

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

MARILLIN DE CASTRO CUNHA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE ESPÉCIES VEGETAIS DO PANTANAL
BRASILEIRO**

**CAMPO GRANDE – MS
2014**

MARILLIN DE CASTRO CUNHA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE ESPÉCIES VEGETAIS DO PANTANAL
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Mestre.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fatima Cepa Matos.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Trentin Perdomo.

**CAMPO GRANDE – MS
2014**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu a vida, guiou meus passos, me iluminou e me deu forças nos momentos de dificuldade. Obrigada Senhor, pelas oportunidades que coloca na minha vida, pela força para chegar até aqui e por sempre me fazer seguir em frente.

Aos meus pais Ordalino e Evanir, meus primeiros e grandes mestres, meus exemplos de dignidade, respeito, força, luta, garra, sabedoria e amor. Obrigada pela maravilhosa família que vocês construíram, por me ensinarem bons valores, por sempre acreditarem em mim e fazerem de tudo para que eu conquistasse meus sonhos. Se hoje cheguei até aqui foi pelo amor e pela confiança que vocês depositaram em mim. Essa conquista é para vocês. Amo infinitamente.

À minha família, minha essência, meus irmãos Marielli, Juliana, Luciano e Maira, que sempre me apoiaram, me escutaram, me ajudaram e estiveram ao meu lado quando precisei. Amo vocês.

Às minhas amigas, especialmente Ulana, Tuti e Camila que sempre me escutaram e me ajudaram nessa caminhada. Com vocês tudo ficou mais fácil de ser vivido. Apesar da distância, o sentimento que nos une ainda é o mesmo. Amo vocês.

Ao meu querido Renaudt, por ter mudado minha vida e me ensinado o sentido do amor. Pelo apoio nos momentos difíceis, pelo incentivo, pelo compartilhamento dos meus sonhos e por toda dedicação a nós. Te amo.

Ao meu incansável e fiel companheiro Chico, que me acompanhou durante os exatos 2 anos de duração do mestrado. Que me esperava com toda alegria do mundo a cada chegada em casa. Que me deu o amor mais puro e incondicional sem pedir nada em troca. Saudades.

A toda a Família Farmácia 2011 UFMS. Foi com vocês que esse sonho começou, e sem vocês ao meu lado nada seria possível. Muito obrigada a cada um.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria de Fatima Cepa Matos, meu sincero e carinhoso muito obrigada por dividir comigo seus conhecimentos e experiências, além de toda confiança depositada durante esses anos de convívio, desde a graduação até o mestrado. Trabalhar na Cultura de Células foi uma experiência única de crescimento pessoal e profissional que levarei para a vida inteira. Gostaria de expressar todo meu respeito e admiração pelo seu trabalho e dedicação a esta instituição.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Renata Trentin Perdomo, que me acompanhou desde os primeiros passos na Cultura de Células e me iniciou no trabalho prático do laboratório. Obrigada por toda paciência e por dividir comigo seu conhecimento e experiência.

À Capes, CNPq e FUNDECT pelo apoio financeiro. Ao prof. Dr. Adriano César Baroni coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e demais professores deste programa. Ao Luiz Fernando Dall Onder, secretário deste programa de Pós-graduação, pela solicitude e simpatia que sempre me atendeu nas diversas vezes em que precisei.

À Prof^a. Dr^a Danielle Bogo que me acompanhou desde a graduação no Laboratório de Cultura de Células, e que incansavelmente me passou tudo que pode do seu conhecimento sobre cultura e manutenção de células.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, do Laboratório de Farmacognosia da UFMS, por ceder as espécies vegetais utilizados na triagem deste estudo. Obrigado por toda ajuda, pelo direcionamento, esclarecimento e paciência nos ensinamentos químicos relativos a este estudo. À técnica Amanda Boaretto, pela ajuda na preparação dos extratos e frações utilizados. Obrigada pela atenção, pelo tempo, pela paciência, pela calma e por estar sempre solicita quando precisei. Ao aluno Me. Daniel Demarque pela boa disposição em me socorrer nas questões químicas.

Aos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Ana Lúcia Ruiz da Universidade Estadual de Campinas pelo suporte técnico, pelos valiosos ensinamentos e experiências sobre culturas celulares, além da doação das linhagens de células usadas neste estudo.

