

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos
de *Valeriana glechomifolia***

Mariana Kliemann Marchioro

Porto Alegre, Dezembro de 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

***Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de extratos
de Valeriana glechomifolia***

Mariana Kliemann Marchioro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, sob orientação da Prof. Dr.
Sandra Beatriz Rech e co-orientação da MSc.
Natasha Maurmann.

Porto Alegre, Dezembro de 2009.

*Dedico este trabalho aos meus pais, os
responsáveis pela minha conquista,
pois mesmo longe sempre estiveram presentes
dando apoio e força para que continuasse
e nunca desistisse dos meus sonhos.*

O que diferencia um sonhador de um criativo, é a capacidade do criativo de concretizar a fantasia.

Domenico De Masi

AGRADECIMENTOS

À Deus, que está sempre ao meu lado.

À minha família pelo amor, apoio e a total confiança em mim.

À minha professora orientadora, Sandra Beatriz Rech, pelos seus conhecimentos, sua atenção e seu comprometimento na execução deste trabalho e na minha formação acadêmico-científica.

À minha co-orientadora, Natasha Maurmann, pelos seus conhecimentos, sua atenção e comprometimento na execução deste trabalho e da minha formação acadêmico-científica e pela amizade.

Aos professores do Laboratório de Pesquisa em Câncer do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Rafael Roesler e Gilberto Schwartzmann pela disponibilização do laboratório para execução da parte experimental de cultivo das linhagens celulares tumorais. Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Câncer do HCPA, em especial, Caroline e Tiago, pela total ajuda e força na execução deste trabalho.

Às minhas amigas, em especial, Josi, Nina, Bibi, Lisa e Mari pela compreensão, cumplicidade, amizade e incentivo.

Às minhas colegas e amigas, em especial, Jé, Quel e Eve, pela cumplicidade, companheirismo e amizade durante a faculdade.

Às minhas colegas do Laboratório 107 da Faculdade de Farmácia, Jéssica e Amanda, pela ajuda e amizade durante toda minha formação acadêmico-científica, em especial, na execução deste trabalho.

RESUMO

Valeriana glechomifolia Meyer, planta nativa do sul do Brasil produz valepotriatos, os quais são relacionados com propriedades sedativas, ansiolíticas, fungicidas e antitumorais. Este trabalho tem por objetivo a avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos padronizados, de plantas micropropagadas e de cultura de raízes de *Valeriana glechomifolia* em linhagens tumorais humanas U138-MG (glioblastoma), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e OVCAR (carcinoma ovariano). Nos experimentos foram analisados extratos bruto e semi-purificado de plantas micropropagadas e de culturas de raízes a fim de quantificar os valepotriatos presentes nas amostras e, devido a limites de detecção, apenas os extratos bruto e clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas foram utilizados para avaliação antiproliferativa. Os extratos apresentaram efeito antiproliferativo em todas as linhagens tumorais, U138-MG, HT-29 e OVCAR, e doses utilizadas, 23,125 µg/mL, 46,25 µg/mL, 92,5 µg/mL, 185 µg/mL, 370 µg/mL e 1850 µg/mL. No extrato bruto a maior redução na viabilidade celular foi observada na linhagem U138-MG na dose 46,25 µg/mL. Já no extrato clorofórmico semi-purificado a maior redução da viabilidade celular foi observada na linhagem U138-MG na dose 92,5 µg/mL, havendo ainda resultados semelhantes em outras linhagens e dosagens. As avaliações mostram que as diferentes linhagens apresentaram perfis semelhantes na redução da viabilidade celular após tratamento com os extratos de *Valeriana glechomifolia*.

Palavras-chave: *Valeriana glechomifolia*. Valeriana. Valepotriatos. Atividade antiproliferativa. U138-MG. HT-29. OVCAR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 VALERIANA	8
1.2 TUMORES: CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA	14
2 OBJETIVO	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 MATERIAL VEGETAL	19
3.2 EXTRAÇÃO DOS VALEPOTRIATOS	19
3.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS	20
3.4 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	20
3.5 FLUXOGRAMAS DE PREPARO DOS EXTRATOS	21
3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES HUMANAS	23
3.7 TRATAMENTO	23
3.8 MTT E AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA	24
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com objetivos medicinais é bastante difundida em todo o mundo. Comumente, as plantas medicinais são consagradas pelo uso popular, cujo uso correto vem sendo estabelecido pelos cientistas através de pesquisas. Estas plantas ocorrem naturalmente em diversos países, sendo algumas restritas a determinadas regiões do planeta (Farnsworth *et al.*, 1985).

A Organização Mundial da Saúde estimou em 1985, que aproximadamente 80% da população mundial, na época mais de 4 bilhões, utilizavam principalmente a medicina popular para cuidados primários à saúde. Além disso, pode-se presumir, com segurança, que uma parte importante da terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos (Farnsworth *et al.*, 1985). Atualmente esta proporção não se modificou, devido ao uso milenar de algumas terapias. Em uma pesquisa realizada no interior do estado do Rio de Janeiro com 1320 pessoas, verificou-se que 63% destas utilizam plantas medicinais como a principal forma de tratamento (Veiga Junior, 2008).

1.1 VALERIANA

Valeriana foi usada tanto na Grécia antiga quanto na China, como observado por Dioscórides, Galeno, e nos primeiros textos da medicina oriental. A mesma foi reconhecida por suas propriedades sedativa e ansiolítica no Formulário Nacional Britânico até a década de 1940, e após ter caído em desuso, tornou-se disponível como potente agente farmacológico (Russo, 2001). Há muitos estudos relacionados à família Valerianaceae e às propriedades farmacológicas de seus compostos, sendo *Valeriana officinalis*, nativa da Europa, a espécie mais estudada e comumente utilizada na medicina popular por seus efeitos sedativo, ansiolítico e anticonvulsivante (Malva *et al.*, 2004).

As raízes das espécies de *Valeriana* compõem o farmacógeno utilizado por suas propriedades farmacológicas, desde que esta foi descrita pelos antigos povos. Hoje, *Valeriana officinalis* ainda é referenciada nas Farmacopéias Alemã, Suíça, Britânica, Francesa, Japonesa, Chinesa e Européia. Mais de 200 outras espécies de

Valeriana são encontradas em todo mundo: *Valeriana wallichii* na Índia, *Valeriana edulis* no México e *Valeriana officinalis* var. *latifolia* no Japão e na China, também utilizadas na medicina popular (Gaou e Björk, 2000). Na Farmacopéia Brasileira, *Valeriana officinalis* é referenciada na primeira, segunda e quarta edição; estas descrevem seu uso como extrato seco, extrato fluido, droga em pó, tintura, raízes e droga vegetal (Brandão *et al.*, 2006).

Valeriana está presente na lista GRAS (Generally Recognized as Safe) da FDA (Food and Drug Administration), na qual é considerada como uma planta de uso seguro. As reações alérgicas e os efeitos colaterais graves, incluindo náuseas, cefaléia, tontura e dor de estômago são raros, sendo estes relatados em menos de 10% dos pacientes nos ensaios clínicos. Além disso, não há relatos de problemas relacionados à *Valeriana* na pediatria ou na gestação e lactação, embora existam estudos clínicos sendo realizados para estabelecer a segurança nestas áreas (Blumenthal, 1998; Hadley e Petry, 2003).

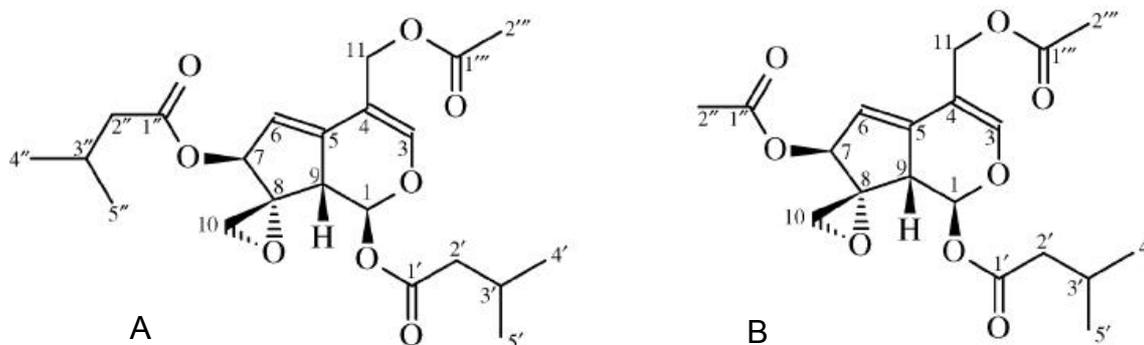
Ensaio clínicos randomizados e controlados por placebo mostraram que a *Valeriana* pode melhorar a qualidade do sono, diminuindo o seu tempo de latência sem produzir ressacas matinais (Leathwood *et al.*, 1982; Lindahl e Lindwall, 1989; Gyllehaal *et al.*, 2000; Wheatley, 2005; Bent *et al.*, 2006). Os estudos *in vitro* mostram que a ação sedativa da *Valeriana* é provocada por mecanismos que envolvem a transmissão GABAérgica (Leuschner *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1994a,b; Cavadas *et al.*, 1995).

Até o momento, os ensaios clínicos desenvolvidos com *Valeriana* forneceram poucas informações sobre suas possíveis interações medicamentosas. A literatura afirma que não há interações entre medicamentos fitoterápicos elaborados com *Valeriana* e fármacos (Blumenthal *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2001), apesar de que alguns estudos indicam que doses excessivas dos extratos de *Valeriana* podem reduzir a expressão das isoformas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C19 (Budzinski *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2004; Hellum *et al.*, 2007) e, também, da glicoproteína P (Lefebvre *et al.*, 2004). *Valeriana* pode potencializar a depressão do SNC quando administrada com benzodiazepínicos e barbitúricos. Além disso, deve-se evitar o seu uso concomitante com medicamentos metabolizados pelas isoformas CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C19 (Alexandre *et al.*, 2008), como alguns fármacos antineoplásicos (Sparreboom *et al.*, 2004).

