias atuais, para uma variedade de doenças (Newman et al., 2000). O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (Pinto et al., 2002). Desde o início de sua colonização essa importância já fora percebida, quando médicos portugueses voltaram-se para os remédios indígenas, devido à escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa. A partir de 1808, começaram a chegar ao país as primeiras expedições científicas, cujo principal objetivo era dar conhecimento aos europeus da exuberância da nossa fauna e flora. De lá para cá, muito se avançou na pesquisa de produtos naturais brasileiros, mas diante da grande biodiversidade de nosso país, pode-se dizer que estamos ainda no início.

1.2.1. Vegetais

A partir de agora a ênfase será dada aos vegetais como candidatos à descoberta de novos fármacos, uma vez que o alvo dessa pesquisa foi uma espécie vegetal e, dentre os diversos reinos da natureza, o vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de moléculas orgânicas (Pinto et al., 2002).

A percepção da natureza como uma coleção de animais que se movem em um fundo verde de plantas é uma má interpretação da complexidade e da dinâmica da vegetação. As plantas realizam todas as funções vitais que um leigo pode, superficialmente, atribuir só a animais, incluindo comunicação e defesa (da Rocha et al., 2001; Ferraz et al., 2005). Com esse objetivo, fazem uso de mecanismos sinalizadores sofisticados, tais como ferormônios e um arsenal químico composto por diversas substâncias.

1.2.1.1. Metabolismo secundário

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários ou macromoléculas, tais como carboidratos, lipídios, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas e freqüentemente desconhecidas, originam o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários ou micromoléculas, que ao contrário daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (von Poser e Mentz, 1999).

No passado, alguns autores lançaram a hipótese de que os metabólitos secundários nada mais eram do que subprodutos do metabolismo primário. Entretanto, o fato de o vegetal utilizar rotas biossintéticas elaboradas, com elevados gastos de energia, conduz à hipótese mais aceita atualmente de que os vegetais consomem essa energia para sintetizar compostos necessários para a sua sobrevivência e preservação. Pesquisas têm demonstrado o papel essencial desses metabólitos na ecofisiologia das plantas, atuando na defesa contra herbívoros e ataques de patógenos, na competição entre as plantas e como atrativo para organismos benéficos como polinizadores ou simbiontes. Também agem como protetores de estresses abióticos, como alterações na temperatura, quantidade de água, níveis de luz, exposição à UV e nutrientes minerais. Além disso, estudos recentes indicaram papéis potenciais em nível celular, como reguladores de crescimento, moduladores da expressão gênica e transdução de sinal (Kaufman et al., 1999).

É provável que essa variedade de funções dos produtos secundários nas plantas possa ter uma relação com os efeitos medicinais em humanos, devido à similaridade de seus alvos potenciais. Por exemplo, produtos secundários envolvidos na defesa da planta por citotoxicidade contra patógenos, poderiam ser úteis como antibióticos ou antitumorais para humanos, se não forem muito tóxicos; ou produtos envolvidos na defesa contra herbívoros por atividade neurotóxica, poderiam ser utilizados por humanos como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (ação no sistema nervoso central) (Briskin, 2000).

As combinações de produtos secundários nas plantas são distintas. Determinados grupos de metabólitos são encontrados caracteristicamente em certas famílias de plantas, conseqüentemente, seus efeitos medicinais também. Há também uma enorme variação no esqueleto, estereoquímica, grupos funcionais e isomerismo posicional nas moléculas de um

mesmo grupo de compostos encontrado em espécies diferentes. Assim, a procura por novos modelos de moléculas a partir de plantas constitui um amplo campo na descoberta de fármacos para o tratamento de muitas doenças humanas.

1.2.2. Desenvolvimento de fármacos

Dos tempos antigos aos modernos, as plantas têm sido utilizadas como agentes medicinais, primeiramente com base no conhecimento popular e posteriormente com base científica (Lee, 2004). Atualmente, em torno de 80% da população mundial residente nos países do terceiro mundo utiliza produtos de plantas no cuidado primário de sua saúde. Os 20% restantes, residentes do primeiro mundo, usam, em mais de 25% dos casos, produtos farmacêuticos diretamente derivados de plantas (Farnsworth, 1984; Cox, 1994). Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas Farmacopéias da época. Muitas das espécies já citadas nos tempos antigos resistiram à ação do tempo e da crítica científica, estando presentes em farmacopéias mais recentes (Schenkel et al., 1999). No início do século passado, os recursos terapêuticos vegetais começaram a ser cientificamente estudados e começaram os isolamentos de compostos ativos. As descobertas das substâncias ativas presentes nas plantas medicinais alavancaram, junto com o início da síntese orgânica, uma revolução científica e tecnológica, alterando muito rapidamente o arsenal terapêutico. Por exemplo, em 1897 Kolbe sintetiza o ácido acetilsalisílico, inspirado na salicina, tida como substância ativa de *Salix alba* L. Destaca-se também a importância do desenvolvimento da farmacologia como ferramenta para desvendar mecanismos fisiológicos. Em muitas situações, a descoberta da atividade de determinadas substâncias

não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica.

Após a década de 60 ocorreu um desinteresse em se continuar essa linha de pesquisa. As razões desse desinteresse são muito mais comerciais do que científicas. Atualmente, para a descoberta de novos fármacos, deseja-se uma filtragem rápida, identificação acertada e desenvolvimento dirigido à identificação de compostos ativos, os quais gerarão compostos-base, ou seja, os denominados em idioma inglês “lead compounds”. Assim, programas de pesquisa tradicionais, baseados em testagem de extratos, isolamento guiado por efeitos biológicos, elucidação estrutural e subsequente produção, ficam em desvantagem quando comparados a projetos que utilizam livrarias químicas sintéticas definidas (Koehn e Carter, 2005).

Entretanto, o interesse foi renovado, pois, como já foi mencionado, as florestas tropicais continuam oferecendo ótimas possibilidades para o descobrimento de novos fármacos promissores e continuam sendo uma fonte de alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as colocam em vantagem como moldes de estrutura para a descoberta de novos fármacos (Koehn e Carter, 2005).

Muitas instituições governamentais de pesquisa que atuam em grande escala e laboratórios farmacêuticos industriais nos países mais desenvolvidos, freqüentemente aplicam a aquisição ao acaso e testagem de vários extratos. Essas estratégias requerem a avaliação de aproximadamente 20 000 compostos candidatos para obter uma droga clinicamente útil (Cragg et al., 1997). Em nosso laboratório, utiliza-se a estratégia da aquisição determinada de espécies de plantas pré-selecionadas. Assim, faz-se uso de informações etnofarmacológicas, quimiosistemáticas e ecológicas (Schwartzmann et al., 1988; Schwartzmann e Workman, 1992; Mans et al., 2000).

1.2.2.1. Aquisição de compostos pela etnofarmacologia

Freqüentemente argumenta-se que a cultura popular identifica sintomas, mas não caracteriza ou entende as doenças como nós as caracterizamos e conclui-se, por isso, que tais informações não servem de base para ajudar a desenvolver novos medicamentos. A ausência de educação e cultura formais não é sinônimo de ausência de conhecimento; de fato, somos todos ignorantes quanto a culturas que não conhecemos (Elisabetsky, 1999). Os dados etnofarmacológicos são obtidos consultando curandeiros tradicionais e pelo acúmulo de informações no uso de plantas da medicina popular, mas também da literatura na medicina popular.

A vasta gama de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédios” em todos os lugares do mundo, leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais (Heinrich e Bremmer, 2006). Como a maior parte da flora ainda é desconhecida do ponto de vista químico, a aquisição de compostos baseada nesse critério, muito provavelmente, levará ao descobrimento de fármacos novos. A perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico (Elisabetsky, 1999).

1.2.2.2. Aquisição de compostos através da quimiosistemática

A quimiosistemática envolve o uso do conhecimento sobre a composição fitoquímica de certas espécies, gêneros ou famílias, como indícios para avaliar espécies relacionadas para a presença de substâncias estruturalmente comparáveis com um índice

terapêutico aperfeiçoado. Uma visão abrangente da quimiodiversidade da natureza vem de encontro à expectativa de descobrimento de novas moléculas. Assim, um levantamento bibliográfico sobre espécies para as quais fora atribuído algum uso medicinal em alguma parte do mundo, pode direcionar os pesquisadores para o estudo de espécies relacionadas. Mais uma vez o Brasil leva vantagem em termos de biodiversidade, uma vez que vários vegetais são nativos e exclusivos de nosso país.

1.2.2.3. Aquisição de compostos através da pesquisa de avaliação ecológica/racional

Através dessa estratégia de aquisição, presume-se descobrir tanto novos compostos, quanto análogos e é melhor explicada com um exemplo prático. A presença de uma única espécie de planta livre de fungo, em uma grande área de vegetação densa, quase completamente coberta de fungos significa que tal espécie pode produzir uma substância fungicida, valendo à pena testar seu potencial frente a outras atividades biológicas. Assim, essa proposta de aquisição de compostos utiliza a diversidade.

Uma das principais limitações até agora relacionadas com a questão das plantas como fonte de novos fármacos é a alegada complexidade do processo de avaliação, pela presença de misturas biológicas, de difícil caracterização. Entretanto, técnicas inovadoras e novos processos de engenharia vêm superando rapidamente essas limitações (Nisbet e Moore, 1997). No que diz respeito aos benefícios oriundos da pesquisa com plantas medicinais, os novos fármacos podem melhorar a qualidade de vida em doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente. Socialmente, a descoberta de fontes naturais e locais pode contribuir para a economia do país que usualmente importa compostos

químicos ou remédios, além de proporcionar autonomia para o gerenciamento das políticas de saúde. O valor econômico do produto (não apenas o seu valor de mercado) pode estar associado à geração de empregos e novas atividades econômicas, bem como à conservação e preservação de plantas e ecossistemas. Além disso, tem-se o valor comercial, que pode movimentar importantes volumes de capital.

1.2.2.4. Principais etapas no desenvolvimento de um novo fármaco

Na descoberta de fármacos, o produto desejado é um composto com propriedades farmacológicas específicas (Tulp e Bohlin, 2002). Por isso, é crucial para qualquer investigação com extratos de plantas para uma determinada atividade biológica, escolher um sistema de testes que seja simples, rápido, reproduzível, sensível e não muito caro. Quando decidido qual teste realizar, é necessário escolher organismos adequados, tais como microorganismos, sistemas subcelulares isolados, cultura de células, órgãos isolados de vertebrados ou animais inteiros (Hostettmann et al., 1997).

A descoberta de uma nova droga, guiada por processos biológicos, é um processo interativo. Uma vez escolhido um vegetal candidato e delineado o experimento, a atividade biológica desejada é testada. A seguir, é dado início ao processo de isolamento e identificação do composto responsável por essa atividade. A cada progresso no isolamento, um novo teste para a atividade biológica é realizado (fracionamento bioguiado). Seguindo a fase pré-clínica, são realizados estudos toxicológicos *in vivo*, preparação de uma fórmula com o composto para uso clínico, envolvendo testes de estabilidade da molécula bioativa e a determinação de uma dose inicial segura para humanos.

Posteriormente, inicia-se a pesquisa clínica, dividida em quatro fases. Na fase I, avalia-se a toxicidade, a dose-limite para a toxicidade, a dose máxima tolerada, farmacocinética e a atividade biológica desejada. Na fase II, os principais focos de estudo são o espectro e frequência dos efeitos tóxicos, determinação objetiva da atividade biológica, ajustes da droga e são obtidas informações adicionais do agente. Já na fase III, o novo composto é comparado com a terapia usual e também é feita a observação de toxicidade tardia. Finalmente, na fase IV é estabelecido o papel do novo composto para o tratamento dos pacientes e a integração desse composto como primeiro tratamento para a doença, além do estudo de toxicidades decorrentes de tratamento prolongado (Schwartzmann et al., 1988).

Paralelamente, estudos ajudam a refinar a estrutura ativa inicial: relação estrutura-atividade, mecanismos de ação (interações com os receptores e inibição de enzimas específicas), metabolismo (identificação de metabólitos bioativos e bloqueio de inativação metabólica), modelação molecular e química combinatória (Lee, 1999).

É evidente que o desenvolvimento de uma nova droga requer um grande investimento de capital e recursos humano e tecnológico. Assim, uma nova droga é desenvolvida em resposta à necessidade da humanidade, na medida em que os recursos financeiros e tecnológicos permitam (Dickson e Gagnon, 2004). Do início ao final, esse processo pode demorar de 12 a 24 anos (Lombardino e Lowe, 2004) e pode ser interrompido em qualquer uma das fases, se a droga não preencher os objetivos propostos do estudo. Dessa forma, o desenvolvimento de uma nova droga envolve muitos riscos e, estima-se que a taxa de sucesso final é de 21,5% (DiMasi, 2003). Entretanto, é um processo extremamente necessário, já que para muitas doenças crônicas e degenerativas ainda não existe tratamento eficaz e para as agudas há a necessidade de renovação dos medicamentos.

1.2.2.4.1.Fármacos anticâncer

O câncer é um problema público em crescimento, cuja incidência de novos casos no mundo é, aproximadamente, seis milhões de casos por ano (Srivastava et al., 2005), constituindo a segunda maior causa de mortes em homens e mulheres, matando mais de seis milhões de pessoas a cada ano no mundo (Kimura, 2005). Depois de cinco décadas de desenvolvimento de novos fármacos e, de obter-se nesse período um número considerável de fármacos quimioterápicos, ainda necessita-se agentes antineoplásicos mais efetivos. Os tumores humanos adultos mais comuns são resistentes às fármacos antineoplásicos disponíveis (Yarbro, 1992) e, a maioria desses agentes tem atividade limitada contra tumores sólidos (Yarbro, 1992; Chabner, 1991) e pouco impacto nas taxas de sobrevivência, além de efeitos colaterais significativos (Nature Review, 2004).

Embora as plantas tenham sido usadas por mais de 3 500 anos no tratamento de “câncer”, foi somente na década de 50 que se iniciou o estudo de extratos de plantas para seu potencial antiproliferativo. Desde então, foram testados mais de 120 000 extratos de mais de 6 000 gêneros de plantas, resultando no desenvolvimento de produtos naturais com grande diversidade química como candidatos a agentes anticâncer. Dentre os compostos anticâncer desenvolvidos a partir de plantas, podemos citar:

- Alcalóides da vinca (vincristina e vinblastina)

Representam uma das mais antigas classes de agentes citotóxicos identificados e são usados no tratamento de grande variedade de cânceres em humanos. Isolados no final da década de 50 da planta *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), possuem como mecanismo de ação a inibição da polimerização de tubulina. Análogos desses alcalóides foram preparados

com o objetivo de aumentar a eficiência terapêutica e alguns deles, como vindesina e vinorelbina são clinicamente utilizados (Budman, 1997).