À Camila, Mariah, Priscila e Laura, colegas do Laboratório de Cultura de Células, agradeço pelo auxílio que recebi de vocês, pelos favores trocados, pela convivência agradável que tivemos e pela amizade construída. Obrigada pelas risadas, pelos papos, reclamações e companheirismo que sempre tivemos.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho... Meu Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

**“Agradeço todas as dificuldades que
enfrentei; não fosse por elas, eu não teria
saído do lugar.”**

(Chico Xavier)

RESUMO

As plantas são as principais fontes de produtos bioativos ou de substâncias protótipos que podem originar fármacos. O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, o que oferece excelentes possibilidades de se encontrar substâncias de interesse terapêutico e o Pantanal é um exemplo de biodiversidade, com riqueza e ampla distribuição de espécies de plantas. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa de 10 espécies coletadas no Pantanal de Mato Grosso do Sul (*Sesbania virgata*, *Centratherum punctatum*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Aeschynomene histrix*, *Sebastiana hispida*, *Croton glandulosus*, *Hyptis brevipes*, *Tocoyena formosa* e *Randia armata*). Foi utilizado um extrator de fluido pressurizado para o preparo de extratos polares a apolares e o fracionamento de cada espécie. Foram utilizadas seis linhagens de células neoplásicas humanas (786-0, PC-3, HT-29, MCF-7, NCI/ADR-RES, Hep G2) e uma linhagem não neoplásica murina (NHI/3T3). O método utilizado foi o da sulforrodamina B (SRB). Os extratos apolares de *Centratherum punctatum* e *Hyptis brevipes* se destacaram, com valores de GI_{50} próximos a 30 $\mu\text{g/mL}$ e as frações acetato de etila destas mesmas espécies mostraram atividade citotóxica aprimorada, com valores de GI_{50} até seis vezes menores que o extrato. As frações ativas foram avaliadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), sugerindo a presença de classe de substâncias já relatadas, isocentraterina e brevipolides, respectivamente para *C. punctatum* e *H. brevipes*, relacionadas à atividade antiproliferativa.

Palavras- chave: Pantanal, Efeito Antiproliferativo, Sulforrodamina B.

ABSTRACT

Plants are the principal sources of bioactive products or prototypic compounds from which drugs can be derived. Home to the greatest biodiversity on the planet, the Brazilian territory provides ample opportunity for the discovery of substances of therapeutic interest. The Pantanal biome is a notable example of this biodiversity, given the richness and wide distribution of its plant species. The purpose of this study was to evaluate the antiproliferative activities of 10 species collected from the Pantanal wetlands of Mato Grosso do Sul state (*Sesbania virgata*, *Centratherum punctatum*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Aeschynomene histrix*, *Sebastiania hispida*, *Croton glandulosus*, *Hyptis brevipes*, *Tocoyena formosa*, and *Randia armata*). Polar and non-polar extracts prepared from each species were fractionated using an accelerated solvent extractor. Six neoplastic human cell lines (786-0, PC-3, HT-29, MCF-7, NCI/ADR-RES, Hep G2) and one murine non-neoplastic line (NHI/3T3) were employed. The sulforhodamine B (SRB) method was applied. Noteworthy were the GI₅₀ values, of around 30 µg/mL, obtained for the non-polar extracts of *Centratherum punctatum* and *Hyptis brevipes*. For both species, the ethyl acetate fractions proved even more active, with GI₅₀ values as much as six times lower than their respective extracts. Evaluation of the active fractions by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) suggested the presence, in *C. punctatum* and *H. brevipes*, of isocentratherin and brevipolides, respectively - compounds pertaining to a class previously reported as antiproliferative.

Keywords: Pantanal, Antiproliferative Effect, Sulforhodamine B.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Câncer.....	2
2.2 Cultura de Células e Ensaio de Citotoxicidade	4
2.3 Pantanal	5
2.4 Produtos Naturais.....	7
2.5 Famílias	8
2.5.1 Fabaceae	8
2.5.2 Asteraceae	9
2.5.3 Alismataceae	9
2.5.4 Euphorbiaceae	10
2.5.5 Lamiaceae.....	10
2.5.6 Rubiaceae.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivo Geral.....	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. REFERÊNCIAS.....	13
5. CAPÍTULO I – Pantanal brasileiro como fonte de espécies com atividade antiproliferativa.....	24

1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades do planeta, com mais de 20% do número total de espécies da Terra (MMA, 2014). Com tantas fontes naturais ainda disponíveis, o país oferece excelentes possibilidades de se encontrar substâncias de interesse terapêutico.