Os constituintes químicos potencialmente ativos de *Valeriana* spp. são: iridóides, compostos secundários, em sua maioria valepotriatos (0,5% - 2,0%), sendo os principais: valtrato, isovaltrato, diidrovaltrato, valerosidato e produtos de degradação (baldrinals); óleos voláteis essenciais (0,2 - 2,8%): bornil isovalerenato e bornil acetato; ácidos valerênico, valérico, isovalérico e acetoxivalerênico; valeranal, valeranona, criptofaurinol; e outros monoterpenos e sesquiterpenos; alcalóides (0,01 - 0,05%): valeranina, chatinina, α -metil pirrilcetona, actinidina, esquiantina e naftiridilmetilcetona; lignanas e flavonóides (0,0013 - 0,013%): hidroxipinoresinol, 6-metilapigenina e hesperidina (ESCOP, 1997). Os aminoácidos livres, como o ácido γ -aminobutírico (GABA), tirosina, arginina e glutamina também estão presentes (Gruenwald, 2000; Hadley e Petry, 2003). O odor característico da *Valeriana* é devido à liberação de moléculas de ácido isovalerênico pelos valepotriatos (Russo, 2001; Weiss e Fintelmann, 2000), podendo este representar um obstáculo no projeto de desenvolvimento de medicamentos, devido à dificuldade de estabelecer um placebo (Fugh-Berman e Cott, 1999).

Valeriana glechomifolia Meyer é uma planta nativa do Sul do Brasil (Sampaio *et al*, 1993), pertencente à família Valerianaceae que encontra-se ameaçada de extinção (IBAMA, 1992). A espécie é composta por inúmeras folhas e raízes pequenas, do tipo estalonífera, e é encontrada em áreas elevadas de solo, principalmente em áreas rochosas (Sobral, 1999).

Os valepotriatos encontrados na espécie estudada, *Valeriana glechomifolia*, são valtrato, DIA-valtrato, acevaltrato, 1- β -acevaltrato e diidrovaltrato (Salles *et al.*, 2000) (Figura 1).



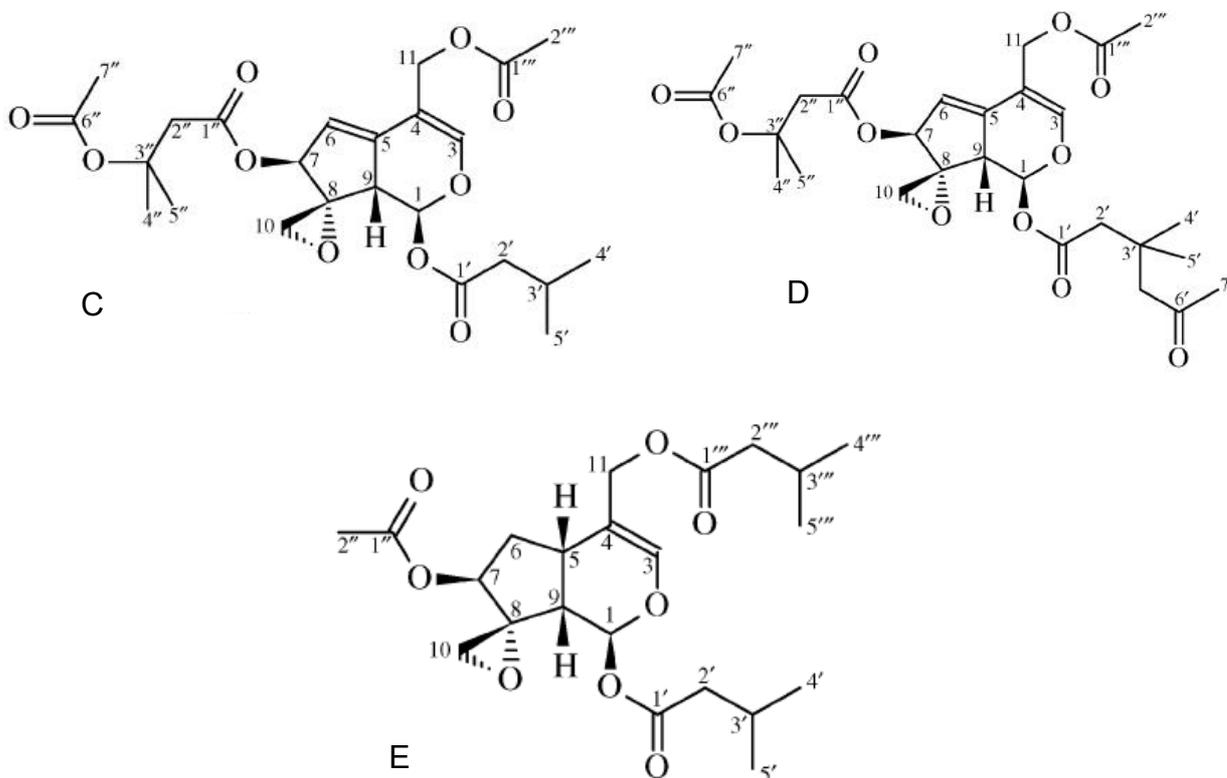


Figura 1. Valepotriatos encontrados em *Valeriana glechomifolia*: valtrato (A), DIA-valtrato (B), acevaltrato (C), 1-β-acevaltrato (D) e diidrovaltrato (E).

Em *Valeriana glechomifolia*, estes compostos foram encontrados nas partes aéreas e nos rizomas (Salles *et al.*, 2000), sendo as partes aéreas mais ricas em valepotriatos em comparação com as raízes (Silva *et al.*, 2002). A importância dos valepotriatos para a área farmacêutica está relacionada às suas propriedades sedativas, ansiolíticas, fungicidas e antitumorais (Fuzzati *et al.*, 1996; Fugh-Bergman e Cott, 1999; Dewick, 2000).

Valeriana glechomifolia in natura (Figura 2A) foi coletada e uma amostra arquivada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) por Sobral (1999). Após foi estabelecido um protocolo para propagação clonal via micropropagação (Figura 2B) com manutenção da capacidade biossintética de acúmulo de valepotriatos (Salles *et al.*, 2002). Estudos adicionais analisaram a influência de reguladores de crescimento em plântulas micropropagadas, a

sobrevivência das mesmas em condições *ex vitro* após a aclimatização e o acúmulo de valepotriatos (Figura 2C-E) (Carvalho *et al.*, 2004).

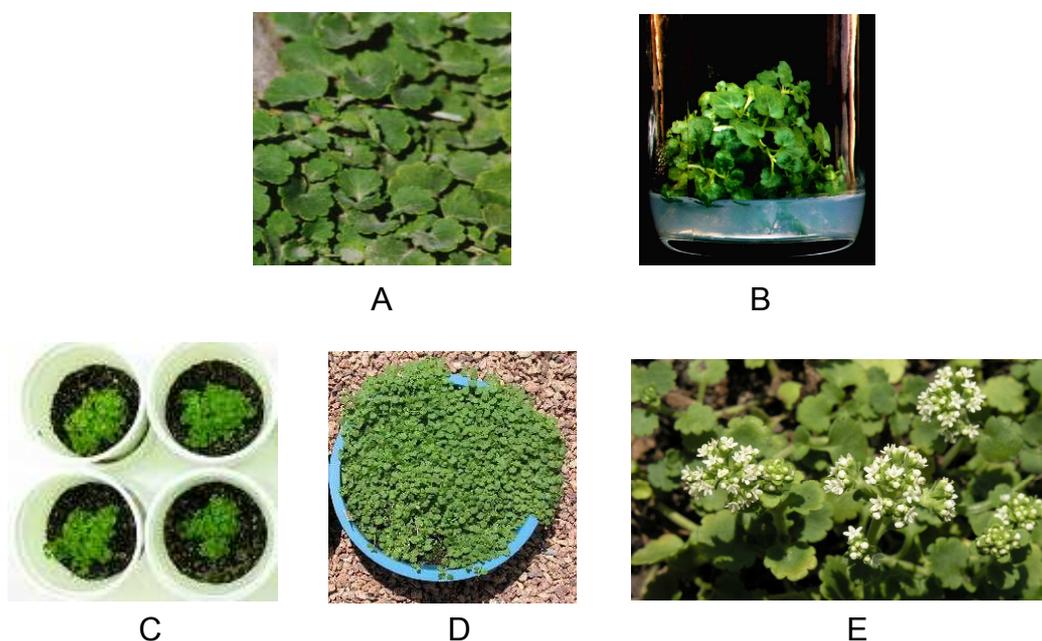


Figura 2. *Valeriana glechomifolia* in natura (A), micropropagada (B) e *ex vitro* (C, D e E).

Além de estudos de micropropagação foram estabelecidas e analisadas culturas de células de *Valeriana glechomifolia*, indicando uma relação positiva entre crescimento e produção de valepotriatos em culturas de calos, de células em suspensão e de raízes (Figura 3A) (Maurmann *et al.*, 2006a). O cultivo de plantas inteiras em meio nutritivo líquido mostrou um aumento na produção de valepotriatos quando comparado ao cultivo em meio semi-sólido (Figura 3B) (Russowski *et al.*, 2006).