- Podofilotoxinas (etoposide e teniposide)

Possuem atividade terapêutica significativa contra vários neoplasmas humanos. Foram isolados de *Podophyllum peltatum* e *P. emodi* (Berberidaceae) no início da década de 50 e atuam inibindo a enzima topoisomerase II.

- Taxanos (paclitaxel e docetaxel)

Os taxanos são uma classe importante de agentes anticâncer que exercem seus efeitos por um mecanismo de ação único: promovem a estabilização da tubulina. Em 1963, um extrato bruto de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) foi avaliado para atividade citotóxica. O paclitaxel foi identificado como o constituinte ativo em 1971 (Rowinsky e Donehower, 1995). Como a pouca abundância na planta do paclitaxel foi um dos problemas enfrentados no desenvolvimento dessa droga, vários estudos foram feitos até ser descoberto outro composto parecido e mais abundante (a 10-acetil-bacatina III), que foi utilizado como matéria-prima para a síntese do paclitaxel. Através da mesma rota sintética foi obtido o docetaxel.

- Camptotecina (irinotecan, topotecan, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina)

As camptotecinas são uma classe de agentes antineoplásicos que têm como alvo a enzima topoisomerase I. O primeiro composto dessa classe (camptotecina) foi isolado em 1966 de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). Devido à forte toxicidade, foram desenvolvidos inúmeros análogos dessa substância. Irinotecan e topotecan são os agentes mais utilizados no tratamento do câncer humano.

Outros agentes derivados de plantas que estão em fase experimental, em aprovação ou já sendo utilizados clinicamente são flavopiridol, homoharringtonina, 4-ipomeanol, elliptinium, dentre outros (Mans et al., 2000; Lee, 2004).

1.2.2.4.2. Fármacos antimicrobianos e antiparasitários

Fungos, bactérias e outros microorganismos causam importantes doenças humanas, especialmente em regiões tropicais e em pacientes com o sistema imune comprometido ou deficiente. Embora existam fármacos potentes contra os microorganismos, linhagens resistentes ou multi-resistentes estão continuamente surgindo, impondo a necessidade de continuamente pesquisar e desenvolver novos fármacos (Silver e Bostian, 1993). Recentemente, novas classes de fármacos antimicrobianos foram colocadas na prática clínica. Entretanto, a experiência até então vivida do surgimento e expansão rápidos da resistência aos novos antibióticos, indicam que essas novas classes terão um curto período de vida (Coates et al., 2002).

A medicina tradicional está aumentando sua receptividade para o uso de fármacos derivados de plantas, sejam antimicrobianas ou com outras atividades biológicas, uma vez que os antibióticos tradicionais (produtos de microorganismos ou seus derivados sintéticos) tornam-se ineficientes e algumas doenças continuam sem tratamento (Cowan, 1999). Outro fator que renovou o interesse em antimicrobianos de plantas nos últimos 20 anos, foi a alta taxa de extinção, pois inúmeras estruturas fitoquímicas potencialmente utilizáveis e que poderiam ser quimicamente sintetizadas, podem ser irreversivelmente perdidas (Lewis et al., 1995).

Durante os últimos anos, houve um acréscimo na incidência de infecções por fungos devido ao crescimento do número de pacientes imunocomprometidos, tais como receptores de órgãos transplantados, portadores de câncer ou HIV/AIDS (García et al., 2003). Também ocorre a resistência a antibióticos e a toxicidade durante o tratamento prolongado, além de haver poucos compostos em uso clínico para o tratamento desse tipo de infecção. Desde o final da década de 70, muitos trabalhos foram feitos, mas os problemas continuam devido à grande especificidade no sistema de transporte de peptídeos desses organismos.

Atualmente, os principais grupos de compostos antimicrobianos isolados de plantas são fenóis e polifenóis (quinonas, flavonas, flavonóides, flavonóis, taninos e cumarinas), terpenóides, incluindo óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipetídeos, poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos e glicosídeos (Cowan, 1999).

Os protozoários causam inúmeras doenças no ser humano. A malária, causada pelo *Plasmodium*, é uma das mais importantes infecções parasitárias devido à alta morbidade e mortalidade (Andrade-Neto et al., 2004a), afetando mais de 500 milhões de pessoas por ano e matando 2,7 milhões delas (Go, 2003), predominantemente nos países tropicais. Os fármacos usados atualmente para tratar a malária são derivados de quinolina, modelados a partir da molécula quinina encontrada nas espécies do gênero *Cinchona* (Rubiaceae). A cloroquina (também inspirada na quinina) aproximou-se de ser a droga ideal para tratar malária durante décadas, devido a sua grande eficiência, baixo custo, alta tolerância e baixa toxicidade. Ainda hoje é utilizada em áreas onde os parasitas não adquiriram resistência (Krettli et al., 2001). Entre os compostos antimaláricos modernos isolados de plantas, podem ser citados alcalóides, xantonas e chalconas (precursores dos flavonóides). Merece atenção especial a artemisinina (lactona sesquiterpênica), isolada de *Artemisia annua* L (Asteraceae) primeiramente em 1972, que proporciona bons efeitos terapêuticos e melhora

ou cura todos os pacientes, além de não ter efeitos colaterais óbvios (Modzelewska et al., 2005).

1.2.2.4.3. Fármacos antioxidantes

A literatura relata abundantemente estudos sugerindo que radicais livres e outras espécies reativas estão envolvidas em diversas doenças humanas. Participam em mais de 100 enfermidades, variando desde artrite reumatóide e choque hemorrágico, passando por cardiomiopatias e fibrose cística, até isquemia gastrintestinal, diabetes, AIDS, câncer e também outras doenças que envolvem processo inflamatório. Isso se deve ao fato de que danos aos tecidos corporais levam a estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999). Algumas doenças podem ser causadas por estresse oxidativo. Entretanto, na maioria delas, esse estresse é uma consequência e não uma causa do processo primário da doença. Apesar disso, desempenha um papel importante nas doenças humanas. A grande descoberta do futuro é desenvolver antioxidantes terapêuticos efetivos, demonstrar seus benefícios para pacientes e provar que estão agindo por um mecanismo antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Atualmente, o papel dos antioxidantes é considerado mais preventivo do que terapêutico, através da ingestão principalmente de vegetais pela dieta. Mas vem crescendo o interesse na utilização dessas substâncias com o intuito de tratar doenças. Isso pode envolver o uso de antioxidantes que ocorrem naturalmente (com ou sem adaptações estruturais), ou moléculas completamente sintéticas. Além disso, há evidências que alguns fármacos já utilizados clinicamente podem exercer parte ou todo o seu efeito por

mecanismos antioxidantes, tais como penicilamina, aminosalicatos, apomorfina, tetraciclina, omeprazol, cetoconazol entre outras (Van Zyl et al., 1993).

1.3. Asteraceae

1.3.1. Distribuição e características

Família natural e cosmopolita, muito grande, formada por cerca de 1 100 gêneros e mais de 24 000 espécies, dos quais 191 gêneros foram identificados no Brasil (Barroso et al., 1991). Aproximadamente 600 espécies são encontradas no Rio Grande do Sul (comunicação pessoal, C. Mondin, 2001). Encontram-se representantes em todas as zonas do globo, podendo ser encontradas em todas as formações (lugares úmidos, secos, sombreados, ensolarados, em selvas, montes e campos, em solos normais, arenosos, salitrosos ou humíferos). A maioria das espécies é composta por ervas anuais ou perenes; somente nas zonas tropicais e subtropicais chegam a formar arbustos e até árvores e, mais raramente, trepadeiras (Burkart et al., 1974).

Relativo à filogenia e paleobotânica, por razões de morfologia comparada, os pesquisadores têm chegado quase unanimemente à conclusão de que a família das Asteraceae é altamente evoluída e representa um desenvolvimento máximo, um clímax evolutivo até hoje não superado das Dicotiledôneas metaclamídeas. Sua homogeneidade fundamental faz supor uma origem monofilética e recente, de desenvolvimento explosivo. No registro fóssil essa família quase não está representada. É certo que a identificação fóssil, geralmente a base de rochas, é difícil porque as plantas dessa família, de certo modo, repetem a variação foliar de outras famílias de latifoliadas. De qualquer modo, a falta ou escassez de

fossilizações atribuíveis a asteráceas, pode ser interpretada como prova do caráter recente, ou seja, a juventude dessa família, sempre considerada em termos de idades geológicas. Segundo os conhecimentos atuais, a evolução dessas plantas se produziu no curso da era Terciária e na atual, é dizer, em menos de 50 milhões de anos. Sua evolução parece ter sido rápida e sua difusão notavelmente de êxito. Possui gêneros com elevada capacidade de adaptação para colonizar altas montanhas, regiões áridas ou terras desmatadas pelo cultivo. Parece que segue evoluindo na atualidade pela facilidade com que se observam mutações, hibridizações, trocas cromossômicas, etc (Burkart et al., 1974).

1.3.2. Espécies e utilização

No que diz respeito à importância econômica pode-se levar em conta o número de espécies úteis e também as daninhas (invasoras, tóxicas ou espinhosas). Plantas da família Asteraceae são comumente utilizadas na medicina popular em todo o mundo, com mais de 1000 espécies registradas em databases etnomedicinais (Monks et al., 2002). O girassol (*Helianthus annuus* L.) e o falso-açafrão (*Carthamus tinctorius* L.) são oleaginosos de grande cultivo. Muitas Asteraceae são hortaliças apreciadas, como a alface (*Lactuca sativa* L.), a chicória (*Cichorium intybus* L.), a salsa (*Tragopogon porrifolius* L.), a alcachofra (*Cynara scolymus* L.), etc. As espécies medicinais, inseticidas e aromáticas são numerosas, como a camomila (*Matricaria chamomilla* L.), o piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.), o absinto (*Artemisia absinthium* L.), a marcela (*Achyrocline satureioides*), etc. Por outro lado, há muitas Asteraceae prejudiciais por invasão. São conhecidos os cardos (*Carduus*, *Cynara*, *Cirsium*, *Centaurea*, *Silybum* div. Espécies), o abrolho (*Xanthium*

cavanillesii Schouv.), que invadem os campos e deslocam os pastos úteis, competindo com as plantas cultivadas (Burkart et al., 1974).

1.3.3. *Symphyopappus casarettoi* (syn. *Eupatorium casarettoi*)

Essa planta constitui-se de um arbusto de 1-2 metros de altura, ramoso, e tem por nomes vulgares eupatório-de-casaretto, vassoura-do-campo, vassoura bichada (Cabrera e Klein, 1989). É característico e exclusivo do litoral do Sul do Brasil, estendendo-se desde Paranaguá (PR), através de Santa Catarina até o Rio Grande do Sul, pela “Porta de Torres”, chegando até Osório, onde possivelmente se encontra seu limite austral (Cabrera e Klein, 1989). É uma espécie heliófita e seletiva xerófila, muito abundante na vegetação litorânea, situada sobre solos arenosos enxutos, onde, por vezes, forma extensos e densos agrupamentos quase puros. Ocorre também de permeio à vegetação arbustiva da restinga em campos litorâneos. Como espécie rara e estranha é encontrada em capoeiras de encostas (Cabrera e Klein, 1989). O nome do gênero, descrito por Turczaninow (1848) é em referência ao pappus que é fortemente fundido ao calo e cai como uma unidade com o último, na maioria das espécies. Sua inflorescência é formada por cinco flores, que podem variar entre as tonalidades branca, rosa ou lilás. Floresce desde setembro até março sendo janeiro e fevereiro o período predominante (Matzembacher, 1979).

Há controvérsia a respeito do gênero ao qual essa planta pertence: se *Eupatorium*, ou se *Symphyopappus*. O gênero tem sido mantido como distinto durante a maioria dos 130 anos desde sua descrição. Foi reconhecido por Bentham and Hooker (1873) e B. Robinson incluiu novas espécies. Na chave de B. Robinson para gêneros (1913), *Symphyopappus* é distinguido pelo pappus com pelos ásperos, unidos em um anel espesso na base e pelas

folhas serem coriáceas. O gênero foi reduzido como sinônimo de *Eupatorium* por Steyermark em 1953, e foi tratado como parte desse gênero por Cabrera e Vittet (1963). No retrospecto, B. Robinson estava correto em manter o gênero, mas reconhecidamente, as características dadas por ele não foram inteiramente fidedignas, e não há caminho para separar adequadamente *Symphyopappus* de *Eupatorium* conforme ele exprimiu (King e Robinson, 1987). O gênero *Symphyopappus* parece ser restrito ao Brasil, e tem 11 espécies reconhecidas. Além de *S. casarettoi*, também podem ser encontradas no Rio Grande do Sul *S. reticulatus* (= *Eupatorium reitzii*), *S. lymansmithii* (= *E. lymansmithii*) e *S. compressum* (= *E. compressum* = *S. polystachyus*) (Matzembacher, 1979; King e Robinson, 1987).

Essa planta foi escolhida para estudo nessa tese com base em informações quimiosistemáticas sobre espécies do gênero *Eupatorium* e da família Asteraceae, de um modo geral. Também foram testados extratos orgânicos e aquosos de outras partes de *S. casarettoi* (folhas e galhos), mas foi escolhido o extrato orgânico de inflorescências devido ao seu melhor desempenho em testes realizados no Instituto do Câncer dos Estados Unidos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de atividades biológicas em extratos de inflorescência de *Symphopappus casarettoi* (sin. *Eupatorium casarettoi*) (Asteraceae).

Objetivos Específicos

- 1- Investigar atividade citotóxica em modelo *in vitro* de linhagens tumorais.
- 2- Investigar atividades antibacteriana e antifúngica em modelos *in vitro* de cepas de bactéria e fungo.
- 3- Investigar atividade antimalárica em modelos *in vitro* e *in vivo*.
- 4- Investigar atividade antioxidante em modelos *in vitro* e *ex vivo*.

ARTIGO 1
In vitro antiproliferative activity of extracts from *Symphyopappus casarettoi*

Robinson (Asteraceae).

(Submetido à Phytomedicine).

In vitro antiproliferative activity of extracts from *Symphopappus casarettoi* Robinson (Asteraceae).

Mara Regina Netto Benetti^{a*}, Kátia Regina Bica Machado^b, Luciana Sperb Tonding^b, Aline Fossá^b, Ivana Grivicich^b, Sérgio Augusto Loreto Bordignon^b, Rafael Linden^d and Gilberto Schwartzmann^{a,c}.