O Pantanal brasileiro está localizado na Bacia do Alto Paraguai, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo um dos maiores complexos de áreas úmidas do mundo, com terras inundadas esporadicamente e áreas de planaltos e depressões circundantes não inundadas (DA SILVA & GIRARD, 2004). Tal diversidade acarreta o aspecto mais marcante do Pantanal, uma combinação de vegetação mesic (úmida) e xeric (seca) crescendo lado a lado devido à inundação sazonal. (ALHO, 2008). Esse conjunto de condicionantes ambientais garante a alta biodiversidade e mantém o funcionamento ecológico de toda a região (ANA, 2004). Pott *et al.* (2011) demonstraram que dentre as 2000 espécies de plantas catalogadas no Pantanal, as famílias mais abundantes são Fabaceae, Poaceae, Malvaceae, Cyperaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Myrtaceae e Convolvulaceae.

Espécies coletadas no Pantanal já demonstraram possuir diversas atividades biológicas, como, por exemplo, citotóxica (MAHMOUD *et al.*, 2011), antiinflamatória (TANUS-RANGEL *et al.*, 2010), antifúngica (BISOLI *et al.*, 2008), anticariogênica (BRIGHENTI *et al.*, 2014) e acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SANTOS *et al.*, 2013). Porém inúmeras espécies ainda permanecem sem estudos, com a possibilidade da descoberta de novos produtos com potencial farmacológico e econômico.

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor (ALMEIDA *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

Desde 1950, o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI), reconhece o potencial uso de produtos naturais como agentes anticâncer. O estudo guiado para triagem de plantas com esta atividade levou a descoberta de diversas substâncias, como por exemplo, os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina, (*Catharanthus roseus* - Apocynaceae), do taxol (*Taxus brevifolia* - Taxaceae) e das podofilotoxinas, etoposídeo e teniposídeo (*Podophyllum peltatum* –

Berberidaceae). Neste contexto, atualmente, a grande maioria dos agentes utilizados para o tratamento do câncer vem de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O ensaio de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas é considerado um parâmetro válido para a detecção da atividade antitumoral, já que a maioria dos quimioterápicos usados na terapêutica foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Neste estudo espécies coletadas no Pantanal de Mato Grosso do Sul foram submetidas a uma atividade biomonitorada quanto a sua atividade antiproliferativa, por meio do teste de Sulforrodamina B (SRB) frente à linhagens de células neoplásicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Câncer é um termo usado não apenas para uma doença, mas muitas doenças em que as células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos. Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer, diferenciados pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento e, por isso, o câncer não pode mais ser considerado como uma única patologia (COELHO, 1998; NCI, 2014).

A célula cancerígena caracteriza-se pela perda da função em consequência da proliferação incontrolada, ausência de diferenciação, capacidade de invadir os tecidos adjacentes e metástases. Resumidamente, o câncer pode ter início por fatores genéticos, como a ativação de oncogenes e/ ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos químicos, físicos ou biológicos (RUBIN; STRAYER; RUBIN, 2008).

Na maioria dos casos a carcinogênese (formação do câncer) ocorre gradativamente. O estágio de iniciação é o primeiro, onde o agente carcinogênico atua sobre as células provocando alterações genéticas. Segue-se então o estágio de promoção, que após período de contato com as células já geneticamente modificadas, as transforma gradualmente em células malignas. Por fim, dá-se o estágio de progressão, processo onde a multiplicação das células já está descontrolada, é irreversível e evolui até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

De acordo com o projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), neste mesmo ano houve 14,1 milhões de casos novos de

câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo. Já para o ano de 2030, essa estimativa aponta para 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer.

A estimativa para o ano de 2014 no Brasil, que também compreende o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer (Tabela 1), o que reforça a amplitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero. No estado de Mato Grosso do Sul, as estimativas para o ano de 2015 indicam 8.120 casos novos de câncer, destes 4.140 para os homens e 3.980 para mulheres, sendo os mais incidentes de próstata (1.020 casos novos) e mama feminina (770 casos novos) (INCA, 2014).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2014

Novas características da sociedade brasileira como o processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia, fazem com que o Brasil altere seu perfil demográfico, e juntamente com estes novos estilos de vida, a exposição ainda mais intensa a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo, se unam para aumentar a incidência de câncer no país. É incontestável que o câncer é hoje, no Brasil e no mundo, um problema de saúde pública, cujo controle, prevenção e tratamento devem ser priorizados.