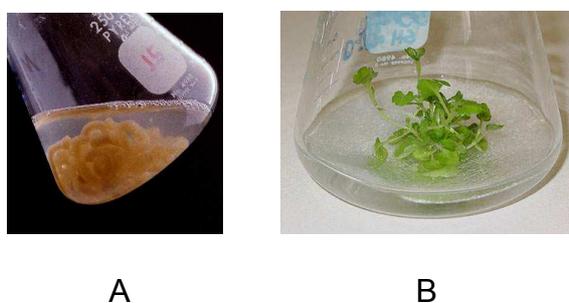


Figura 3. Cultivo de raízes (A) e da planta inteira (B) de *Valeriana glechomifolia* em meio líquido.

A importância da biotecnologia, como cultivo micropropagado *in vitro*, é discutida com especial ênfase na produção comercial de metabólitos secundários de interesse farmacêutico (Mühlbacha, 1998). Deste modo, pode-se estimular a produção do composto de interesse, encontrando meios que exerçam, por exemplo, algum estresse sobre a planta, fazendo com que esta produza mais metabólitos costumeiramente gerados em estresse. Além disso, a propagação *in vitro* auxilia no cultivo em maior escala e, conseqüentemente, na preservação da espécie e no sucesso do cultivo *ex vitro*. Esta etapa foi investigada em *Valeriana glechomifolia* com adição de auxina ácido indolacético, que mostrou-se eficaz no crescimento da planta, bem como na produção de valepotriatos, assegurando a viabilidade da rota biossintética (Luz *et al.*, 2003).

Atualmente, existem muitas técnicas biotecnológicas desenvolvidas para ajudar os produtores a atender à demanda da indústria farmacêutica. Estes protocolos são projetados para fornecer os melhores níveis de hidratos de carbono, compostos orgânicos (vitaminas), nutrientes minerais, fatores ambientais (por exemplo, luz, ambiente gasoso, temperatura e umidade) e reguladores de crescimento necessários para obter altas taxas de regeneração de muitas espécies de plantas *in vitro* e assim, facilitar a micropropagação comercialmente viável. Além disso, métodos de cultura de células também foram desenvolvidos para a produção de vários metabólitos secundários importantes (Rout *et al.*, 2000).

A partir dessas novas tecnologias biotecnológicas pode-se aumentar a produção de metabólitos de interesse. Isto torna-se importante visto que a pesquisa por novos fármacos é cada vez maior. Pesquisas vem sendo desenvolvidas para área de novos agentes antineoplásicos. Ferraz e colaboradores (2005) pesquisaram a atividade antitumoral de três benzopiranos isolados de *Hypericum polyanthemum* em linhagens celulares humanas, sendo uma delas adenocarcinoma colorretal. Estes benzopiranos apresentaram uma potente atividade inibitória, podendo vir a ser protótipo de um novo fármaco antitumoral. Além deste, existem diversos estudos com diferentes plantas que avaliam a atividade antiproliferativa de extratos.

Além dos benzopiranos, existem estudos com outras substâncias biologicamente ativas, como iridóides. Com estes foram realizados estudos de viabilidade em fibroblastos de pele humana (HSF) com diferentes concentrações de *Lamii albi flos* extraída com metanol, acetato de etila e heptano. Após 24 horas de

cultivo das células houve redução da viabilidade celular a partir da dose de 75 µg/mL, sendo o extrato de acetato de etila na dose de 175 µg/mL o mais efetivo na redução das células viáveis, aproximadamente 86% (Paduch *et al.*, 2007).

1.2 TUMORES: CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

O câncer ainda é um grave problema clínico e tem um significativo impacto social e econômico no sistema de saúde humana. Apesar dos modernos avanços no diagnóstico, prevenção e terapia, a doença ainda afeta milhões de pessoas em todo o mundo, reduzindo sua qualidade de vida e sendo uma das principais causas de morte no mundo.

Dentre os tumores mais severos encontram-se os tumores do Sistema nervoso central (SNC). Este é composto pelo encéfalo (hemisférios cerebrais, cerebelo e tronco encefálico) e pela medula espinhal, porém comumente seus tumores são estudados como sendo neoplasias que acometem as estruturas do neurocrânio – basicamente o encéfalo, seus envoltórios e os nervos cranianos, embora esses nervos sejam componentes do sistema nervoso periférico. Os tumores mais frequentes do SNC são as metástases e os gliomas, meningiomas e neurinomas (Lopes *et al.*, 2008).

Após a puberdade, apenas componentes gliais, quase exclusivamente a linhagem astrocitária, conseguem se renovar. Por isso, os tumores do SNC são muito frequentes na faixa etária infantil, sendo gliomas os tumores primários predominantes. Assim, os tumores do SNC causam 22% das mortes por neoplasias em indivíduos de ambos os sexos abaixo dos 15 anos de idade, tornando-se a segunda causa de óbitos por neoplasias. Na faixa dos 15 aos 35 anos de idade a taxa é de 11,5% entre homens e 8,5% entre mulheres, sendo, a segunda e a quarta causa de óbitos, respectivamente. Entre pessoas de 35 a 55 anos, a taxa é de 4,5%, sendo a terceira causa de óbitos (Lopes *et al.*, 2008).

Gliolastomas, o mais maligno de todos tumores da linhagem astrocitária, consiste em uma diferenciação astrocitária reduzida. Isto inclui fatores histopatológicos, como atividade mitótica, polimorfismo celular, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose, os últimos são importantes para um diagnóstico futuro (Brandes *et al.*, 2008). Este tumor corresponde a mais de 50% de

todos os gliomas e a, aproximadamente, 12 a 15% de todos os tumores cerebrais (Guimarães e Rosa, 2008). Aproximadamente 60% dos pacientes com diagnóstico de glioblastoma possuem idade entre 55 e 74 anos e a relação de incidência entre homens e mulheres é de 3:2 (Brandes *et al.*, 2008).

O tratamento de escolha para glioblastoma é a cirurgia. A radioterapia, deve ser iniciada após 6 semanas da cirurgia, sendo esta obrigatória para praticamente todos pacientes com glioblastoma (Brandes *et al.*, 2008). Em estudo randomizado com 77 pacientes com diagnóstico de glioblastoma e com mais de 70 anos observou-se um aumento da sobrevida com a radioterapia, sem reduzir a qualidade de vida ou de cognição (Keime-Guibert *et al.*, 2007). A quimioterapia não é curativa para tumores do SNC, mas pode controlar o crescimento tumoral, sendo, assim, o principal adjuvante à cirurgia e à radioterapia, principalmente para gliomas (Lopes *et al.*, 2008). A adição de temozolomida à radioterapia, resultando em um benefício à sobrevida do paciente com mínima toxicidade adicional, tornou-se o tratamento de escolha para o glioblastoma recém-diagnosticado (Stupp *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de fármacos quimioterápicos como tratamento adjuvante de tumores do SNC é dificultado por características do próprio SNC. A barreira hematoencefálica, a qual seleciona a entrada de substâncias do SNC, pode estar ausente ou menos competente no interior destes tumores. Os fármacos que melhor atuam no SNC, por atravessarem a barreira hematoencefálica, são lipossolúveis, não iônicas e de pequenas moléculas (Lopes *et al.*, 2008).

Outro tipo de câncer bastante severo é o adenocarcinoma colorretal, este é um tumor maligno do cólon, reto ou ambos, que juntos, compõem o intestino grosso. É um dos tumores mais frequentes do tubo digestivo, diferenciando-se dos tumores de cólon devido à particularidade de sua localização anatômica fixa, sua íntima relação com os órgãos pélvicos, sua drenagem linfática e sua ausência de serosa (Guimarães e Rosa, 2008). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que o número de novos casos de câncer colorretal para o Brasil em 2010 seja de, aproximadamente, 28.110 casos (BRASIL, 2009a). Para o estado do Rio Grande do Sul estima-se 1520 novos casos em homens e 1610 novos casos em mulheres (BRASIL, 2009b).

O rastreamento de neoplasias colorretais permite a prevenção através da detecção e remoção de pólipos, o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, a

redução da mortalidade. O início do rastreamento é recomendado tanto para homens quanto para mulheres, após os 50 anos de idade. Para isso, alguns exames são recomendados como: pesquisa de sangue oculto nas fezes anual, colonoscopia a cada 10 anos, sigmoidoscopia flexível a cada 5 anos, sendo os dois últimos além de métodos de rastreamento, diagnósticos e terapêuticos (Guimarães e Rosa, 2008). Pacientes com adenocarcinoma estágio I possuem bom prognóstico, com 5 anos de sobrevida em 80% a 90% dos casos (Di Gregorio *et al.*, 2005).

A maioria dos tumores colorretais, 95%, são adenocarcinomas, tumores malignos originados das células epiteliais ductais ou glandulares, com múltiplos graus de diferenciação, podendo ser classificados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (Guimarães e Rosa, 2008).

Alguns fatores são levados em conta no momento do diagnóstico do paciente, fatores de risco ambientais, como dieta rica em gordura animal, tabagismo, sedentarismo e alcoolismo; e fatores de risco individuais e familiares, os quais também são importantes, como idade superior a 50 anos, presença de pólipos intestinais, história de câncer e familiar, portadores de doença inflamatória no cólon (retocolite ulcerativa e doença de Crohn) (Lopes *et al.*, 2008).

O tratamento cirúrgico ideal consiste na ressecção do tumor e de todo o mesorreto, que contém a rede linfática, preservando a inervação autonômica da pelve (Ross *et al.*, 2005; Weitz *et al.*, 2005). Em pacientes com estágios clínicos mais avançados recomenda-se tratamentos adjuvantes como radioterapia e/ou quimioterapia. O tratamento medicamentoso consiste basicamente em protocolos específicos contendo fluorouracil e ácido folínico. Para pacientes com metástases, além de tratamento cirúrgico com ressecção do local da metástase, recomenda-se a utilização de protocolos específicos para tratamento de câncer de cólon, contendo basicamente fluorouracil, ácido folínico, oxaliplatina e/ou irinotecan, possibilitando, assim uma sobrevida média que ultrapassa 20 meses (Guimarães e Rosa, 2008).