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

^c South-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Mara Regina Netto Benetti

South American Office for Anti-Cancer Drug Development (SOAD)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sala 399

R. Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-007

Telephone/Fax: 55-51-2101-8012

E-mail: marare@ig.com.br and fsoad@hcpa.ufrgs.br

Summary

In the present study we have investigated the in vitro antiproliferative activity of crude and partially purified extracts from *Symphiopappus casarettoi* Robinson (syn: *Eupatorium casarettoi* (B.L. Rob) Steyerm) (Asteraceae) native from South Brazil against five human tumor cell lines, lymphocytes and fibroblasts. The ethanolic extract showed significant inhibitory activity. Fractionation with solvents in increasing polarity demonstrated antiproliferative activity in chloroformic fraction. Three of four TLC spots from sesquiterpene enriched fraction were considered active with IC₅₀ values ranging from 24.33±3.65 to 1.87±0.32 µg/ml on five human cancer cell lines tested and normal human fibroblasts. No cytotoxic activity was found on lymphocytes. The flow cytometry analysis suggested a different mechanism of action of the active compound among the cell lines tested. Further studies to characterize the active components of these extracts and to better define its therapeutic potential in tumor models are warranted.

Keywords: *Symphiopappus*; *Eupatorium*; anticancer; natural products, extracts.

1. Introduction

Throughout history, a variety of plants or plant-derived materials have been used for the prevention and treatment of several diseases in virtually all cultures (Matthews et al., 1999). Plants have also formed the basis of sophisticated traditional medicine systems (Cragg et al., 1999; Schwartsmann et al., 2002). Over the last five decades, a systematic approach to drug discovery and development has led to the identification of a significant number of active agents for the management of human cancer, which were derived from terrestrial and marine natural sources (Jessup et al., 1996; Schwartsmann et al., 2001; da Rocha et al., 2001). As the need for more effective antineoplastic agents remains, nature continues to be a very rich source of anticancer compounds (Mans et al., 2000).

Asteraceae is a large family comprising millions species. The genus *Symphiopappus* belongs to the Eupatorieae and over ten species are listed, all appearing to be restricted in Brazil (King and Robinson, 1987). *Symphiopappus casarettoi* is synonym of *Eupatorium casarettoi*, and it is native to South Brazil. The two genera are very similar and there is controversy about which genus this plant belongs on the basis of morphological and anatomical data. A molecular study to clarify this matter is warranted.

Various species of the Asteraceae have been used in folk medicine in different parts of the world. *Eupatorium* spp are used against several diseases and are know to contain a considerable number of bioactive natural products. This genus seems to be a promising bioresource for lead to new drugs and value-added products (Sharma et al., 1998). Species that belong to this genus have shown to posses cytotoxicity and antitumor (Herz et al., 1981; Woerdenbag et al.,1987; Woerdenbag,1989; Rucker et al., 2001; Yang et al., 2004), antibacterial (Habtemariam and Macpherson, 2000; El-Seedi et al., 2002), antifungal

(Gupta et al., 2002.) antiinflammatory and antioxidant (de las Heras et al., 1998), ant-repellent (Okunade and Wiemer, 1985), antiplasmodial (Lang et al., 2002) activities.

The purpose of this study was to evaluate the antiproliferative activity of crude and partially purified extracts of *Symphiopappus casarettoi* Robinson (syn: *Eupatorium casarettoi* (B.L. Rob) (Steerm) against a series of human tumor cell lines, fibroblasts and lymphocytes.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Symphiopappus casarettoi was collected in the Estrada do Mar, Arroio do Sal – RS, Brazil. A voucher specimens (Bordignon et al., 2396) was identified by Dr. S. Bordignon, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil and has been deposited in the Herbarium of the same university.

2.2. Extract preparation

The air dried and powdered inflorescence material was extracted with ethanol (EtOH) 10x the weight in volume (yield:12.07%) by maceration. These organic extracts were concentrated by rotary evaporation in a Quimis 219 equipment and stored at –20°C until testing.

Subsequently, the crude extract was dissolved successively with hexane (C₆H₁₄) (yield:19.60%), chloroform (CHCl₃) (yield:43.40%) and methanol (MeOH)

(yield:32.60%). These fractions were also evaporated to dryness under reduced pressure at 45°C.

CHCl₃ fraction was partitioned with 25ml EtOH and 25ml lead acetate 10% to form the enriched sesquiterpene lactones fraction (ESL) which was re-solubilized with CHCl₃ and submitted to preparative TLC over silica gel 60 PF₂₅₄ (Merck). The plate was eluted using the system hexane:CHCl₃:MeOH (20:79:01). Chromatograms were visualized in UV (254 and 365nm) and revealed Vanillin-sulphuric acid spray. Resulting spots were coded as C₀, C₁, C₂ and C₃.

2.3. *Phytochemical analysis*

Phytochemical analysis was performed with dry and powdered inflorescences of *S. casarettoi* as described previously (Costa, 2002).

2.4. *HPLC analysis*

Ten mg of ESL fraction was diluted in 10 ml methanol and taken to perform HPLC analysis. The HPLC system (Shimadzu) consisted of a pump (LC-10ATVP), a degasifier (DGU-14A), a column oven (CTO-10ASVP), an autosampler (SIL10AF), a diode array detector (SPDM10AVP) and a SCL-10AVP control module. Column was a Shim-Pack C18, 15 x 4.6 mm, 5 µm particle size. Mobile phase used for isocratic elution was acetonitrile: phosphate buffer pH 2.3 (63:37 v/v). Injection volume was 10µl at flow-rate of 1ml/min and 225 nm monitoring (sweeping 196 to 380 nm). The sample was analysed for the presence of eupatoriopicrin and quercetin.

2.5. Cell line maintenance

The crude extracts as well as (partially) purified samples prepared from them were evaluated for their cell growth-inhibiting potential at 100 µg/ml concentration, against two cell lines: HT29 human colon carcinoma and NCI-H460 non-small cell lung carcinoma. Subsequently, extracts were evaluated in the five human cell line panel, at five concentrations (50, 25, 10, 5, 1 µg/ml) and the IC₅₀ value (concentration that inhibits 50% of cell growth when compared to untreated controls) was determinate. The cell lines were: HT29 human colon carcinoma, NCI-H460 non-small cell lung carcinoma, MCF-7 human breast carcinoma, OVCAR-3 human ovarian carcinoma were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville; Maryland, USA) and RXF393 human kidney carcinoma, was kindly supplied by Dr. G. Cragg from the National Cancer Institute (USA).

Further, spots resulted from TLC were evaluated in fibroblasts and lymphocytes obtained from healthy donors. Fibroblasts were centrifuged from amniotic fluid and lymphocytes were obtained by Ficoll-Hypaque centrifugation from anticoagulated venous blood.

Cells were maintained in RPMI 1640 cell culture medium containing 10% (v/v) fetal calf serum and 2% (w/v) L-glutamine, at a temperature of 37°C and in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Fibroblasts were maintained in Amniomax (Gibco) medium at the same conditions.

2.6. Cell growth inhibition studies

Thus, cancer cell were inoculated into the wells of microtiter plates and incubated for 72 h in the presence of extract. Extracts were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and further diluted with cell culture medium (final DMSO concentration of 0.25%, v/v) before inoculation. At the end of the incubation period, cells were fixed *in situ* with trichloroacetic acid (TCA) 50%, stained with sulforhodamine B (SRB) and assessed by means of a colorimeter (ELISA microplate reader, 515 nm) for their cell growth-inhibiting capacity (Monks et al., 2002).

Compounds were considered to have potent growth inhibitory activity when the reduction in SRB absorbance was lower than 25% when compared to untreated cells, or the IC₅₀ value was ≤50µg/ml. The DMSO present in the samples (0.25%,v/v) was shown not to affect the experiments performed.

2.7. Flow cytometric analysis of cell cycle phase distribution.

MCF-7 human cell line and human normal fibroblasts were treated with the IC₅₀ value of C₂ TLC spot for 72h. After treatment, cells were harvested by trypsinization and washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) (3,000 rpm centrifuged). Samples (floating and adherent cells) were then fixed in 70% EtOH at 4°C overnight. The 3,000 rpm centrifuged cells pellet was again washed and resuspended in ice-cold PBS. Into 0.5 ml cell sample was added 0.5 ml hypotonic fluorochrome solution (RNase A 250 µl/ml, 100µg/ml propidium iodide in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100).

Samples were then incubated in the dark at room temperature for 30 min, and kept at 4°C until measured. Cells (15,000) were assessed using a flow cytometer (FACS Calibur). The DNA content was analyzed using ModFit 2.0 software. The number of cells having a subdiploid DNA content was taken as a measure of the number of apoptotic cells (Nicoletti et al., 1991).

2.8. Statistical analysis

The statistical analysis (ANOVA) was performed using the SPSS 10.0 software.

3. Results and Discussion

The ethanolic extract showed a potent growth inhibitory effect (< 25% of control SRB absorbance) at 100 µg/ml in the HT-29 and H-460 human cell lines (Figure 1). The presence of antiproliferative activity is in accordance with previous observations with species of the *Eupatorium* genus, which were shown to have cytotoxic activity in various preclinical models (Woerdenbag et al., 1989; Habtemariam and Macpherson, 2000; Mongelli et al., 2000).

Subsequently, the ethanolic extract was submitted to fractionation with solvents of increasing polarity and re-assayed in five concentrations (50, 25, 10, 5, 1 µg/ml) against a panel of five human tumor cell lines (Table 1). Testing the hexane, chloroform and methanol fractions, we observed a typical concentration-dependent antiproliferative effect of the CHCl₃ fraction against five cancer cell lines. HT29 was the most resistant cell line,

showing an IC₅₀ value 3.1-fold higher than RXF393 (less resistant cell line) (Table 1). The chloroform fraction was the most active one, with IC₅₀ values ranging from 20.01±0.92 to 6.42±0.73 µg/ml. Considering that the antiproliferative effect in *Eupatorium* genus has been attributed to sesquiterpene lactones, a large and diverse group of biologically active plant constituents (Robles et al., 1995) whose cytotoxic activity was previously demonstrated (Sharma et al., 1998), we decide to elute the chloroformic fraction with lead acetate to form an enriched sesquiterpene lactones fraction (ESL). Results of the phytochemical analysis are summarized in Table 3. HPLC analysis of this fraction suggested the presence of eupatoriopicrin, a characteristic sesquiterpene lactone from *Eupatorium* genus. The ESL fraction showed the lowest IC₅₀ values against the five human tumor cell lines (p<0.05) ranging from 6.45±2.37 to 3.42±0.44 µg/ml. Notably, the IC₅₀ values were more than 2-fold lower in all cell lines (p<0.05), when compared to the chloroformic fraction, suggesting that growth inhibitory effect was related, at least in part, to sesquiterpene lactones.

In order to continue the bioassay-guided purification, we submitted the ESL fraction to TLC. The resulting spots C₀, C₁, C₂ and C₃ were tested against the five tumor cell lines, fibroblasts and lymphocytes. No antiproliferative activity was observed in C₀. However, the C₁, C₂ and C₃ fractions showed a dose-dependent cytotoxic effect in highly proliferative cells (tumor cell lines and fibroblasts) inhibiting cell growth at doses ranging from 24.33±3.65 to 1.87±0.32 µg/ml, but were inactive against lymphocytes, which present a very low proliferation rate (Table 2). The results suggest that this effect is dependent on the presence of cells in exponential growing. Cells were more resistant to C₁ while IC₅₀ values were similar between C₂ and C₃.

The activity found in three of four fractions, could be attributed to more than one type of sesquiterpene lactones, considering that several of them have been isolated from *Eupatorium* species (Woerdenbag, 1988; Sharma et al., 1998; Yang et al., 2004). These bioactive compounds are known to possess a variety of skeletons, stereochemical variations, functional groups and positional isomerism. Variations in the molecular structure of the sesquiterpene lactones may enhance or diminish the cytotoxic properties (Woerdenbag, 1988).

The observed antiproliferative effects could also be related to the presence of flavonoids (Dobberstein et al., 1977; Herz et al., 1981; Stevens et al., 1995; Sharma et al., 1998; Colossi et al., 1999; Oliveira et al., 2001) others than quercetin, absent in ESL fraction as suggested by HPLC analysis. However, as shown in table 3, sesquiterpene lactones are present in much higher concentration in the SLE fraction and the cytotoxic effect of flavonoids have been demonstrated in a least extent (Woerdenbag, 1988).

Flow cytometry analysis was performed with the MCF-7 breast cancer cells and normal human fibroblasts. The fraction utilized in this assay was C₂, which showed the lowest IC₅₀ value (5.47±0.61 µg/ml) in MCF-7 cell line (p<0.001).

As shown in Figure 2, the antiproliferative effect of the C₂ fraction could be associated to alterations in the cell cycle phase distribution. MCF-7 cells were arrested in the S-phase of the cell cycle (2.3-fold increase in treated cells) (p=0.005), while fibroblasts were arrested in S and G₂-M phases of the cell cycle (p<0.001). In addition, there was only a small amount of cells in G₀-G₁ phases, when compared to control.

The induction of cell death was evaluated using flow cytometry in cells stained with propidium iodide. Despite the similar C₂ IC₅₀ values in both, MCF-7 cell line and

fibroblasts, results of flow cytometry analysis indicate that the mechanisms of action of the antiproliferative effect seems to differ in tested cells. By contrast to the induction of sub-G1 population in fibroblasts, C₂ TLC spot did not promote increase in sub-G1 cell fraction in MCF-7 cells, suggesting that in this cell line this fraction decreases the survival of cells by a nonapoptotic mechanism. Indeed, some sesquiterpene lactones are know to have both cytostatic and cytotoxic effects against human tumor cell lines (Woerdenbag, 1988), causing DNA damage in tumour cells (Woerdenbag et al., 1989).

In summary, our preliminary results demonstrated the antiproliferative activity of extracts from *S. casarettoi*, confirming previous observations of this effect of compounds derived from *Eupatorium* genus. Considering that the extracts proved to be active at relatively low concentrations, further studies are warranted to complete the isolation and characterization of its active components and to better define its therapeutic potential.

Acknowledgements

Financial support of the CNPq/Brasil and SOAD. We thank staff of Screening and Extraction Laboratories, Lutheran University of Brazil, for assistance and Dr. R. Bos for kindly supply the eupatoriopricrin.

References

Colossi, R., Rauber, T., Silva, R., Rates, S.M.K., 1999. Análise fitoquímica de *Eupatorium verbenaceum* de candolle (Asteraceae). Acta Biol Leopold 21, 63-69.