De acordo com a OMS, a utilização de preparados de plantas é em torno 63% entre os pacientes com câncer em todo mundo, confirmando o eminente crescimento do interesse por produtos naturais no mundo (SIU, 2011). Nesta linha de pesquisas, um dos principais e mais promissores segmentos é o desenvolvimento de novos quimioterápicos, pois atualmente a grande

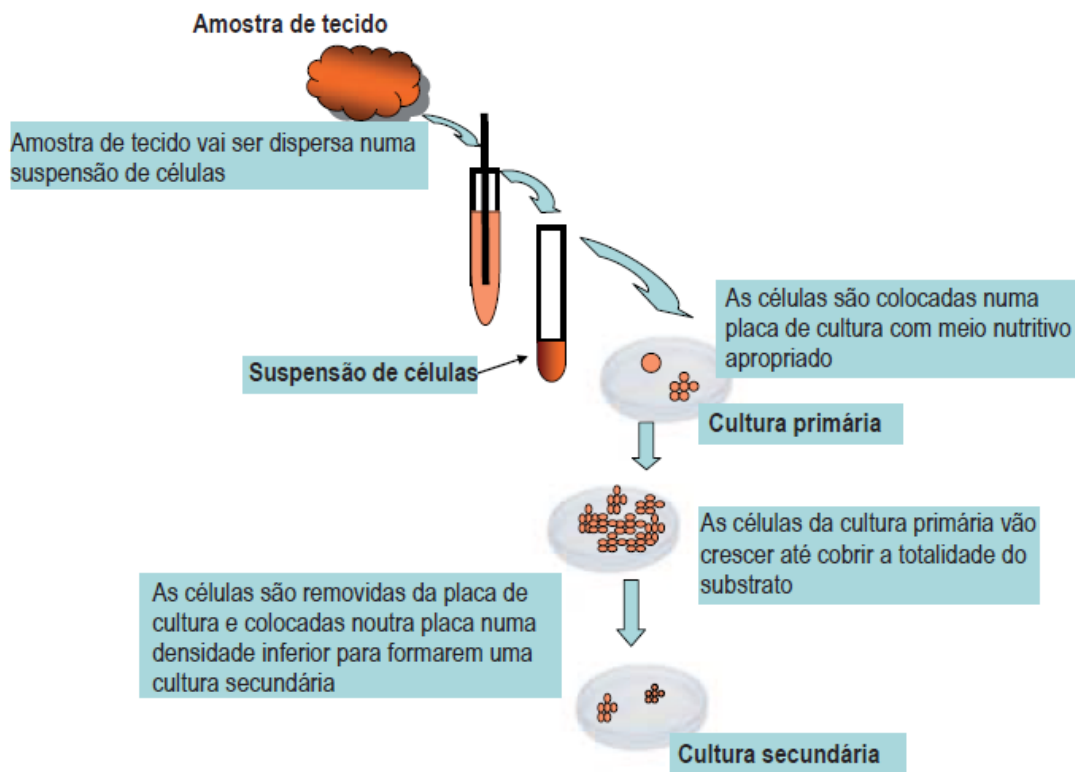
maioria dos agentes utilizados para o tratamento do câncer vem de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

2.2 Cultura de Células e Ensaio *In Vitro*

Há algumas décadas, a cultura de células era vista como algo de difícil compreensão, cuja finalidade e aplicabilidade práticas não eram possíveis extrapolar para a realidade da medicina. Atualmente, é uma técnica largamente reconhecida e rotineiramente utilizada em laboratório, particularmente em investigação (CRUZ *et al.*, 2009).

As culturas celulares podem ser cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido, ou em suspensão de meio de cultura, quando as células são não-aderentes. São derivadas de explantes primários ou de suspensão de células dispersas (FRESHNEY, 2005). Elas normalmente se iniciam a partir da retirada de um fragmento de tecido, sendo chamada de cultura primária. A manutenção destas células dá origem a sub-culturas sucessivas, denominadas culturas secundárias (Figura 2), que podem ser mantidas imortalizadas nas condições adequadas.

Figura 2 - Obtenção de uma linhagem celular a partir de um tecido. Estabelecimento de uma linhagem celular através da cultura primária e de sub-culturas sucessivas (cultura secundária).