Outro tipo de câncer que ocorre com maior frequência em pacientes acima de 50 anos é o carcinoma de ovário, este é o mais agressivo de todos os tumores ginecológicos, pois é assintomático em estágios iniciais. Assim, comumente, o tumor é diagnosticado apenas em estágios avançados, cerca de 67% dos casos. Apresenta maior incidência em mulheres na pós-menopausa, acima dos 40 anos com pico de incidência entre 75 e 79 anos de idade, mostrando que sua incidência

aumenta drasticamente com o envelhecimento (Guimarães e Rosa, 2008). A sobrevida em 5 anos para estágio inicial é de 95%, para estágios mais avançados pode chegar a apenas 17% (Lopes *et al.*, 2008).

No Brasil, o número de mortes por adenocarcinoma ovariano em 2007 foi de 2.583 casos e a estimativa de novos casos de para 2009 é de 3.837 (Brasil, 2009c).

O tratamento da maioria dos carcinomas ovarianos inicia-se com cirurgia. O tratamento adjuvante é composto por medicamentos quimioterápicos seguindo protocolos específicos, sendo os mais utilizados carboplatina, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina lipossomal, gemcitabina e topotecan (Lopes *et al.*, 2008). Em estudos, em pacientes com diagnóstico de carcinoma ovariano estágio III, foram testadas duas formas combinadas de tratamento, cirurgia com tratamento adjuvante de quimioterapia e cirurgia tratamento adjuvante de radioterapia. Os resultados indicam que ambos protocolos modalidade combinada são factíveis e bem tolerados, mas o o protocolo curativo para pacientes com carcinoma ovariano avançado é ainda desconhecido (Rizel *et al.*, 1985).

2 OBJETIVO

Considerando os estudos de cultivo *in vitro* com a obtenção de metabólitos secundários de *Valeriana glechomifolia*, a possível atividade citotóxica de valepotriatos obtidos de *Valeriana wallichii* (Bounthanh *et al.*, 1981) e os maus prognósticos de muitos tumores, este trabalho tem por objetivo a avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos padronizados de plantas micropropagadas e de cultura de raízes de *Valeriana glechomifolia* em linhagens tumorais humanas U138-MG (glioblastoma), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e OVCAR-3 (carcinoma ovariano).

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

No presente estudo foram utilizadas plântulas de *Valeriana glechomifolia* micropropagadas em meio Murashige & Skoog (Murashige e Skoog, 1965) modificado, chamado de M Δ , por apresentarem os maiores teores de valepotriatos principalmente a partir do mês 5 de cultivo (Maurmann *et al.*, 2008). As plântulas utilizadas foram cultivadas por 5 meses, e posteriormente liofilizadas. Após, as mesmas foram armazenadas em refrigeração a -4 °C até o momento da extração.

As raízes de *Valeriana glechomifolia* utilizadas foram cultivadas em meio líquido Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) com adição de 1 mg/L de ácido 2,4 diclorofenóxiacético (2,4-D) e 0,2 mg/L de cinetina (Maurmann *et al.*, 2006a). Estas foram subculturadas mensalmente por 7 meses, quando então foram liofilizadas e mantidas em refrigeração a -4 °C até extração.

3.2 EXTRAÇÃO DOS VALEPOTRIATOS

Plântulas liofilizadas foram trituradas e extraídas e dois extratos brutos obtidos após três extrações de, respectivamente, 10,03 g e 10,07 g de planta a 25 °C. Para as extrações foram utilizados, respectivamente, 150, 100 e 50 mL de clorofórmio com 20 minutos em ultrassom (Ultrasonic®, São Paulo, Brasil). Os extratos foram filtrados em funil de vidro sinterizado G2 e, posteriormente, concentrados em rotavapor à vácuo, segundo protocolo de Silva *et al.* (2002) adaptado. Um dos extratos obtidos foi, então, reservado para análise como extrato bruto.

As culturas de raízes liofilizadas, diferentemente das plantas, não sofreram trituração, pois estas eram bastante cisalháveis. Utilizando-se 5,74 g de raízes foram realizadas três extrações a 25 °C utilizando, sequencialmente, 300, 200 e 150 mL de clorofórmio com 20 minutos em ultrassom (Ultrasonic®, São Paulo, Brasil). O extrato obtido foi filtrado em funil de vidro sinterizado G2 e posteriormente concentrado em rotavapor à vácuo.

3.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos foram purificados em cromatografia de coluna com auxílio de vácuo, realizada em coluna de vidro sinterizado G2, sílica para coluna (Merck®), quitassato e trompa de vácuo (Maurmann, 2006b).

Para purificação do extrato de plantas micropropagadas utilizado aproximadamente 3 g de sílica para coluna, na qual foi adicionado o extrato metanólico. Após evaporação do metanol, esta sílica com o extrato foi colocada sobre a coluna contendo sílica e então, os solventes foram adicionados, em ordem crescente de polaridade. Foram utilizados, sequencialmente, 100 mL de hexano, 50 mL de hexano:clorofórmio (25:25), 200 mL de clorofórmio, 50 mL de clorofórmio:metanol (25:25) e por fim 100 mL de metanol. As frações resultantes da coluna foram separadas em 3 alíquotas, sendo a primeira composta pela fração predominantemente hexânica (hexano e hexano:clorofórmio), a segunda composta pela fração clorofórmica (clorofórmio) e a terceira composta em sua maioria pela fração metanólica (clorofórmio:metanol e metanol). A fração clorofórmica foi separada, pois é onde os valepotriatos possivelmente ficam retidos.

Para o extrato das culturas de raízes procedeu-se da mesma forma, porém os volumes de solventes utilizados foram diferenciados, devido à presença da clorofila nas plantas e a proximidade da polaridade desta com a dos valepotriatos. Para esta cromatografia de coluna foram utilizados, sequencialmente, 100 mL de hexano, 100 mL de hexano:clorofórmio (50:50), 150 mL de clorofórmio, 100 mL de clorofórmio:metanol (50:50) e 50 mL de metanol. As frações resultantes foram separadas em 3 alíquotas, da mesma forma que os extratos das culturas de raízes.

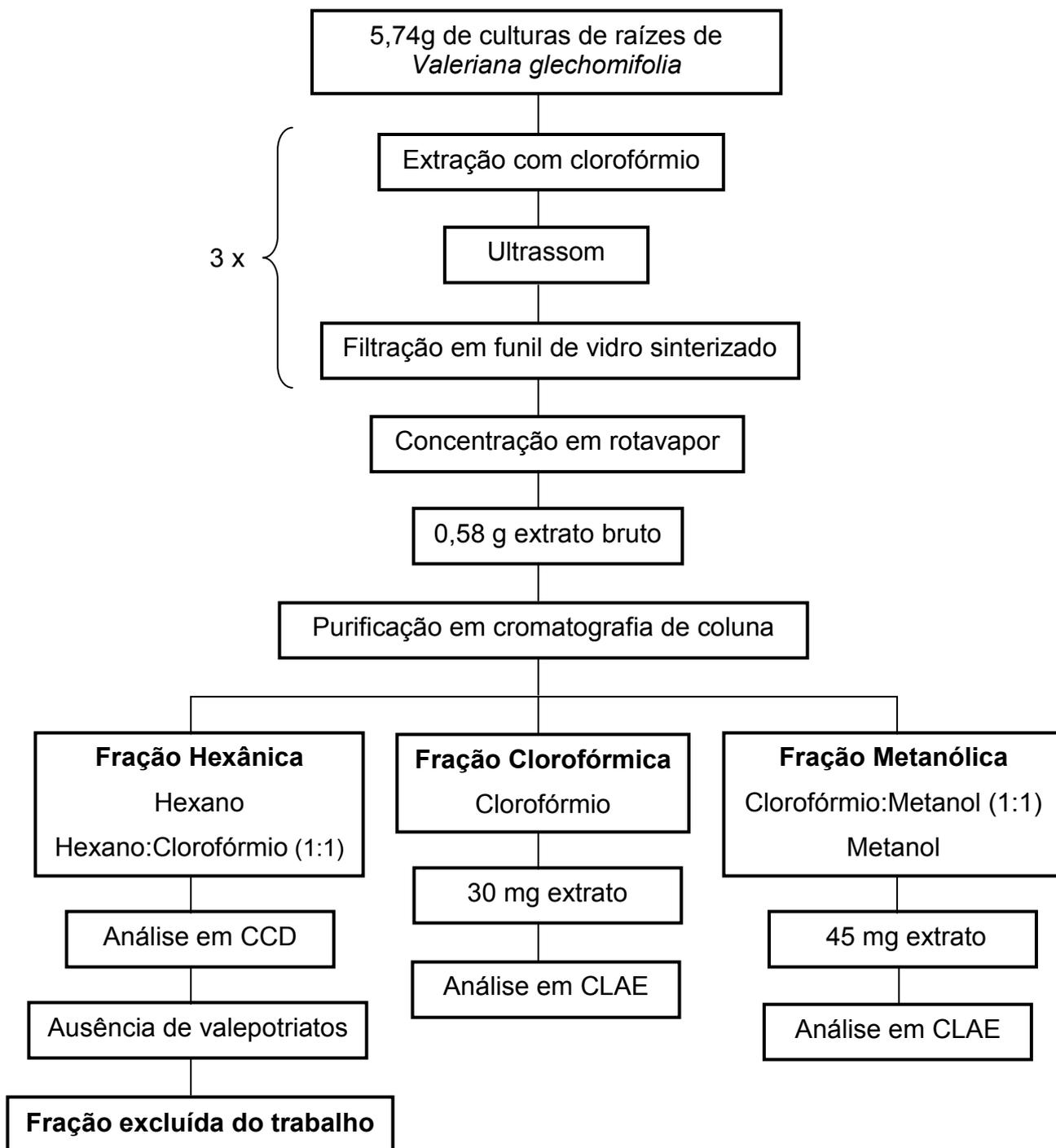
3.4 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os extratos concentrados foram ressuspensos em metanol, para obter aproximadamente a concentração de 1 mg/ml. Após filtração em membrana (0,22 µm, Merck®), 20 µL das soluções foram submetidos à análise em CLAE, aparelho HPLC Waters com bomba Waters 600 detector Waters 2487 UV, com injeção de 20 µL. A coluna utilizada como fase estacionária foi Waters Nova-Pack C18 e pré-coluna Waters Nova-Pack C18, 60 Å; e a fase móvel isocrática utilizada