Costa, A.F., 2002. Farmacognosia. 6ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Cragg, G.M., Boyd, M.R., Khanna, R., Newman, D.J., Sausville, E.A., 1999. Natural product drug discovery and development. The United States National Cancer Institute Role. In: Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense. Romeo (ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 2-29.

da Rocha, A.B., Lopes, R.M., Schwartzmann, G., 2001. Natural products in anticancer therapy. Curr Opi Pharmacol 4, 364-369.

de las Heras, B., Slowing, K., Benedí, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., Bermejo, P., Iglesias, I., Abad, M.J., Gómez-Serranillos, P., Liso, P.A., Villar, A., Chiriboga, X., 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. J Ethnopharmacol 61, 161-166.

Dobberstein, R.H., Tin-Wa, M., Fong, H.H.S., Crane, F.A., Farnsworth, N.R., 1977. Flavonoid constituents from *Eupatorium altissimum* L. (Compositae). J Pharma Sci 4, 600-602.

El-Seedi, H.R., Ohara, T., Sata, N., Nishiyama, S., 2002. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 81, 293-296.

Gupta, M., Mazumder, U.K., Chaudhuri, I., Chaudhuri, R.K., Bose, P., Bhattacharya, S., Manikandan, L., Patra, S., 2002. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. *Fitoterapia* 73, 168-170.

Habtemariam, S. and Macpherson, A.M., 2000. Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of a herbal drug, boneset (*Eupatorium perfoliatum*). *Phytother Res* 14, 575-577.

Herz, W., Govindan, S.V., Kumar, N., 1981. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eupatorium lancifolium* and *E. semiserratum*. *Phytochem* 20, 1343-1347.

Jessup, J.M., McGinnis, L.S., Winchester, D.P., Eyre, H., Fremgen, A., Murphy, G.P., Menck, H.R., 1996. Clinical highlights from the National Cancer Database:1996. *CA A Cancer J Clin* 46, 185-187.

King, R.M. and Robinson, H., 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Missouri Botanical Garden, Saint Louis 581p.

Lang, G., Passreiter, C.M., Wright, C.W., Filipowicz, N.H., Addae-Kyereme, J., Medinilla, B.E., Castillo, J.J., 2002. Antiplasmodial activities of sesquiterpene lactones from *Eupatorium semialatum*. *Z Naturforsch* 57, 282-286.

Mans, D.R.A., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5, 185-198.

Matthews, H.B., Lucier, G.W., Fisher, K.D., 1999. Medicinal herbs in the United States: research needs. *Environ Health Perspec* 107, 1-6.

Mongelli, E., Pampuro, S., Coussio, J., Salomon, H., Ciccía, G., 2000. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *J Ethnopharmacol* 71, 145-151.

Monks, N.R., Bordignon, S.A.L., Ferraz, A., Machado, K.R., Faria, D.H., Lopes, R.M., Mondin, C.A., Souza, I.C.C., Lima, M.F.S., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., 2002. Anti-tumor screening of Brazilian plants. *Pharm Biol* 40, 623-646.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.

Okunade, A.L. and Wiemer, D.F., 1985. Ant-repellent sesquiterpene lactones from *Eupatorium quadrangulrae*. *Phytochem* 24, 1199-1201.

Oliveira, B.H. de, Nakashima, T., Souza Filho, J.D. de, Fehse, F.L., 2001. HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*. J Braz Chem Soc 12, 243-246.

Robles, M., Aregullin, M., West, J., Rodriguez, E., 1995. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. Planta Med 61, 199-203.

Rucker, G., Heiden, K., Schenkel, E., 2001. Antitumor-active lactones from *Kaunia rufescens* and *Eupatorium cannabinum*. J Indian Inst Sci 81, 333-334.

Schwartzmann, G., Ratain, M.J., Cragg, G.M., Wong, J.E., Saijo, N., Parkinson, D.R., Fujiwara, Y., Pazdur, R., Newmann, D.J., Dagher, R., Di Leone, L., 2002. Anticancer drug discovery and development throughout the world. J Clin Oncol 18(Suppl), 47S-59S.

Schwartzmann, G., da Rocha, A.B., Berlinck, R.G., Jimeno, J., 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. Lancet Oncol 12, 716-717.

Sharma, O.P., Dawra, R.K., Kurade, N.P., Sharma, P.D., 1998. A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. Nat Toxins 6, 1-14.

Stevens, J.F., Elema, E.T., Wollenweber, E., 1995. Exudate flavonoids of *Eupatorium cannabinum*. Biochem Sys Ecol 23, 451-452.

Woerdenbag, H.J., Malingre, T.M., Lemstra, W., Konings, A.W.T., 1987. Cytostatic activity of eupatoriopicrin in fibrosarcoma bearing mice. *Phytother Res* 1, 76-79.

Woerdenbag, H.J., 1988. A fundamental study on the cytostatic action of sesquiterpene lactones from *Eupatorium cannabinum* L. Ph.D. Thesis, University of Groningen, The Netherlands.

Woerdenbag, H.J., van der Linde, J.C.C., Kampinga, H.H., Malingré, T.M., Konings, W.T., 1989. Induction of DNA damage in Ehrlich Ascites tumour cells by exposure to eupatoriopicrin. *Biochem Pharmacol* 38, 2279-2283.

Yang, S-P., Huo, J., Wang, Y., Lou, L-G., Yue, J-M., 2004. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Eupatorium chinese*. *J Nat Prod* 67, 638-643.

Table 1. IC₅₀ values (µg/ml; means ± SD; n=9) in five cell lines after treatment for 72h with hexane, chloroform, methanol and sesquiterpene enriched fractions of *S. casarettoi*.

Table 2. IC₅₀ values (µg/ml; means ± SD; n=9) in five cell lines, fibroblasts and lymphocytes after treatment for 72h with C₀, C₁, C₂ and C₃ TLC spots from sesquiterpene lactones enriched fraction of *S. casarettoi* (syn: *E. casarettoi*).

Table 3. Phytochemical analysis of inflorescences of *S. casarettoi* (syn: *E. casarettoi*).

Figure1. Percentage of cell growth (means ± SD, n=9) in H-460 non-small cell lung carcinoma and HT-29 colorectal carcinoma by 72h *S. casarettoi* ethanolic extract treatment.

Figure 2. Cell cycle phase distribution (% of cells; means ± SD, n ≥ 9) in MCF-7 breast carcinoma and human normal fibroblasts, upon treatment for 72h with C₂ TLC spot from chloroformic fraction of *S. casarettoi*.

Table 1.

	Hexane	Chloroform	Methanol	SL
HT-29	OR	20.01±0.92	OR	6.45±2.37
NCI-H460	OR	11.36±3.07	OR	5.48±1.87
RXF393	OR	6.42±0.73	47.00±3.37	3.42±0.44
MCF-7	OR	14.13±4.08	OR	5.84±1.28
OVCAR-3	OR	11.81±4.21	OR	4.38±0.90

SL: Sesquiterpene lactones enriched fraction

OR: Overage ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$)

Table 2.

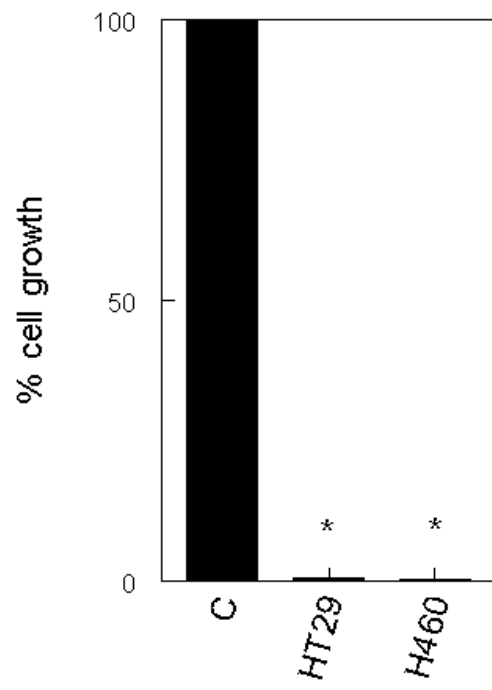
	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃
HT29	OR	24.33±3.65	7.88±0.49	8.64±0.64
NCI-H460	OR	18.05±0.27	3.28±0.70	3.50±0.08
RXF393	OR	6.93±0.48	2.46±0.23	1.87±0.32
MCF-7	OR	14.69±4.42	5.47±0.61	6.65±0.48
OVCAR-3	OR	9.26±0.44	4.48±0.64	4.48±0.85
FIBROBLASTS	OR	18.92±2.96	4.52±0.27	3.73±0.07
LYMPHOCYTES	OR	OR	OR	OR

OR: overage ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$)

Table 3.

Compounds	Results
Phenolic compounds	Positive
Flavonoids	Weakly positive
Lactones	Strongly positive
	Negative
Coumarins	
Tanins	Negative
Cardiotonic heterosides	Negative
Alkaloids	Negative
Saponins	Negative
Antraquinones	Negative

Figure 1.



*Different of control

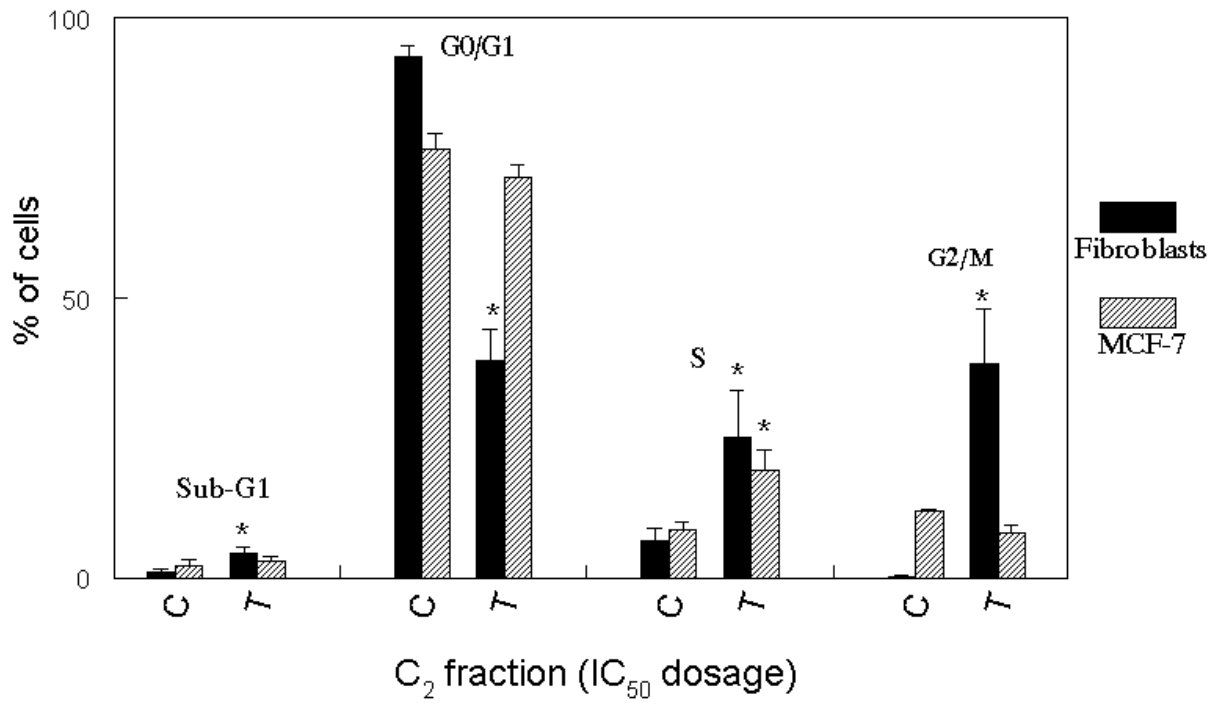


Figure 2.

*Different of control

C: Control

T: Treated

List of abbreviations

DMSO: dimethylsulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

ESL: enriched sesquiterpene lactones fraction

PBS: phosphate-buffered saline

RNAse: ribonuclease

rpm: rotations per minute

SRB: sulforhodamine B

TCA: trichloroacetic acid

TLC: thin layer chromatography

UV: ultraviolet

ARTIGO 2

Antimalarial activity of *Symphyopappus casarettoi* Robinson (Asteraceae) extracts.

(A ser submetido à Phytotherapy Research).

Antimalarial activity of *Symphopappus casarettoi* Robinson (Asteraceae) extracts.

Mara Regina Netto Benetti¹, Rodrigo Soares², Isabel Freitas², Adriana Coitinho³, Gilberto Schwartzmann^{1,4} and Antoniana Ursine Krettl².

¹ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratory of Malaria, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ University Center Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

⁴ South-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Antimalarial activity of *S. casarettoi*.

Keywords: *Symphopappus*, *Eupatorium*, Asteraceae, antimalarial activity.

Correspondence to:

Mara R. N. Benetti

Address: South-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 3 Leste, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil.

CEP: 90035-007.

E-mail: marare1@hotmail.com

Telephone/Fax: 55-51-2101-8012

SUMMARY

The antibacterial, antifungal and antimalarial activities of extracts of *Symphopappus casarettoi* (syn. *Eupatorium casarettoi*) were investigated. The extracts showed no antibacterial and antifungal activities. Antimalarial activity was observed *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo*, at 250 mg/kg in mice infected with *P. berghei*. The chloroformic fraction was the most active one, while methanolic fraction did not demonstrate any activity and the hexanic fraction had a weak activity. Further studies to confirm its antimalarial properties and the identification of the chemical structure of the active(s) compound(s) are planned.

INTRODUCTION

Fungus, bacterias and other microorganisms cause important human diseases, especially in tropical regions and in immunocompromised patients. Although there are many potent drugs against microorganisms, resistant or multi-resistant lines are continually appearing, carry on the need of new drugs research and development (Silver and Bostian, 1993). Malaria (caused by *Plasmodium* spp) is one of the most important parasitic infections of humans due to its high morbidity and mortality (Andrade-Neto et al., 2004b), affecting more than 500 million people a year, and killing about 2,7 million of them (Go, 2003).

Eupatorium spp were reported to have activity against several diseases and are know to have a considerable number of bioactive natural products. Among its biological activities are antimicrobial (Gupta et al., 2002) and anti-plasmodial (Lang et al., 2002). In this paper, we presented the results of the antibacterial, antifungic and antimalarial evaluation of *Symphyopappus casarettoi* Robinson (syn. *Eupatorium casarettoi* (B.L. Rob) Steyerm) (Asteraceae) extracts.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and extract preparation. *Symphyopappus casarettoi* Robinson (Asteraceae) was collected in the Estrada do Mar, Arroio do Sal – RS, Brazil. A voucher specimens (Bordignon et al., 2396) was identified by Dr. S. Bordignon, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil and has been deposited in the Herbarium of the same university.