Fonte: CRUZ *et al.*, 2009

O cultivo celular *in vitro* possibilita o monitoramento físico-químico do pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de CO₂ e O₂, além das condições fisiológicas poderem ser mantidas relativamente constantes. Também possui vantagens como ser menos custosa economicamente que os testes *in vivo*, e reduzir o uso de animais em experimentos, evitando questões éticas e morais (FRESHNEY, 2005).

O cultivo celular permitiu até hoje grande avanço nas descobertas científicas (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011), especialmente na triagem de novos agentes antineoplásicos onde os ensaios de citotoxicidade em cultura de células avaliam a atividade antitumoral dos compostos testados (HOUGHTON *et al.*, 2007). Os testes mais usados são os colorimétricos que utilizam o sal de tetrazolium - MTT (MOSMANN, 1983) e a Sulforrodamina B (SRB) (SKEHAN *et al.*, 1990; FRESHNEY, 2005).

No teste de citotoxicidade baseado na coloração, as células são primeiramente submetidas a condições normais de crescimento e proliferação e têm sua intensidade quantificada (diretamente proporcional ao número de células viáveis). Em seguida é feita a comparação desses resultados na presença ou ausência de uma substância-teste (HOUGHTON *et al.*, 2007).

O MTT quantifica a capacidade das células viáveis de reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan, usando a enzima mitocondrial Succinato Desidrogenase. O ensaio detecta quantitativamente a proliferação e sobrevivência das células. (MOSMANN, 1983). Já a SRB se liga a componentes protéicos das células, ou seja, cora proteínas celulares fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA), sendo independente do metabolismo celular (HOUGHTON *et al.*, 2007). Este método permite a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a pesquisa de amostras com maior especificidade. Outra vantagem é a rapidez e a eficiência do método, que em poucos dias pode avaliar um número elevado de amostras (SKEHAN *et al.*, 1990; MONKS *et al.*, 1991).

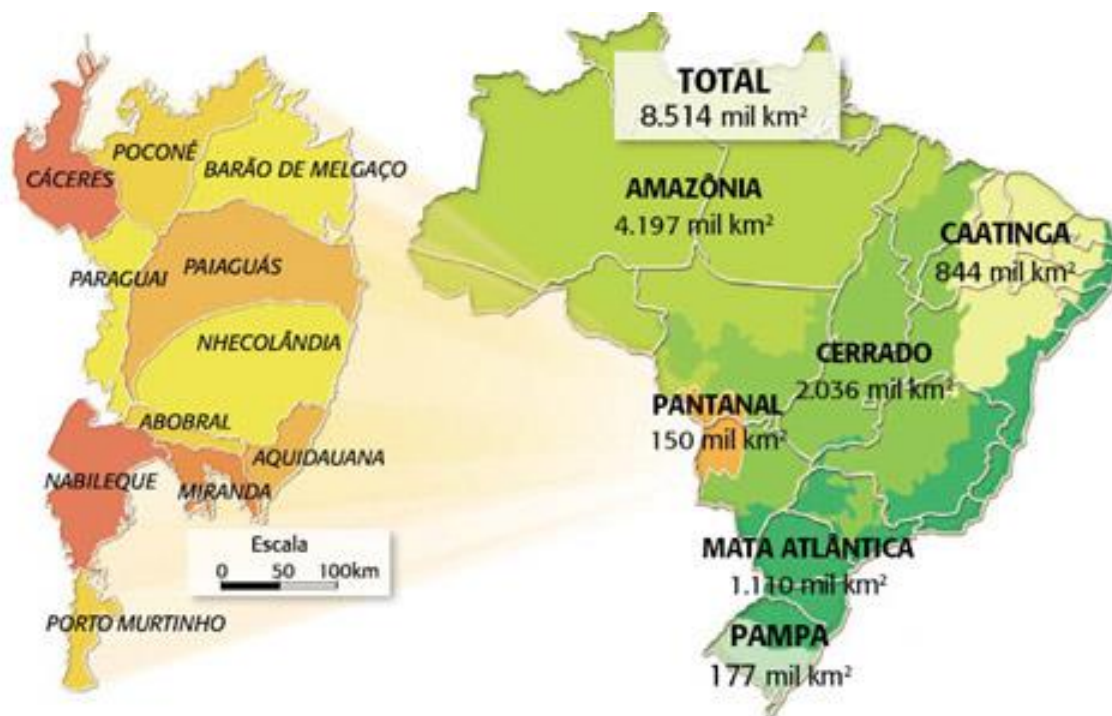
Com isso, os métodos de triagem *in vitro*, utilizando a cultura de células neoplásicas, são os mais utilizados para a triagem inicial de novas substâncias antitumorais (HOLBECK, 2004).