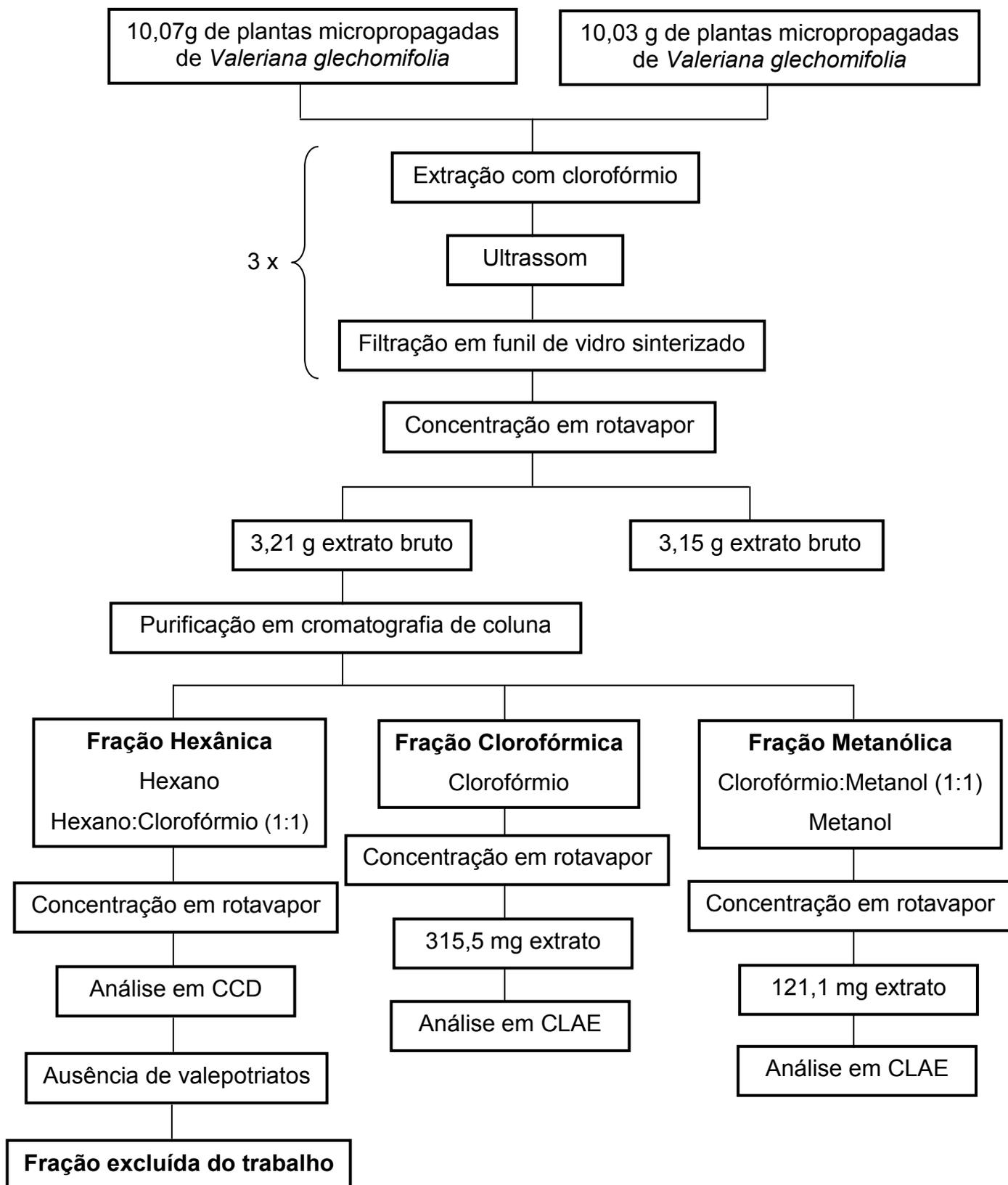
foi composta por acetonitrila:água, 50:50 (v/v), com fluxo de 1 mL/min (Silva *et al.*, 2002).

3.5 FLUXOGRAMA DE PREPARO DOS EXTRATOS

Fluxograma 1. Preparo do extrato de cultura de raízes de *Valeriana glechomifolia*



Fluxograma 2. Preparo do extrato de plantas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia*



3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES HUMANAS

As avaliações dos efeitos do extrato bruto e da fração semi-purificada de valepotriatos na viabilidade de células tumorais foram realizadas utilizando culturas de linhagens celulares de glioblastoma (U138-MG), adenocarcinoma colorretal (HT-29) e carcinoma ovariano (OVCAR) humanos. Foram utilizadas células obtidas do *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, EUA). As células HT-29 e OVCAR foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e as células U138-MG, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Grand Island, New York, EUA) com alta concentração de glicose, contendo 15% (v/v) de SFB, 2% de glutamina e, ambos contendo 0,1% de fungizona, 0,125% de gentamicina e 1% de ampicilina (Farias *et al.*, 2008; Schmitd *et al.*, 2009; Abujamra *et al.*, 2009). As culturas foram mantidas em frascos estéreis de 25 cm² com o meio de cultura adequado para cada linhagem, em incubadora com atmosfera de 5% de gás carbônico, a temperatura de 37 °C, com umidade relativa mínima de 95%.

Após contagem das células, as mesmas foram semeadas na concentração de 4x10³ células/poço para as linhagens U138-MG e OVCAR, e na concentração de 7x10³ células/poço para linhagem HT-29 em microplaca de 96 poços, sendo utilizados 32 poços para cada linhagem celular. Estas foram mantidas à temperatura de 37 °C com umidade relativa mínima de 95% e atmosférica de 5% de CO₂ no ar por 24 horas, para posterior tratamento com extratos de *Valeriana glechomifolia*.

3.7 TRATAMENTO

Para obtenção das concentrações de valepotriatos utilizadas nos tratamentos foram pesados 37,0 mg do extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas e 305,5 mg do extrato bruto. Esta diferença entre as pesagens se dá pois a concentração de valepotriatos no extrato semi-purificado é cerca de oito vezes maior que a concentração no extrato bruto.

Para preparação dos tratamentos, os extratos de *Valeriana glechomifolia* escolhidos, extrato bruto e extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas, foram dissolvidos em etanol PA, com posterior diluição para

obtenção das doses: 23,125 µg/mL, 46,25 µg/mL, 92,5 µg/mL, 185 µg/mL, 370 µg/mL e 1850 µg/mL de valepotriatos quantificados no extrato semi-purificado ou o seu equivalente contido no extrato bruto, resultando em 5% de etanol por poço. Além destas doses foram utilizados dois controles, um contendo solução etanólica 5% e outro contendo apenas o meio de cultivo específico da linhagem celular, chamado de controle positivo, uma vez que ainda não havia sido testada a viabilidade das células com 5% de etanol.

Após 24 horas de cultivo das linhagens celulares tumorais humanas, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 µL de cada tratamento, contendo meio de cultivo específico de cada linhagem celular, em cada poço. As células permaneceram, então, sob condições de cultivo por 24 horas e após determinada a viabilidade celular.

3.8 MTT E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA

Após os tratamentos, as células foram avaliadas pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltertrazolim], conforme descrito por Mosmann (1983). Após o período de tratamento, foi adicionado ao meio das células 11 µL de uma solução com MTT (Sigma Aldrich, Brasil; 5 mg/ml). Após 4 horas a 37°C, o MTT foi descartado e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Spectra MAX 190) utilizando-se 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, no comprimento de onda de 492 nm (Farias *et al.*, 2008; Schmitd *et al.*, 2009; Abujamra *et al.*, 2009).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média + erro padrão da média (EPM) da porcentagem da viabilidade celular. Diferenças entre os valores de média foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de LSD quando necessário. Em todas as comparações, $P \leq 0,05$ indicaram diferenças estatísticas significativas. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS 16.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas micropropagadas após extração clorofórmica apresentaram rendimento de 31,88% para o extrato posteriormente purificado e 31,40% para o extrato bruto, e as culturas de raízes apresentaram rendimento de 10,02%. Após a semi-purificação o extrato de plantas micropropagadas teve um rendimento de 9,83% (extrato clorofórmico) e 3,77% (extrato metanólico); o extrato das culturas de raízes teve um rendimento de 5,17% (extrato clorofórmico) e 7,76% (extrato metanólico). Os extratos de plantas micropropagadas, obtido por sonicação, e das culturas de raízes após cromatografia em coluna foram separados em 3 alíquotas, de acordo com a fase móvel, sendo obtidas as frações hexânica (hexano e hexano:clorofórmio), clorofórmica e metanólica (clorofórmio:metanol e metanol), as quais foram, posteriormente, concentradas em rotavapor à vácuo. A fração hexânica dos extratos foi ressuspensa e analisada em cromatografia em camada delgada (CCD) (placas contendo camada de 0,5 mm de sílica gel GF₂₅₄) tendo como eluente clorofórmio:metanol (50:5) (Salles *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002), com posterior visualização em luz UV em comprimento de onda de 254nm, para observação da existência ou ausência de valepotriatos. Esta fração foi escolhida para análise em CDD, pois os valepotriatos são compostos que possuem características menos polares, sendo extraídos por clorofórmio. A placa analisada com as duas amostras não mostrou a presença de valepotriatos, sendo, assim, as frações hexânicas dos extratos de plantas micropropagadas e das culturas de raízes excluídas do trabalho.