The air dried and powdered inflorescence material was extracted with ethanol (EtOH) 10x the weight in volume (yield:12.07%) by maceration. These organic extracts were concentrated by rotary evaporation in a Quimis 219 equipment and stored at -20°C until testing. Subsequently, the crude extract was eluted successively with hexane (C_6H_{14}) (yield:19.60%), chloroform (CHCl_3) (yield:43.40%) and methanol (MeOH) (yield:32.60%). These fractions were also evaporated to dryness under reduced pressure at 45°C .

Antibacterial and antifungal assays. Antibacterial and antifungal activities were tested using the modified broth microdilution MIC testing (Hindler J, 1997) with *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Briefly, 90 μl of sterile Mueller-Hinton or Saboraud 2% broths, 100 μl of corresponding dosis of the extract (700, 300, 100, 50, 20, 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$) and 10 μl of bacterial or fungal suspension (0,5 Mc Farland) were inoculated in microdilution wells and incubated in ambient-air incubator at 35°C overnight. Standard antibiotics were ceftazidime and chloramphenicol for bacterias and anfotericin for fungus. The MIC (minimal inhibitory concentration) was determined by observing the lowest concentration of extract that inhibited visible growth of the organisms. Experiments were performed in triplicates.

Antimalarial assays. *Plasmodium falciparum* (clones W2 and BH2) parasites were cultured with human erythrocytes (blood group O^+) at 5% hematocrit in RPMI 1640 supplemented with 10% human plasma as previously described (Trager & Jensen, 1976).

Antimalarial activity was tested as described previously (Desjardins et al., 1979). Briefly, *in vitro* [³H]-hypoxanthine incorporation assay was performed with trophozoite stages in sorbitol-synchronized blood cultured at 2% parasitaemia and 2.5% haematocrit. *P. falciparum* were incubated in 96 wells plates with the plant extracts at different concentrations, at a temperature of 37°C, 5% CO₂ in air, for 24h. After, 25 µl of a [³H]-hypoxanthine solution were added, following 18h incubation. Then, erythrocytes were lysed, harvested and readed in a Betaphase or Microbeta apparatus (Wallac-Perkin Elmer) to count [³H]-hypoxanthine incorporation. The half-maximal inhibitory response (IC₅₀) compared with parasite growth in the drug-free controls was estimated by curve fitting using a software program (Microcal, Origin Software, Inc., Northampton, MA, USA). Chloroquine was the standard antimalarial drug.

In vivo antimalarial suppressive test described by Peters (1985) and modified by Carvalho et al., (1991) was performed in mice infected with *P. berghei*, strain NK-65, originally received from New York Medical School. Parasites were maintained by weekly blood passage in BALB/c mice by intraperitoneal route, 10⁵ infected red blood cells per mice. Animals were randomly separated into groups of five (two control groups: treated with chloroquine and not treated, and tested groups). Treatment was carried out by oral route, daily, for 4 consecutive days, in dosis of 250 and 500 mg/kg of the extracts of *S. casarettoi*, diluted in 70% ethanol and further solubilized in water (0.2 ml volume per animal). Antimalarial activity was evaluated by counting parasitaemia in blood smears taken at days 5 and 7 after parasite inoculation, by microscopy, after methanol fixation and staining with Giemsa. Inhibition of parasite growth was calculated in relation to the control (non-treated) group. Results were expressed as a percentage of parasitaemia reduction and

extracts that reduced parasite growth by $\geq 30\%$ were considered active (Carvalho et al., 1991). All assays were performed in triplicate.

Animal use and ethical approval. BALB/c adult mice, weighing 18-20g, were used for the antimalarial tests. The animals received water and food *ad libitum*. Their use was approved by the Ethical Committee for Using Animals (CEUA-P0094-01) at Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

RESULTS AND DISCUSSION

Over the past years, some researchers have demonstrated the antibacterial and antifungal properties of *Eupatorium* species (Urzua et al., 1998; Habtemariam and Macpherson, 2000; El-Seedi et al., 2002; García et al., 2003). We did not observed such activities testing inflorescence ethanolic extract of *S. casarettoi*. That might be due to the low concentration of flavonoids found in phytochemical screening (data not showed). Since some of these compounds are known to be synthesized by plants in response to microbial infection, it should not be surprising that they have been found *in vitro* to be effective antimicrobial substances against a wide array of microorganisms (Cowan, 1999).

This work shows for the first time the antimalarial activities of *S. casarettoi* (syn. *E. casarettoi*) extract and fractions. Ethanolic extract showed parasite growth inhibition *in vitro* against *P. falciparum* in a dose dependent manner (Figure 1). *In vivo* experiments suggested important antimalarial activity against *P. berghei*, reducing parasitaemia by 42% at day 5 and 63% at day 7 in animals treated with 250 mg/Kg of extract and 73% at day 5

and 65% at day 7 with 500 mg/Kg of extract (Table 1). These data confirmed the presence of a clear antimalarial activity. These results are in agreement with previous studies that suggested antiplasmodium and antimalarial activities of *Eupatorium* species (Carvalho et al., 1991; Blair et al., 2002; Lang et al., 2002).

In order to begin the bioassay-guided purification, the ethanolic extract was submitted to fractionation with solvents of increasing polarity and re-assayed *in vitro*. Both clones (W2 and BHz) of the human malaria parasite *P. falciparum* displays similar *in vitro* antimalarial susceptibility to *S. casarettoi* fractions (hexane, chloroform and methanol). As shown in Table 2, methanol fraction displays no activity ($IC_{50} \geq 50 \mu\text{g/ml}$) and hexane fraction displays a weak activity (IC_{50} 43.03 and 39.38 $\mu\text{g/ml}$, respectively). However, the chloroform fraction was the most active one, with IC_{50} values 4.97-fold and 4.42-fold lower than hexane fraction, in clones W2 and BHz respectively. Considering that in a phytochemical analysis (data not showed), *S. casarettoi* demonstrate to have a high concentration of sesquiterpene lactones, we speculate that the better antimalarial effect of chloroformic fraction is due to this class of compounds. Artemisinin is an example of a sesquiterpene lactone used in treatment of malaria.

These results are important in the sense that these strains are chloroquine-resistant and chloroquine is still widely used to treat malaria, but only in areas where notable drug resistance has not yet appeared (Krettli, 2001). The observed anti-malarial activity of *S. casarettoi* inflorescence extracts *in vitro* and *in vivo* were encouraging and have stimulated us to initiate additional experiments to isolate and identify the active compound (s) responsible for the above mentioned biological activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support of CNPq/Brazil and SOAD; Dr. S. Bordignon for identification of plant material; Dr. A. Bart for assistance with the antibacterial and antifungal assays.

REFERENCES

Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Oliveira FQ, Casali VWD, Njaine B, Zalis MG, Oliveira LA, Krettli AU. 2004. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. *Phytother Res* **18**: 634-639.

Andrade-Neto VF, Goulart MOF, Silva Filho JF, Silva MJ, Pinto MCFR, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU. 2004b. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 1145-1149.

Blair, S., Mesa, J., Correa, A., Carmona-Fonseca, J., Granados, H., Saez, J. (2002). Antimalarial activity of neurolenin B and derivatives of *Eupatorium inulaefolium* (Asteraceae). *Pharmazie* **57**, 413-415.

Carvalho, L.H., Brandão, M.G.L., Santos-Filho, D., Lopes, J.L.C., Krettli, A.U. (1991). Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants in vivo in *Plasmodium berghei*

infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Biol Med Res* **24**, 1113-1123.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 564-582.

Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* **16**, 710-718.

El-Seedi, H.R., Ohara, T., Sata, N., Nishiyama, S. (2002). Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* **81**, 293-296.

García, V.M.N., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M.Y., Zepeda, G., Rojas, M.G. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* **87**, 85-88.

Go, M-L. (2003). Novel antiplasmodial agents. *Med Res Rev* **23**, 456-487.

Gupta, M., Mazumder, U.K., Chaudhuri, I., Chaudhuri, R.K., Bose, P., Bhattacharya, S., Manikandan, L., Patra, S. (2002). Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. *Fitoterapia* **73**, 168-170.

Habtemariam, S., Macpherson, A., M. (2000). Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of a herbal drug, boneset (*Eupatorium perfoliatum*). *Phytother Res* **14**, 575-577.

Hindler, J. (1997) (ed.). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Microdilution method. Wayne, Pa.

Krettli, A.U., Andrade-Netto, V.F., Brandão, M.G.L., Ferrari, W.M.S. (2001). The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**, 1033-1042.

Lang, G., Passreiter, C.M., Wright, C.W., Filipowicz, N.H., Addae-Kyereme, J., Medinilla, B.E., Castillo, J.J. (2002). Antiplasmodial activities of sesquiterpene lactones from *Eupatorium semialatum*. *Z Naturforsch* **57**, 282-286.

Peters, W. (1985). The problem of drug resistance in malaria. *Parasitology* **90**, 705-715.

Silver, L.L., Bostian, K.A. (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 377-383.

Trager, W., Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 661-673.

Urzua, A., Caroli, M., Vasquez, L., Mendoza, L., Wilkens, M., Tojo, E. (1998).

Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* **62**, 251-254.

Figure 1. *In vitro* growth inhibition of *P. falciparum* (strain W2) incubated with ethanolic extract of *S. casarettoi* and the inhibitory concentration dose (IC₅₀) in one representative experiment.

Table 1. *In vivo* antimalarial activity of *S. casarettoi* ethanolic extract in mice infected with *P. berghei*. Results are representative of experiments performed in triplicata.

Table 2. *In vitro* growth inhibition (%) of *P. falciparum* (strains W2 e BHZ) incubated with chloroformic, methanolic and hexanic fractions of *S. casarettoi*.

Figure 1.

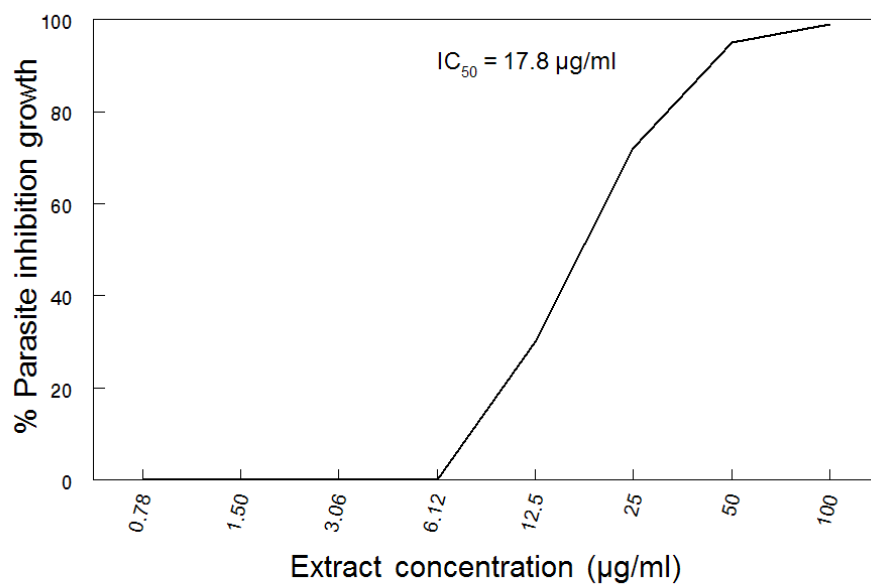


Table 1.

Ethanollic extract	Parasitaemia reduction	
	Day 5	Day 7
250 mg/kg	42%	63%
500 mg/kg	73%	65%

Table 2.

Concentration	Parasite inhibition growth						
	Hexane	Strain W2			Strain BHz		
		Chloroform	Methanol	Hexane	Chloroform	Methanol	
50 µg/ml	62%	80%	7%	60%	82%	14%	
25 µg/ml	18%	77%	0%	31%	79%	11%	
12.5 µg/ml	10%	62%	0%	19%	62%	14%	
6.25 µg/ml	0%	35%	0%	5%	34%	7%	
3.12 µg/ml	0%	18%	0%	0%	16%	0%	
1.56 µg/ml	0%	6%	0%	0%	0%	0%	
IC_{50}	43.03 µg/ml	8.71 µg/ml	≥ 50 µg/ml	39.38 µg/ml	8.90 µg/ml	≥ 50 µg/ml	

ARTIGO 3

Evaluation of the antioxidant effect of extracts of *Symphiopappus casaretoi*

Robinson.

(Aceito para publicação na Fitoterapia).

Evaluation of antioxidant effect of extracts of *Symphiopappus casarettoi* Robinson.

Mara Regina Netto Benetti^{a,c*}, Martina Rudnicki^{a,b}, Alfeu Zanotto^b, Marcos Roberto de Oliveira^b, Andréa Gisiane Kurek^a, Adriana Coitinho^d, Gilberto Schwartzmann^{a,c} and José Cláudio Fonseca Moreira^{a,b}.

^aCurso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 (anexo), Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90035-003.

^bCentro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 (anexo), Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90035-003.

^cSouth-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90035-007.

^dCentro Universitário Feevale, RS 239, 2755, Novo Hamburgo, RS, Brazil. CEP: 93352-000.

*Correspondence to:

E-mail: marare1@hotmail.com

Telephone/Fax: 55-51-2101-8012

Abstract

The ethanolic extract of *Symphyopappus casarettoi* (syn. *Eupatorium casarettoi*) was partitioned in three fractions (hexanic, chloroformic and methanolic). Extract and fractions were tested for their antioxidant activity *in vitro* and *ex vivo* assays. The methanolic fraction showed a higher total reactive antioxidant potential compared to the other fractions, which was correlated with its total phenol content. In addition, the ethanolic extract and the methanolic fraction attenuated *ex vivo* iron-induced cell death, quantified by lactate dehydrogenase leakage, and effectively protected against lipid damage induced by iron. These findings suggest that the ethanolic extract of *Symphyopappus casarettoi* inflorescence and its methanolic fraction have potent *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties and might be considered as possible new sources of natural antioxidants.

Keywords: *Symphyopappus*, *Eupatorium*, antioxidant activity.

Plant. *Symphyopappus casarettoi* Robinson (= *Eupatorium casarettoi* (B.L. Rob) Steyermer) was collected in Arroio do Sal, Rio Grande do Sul, Brazil, in January 2002. A voucher specimens (Bordignon et al., 2396) were identified by Dr. S. Bordignon, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil and are on deposited at the Herbarium of the same university.

Uses in traditional medicine. *Eupatorium* species have a wide range of activities such as cardiac stimulant, laxative, anticoagulants [1], against spleen, liver and biliary diseases, diarrhoea, ulcers, fever, bronchial infections, malaria, cancer, rheumatism. Also are used as a diuretic, immunostimulant and antiseptic, among others [2].