2.3 Pantanal

O complexo do Pantanal está localizado na bacia hidrográfica do Alto Paraguai, é uma ampla depressão sazonalmente inundada e abrange no território brasileiro uma área de 150.355 Km² nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Figura 1), no Centro-Oeste brasileiro (ABDON *et al.*, 2007). É considerada a maior área úmida do mundo e foi declarado Patrimônio Nacional pela

Constituição Brasileira de 1988, além de contemplar áreas de Reserva da Biosfera declaradas pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura) em 2000.

Figura 1 – Regiões Brasileiras e Sub-Regiões do Pantanal



Fonte: ECOA, 2014

Da Silva e Abdon (1998) dividiram o ecossistema pantaneiro em 10 sub-regiões diferentes, de acordo com uma interação única de fatores relacionados à inunda  o, relevo, solo e vegeta  o. Estas sub-regiões são: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia, Abobral, Aquidauana, Miranda e Nabileque (Figura 1).

Com base na altitude, a bacia do Pantanal pode ser subdividida em três unidades: Planalto, de 250 a 750 metros acima do nível do mar, caracterizado por uma planície com cobertura vegetal característica de savana aberta, chamado de cerrado; Depressão, que ocorre em altitudes entre 180 e 250 metros,    uma pequena região, com encostas íngremes, geralmente cobertos por uma densa floresta denominada localmente de cerradão; e o Pantanal, que varia de 150 a 180 metros. A baixa declividade desta unidade dificulta o escoamento da água, sendo um bom exemplo da complexidade hidrológica de áreas alagadas (DA SILVA; GIRARD, 2004; JUNK *et al.*, 2006; FANTIN-CRUZ *et al.*, 2008).

O Pantanal possui clima tropical quente e sub-úmido, com duas esta  es bem definidas, a de seca entre os meses de maio e setembro e a chuvosa de outubro a março, alcançando m  dias de 1000 a 1200 mm de chuva, cerca de 80% das precipita  es anuais (CÂMARA; VITAL, 2004).

O Pantanal é um mosaico, com plantas oriundas do Chaco, Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica (POTT & POTT, 1994). Seu ciclo hidrológico e a dinâmica hídrica da região, representadas principalmente pela alternância de períodos de secas e cheias, são condicionantes ambientais que garantem a alta biodiversidade e mantêm o funcionamento ecológico de toda a região (ANA, 2004).

A mudança sazonal entre as fases aquáticas e terrestres resulta em rápida ciclagem de nutrientes e permite a produtividade de uma região geralmente considerada pobre de nutrientes. Nogueira *et al.* (2002), Ferraz (2003) e Rebellato e Cunha (2005) demonstraram que durante o período seco, a matéria orgânica se acumula na superfície do solo. Quando a temporada de inundação chega, um processo de decomposição acelerada começa e ocorre a liberação de nutrientes, que transfere detritos orgânicos nutricionalmente ricos, mantendo o solo fértil durante o período seco. Além disso, a comunidade de plantas aquáticas se torna terrestre ao longo do pulso de inundação. Assim, essa variação das fases anuais das águas resulta na essência da complexibilidade ecológica, com riqueza de diversidade e distribuição de espécies de plantas, adaptação a uma vasta gama de habitats de inundação e manutenção da diversidade da paisagem e heterogeneidade (ALHO, 2008; HAMILTON, 2002).

2.4 Produtos Naturais

O Brasil com uma área territorial de 8,5 milhões de quilômetros quadrados e vários biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga) possui a maior biodiversidade do mundo, cerca de 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003), com a possibilidade da descoberta de novas substâncias com potencial farmacológico e econômico (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma forma quanto ao seu emprego medicinal e a maioria, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos, o que demonstra o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 1999; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003). Estima-se ainda, que do total de 252 drogas na lista de medicamentos essenciais da OMS, 11% é exclusivamente de origem vegetal (SAHOO *et al.*, 2010).

No caso das drogas anticâncer, esse percentual atinge cerca de 70% (ROUHI; WASHINGTON, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2013). Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), entre 1940 e 2006, mais de dois terços das drogas anticâncer aprovadas ou são produtos naturais, ou foram desenvolvidas com base neles, tais como os alcaloides da vinca (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina); taxanos (paclitaxel, docetaxel); epipodofilotoxinas (etoposídeo, tenoposídeo); camptotecina e seus derivados (topotecan, irinotecan); antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina) e outros (EFFERTH, 2010).