As frações clorofórmicas e metanólicas de ambos extratos foram pesadas, obtendo-se para os extratos semi-purificados das culturas de raízes 30 mg de extrato clorofórmico e 45 mg de extrato metanólico. Os extratos semi-purificados das plantas micropropagadas apresentaram 315,5 mg de extrato clorofórmico e 121,1 mg de extrato metanólico. Estas amostras foram, então, submetidas à análise em CLAE, juntamente com o extrato bruto, não purificado.

Sabendo-se que o limite de detecção para os valepotriatos acevaltrato, valtrato e diidrovaltrato é de 3,9 µg/mL; e para 1-β-acevaltrato e DIA-valtrato é de 7,2 µg/mL (Silva *et al.*, 2002), podemos excluir do trabalho as seguintes amostras: extrato metanólico de plantas micropropagadas e extratos clorofórmico e metanólico

de culturas de raízes. Para os extratos que obtiveram concentrações de valepotriatos superiores ao limite de detecção foi determinada a concentração média de valepotriatos.

Os extratos bruto e clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas foram, então, avaliados quanto à atividade antiproliferativa. Os resultados expostos (Gráficos 1-6) mostram atividade de ambos extratos sobre as linhagens celulares humanas escolhidas, U138-MG, HT-29 e OVCAR. As avaliações mostram que as diferentes linhagens apresentaram perfis semelhantes estatisticamente significativos na redução da viabilidade celular após tratamento com os extratos de *Valeriana glechomifolia*.

Na linhagem celular U138-MG, o extrato bruto apresentou atividade antiproliferativa em cinco das seis doses administradas (Gráfico 1). A dose de 46,25 µg/mL apresentou, após 24 horas de tratamento, 58% de células viáveis. No extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas todas doses administradas apresentaram atividade antiproliferativa (Gráfico 2). As doses 23,125 µg/mL, 46,25 µg/mL, 92,5 µg/mL, 185 µg/mL e 370 µg/mL apresentaram viabilidade celular de 51%, 48%, 40%, 44% e 50%, respectivamente.

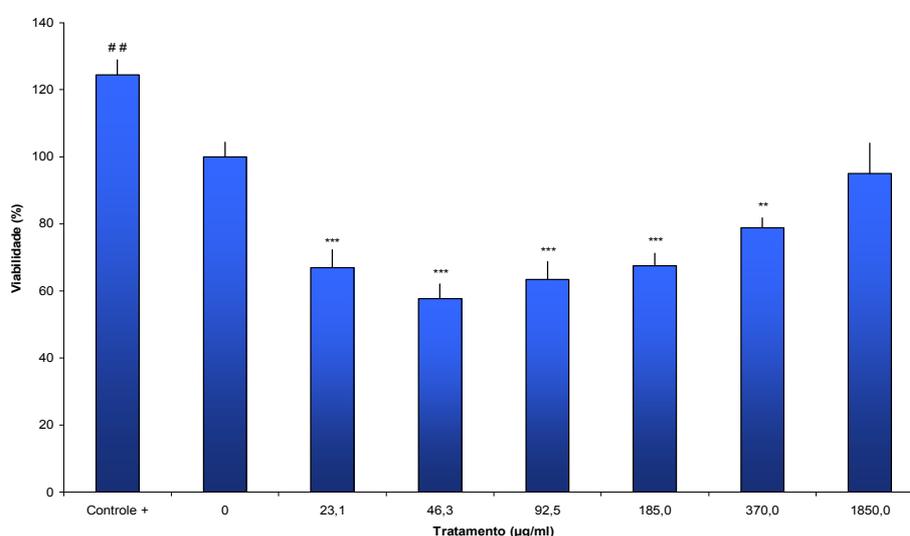


Gráfico 1. Atividade antiproliferativa do extrato bruto de *Valeriana glechomifolia* na linhagem celular U138-MG após 24 horas de tratamento (** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$ indicam diferenças estatísticas significativas de redução da viabilidade em comparação ao controle e ### $P \leq 0,001$ indica diferença estatística significativa de aumento da viabilidade em comparação com o controle).

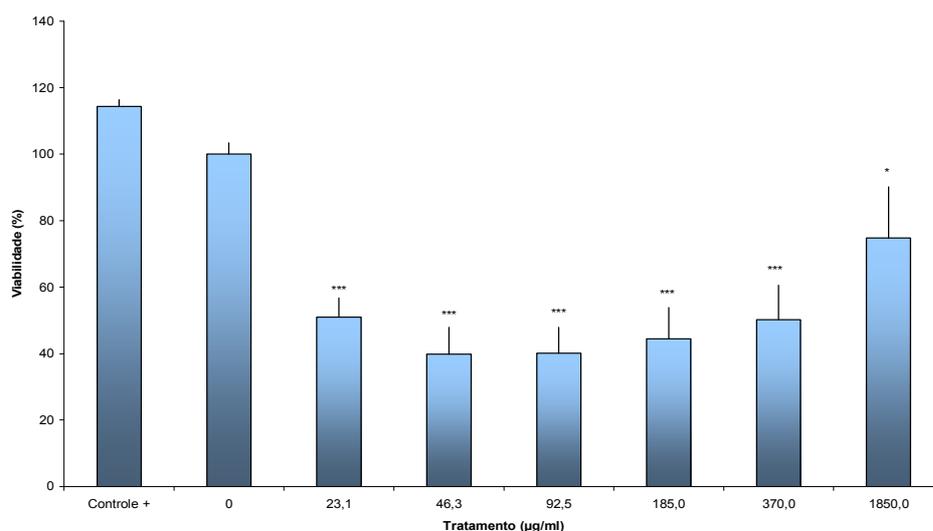


Gráfico 2. Atividade antiproliferativa do extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia* na linhagem celular U138-MG após 24 horas de tratamento. (* $P \leq 0,05$ e *** $P \leq 0,001$ indicam diferenças estatísticas significativas de redução da viabilidade em comparação ao controle).

Na linhagem celular HT-29 quatro das seis doses do extrato bruto mostraram-se efetivas, com diferença estatística significativa, na redução da viabilidade celular, sendo a dose 23,125 µg/mL a mais efetiva, apresentando 67% das células viáveis (Gráfico 3). O extrato clorofórmico semi-purificado apresentou atividade antiproliferativa em cinco das seis doses avaliadas (Gráfico 4), sendo as doses 23,125 µg/mL, 46,25 µg/mL, 92,5 µg/mL, 185 µg/mL e 370 µg/mL as mais efetivas apresentando 62%, 54%, 59%, 63% e 67% de células viáveis, respectivamente.

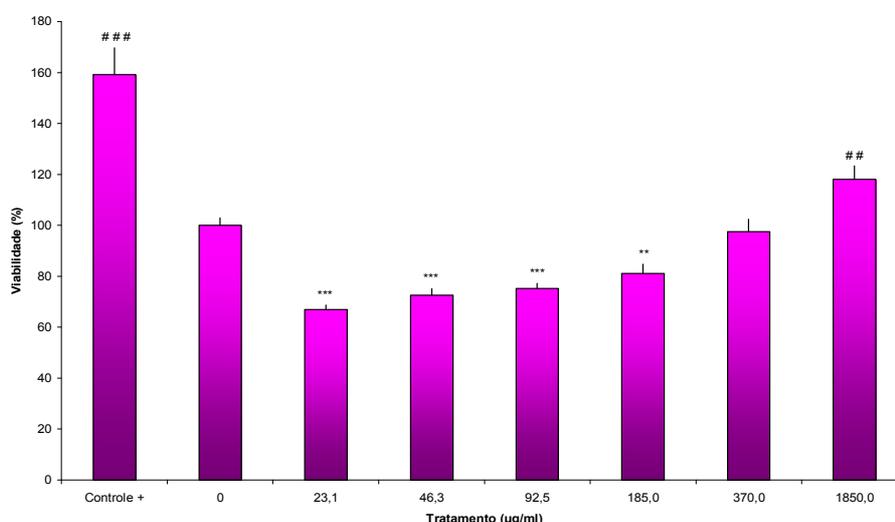


Gráfico 3. Atividade antiproliferativa do extrato bruto de *Valeriana glechomifolia* na linhagem celular HT-29 após 24 horas de tratamento (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ indicam diferenças estatísticas significativas de redução da viabilidade em comparação ao controle; ## $P \leq 0,01$ e ### $P \leq 0,001$ indicam diferenças estatísticas significativas de aumento da viabilidade em comparação com o controle).

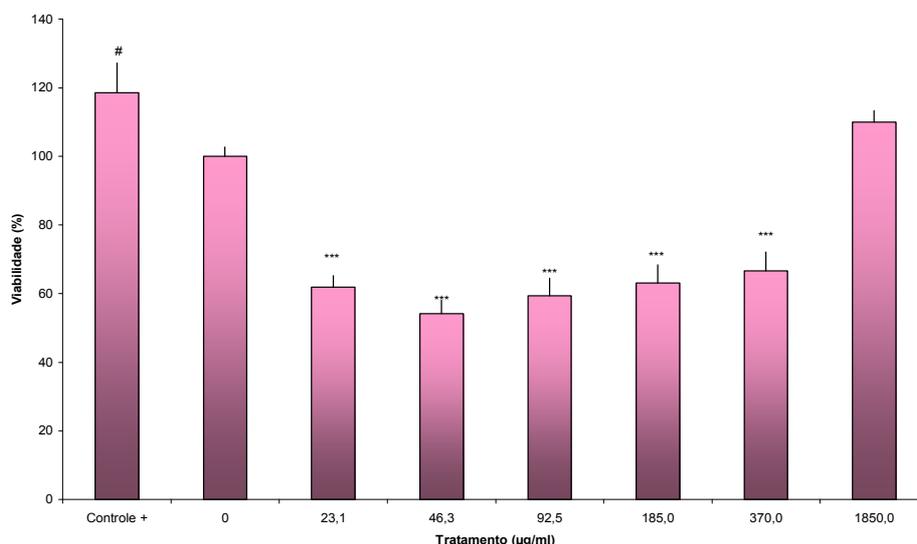


Gráfico 4. Atividade antiproliferativa do extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia* na linhagem celular HT-29 após 24 horas de tratamento (*** $P \leq 0,001$ indica redução da viabilidade e # $P \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa de aumento da viabilidade, em comparação ao controle).