Previously isolated classes of constituents. *Eupatorium* species contain predominantly sesquiterpene lactones. Flavonoids and alkaloids have been also reported [3]. In a minor extent other classes of compounds such as coumarins [3], diterpenes [4], benzofuranes [5] and sesquiterpenes [2] were found in this genus.

Tested material. Ethanol extract (yield:12,07%), that was partitioned successively with hexane (yield:19,60%), chloroform (yield:43,40%) and methanol (yield:32,60%) resulting three fractions. Phytochemical screening gave positive tests for lactones and phenolic compounds.

Studied activity. Total phenolic content of the extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method [6] employing tannic acid as standard. The *in vitro* antioxidant activity was estimated by the TRAP assay [7] while the *ex vivo* cytoprotective potential was

verified by the LDH leakage [Kit LDH LiquiformTM, Brazil] and antilipoperoxidative activity by TBARS measurement [8].

Results. Results of the *in vitro* experiments are reported in Table 1 and data of the *ex vivo* assays are presented in Table 2. Hexanic fraction was excluded due low total polyphenol content.

Conclusions. The ethanolic inflorescence extract, the methanolic and the chloroformic fractions of *S. casarettoi* demonstrated a dose-dependent antioxidant capacity. However, the methanolic fraction showed a higher total reactive antioxidant potential compared to the other fractions. Total phenolic content and antioxidant capacity were correlated ($r = 0.976$) only in methanolic fraction suggesting that phenolic compounds accounted for the antioxidant capacity in this fraction. In addition, LDH leakage was significantly decreased with the presence of methanolic fraction in both concentrations tested suggesting a cytoprotective role. Methanolic fraction also prevented lipid peroxidation in a dose dependent manner, being the best antioxidant among those tested. Ethanolic extract prevented lipoperoxidation only in the concentration of 0.5 μ g/ml, maybe due to the increase of the concentration of other compounds (for example, sesquiterpene lactones) in the 5 μ g/ml that might be acting as pro-oxidant molecules. Further studies are in progress to identify the active components.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Bordignon for identification of the plant material.

References

[1] Gupta M, Mazumder UK, Chaudhuri I, Chaudhuri RK, Bose P, Bhattacharya S, Manikandan L, Patra S. *Fitoter* 2002;73:168.

[2] Sharma OP, Dawra RK, Kurade NP, Sharma PD. *Nat Toxins* 1998;6:1.

[3] Woerdenbag HJ. A fundamental study on the cytostatic action of sesquiterpene lactones from *Eupatorium cannabinum* L. Ph.D. Thesis, The Netherlands:University of Groningen, 1988. p.1.

[4] González AG, Barrera JB, Diaz JG, Pérez EMR, Yanes AC, Rauter P, Pozo J. *Phytochem* 1990;29:321.

[5] Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Navarro V. *Planta Med* 2003;69:967.

[6] Waterman P and Mole S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p.1.

[7] Polydoro M, de Souza KC, Andrades ME, da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EE, Bassani VL, Moreira JCF. *Life Sci* 2004;23: 2815.

[8] Draper HH, Hadley M. *Methods Enzymol* 1990;186:421.

Table 1. Total polyphenol content of ethanolic extract and methanolic and chloroformic fractions of *S. casarettoi* and their antioxidant properties (TRAP). Results of total polyphenol content were expressed as mg/g of extract and data of TRAP were expressed as trolox equivalent capacity (TEAC). Experiments were performed in triplicate.

Table 2. The effect of ethanolic extract and methanolic fraction of *S. casarettoi* on iron induced lipoperoxidation (TBARS) and on LDH leakage. Results of TBARS were expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein) \pm SD and in LDH leakage are expressed as U LDH/ μ g protein \pm SD. The chosen doses of the extract and the fraction were the lowest concentration that showed an antioxidant capacity in the TRAP assay. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate.

Table 1.

	Ehanolic extract	Metanolic fraction	Chloroformic fraction
TRAP (TEAC)	3.02	0.41	0.1
Total polyphenolic content (mg/g extract)	2.16	4.104	1.403
Correlation between TEAC and total phenolic content	0,919	0,976*	0,81

*Pearson coefficient; $p < 0.05$

Table 2.

	TBARS (nmol/mg protein \pm SD)		LDH (U LDH/ μ g protein \pm SD)	
	Ethanollic	Methanolic	Ethanollic	Methanolic
Control	0.133 \pm 0.012	0.203 \pm 0.012	2.830 \pm 0.075	1.059 \pm 0.151
Control+Iron	0.425 \pm 0.065*	0.350 \pm 0.15*	3.937 \pm 0.105*	1.877 \pm 0.221*
Extract	0.141 \pm 0.018	0.162 \pm 0.018	2.500 \pm 0.200	1.334 \pm 0.066
Extract + Iron	0.2971 \pm 0.017**	0.241 \pm 0.013**	3.221 \pm 0.045	1.014 \pm 0.012**
Extract 10x + Iron	0.465 \pm 0.035*	0.103 \pm 0.006***	2.671 \pm 0.120**	1.170 \pm 0.102**

*Different of control.

**Different of control + iron (FeSO₄ 80 μ M).

*** Different of control, different of control + iron (FeSO₄ 80 μ M) and different of extract + iron (FeSO₄ 80 μ M)

ANOVA; Tukey and SNK tests; $p < 0.05$

6. DISCUSSÃO

Desde os tempos mais remotos, em todos os povos, extratos de plantas são comumente utilizados para tratar doenças. Isso sugere que o apelo de “drogas maravilhosas” que resolvem problemas médicos complexos é universal e parte da natureza humana (Schwartzmann, 2001). O redescobrimento da conexão entre plantas e saúde é responsável pelo lançamento de uma nova geração de tratamentos envolvendo vegetais, que incluem medicamentos derivados de plantas, fármacos “multicomponentes”, suplementos dietéticos e proteínas recombinantes produzidas a partir de plantas (Devasagayam et al., 2004). Medicamentos derivados de plantas precederam os progressos da medicina ao longo de nossa existência (Schwartzmann, 2000). Os compostos, isolados das plantas, podem ser usados como tais, mas também como moléculas que servem de base para a preparação de compostos semi-sintéticos ou ainda servir como modelo para sintetizar outros compostos (Woerdenbag, 1988).

O gênero *Eupatorium* tem sido pesquisado em várias partes do mundo e muitas propriedades biológicas são atribuídas a extratos e compostos bioativos presentes nas plantas pertencentes a espécies desse gênero. O principal grupo de atividades biológicas relacionadas a esse gênero refere-se ao câncer: citotóxica, citostática, antitumor e antileucêmica (Woerdenbag, 1988; Sharma et al., 1998; Mongelli et al., 2000; Rucker et al., 2001; Monks et al., 2002; Yang et al., 2004; Shen et al., 2005). Destacam-se também as atividades antimicrobianas: antibactérias, antifungos e antivírus (Abad et al., 1999; Hnatyszyn et al., 1999; Habtemariam e Macpherson, 2000; El-Seedi et al., 2002; García et al., 2003, Muschietti et al., 2005; Sasikumar et al., 2005). Citam-se ainda propriedades antimaláricas (Blair et al., 2002; Lang et al., 2002), antioxidantes (de las Heras et al., 1998)

e antiinflamatórias (de las Heras et al., 1998; Habtemariam, 2001; Muschietti et al., 2001), entre inúmeras outras.

Dentre os compostos presentes em plantas desse gênero, merecem atenção as lactonas sesquiterpênicas, que serão discutidas mais adiante juntamente com as propriedades biológicas de *S. casarettoi*. Também foram descritos polifenóis, alcalóides e inúmeros outros grupos de substâncias. De acordo com o screening fitoquímico realizado com *S. casarettoi*, as lactonas são os metabólitos secundários majoritários. Compostos fenólicos estão presentes nessa planta, sendo baixa a concentração de flavonóides. Não detectamos a presença de cumarinas, taninos, saponinas, antraquinonas, heterosídeos cardiotônicos ou alcalóides. Pela análise de HPLC, observamos a presença de eupatoriopicrina, a lactona mais freqüentemente encontrada nas espécies de *Eupatorium*, segundo revisão bibliográfica. Essa análise também sugeriu ausência de quercetina, flavonóide observado em espécies vegetais de vários gêneros, incluindo *Eupatorium* (Nair Ramachandran et al., 1995).

Apesar dos avanços na compreensão dos processos biológicos que levam ao desenvolvimento de câncer, ainda há a necessidade de agentes novos e efetivos, para auxiliar no controle dessa doença. Uma das mais antigas e mais efetivas estratégias para desenvolver novos quimioterápicos é o isolamento de moléculas de origem natural. A importância dos produtos naturais para a descoberta de fármacos é impressionante: basta olhar para o número de fármacos clinicamente ativos utilizados na terapia do câncer, para ver quantas delas são produtos naturais ou baseadas em produtos naturais (Modzelewska et al., 2005). Para satisfazer a demanda de novos agentes anticâncer, os cientistas estão percorrendo o mundo em busca de organismos que possuam compostos com propriedades antiproliferativas (Monks et al., 2002).

Levando em consideração que um agente anticâncer pode ter suas propriedades farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas melhoradas devido a variações moleculares e que os compostos oriundos do metabolismo secundário variam de espécie para espécie, muitos pesquisadores baseiam-se na literatura existente para eleger suas plantas-alvo de estudo. Docetaxel é um exemplo de um composto anticâncer desenvolvido a partir de uma molécula isolada de uma planta do mesmo gênero (*Taxus*) com propriedades melhoradas, se comparada ao composto original (paclitaxel). Assim, *Symphopappus casarettoi* foi selecionada com base em informações quimiossistemáticas de espécies do gênero *Eupatorium*.

A presença de atividade antiproliferativa *in vitro* no extrato etanólico de *S. casarettoi* confirmou as observações prévias para plantas do gênero *Eupatorium*. Como no campo da descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais, um método que aumenta o sucesso é o fracionamento bioguiado (Park e Pezzuto, 2002), o extrato etanólico foi fracionado em hexano, clorofórmio e metanol e novamente testado. Visto que o efeito antiproliferativo nesse gênero é atribuído principalmente às lactonas sesquiterpênicas, nossos resultados também sugeriram ser provável que esse mesmo grupo seja o responsável por essa atividade, uma vez que obtivemos um IC₅₀ menor para a fração clorofórmica (obtida a partir do extrato etanólico) e ainda menor para a fração enriquecida de lactonas sesquiterpênicas (obtida a partir da fração clorofórmica). A fração hexânica não demonstrou efeito antiproliferativo em nenhum dos tipos celulares testados e a metanólica apresentou somente na linhagem tumoral RXF 393.

Sesquiterpenos são uma classe de moléculas que têm demonstrado potencial terapêutico (Modzelewska et al., 2005). As frações C₁, C₂ e C₃ (separadas a partir da fração enriquecida de lactonas sesquiterpênicas) demonstraram efeito antiproliferativo, sendo que

no tratamento com C₁ houve uma maior resistência celular, se comparado ao tratamento com C₂ e C₃ que demonstrou valores menores de IC₅₀. As lactonas sesquiterpênicas são conhecidas também por possuírem uma ampla variedade de esqueletos, variações estereoquímicas, grupos funcionais e isomerismo de posição. Essas variações estruturais podem aumentar ou diminuir a atividade citotóxica (Woerdenbag, 1988). Por esse motivo, sugerimos que o efeito antiproliferativo encontrado em C₁, C₂ e C₃, possa ser atribuído a mais de um tipo de lactonas sesquiterpênicas, considerando que muitas delas já foram isoladas de espécies do gênero *Eupatorium* (Woerdenbag, 1988; Sharma et al., 1998; Yang et al., 2004).

Segundo Woerdenbag (1988), a ação de algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas de *E. cannabinum* não é específica, resultando em pouca discriminação de toxicidade entre células de tecido tumoral e células de tecidos normais. Apesar de diminuir a sobrevivência de fibroblastos e células tumorais de forma semelhante (valores de IC₅₀ próximos), as frações C₁, C₂ e C₃ de *S. casarettoi* não causaram decréscimo de sobrevivência em leucócitos, sugerindo que o efeito antiproliferativo dos compostos é observado somente em células em crescimento exponencial. Diversos fármacos em uso clínico no tratamento de câncer, também afetam todas as células em crescimento exponencial, causando os efeitos colaterais mais freqüentemente observados em pacientes utilizando quimioterápicos: alopecia e mielossupressão.

Na tentativa de indicar um mecanismo de ação para a fração C₂, e de observar se esse mecanismo assemelhava-se em células normais e tumorais, foi realizada a citometria de fluxo. Observou-se que o efeito antiproliferativo da fração C₂ pode ser associado a alterações na distribuição das fases do ciclo celular, uma vez que a linhagem MCF-7 teve seu ciclo celular interrompido na fase S, enquanto os fibroblastos tiveram seu ciclo celular

interrompido nas fases S e G2-M, além de uma quantidade pequena de células nas fases G0-G1, se comparadas ao controle. A interrupção do ciclo celular na fase S, provavelmente ocorreu devido à inibição da síntese de enzimas envolvidas na replicação do DNA, uma vez que as lactonas sesquiterpênicas exibem interação com enzimas que possuem grupo sulfidril (Woerdenbag, 1988; Zhang et al., 2005), dentre as quais podem ser citadas a DNA polimerase e a timidilato sintetase. Algumas lactonas também demonstraram efeito de supressão da síntese de RNA e redução de fosforilação de histonas, sendo que esses efeitos também ocorreram pela inibição de enzimas com grupo tiol (Hall et al., 1980; Zhang et al., 2005). Já a parada no ciclo na fase G2-M em fibroblastos, pode ter ocorrido por vários motivos, uma vez que nessa fase, a célula faz uma checagem de possíveis erros (checkpoint) e inúmeros mecanismos celulares estão envolvidos. Estudos prévios demonstraram que algumas lactonas sesquiterpênicas causam dano ao DNA, fato que pode ter ocorrido nesse caso. Outra possibilidade para a interrupção do ciclo celular na fase G2-M é que a replicação do DNA pode não ter sido completada.

Segundo esses dados, percebeu-se que as células normais (fibroblastos) foram mais sensíveis à ação da fração C₂, pois o tratamento com essa fração causou mais alterações no ciclo celular, quando comparadas com as células não tratadas. Pode-se especular que essa diferença seja devida a mutações na linhagem MCF-7, que possam tê-la tornado menos suscetível a determinados danos.