Os efeitos indesejáveis causados pelo uso abusivo ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a insatisfação com a medicina convencional, a consciência ecológica, a disponibilidade, a nova tendência mundial e os custos mais baixos são fatores que impulsionam o aumento da busca por produtos naturais como recursos terapêuticos (CALIXTO, 2003; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Assim, mesmo na sociedade moderna é possível observar a grande importância dos produtos naturais, como fonte de medicamentos ou protótipos para os mesmos. Porém é necessário um minucioso conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização como medicamentos, pois é fato que as plantas medicinais apresentam ampla diversidade de componentes com diferentes atividades biológicas (SIMÕES *et al.*, 2007).

2.5 Famílias

2.5.1 Fabaceae

A família Fabaceae (Leguminosae) possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais do ponto de vista econômico. No Brasil ocorrem cerca de 175 gêneros e 1.500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). Possuem grande interesse econômico por conter espécies utilizadas na alimentação, especialmente o feijão (*Phaseolus vulgaris*) e a soja (*Glycine max*). Considerando sua associação com bactérias do gênero *Rhizobium*, fixadoras de nitrogênio, esta família também é usada na adubação verde. Outras tantas espécies desta família são utilizadas como ornamentais, sendo a principal família utilizada na arborização urbana no Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Sesbania* é constituído por cerca de 500 espécies em todo o mundo, sendo um grupo de espécies nativas de ocorrência nos trópicos e subtropicais (SHUGUANG *et al.*, 2009). A espécie *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., por fixar N₂ é comumente utilizada em áreas de recuperação

de solos degradados, no reflorestamento de matas ciliares e como adubo verde (TRANNIN *et al.*, 2001; COUTINHO *et al.*, 2005), mas também apresenta relato de atividade antinociceptiva, antiinflamatória (BRAGGIO *et al.*, 2002) e antifúngica (PRAXEDES *et al.*, 2011).

O gênero *Aeschynomene* possui cerca de 350 espécies, distribuídas nos trópicos e em locais mais quentes das zonas temperadas sendo que, para o continente americano, foram listadas 160 espécies (KLITGAARD; LAVIN, 2005). Espécies de *Aeschynomene* são citadas como fixadoras de nitrogênio, apícolas, ornamentais e forrageiras (RUDD, 1955; POTT *et al.*, 2000; ULIBARRI *et al.*, 2002; ALVES, 2008).

2.5.2 Asteraceae

Asteraceae é a maior família em número de espécies descritas, com cerca de 23.000 - 30.000 espécies, distribuídas entre 1.600 - 1.700 gêneros que ocorrem em todos continentes, exceto na Antártida (FUNK *et al.*, 2005; JUDD *et al.*, 2008). Segundo Nakajima e Semir (2001) o Brasil detém boa parte da diversidade de Asteraceae da flora mundial.

As espécies de Asteraceae têm seus constituintes químicos e atividades biológicas largamente estudadas, com uma ampla variedade de metabólitos secundários (VERDI *et al.*, 2005). Talvez essa característica seja a principal responsável pela importância econômica da família principalmente na medicina tradicional, bem como na alimentação, na produção cosmética e como plantas ornamentais (ROQUE; BAUTISTA, 2008). Possui diversas atividades biológicas relatadas, como antioxidante, antimicrobiana (FABRI *et al.*, 2011) analgésica, antiinflamatória (LORENZI; MATOS, 2002), inseticida, antimalária, antiulcerogênica (RIVERO *et al.*, 2002), entre outros.

O gênero *Centratherum* possui 48 espécies descritas, porém apenas cinco aceitas cientificamente. Uma delas, *Centratherum punctatum* Cass., conhecida popularmente como perpétua-roxa-do-mato, vassourinha-roxa ou perpétua-do-mato, é utilizada no paisagismo urbano, principalmente no entorno de edificações. Também empregada na medicina tradicional, estudos relatam sua atividade antioxidante, antimicrobiana, antiproliferativa (Gbolade *et al.*, 2009), anti-helmíntica, anti-filiaríose e anti-hiperglicêmica (NISHA *et al.*, 2007; ANI; NAIDU, 2008).