Na linhagem OVCAR, o extrato bruto apresentou redução da viabilidade celular nas seis doses avaliadas (Gráfico 5). As doses 23,125 µg/mL, 46,25 µg/mL, 92,5 µg/mL, 185 µg/mL, 370 µg/mL e 1850 µg/mL apresentaram 62%, 62%, 61%, 68%, 74% e 84% de células viáveis, respectivamente. O extrato clorofórmico semi-purificado apresentou atividade antiproliferativa em quatro das seis doses avaliadas (Gráfico 6), sendo as doses 46,25 µg/mL, 92,5 µg/mL, 185 µg/mL e 370 µg/mL as mais efetivas apresentando 56%, 72%, 61% e 65% de células viáveis, respectivamente.

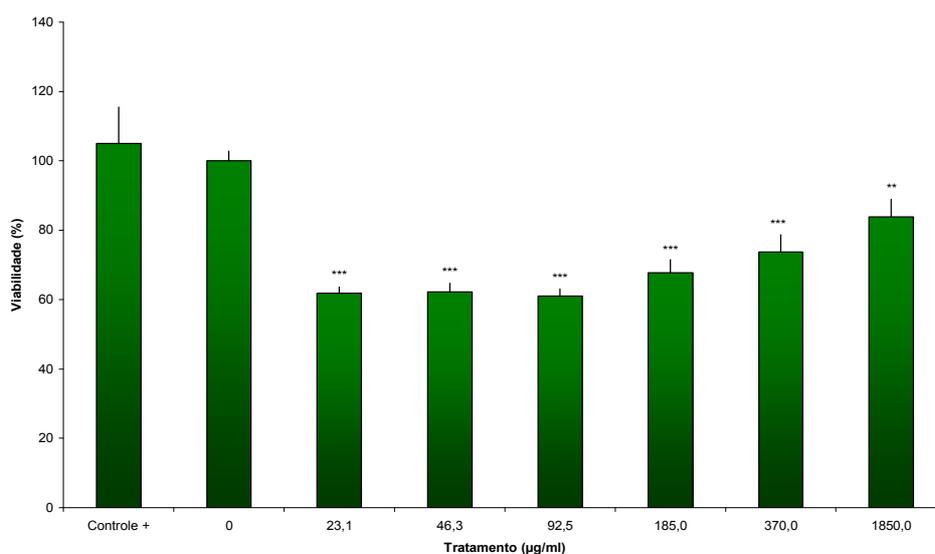


Gráfico 5. Atividade antiproliferativa do extrato bruto de *Valeriana glechomifolia* na linhagem celular OVCAR após 24 horas de tratamento (** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$ indicam redução da viabilidade celular em comparação com o controle).

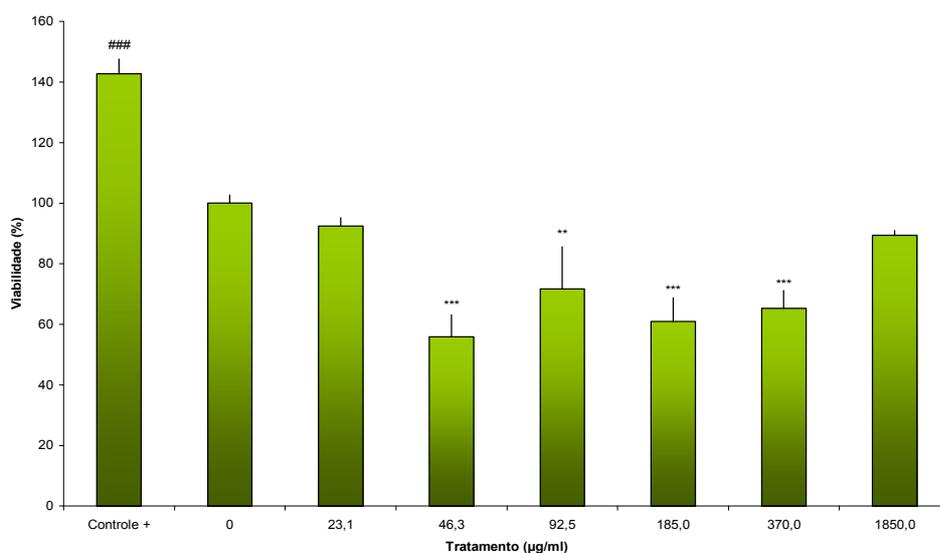


Gráfico 6. Atividade antiproliferativa do extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia* na linhagem celular OVCAR após 24 horas de tratamento (** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$ indicam redução da viabilidade e ### $P \leq 0,001$ indica diferença estatística significativa de aumento da viabilidade, em comparação com o controle).

Os extratos brutos e o semi-purificado apresentaram um perfil de viabilidade celular semelhante nas diferentes linhagens tumorais celulares estudadas, indicando

que são os valepotriatos os principais compostos do extrato bruto responsáveis pelo efeito encontrado, e não os demais compostos presentes no extrato bruto.

No presente estudo, o extrato clorofórmico semi-purificado de plantas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia* e o equivalente de valepotriatos contido no extrato bruto apresentaram atividade antiproliferativa em três linhagens de células tumorais distintas estudadas, após 24h de tratamento. Assim, na continuidade do trabalho, os valepotriatos poderão ser isolados para inferir-se qual o metabólito mais ativo sobre as linhagens celulares tumorais humanas testadas e iniciar o estudo de mecanismo de ação. Resultados semelhantes foram encontrados em *Valeriana wallichii*, outra espécie do gênero, utilizando-se doses de 33 µg/mL, no qual os valepotriatos apresentaram-se como agentes antitumorais e citotóxicos em linhagem celular de hepatoma de ratos (HTC) (Bounthanh *et al.*, 1981).

Em estudos da avaliação da atividade antiproliferativa na linhagem celular HT-29 com extratos aquosos de *Rubus coreanun*, Kim e colaboradores (2005) observaram uma redução da viabilidade celular de $51,8 \pm 0,9\%$ após 48 horas de tratamento com dose de 400µg/ml, porém no extrato etanólico esta redução foi de apenas $14,8 \pm 1,2\%$ com a mesma dose, demonstrando a influência do solvente de extração na composição dos extratos e conseqüentemente na viabilidade celular. No presente trabalho, a composição diferente dos extratos testados provavelmente não interferiu na citotoxicidade, indicando serem os valepotriatos os responsáveis pelos efeitos antiproliferativos.

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que ambos os extratos demonstraram efeito antiproliferativo sobre as linhagens celulares humanas U138-MG, HT-29 e OVCAR, tendo as diferentes linhagens celulares perfis semelhantes de viabilidade celular em quase todas as doses utilizadas no presente estudo.

Analisando as linhagens e as dosagens utilizadas, observa-se uma relação de dosagem entre os tipos de extratos, as células tratadas com extrato bruto sofreram maior redução da viabilidade celular na dose de 46,25 µg/mL para U138-MG e 23,125 µg/mL para as linhagens HT-29 e OVCAR. Porém, as células tratadas com o extrato clorofórmico semi-purificado apresentaram maior redução da viabilidade celular na dosagem 46,25 µg/mL, em todas as linhagens avaliadas.

Os resultados aqui apresentados poderão nortear outras investigações como avaliação antiproliferativa em outras linhagens tumorais, outras doses, e com controle negativo, para comparação da eficácia com fármacos já existentes. Além disso, o isolamento dos valepotriatos a fim de identificar qual valepotriato é o principal responsável pela atividade antiproliferativa, bem como realização de *western blot* para estudo do mecanismo de ação dos valepotriatos na redução da viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

ABUJAMRA, A.L.; ALMEIDA, V.R.; BRUNETTO, A.L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: Prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biology International*, v.33, p.899-903, 2009.

ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.18, n.3, p.455-463, 2008.

BENT, S.; PADULA, A.; MOORE, D.; PATTERSON, M.; MEHLING, W. Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medicine*. v.119, p.1005-1012, 2006.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. *Herbal Medicine: Expanded commission e monographs*. 1. ed. Austin: American Botanical Council, 2000. 519p.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J.P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Medica*, v.41, p.21-28, 1981.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.3, p.408-420, 2006.

BRANDES, A.A.; TOSONI, A.; FRANCESCHI, E.; RENI, M.; GATTA, G.; VECHT, C. Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v.67, p.139-152, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Instituto Nacional do Câncer (INCA): Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos*

por câncer, em homens e mulheres, no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2009a. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>

BRASIL. Ministério da Saúde. *Instituto Nacional do Câncer (INCA): Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, no Rio Grande do Sul e em Porto Alegre*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2009b. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=RS>

BRASIL. Ministério da Saúde. *Instituto Nacional do Câncer (INCA): Tipos de Câncer: Ovário*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2009c. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>

BUDZINSKI, J.W.; FOSTER, B.C.; VANDENHOEK, S.; ARNASON, J.T. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine*, v.7, n.4, p.273-282, 2000.