No que se refere à indução de morte celular, também observamos que em contraste à indução de população sub-G1 em fibroblastos, a fração C₂ não causou aumento em sub-G1 na linhagem MCF-7, sugerindo que o decréscimo de sobrevivência das células acontece por um mecanismo não apoptótico. Woerdenbag (1988) demonstrou as atividades

citotóxica e citostática da lactona sesquiterpênica eupatoriopirina, isolada de *E. cannabinum*.

A atividade citotóxica das lactonas sesquiterpênicas acontece pela interação do motivo ativo com enzimas pertencentes ao grupo sulfidríla, resultando em uma inibição de atividades e metabolismos enzimáticos celulares, levando a dano ao DNA (Woerdenbag, 1988; Zhang et al., 2005) e possivelmente à apoptose. Sabendo-se que o tratamento de células de mamíferos com doses adequadas de fármacos citostáticos causa a morte celular, Woerdenbag (1988) sugeriu que a atividade citostática da eupatoriopirina (e talvez de outras lactonas sesquiterpênicas) aumenta, *in vitro* e *in vivo*, com a inibição da síntese de glutatona (envolvida em reparo de dano celular e detoxificação). Também sugeriu que provavelmente essa ação citostática possa estar relacionada com reações de radicais livres, uma vez que a eupatoriopirina causa lipoperoxidação *in vitro* e um excesso desse tipo de reação pode ocorrer se os níveis celulares de sequestradores de radicais livres (como a glutatona) forem insuficientes. Além do mais, os radicais livres também causam dano ao DNA.

As doenças infecciosas representam um problema crítico para a saúde e são umas das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (García et al., 2003). Sendo que as plantas têm uma capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias aromáticas, a maioria delas sendo metabólitos secundários, várias categorias de compostos fitoquímicos com capacidade antimicrobiana já foram identificadas (Conan et al., 1999).

Alguns pesquisadores demonstraram atividades antibacterianas e antifúngicas de espécies do gênero *Eupatorium* (Urzua et al., 1998; Habtemariam and Macpherson, 2000; El-Seedi et al., 2002; García et al., 2003). Em nossos estudos, não observamos atividade nos testes com o extrato etanólico de inflorescência de *S. casarettoi*, talvez devido à baixa

concentração de flavonóides nesse extrato, demonstrada pela análise fitoquímica. Os flavonóides são apontados como os principais compostos derivados de plantas, responsáveis por tais atividades. Uma vez que esses compostos são sintetizados pelas plantas em resposta a infecção por micróbios, não surpreende o fato de pesquisas demonstrarem sua eficiência antibiótica *in vitro*, contra uma grande variedade de microorganismos. Sua atividade é, provavelmente, devida à habilidade de formar complexos com proteínas extracelulares e solúveis e também de se ligar com a parede celular de bactérias (Cowan, 1999). Algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas de plantas do gênero *Eupatorium* demonstraram propriedades antibacteriana e antifúngica (Sharma et al., 1998), mas nosso estudo sugere que embora estejam presentes em grande quantidade em *S. casarettoi*, as lactonas dessa espécie não possuem tais atividades biológicas.

Grandes esforços têm sido feitos no sentido de encontrar novos agentes antiplasmodiais com maior potência e seletividade, devido à morbidade e mortalidade associadas à malária. Espera-se que a triagem de extratos e moléculas de plantas selecionadas constitua uma estratégia promissora e menos dispendiosa que os medicamentos sintéticos, nessa procura por novos antimaláricos. Nas últimas décadas muitos fármacos alcançaram estágios avançados de screening e um número menor chegou a entrar em estudos clínicos (Carvalho et al., 1991). Modelos para compostos continuam sendo obtidos de fontes naturais (plantas e microorganismos) e síntese química. O grande desafio no tratamento da malária é descobrir agentes seguros e seletivos, cujos efeitos não sejam comprometidos pela resistência adquirida pelo *Plasmodium* (Go, 2003), que é altamente adaptativo por mutação (Andrade-Neto et al., 2004a). A resistência à cloroquina (droga mais comumente usada no tratamento da malária) é o principal problema que afeta o controle da doença (Andrade-Neto et al., 2004b). A artemisinina (isolada de *Artemisia*

annua L.) e seus derivados, surgiram como uma promessa de uma nova classe de fármacos antimaláricos, particularmente para o tratamento da malária severa (Carvalho et al., 1991).

Outra estratégia que tem sido utilizada na busca de novos antimaláricos é o screening de databases comerciais ou especializadas. Como os agentes antiplasmodiais são basicamente agentes citotóxicos, no caso da malária atuando seletivamente contra o parasita, um número crescente de estudos tem mostrado atividade desses compostos *in vitro* e *in vivo* (Go, 2003). Há uma grande diversidade estrutural nos compostos com boa atividade antimalárica (\leq micromolar), refletindo a variedade de possíveis alvos existentes no *Plasmodium*, um organismo de complexidade considerável. Os mecanismos de ação da maioria desses fármacos permanecem desconhecidos.

Em nosso estudo, verificamos atividade antimalárica importante do extrato etanólico de *S. casarettoi* *in vitro* contra *P. falciparum* e *in vivo* contra *P. berghei*. No ensaio *in vitro*, a inibição do crescimento do parasita ocorreu de maneira dose-dependente. Já nos experimentos *in vivo*, a parasitemia foi reduzida 42% no quinto dia de tratamento e 63% no sétimo dia do tratamento com uma dose de 250 mg/kg do extrato e 73% no quinto dia e 65% no sétimo dia em animais tratados com uma dose de 500 mg/kg do extrato. Os dados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram concordantes entre si, sugerindo que o(s) composto(s) responsável (eis) continua (m) ativo (s) em hospedeiros e que a atividade antimalárica demonstrada provavelmente não é dependente de transformação metabólica pelo hospedeiro.

Dando início ao processo de purificação guiado por atividades biológicas, o extrato etanólico foi fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e

metanol) e novamente testado *in vitro* contra os clones W2 e BHz do parasita causador de malária em humanos *P. falciparum*. Ambos os clones demonstraram suscetibilidade similar às frações de *S. casarettoi*, sendo que no tratamento com a fração metanólica, não houve inibição de crescimento do parasita. Houve uma fraca inibição no tratamento com a fração hexânica e uma ótima inibição no tratamento com a fração clorofórmica. Esses resultados são importantes, uma vez que os clones utilizados nos experimentos são resistentes à cloroquina. Experimentos que descreveram previamente atividades antimaláricas e antiplasmodiais para espécies de *Eupatorium*, sugeriram que lactonas sesquiterpênicas são responsáveis por essa atividade (Blair et al., 2002; Lang et al., 2002). De acordo com os dados do nosso estudo, especulamos que esses compostos respondem pela atividade antimalárica, visto que a análise fitoquímica revelou uma alta concentração de lactonas em *S. casarettoi*.

Os radicais livres podem estar envolvidos na etiologia de várias doenças humanas e do processo de envelhecimento (stress oxidativo). Todas as moléculas biológicas presentes em nosso corpo correm risco de ser atacadas por radicais livres. Os antioxidantes são substâncias que neutralizam os radicais livres ou suas ações, sendo que atualmente, várias pesquisas têm revelado as aplicações em potencial das manipulações de antioxidantes/radicais livres na prevenção ou controle de doenças. Adicionalmente, há estudos epidemiológicos que demonstraram correlação inversa entre os níveis de antioxidantes presentes em amostras de tecidos/sangue e a ocorrência de doença cardiovascular, câncer ou mortalidade devido a essas doenças (Devasagayam et al., 2004).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos encontrados em vegetais, podemos citar além das vitaminas E e C, os carotenóides, flavonóides e polifenóis relacionados (Devasagayam et al., 2004), que atuam principalmente em nível de interceptação de

radicais livres, geralmente por seqüestramento de radicais. Dentre estes, as pesquisas envolvendo polifenóis vêm recebendo atenção crescente, devido às suas propriedades biológicas.

Os polifenóis incluem um grande grupo de componentes de plantas, principalmente associados com a parede celular. Os dados de pesquisas sugerem que os polifenóis podem agir na prevenção do câncer, como antiinfecciosos, antioxidantes, atuarem em nível hormonal, na indução de enzimas em nossa defesa química, na coagulação sangüínea e no sistema vascular, entre inúmeras outras propriedades (Dragsted, 2003).

Ao testarmos a capacidade de seqüestramento de radicais, observamos atividade antioxidante da fração metanólica, extrato etanólico e fração clorofórmica (em ordem decrescente de atividade) de *S. casarettoi*. A fração hexânica não foi testada devido à sua baixa concentração de polifenóis. A fração metanólica teve a mais alta concentração de polifenóis e também foi a fração com melhor capacidade antioxidante, demonstrando correlação entre esses dois grupos de dados, sugerindo que os polifenóis são os responsáveis pela atividade antioxidante nessa fração. Já no extrato etanólico, podemos sugerir que os polifenóis são parcialmente responsáveis pela atividade antioxidante (não houve correlação). Adicionalmente, nesse extrato há uma mistura maior de substâncias, podendo conter compostos que estejam atuando como pró-oxidantes, tais como as lactonas sesquiterpênicas. A fração clorofórmica demonstrou uma baixa capacidade antioxidante e foi excluída dos testes subseqüentes.

Os lipídeos das membranas celulares e das organelas subcelulares são altamente suscetíveis ao dano provocado por radicais livres. Quando os lipídeos reagem com radicais livres, podem sofrer peroxidação, uma reação em cadeia grandemente prejudicial para o funcionamento da célula, que provoca efeitos diretos e indiretos. Com essa reação, muitos

subprodutos são gerados, acarretando efeitos em áreas longe daquelas onde surgiram, atuando como mensageiros secundários (Devasagayam et al., 2004). Muitas pesquisas têm demonstrado que o ferro é um iniciador de oxidações envolvendo radicais livres, como a lipoperoxidação (Qian & Buettner, 1999). Nós também constatamos um aumento na geração de TBARS (espécies reativas de ácido tiobarbitúrico), na presença de ferro. Entretanto, a fração metanólica de *S. casarettoi* preveniu a lipoperoxidação, demonstrando atividade antioxidante de maneira dose dependente e confirmando a melhor capacidade antioxidante entre os extratos testados. O extrato etanólico preveniu o dano causado pelo ferro somente em uma concentração baixa. Provavelmente não tenhamos observado o efeito antioxidante em concentração maior, novamente devido ao aumento da concentração de outros compostos que possam ter agido como pró-oxidantes.

O vazamento extracelular de LDH foi utilizado para quantificar dano celular em fatias de fígado de camundongos. A fração metanólica de *S. casarettoi* diminuiu significativamente o extravasamento dessa enzima, sugerindo uma propriedade citoprotetora. Esse efeito pode ter ocorrido devido à ação estabilizadora dos polifenóis na membrana celular, pois tais compostos podem interagir com essas membranas aumentando sua fluidez e protegendo-as da peroxidação dos lipídeos e da oxidação de proteínas (Saija et al., 1995; Arora et al., 2000). O extrato etanólico demonstrou efeito citoprotetor em alta concentração. É possível que esse extrato não seja citoprotetor nesse modelo de experimento e que os resultados sejam devidos à deficiência na medida da atividade enzimática, a qual pode ser inibida por lactonas sesquiterpênicas, bem como o são outras enzimas que possuem grupamento tiol (Hall et al., 1980).

7. CONCLUSÕES

Conclusão geral

Foram descritas atividades antitumoral, antimalárica e antioxidante para o extrato bruto e frações de inflorescência de *S. casarettoi* Robinson.

Conclusões específicas

1. O extrato etanólico e as frações clorofórmica, enriquecida de lactonas sesquiterpênicas e as manchas de cromatografia C₁, C₂ e C₃, demonstraram atividade antiproliferativa em linhagens tumorais e fibroblastos.

2. O extrato etanólico não demonstrou atividades antibacteriana e antifúngica nos ensaios utilizados.

3. O extrato etanólico e a fração clorofórmica demonstraram atividade antimalárica significativa *in vitro* e *in vivo*.

4. O extrato etanólico e a fração metanólica demonstraram atividade antioxidante nos modelos testados.

Comentários Finais

Desde os tempos mais remotos, a natureza tem desempenhado um papel crítico na sobrevivência do homem no planeta. As plantas, desde a antigüidade, têm sido utilizadas na prevenção e tratamento de doenças, bem como para solucionar problemas de diversas naturezas, por exemplo, no combate à infertilidade, para afugentar animais, em rituais religiosos etc. Nos dias atuais as plantas continuam sendo fundamentais para a sobrevivência humana. Além de outros auxílios, já forneceram várias moléculas, ou modelos de moléculas, utilizadas no tratamento de uma ampla variedade de doenças. A maioria dessas moléculas é metabólitos secundários, dos quais, no mínimo 12 000 foram isolados, um número que se estima ser menos de 10% do total (Cowan, 1999).

Nesse sentido, investigamos a espécie *S. casarettoi*, nativa do Rio Grande do Sul, e cujas propriedades biológicas nunca tinham sido estudadas. Em resumo, sugerimos que o extrato etanólico e as frações clorofórmica, enriquecida de lactonas sesquiterpênicas e as manchas de cromatografia C₁, C₂ e C₃, de inflorescência de *S. casarettoi*, demonstraram atividade antiproliferativa *in vitro*. Considerando que o extrato e as frações foram ativos em concentrações relativamente baixas, estudos adicionais são necessários para completar o isolamento e a caracterização dos componentes ativos e definir melhor seu potencial terapêutico.

Apesar de espécies do gênero *Eupatorium* terem demonstrado atividade contra microorganismos, o extrato etanólico de inflorescência de *S. casarettoi* não demonstrou atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro*. O extrato etanólico e a fração clorofórmica e em menor intensidade, a fração hexânica, demonstraram atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. Também nesse caso, a atividade foi verificada com concentrações dos extratos

relativamente baixas, inclusive nos experimentos *in vivo*. A continuidade do isolamento bioguiado é necessária para a identificação do (s) composto (s) responsáveis pela atividade antimalárica.

Ainda outra propriedade biológica foi verificada: o extrato etanólico e a fração metanólica de inflorescência de *S. casarettoi* demonstraram capacidade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*. A fração metanólica, que não demonstrou atividade relacionada com morte celular (nos experimentos antiproliferativos e antimaláricos), teve o melhor efeito antioxidante entre o extrato e as frações testadas, sugerindo um efeito preventivo de dano celular e citoprotetor.

Embora preliminares, os resultados descritos nessa tese podem ter relevância para o desenvolvimento de novos fármacos com diferentes aplicações terapêuticas. Nesse sentido, estudos estão sendo elaborados com o intuito de elucidar as estruturas dos compostos responsáveis pelas atividades descritas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad MJ, Bermejo P, Sanchez OS, Chiriboga X, Carrasco L (1999). Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytother Res* 13: 142-146.

Andrade-Neto VF, Goulart MOF, Silva Filho JF, Silva MJ, Pinto MCFR, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU (2004a). Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioor Med Chem Lett* 14: 1145-1149.

Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Oliveira FQ, Casali VWD, Njaine B, Zalis MG, Oliveira LA, Krettli AU (2004b). Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. *Phytother Res* 18: 634-639.

Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys* 373: 102-109.

Barroso GM, Peixoto AL, Costa CG, Ichaso CLF, Guimarães EF, Cavalcante de Lima H (1991). Ordem 9 – Asterales. In: Barroso GM, ed. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Universidade de Viçosa, Viçosa, Brasil.

Blair S, Mesa J, Correa A, Carmona-Fonseca J, Granados H, Saez J (2002). Antimalarial activity of neurolepin B and derivatives of *Eupatorium inulaefolium* (Asteraceae). *Pharmazie* 57: 413-415.

Briskin DP (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology* 124: 507-514.

Budman DR (1997). Vinorelbine (Navelbine): a third-generation vinca alkaloid. *Cancer Inv* 15: 475-490.

Burkart A, Bacigalupo NM, Cabrera AL, Crovetto RM, Sorarú SB (1974). Dicotiledôneas Metaclamídeas (Gamopétalas). In: Burkart A, ed., *Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)*, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina.

Cabrera AL, Klein RM (1989). Compostas – Tribo Eupatorieae, *Flora Ilustrada Catarinense*, Herbário “Barbosa Rodrigues”, Itajaí, Brasil.

Carvalho LH, Brandão MG, Santos-Filho D, Lopes, JL, Krettli AU (1991). Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei* – infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Med Biol Res* 24: 1113-1123.

Chabner BA. Anti-câncer drugs. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS, eds. (1991). *Cancer: Principles and Practice*, Forth Edition. Philadelphia: Lippincott, 325-417.

Coates A, Hu Y, Bax R, Page C (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1: 895-910.

Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.

Cox PA. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. In: Chadwick DJ, Marsh J, eds. (1994). *CIBA Foundation Symposium 185 – Ethnobotany and the search for new drugs*. Chichester: John Wiley & Sons, 25-41.

Cragg GM, Newmann DJ, Snader KM (1997). Natural products in drug discovery and development. *Nat Prod* 60: 52-60.

da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G (2001). Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1: 364-369.

de las Heras B, Slowing K, Benedí J, Carretero E, Ortega T, Toledo C, Bermejo P, Iglesias I, Abad MJ, Gómez-Serranillos P, Liso PA, Villar A, Chiriboga X (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J Ethnopharmacol* 61: 161-166.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Bolor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794-804.

Dickson M, Gagnon JP (2004). Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 3: 417-429.

DiMasi JA (2003). Risks in new drug development: approval success rates for investigational drugs. *Clin Pharmacol Ther* 69: 297-307.

Dolle RE, Nelson KH Jr (1999). Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1998. *J Comb Chem* 4:235-282.

Dragsted LO (2003). Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 73: 112-119.

Elisabetsky E (1999). Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (orgs). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil pp. 87-99.

El-Seedi HR, Ohara T, Sata N, Nishiyama S (2002). Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 81: 293-296.

Farnsworth NR (1984). The role of medicinal plants in drug development. In: Krogsgaard-Larsen P, Christensen SB, Kofod H, eds. Natural Products and Drug Development. London: Ballière, Tindall, and Cox, 8: 98.

Ferraz A, Faria DH, Benetti MRN, da Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques A, von Poser GL (2005). Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. Phytomedicine 12: 112-115.

García VMN, Gonzáles A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, Rojas MG (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol 87: 85-88.

Go M-L (2003). Novel antiplasmodial agents. Med Res Rev 23: 456-487.

Habtemariam S (2001). Antiinflammatory activity of the antirheumatic herbal drug, gravel root (*Eupatorium purpureum*): further biological activities and constituents. Phytother Res 15: 687-690.

Habtemariam S, Macpherson A M (2000). Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of a herbal drug, boneset (*Eupatorium perfoliatum*). Phytother Res 14: 575-577.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York, United States of America.

Hall IH, Lee KH, Williams WL, Jr., Kimura T, Hirayama T (1980). Antitumor agents XLI: effects of eupaformosanin on nucleic acid, protein and anaerobic and aerobic glycolytic metabolism of Ehrlich Ascites Cells. *J Pharm Sci* 69: 294-297.

Harvey AL, Bradley KN, Cochran AS, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA (1998). What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36: 1635-1640.

Harvey AL (1999). Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends Pharmacol Sci* 20: 196-198.

Heinrich M, Bremmer P (2006). Ethnobotany and ethnopharmacy - their role for anti-cancer drug development. *Curr Drug Target* 7: 239-245.

Hnatyszyn O, Broussalis A, Herrera G, Muschietti L, Coussio J, Martino V, Ferraro G, Font M, Monge A, Martinez-Irujo JJ, Sanroman M, Cuevas MT, Santiago E, Lasarte JJ (1999). Argentine plant extracts active against polymerase and ribonuclease H activities of HIV-1 reverse transcriptase. *Phytother Res* 13: 206-209.

Hostettmann K, Wolfender J-L, Rodriguez S (1997). Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med* 63: 2-10.

Jones WP, Chin Y-W, Kinghorn AD (2006). The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *Curr Drug Target* 7: 247-264.

Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Briemann HL (1999). Natural products from plants. CRC Press, Boca Raton, United States of America.

Kimura Y (2005). New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo* 19: 37-60.

King RM, Robinson H (1987). The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Missouri Botanical Garden, Saint Louis, United States of America.

Koehn FE, Carter GT (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 206-220.

Krettli AU, Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Ferrari WMS (2001). The search of new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Osw Cruz* 96: 1033-1042.

Lang G, Passreiter CM, Wright CW, Filipowicz NH, Addae-Kyereme J, Medinilla BE, Castillo JJ (2002). Antiplasmodial activities of sesquiterpene lactones from *Eupatorium semialatum*. *Z Naturforsch* 57: 282-286.

Lee K-H (1999). Novel antitumor agents from higher plants. *Med Res Rev* 19: 569-596.

Lee K-H (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural products leads. *J Nat Prod* 67: a-j (ASAP).

Lewis WH, Elvin-Lewis MP (1995). Medicinal plants as a source of new therapeutics. *Ann Mo Bot Gard* 82: 16-24.

Lombardino JG, Lowe JA (2004). The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. *Nat Rev Drug Discov* 3: 853-862.

Mans DRA, da Rocha AB, Schwartzmann G (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncol* 5: 185-198.

Matzembacher NI (1979). Estudo Taxonômico do Gênero *Eupatorium* L. (Compositae) no Rio Grande do Sul – Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Modzelewska A, Sur S, Kumar SK, Khan SR (2005). Sesquiterpenes: natural products that decreases cancer growth. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 5: 477-499.

Mongelli E, Pampuro S, Coussio J Salomon H, Ciccía G (2000). Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plantas used in Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 145-151.

Monks NR, Ferraz A, Bordignon S, Machado KR, Lima MFS, da Rocha AB, Schwartzmann G (2002). In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. *Pharmac Biol* 40: 494-500.

Muschietti L, Gorzalczany S, Ferraro G, Acevedo C, Martino V (2001). Phenolic compounds with antiinflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Med* 67: 743-744.

Muschietti L, Derita M, Sulsen V, de Dios Munoz J, Ferraro G, Zacchino S, Martino V (2005). In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 14: 233-238.

Nair Ramachandran AG, Gunasegaran R, Krishnan S, Bayet C, Voirin B (1995). Flavonol glycosides from leaves of *Eupatorium glandulosum*. *Phytochem* 40: 283-285.

Nature Reviews (2004). (No authors listed). Hot drugs 2004. *Nat Rev Drug Discov. Supl* S3-40.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 17: 215-234.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.

Nisbet LJ, Moore M (1997). Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Curr Opin Biotechnol* 8: 707-712.

Nodari RO, Guerra MP (1999). Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (orgs). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil pp. 61-74.

Park EJ & Pezzuto JM (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Met Rev* 21: 231-255.

Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA (2002). Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* 25(sup11): 45-61.

Primack RB, Rodrigues E (2001). *Biologia da conservação*. Editora Planta, Londrina, Brasil 327p.

Qian SY, Buettner GR (1999). Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic Biol Med* 26: 1447-1456.

Ricklefs RE. *A economia da natureza* (2003). Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil pp.443-461.

Rowinsky EK, Donehower RC (1995). Paclitaxel (Taxol). N Engl J Med 332: 1004-1014.

Rucker G, Heiden K, Schenkel E (2001). Antitumor-active lactones from *Kaunia rufescens* and *Eupatorium cannabinum*. J Indian Inst Sci 81: 333-334.

Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F (1995). Flavonoids as antioxidants agents: importance of their interaction with biomembranes. Free Radic Biol Med 19: 481-486.

Sasikumar JM, Doss AP, Doss A (2005). Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. Fitoterapia 76: 240-243.

Schenckel EP, Gosmann G, Petrovick PR (1999). Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO, Schenckel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (orgs). Farmacognosia, da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil pp. 291-320.

Schwartzmann G (2000). A natureza como fonte de novos fármacos anticâncer: a contribuição dos oceanos. An Acad Nac Med 160: 95-103.

Schwartzmann G (2001). Anticancer drugs from nature. Med Ped Oncol 37: 79-80.

Schwartzmann G, Brondani da Rocha A, Berlinck RG, Jimeno J (2001). Marine organisms as a source of new anticancer agents. Lancet Oncol 2: 221-225.

Schwartzmann G, Ratain Mj, Cragg GM, Wong JE, Saijo N, Parkinson DR, Fujiwara Y, Pazdur R, Newman DJ, Dagher R, Di Leone L (2002). Anticancer drug discovery and development throughout the world. *J Clin Oncol* 15;20: 47S-59S.

Schwartzmann G, Winograd B, Pinedo HM (1988). The main steps in the development of anticancer agents. *Radiother Oncol* 12: 301-313.

Schwartzmann G, Workman P (1992). Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a European perspective. *Eur J Cancer* 29A: 3-14.

Sharma OP, Dawra RK, Kurade NP, Sharma PD (1998). A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. *Nat Toxins* 6: 1-14.

Shen Y-C, Lo K-L, Kuo YH, Khalil AT (2005). Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium kiirunense*, a coastal plant of Taiwan. *J Nat Prod* 68: 745-750.

Silver LL, Bostian KA (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 377-383.

Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SPS (2005). Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* 13: 5892-5908.

Tulp M, Bohlin L (2002). Chemical diversity: independent of functional diversity. Trends Pharmacol Sci 23: 405.

Urzua A, Caroli M, Vasquez L, Mendoza L, Wilkens M, Tojo E (1998). Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). J Ethnopharmacol 62: 251-254.

Van Zyl, Kriegler A, van der Walt BJ (1993). Anti-oxidant properties of H₂-receptor antagonists. Biochem Pharmacol 45: 2389-2397.

Wink M (1999). Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary products. In: M Wink, ed, Biochemistry of secondary product metabolism. CRC Press, Boca Raton, United States of America, pp 1-16.

Woerdenbag HJ (1988). A fundamental study on the cytostatic action of sesquiterpene lactones from *Eupatorium cannabinum* L. Ph.D. Thesis, University of Groningen, The Netherlands.

Yang S-P, Huo J, Wang Y, Lou L-G, Yue J-M (2004). Cytotoxic sesquiterpenoids from *Eupatorium chinense*. J Nat Prod 67: 638-643.

Yarbro JW (1992). The scientific basis of cancer chemotherapy. In: Perry MC, ed. The Chemotherapy Source Book. Williams & Wilkins, Baltimore, United States of America, 2-14.

Zhang S, Won Y-K, Ong C-N, Shen H-M (2005). Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 5: 239-249.

9. ANEXOS

9.1. Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1 – Porcentagem de crescimento celular (médias \pm DP, n=9) na H-460 carcinoma de pulmão de células não pequenas e HT-29 carcinoma coloretal, após tratamento de 72h com extrato etanólico de *S. casarettoi*.

Figura 2 – Distribuição das fases do ciclo celular (% de células; médias \pm DP, n \geq 9) na MCF-7 carcinoma de mama e em fibroblastos humanos normais, após tratamento por 72h com a mancha de cromatografia C₂ da fração enriquecida de lactonas sesquiterpênicas de *S. casarettoi*.

Artigo 2

Figura 1 – Inibição do crescimento de *P. falciparum* (strain W2) *in vitro*, incubado com extrato etanólico de *S. casarettoi* e dose da concentração inibitória (IC₅₀) em um experimento representativo.

9.2. Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ (µg/ml; médias ± DP; n=9) em cinco linhagens celulares após tratamento por 72h com as frações hexânica, clorofórmica, metanólica e enriquecida de lactonas sesquiterpênicas de *S. casarettoi*.

Tabela 2 – Valores de IC₅₀ (µg/ml; médias ± DP; n=9) em cinco linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos, após tratamento por 72h com as manchas de cromatografia C₀, C₁, C₂ e C₃ da fração enriquecida de lactonas sesquiterpênicas de *S. casarettoi*.

Tabela 3 – Análise fitoquímica de inflorescências de *S. casarettoi*.

Artigo 2

Tabela 1 – Atividade antimalárica *in vivo* do extrato etanólico de *S. casarettoi* em camundongos infectados com *P. berghei*. Os resultados são representativos de experimentos feitos em triplicata.

Tabela 2 – Inibição do crescimento (%) *in vitro* de *P. falciparum* (linhagens W2 e BHZ) incubadas com as frações hexânica, clorofórmica e metanólica de *S. casarettoi*.

Artigo 3

Tabela 1 – Conteúdo total de polifenóis do extrato etanólico e das frações metanólica e clorofórmica de *S. casarettoi* e suas propriedades antioxidantes (TRAP). Os resultados do conteúdo total de polifenóis foram expressos como mg/g do extrato e os dados do TRAP foram expressos como capacidade equivalente de trolox (TEAC). Os experimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 2 – Efeito do extrato etanólico e da fração metanólica de *S. casarettoi* na lipoperoxidação induzida por ferro (TBARS) e no extravasamento de LDH. Os resultados de TBARS foram expressos como equivalentes de MDA (nmol/mg proteína) \pm DP e em extravasamento de LDH foram expressos como U LDH/ μ g proteína \pm DP. As doses para o extrato e a fração foram a menor concentração com atividade antioxidante no experimento TRAP. Os dados são representativos de três experimentos independentes, feitos em triplicata.