CAVADAS, C.; ARAUJO, I.; CTRIM, M.D.; AMARAL, T.; CUNHA, A.P.; MACEDO, T.; RIBEIRO, C.F. *In vitro* study on the interaction of *Valeriana officinalis* L. extracts and their aminoacids on GABA_A receptor in rat brain. *Arzneimittel-Forsch*, v.45, p.753-755, 1995.

DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 1. ed. London: Barnes, Noble, 2000. 520 p.

DONOVAN, J.L.; DEVANE, C.L.; CHAVIN, K.D.; WANG, J.S.; GIBSON, B.B.; GEFROH, H.A.; MARKOWITZ, J.S. Multiple nighttime doses of valerian (*Valeriana officinalis*) had minimal effects on CYP3A4 activity and no effect on CYP2D6 activity in healthy volunteers. *Drug Metabolism and Disposition*, v.32, p.1333-1336, 2004.

EUROPEAN SCIENTIFIC COOPERATIVE ON PHYTOTHERAPY (ESCOP). *Monographs on the Medicinal Use of Plants*. 1. ed. Exeter: ESCOP, 1997.

FARIAS, C.B.; CRUZ LIMA, R.; LIMA, L.O.; FLORES, D.G.; MEURER, L.; BRUNETTO, A.L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology*, v.75, p.27-31, 2008.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, v.63, n.6, p.965-981, 1985.

FERRAZ, A.B.F.; GRIVICICH, I.; VON POSER, G.L.; FARIA, D.H.; KAYSER, G.B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.T.; ROCHA, A.B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. *Fitoterapia*, v.76, p.210-215, 2005.

FUGH-BERGMAN, A.; COTT, J.M. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. *Psychosomatic Medicine*, v.61, p.712-728, 1999.

FUZZATI, N.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K.; MSONTHI, J.D.; MAVI, S.; MOLLEYRES, L.P. Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochemical Analysis*, v.7, n.2, p.76-85, 1996.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, n.1, p.151-58, 1968.

GAOU, X.Q.; BJÖRK, L. Valerenic acid derivatives and valepotriatos among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia*, v.71, p.19-24, 2000.

GRUENWALD, J. *PDR for Herbal Medicines*. 1. ed. Montvale: Thomson, 2000. 1244p.

GUIMARÃES, J.L.M.; ROSA, D.D. *Rotinas em oncologia*. Porto Alegre: Artmed, 2008. 942p.

GYLLENHAAL, C.; MERRITT, S.L.; PETERSON, S.D.; BLOCK, K.L.; GOCHENOUR, T. Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders. *Sleep Medicine Review*. v.4, p.229-251, 2000.

HADLEY, S.; PETRY, J.J. Valerian. *American Family Physician*. v.67, p.1755-1758, 2003.

HELLUM, B.H.; HU, Z.; NILSEN, O.G. The induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by six trade herbal products in cultured primary human hepatocytes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. v.100, n.1, p.23-30, 2007.

IBAMA. *Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção*, Portaria n.º 37-N, de 03 de abril de 1992.

KEIME-GUIBERT, F.; CHINOT, O. TAILLANDIER, L. ; CARTALAT-CAREL, S.; FRENAY, M.; KANTOR, G.; GUILLAMO, J.S.; JADAUD, E.; COLIN P.; BONDIAU, P.Y.; MENEÏ, P.; LOISEAU, H.; BERNIER, V.; HONNORAT, J.; BARRIÉ, M.; MOKHTARI, K.; MAZERON, J.J.; BISSERY, A.; DELATTRE, J.Y. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *The New England Journal of Medicine*. v.356, p.1527-1535, 2007.

KIM, E.J.; LEE, Y.; SHIN, H.; PARK, J.H.Y. Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition*, v.21, p.1141-1148, 2005.

LEATHWOOD, P.D.; CHAUFFARD, F.; HECK, E.; MUNOZ-BOX, R. Aqueous extract of valerian root (*Valeriana officinalis* L.) improves sleep quality in man. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v.17, p.65-71, 1982.

LEFEBVRE, T.; FOSTER, B.C.; DROUIN, C.E.; KRANTIS, A.; LIVESEY, J.F.; JORDAN, S.A. *In vitro* activity of commercial valerian root extracts against human cytochrome P450 3A4. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v.7, n.2, p.265-273, 2004.

LEUSCHNER, J.; MÜLLER, J.; RUDMANN, M. Characterisation of the central nervous depressant activity of a commercially available valerian root extract. *Arzneimittel-Forsch*, v.43, n.6, p.638-641, 1993.

LINDHAL, O., LINDWALL, L. Double blind study of a valerian preparation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v.32, n.4, p.1065-1066, 1989.

LOPES, A.; IYEYASU, H.; CASTRO, R.M.R.P.S. *Oncologia para graduação*. 2 ed. São Paulo: Tecmedd, 2008. 739p.

DI GREGORIO, C.; BENATTI, P.; LOSI, L.; RONCUCCI, L.; ROSSI, G.; PONTI, G.; MARINO, M.; PEDRONI, M.; SCARSELLI, A.; RONCARI, B.; DE LEON, M.P. Incidence and survival of patients with Dukes'A (stage T1 and T2) colorectal carcinoma: a 15-years population-based study. *International Journal of Colorectal Disease*. v.20, p.147-154, 2005.

LUZ, D.I.; MAURMANN, N.; CARVALHO, C.M.B.; RECH, S.B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. *Caderno de Farmácia*, v.19, n.2, p.89-92, 2003.

MALVA, J.O.; SANTOS, S.; MACEDO, T. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. *Neurotoxicity Research*, v.6, n.2, p.131-140, 2004.

MAURMANN, N.; DE CARVALHO, C. M. B.; SILVA, A. L.; FETT-NETO, A. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.42, n.1, p.50-53, 2006a.

MAURMANN, N. *Valeriana glechomifolia*: crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar da atividade neurofarmacológica. Dissertação de mestrado. Programa de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do rio Grande do Sul. 2006b.

MAURMANN, N.; RECH, S.B.; FETT-NETO, A.G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.44, n.3, p.209-215, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

MÜHLBACHA, H.P. Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, v.4, p.113-176, 1998.

PADUCH, R.; WÓJCIAK-KOSIOR, M.; MATYSIK, G. Investigation of biological activity of *Lamii albi flos* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p.69-75, 2007.

RIZEL, S.; BIRAN, S.; ANTEBY, S.O.; BRUFMAN, G.; SULKES, A.; MILWIDSKY, A.; WESHLER, Z.; FUKS, Z. Combined modality treatment for stage III ovarian carcinoma. *Radiotherapy and Oncology*. v.3, n.3, p.237-244, 1985.

ROSS, H.M.; MAHMOUD, N.; FRY, R.D. The current management of rectal cancer. *Current Problems in Surgery*, v.42, n.2, p.72-131, 2005.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, v.18, p.91-120, 2000.

RUSSO, E. *Handbook of Psychotropic Herbs*. 1. ed. New York: Haworth, 2001. 352p.

RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; RECH, S.B.; FETT-NETO, A.G.. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.86, n.2, p.211-218, 2006.

SALLES, L.A.; SILVA, A.L.; RECH, S.B.; ZANATTA, N.; VON POSER, G.L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.28, p.907-910, 2000.

SALLES, L.A.; SILVA, A.L.; FETT-NETO, A.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriatos. *Plant Science*, v.163, p.165-168, 2002.

SAMPAIO, M.I.R.; CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C. Valerianaceae: etnofarmacologia, farmacologia e química. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.74, p.54-56, 1993.

SANTOS, M.S.; FERREIRA, F.; FARO, C.; CUNHA, A.P.; PIRES, E.; CARVALHO, A.P.; MACEDO, T. The amount of GABA present in aqueous extracts of valerian is sufficient to account for [3H] GABA release in synaptossomes. *Planta Medica*, v.60, p.475-476, 1994a.

SANTOS, M.S.; FERREIRA, F.; FARO, C.; CUNHA, A.P.; PIRES, E.; CARVALHO, A.P.; MACEDO, T. An aqueous extract of valerian influences the transports of GABA in synaptossomes. *Planta Medica*, v.60, p.278-279, 1994b.

SCHMIDT, A.L.; FARIAS, C.B.; ABUJAMRA, A.L.; BRUNETTO, A.L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. Phosphodiesterase-4 inhibition and brain tumor growth. *Clinical Cancer Research*, v.15, p.3238-3238, 2009.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. *Rational phytotherapy: a physicians' guide to the herbal medicine*. 4. ed. Berlin: Springer, 2001. 383p.

SILVA, A.L.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to South Brazil. *Planta Medica*, v.68, p.570-572, 2002.

SOBRAL, M. Valerianaceae. *Boletim do Instituto de Biociências*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, v.58, p.1-61, 1999.

SPARREBOOM, A.; COX, M.C.; ACHARYA, M.R.; FIGG, W.D. Herbal remedies in the United States: potential adverse interactions with anticancer agents. *Journal of Clinical Oncology*, v.22, n.12, p.2489-2503, 2004.

STUPP, R.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M.J.; BELANGER, K.; BRANDES, A.A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R.C.; LUDWIN, S.K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J.G.; EISENHAUER, E.; MIRIMANOFF, R.O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*. v.352, p.987-996, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.308-313, 2008.

WEISS, R.F.; FINTELMANN, V. *Herbal Medicine*. 2. ed. Stuttgart: Thieme, 2000.

WEITZ, J.; KOCH, M.; DEBUS, J.; HOHLET, T.; GALLE, P.R.; BUCHLER, M.W. Colorectal cancer. *The Lancet*, v.365, n. 9454, p. 153-165, 2005.

WHEATLEY, D. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Journal of Psychopharmacology*, v.19, n.4, p.414-421, 2005.