2.5.3 Alismataceae

A família Alismataceae apresenta cerca 16 gêneros e de 100 espécies, com distribuição cosmopolita (ANDRADE *et al.*, 2007). Essa família reúne ervas aquáticas, parcialmente submersas,

sendo encontradas frequentemente em lagos, pântanos, rios e córregos de água doce (SOUZA; LORENZI, 2005).

Dentre seus gêneros, *Echinodorus* possui a maior diversidade específica, apresentando 45 espécies (JUDD *et al.*, 2008) que ocorrem, predominantemente, na região tropical da América do Sul. Este gênero possui relato de atividade anti-hipertensiva, vasodilatadora (LESSA *et al.*, 2008), analgésica, antiinflamatória (DUTRA *et al.*, 2006), imunossupressora (PINTO *et al.*, 2007) e antiepilética (BUZNEGO; PÉREZ-SAAD, 2006). *Echinodorus paniculatus* Micheli, popularmente conhecida como chapéu-de-couro-de-folha-fina, é uma espécie ornamental, decorativa, medicinal, apícola e forrageira (POTT; POTT, 2000).

2.5.4 Euphorbiaceae

Euphorbiaceae apresenta aproximadamente 6.300 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2000) agrupadas em 300 gêneros (SIMPSON *et al.*, 2006). No Brasil são pouco mais de 1.000 espécies reunidas em 70 gêneros de hábitos variados e presentes em todos os tipos vegetacionais (SOUZA; LORENZI, 2008). Com grande diversidade morfológica e fitoquímica, possui muitas espécies de importância econômica (WURDACK *et al.*, 2005). Possui relatada atividade antifúngica (CARDOSO-LOPES *et al.*, 2009), antiviral sobre o vírus influenza (FORERO *et al.*, 2008), no tratamento de colesterol e diabetes (KRISHNAVENI; MIRUNALINI, 2010), cardioprotetora e calmante (COMPAGNONE *et al.*, 2010).

O gênero *Croton* conta com um número entre 1.200 e 1.300 espécies descritas (LIMA; PIRANI, 2008), com relatada atividade anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante, antirreumática, antiulcérica (SIMIONATTO *et al.*, 2007), antinociceptiva e antifúngica (SOUZA *et al.*, 2006).

O gênero *Sebastiania* compreende 17 espécies, das quais 12 foram registradas para a América do Sul, estando algumas dessas espécies normalmente associadas a ambientes xéricos e, freqüentemente, ocorrem próximas a cursos d'água (ESSER, 2011).

2.5.5 Lamiaceae

A família Lamiaceae compreende 236 gêneros e 7.173 espécies de distribuição cosmopolita (HARLEY *et al.*, 2004). No Brasil ocorrem aproximadamente de 26 gêneros e 350 espécies (SILVA *et al.*, 2011). Possui importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos, voláteis essenciais e de plantas ornamentais. Muitas espécies são utilizadas como condimentos na

culinária, sendo algumas especiarias fonte de antioxidantes (HOSSAIN *et al.*, 2010; JUDD *et al.*, 2008).

O gênero *Hyptis* é representado por mais de 300 espécies e apresenta uma grande diversidade no Brasil. Várias espécies são relatadas como sendo aromáticas e apresentam propriedades medicinais com relevantes atividades farmacológicas (ZELLNER *et al.*, 2009). Possui relatada atividade antiproliferativa (LAMBLIM *et al.*, 2008), inseticida (JO; LA; EO, 2009), antimicrobiana (LADAN *et al.*, 2009), antiedematogênica (BISPO *et al.*, 2001), anti-inflamatória (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2005) e antinociceptiva (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2008).

2.5.6 Rubiaceae

A família Rubiaceae possui aproximadamente 650 gêneros e 13.000 espécies (DELPRETE, 2004). Souza e Lorenzi (2005) citam 127 gêneros e aproximadamente 1.500 espécies nativas para o Brasil, o que corresponde a uma das principais famílias da flora brasileira. Rubiaceae reúne um considerável número de espécies com importância econômica, principalmente como ornamental, medicinal ou alimentícia (MENDOZA *et al.*, 2004). Como exemplos de substâncias ativas encontradas na família Rubiaceae, podemos citar a cafeína utilizada em diversos medicamentos, a emetina isolada de com atividade emética e anti-amebocida, a quinidina usada como antiarrítmico, a quinina utilizada por suas propriedades antimalárica e tônica, e ioimbina com efeito afrodisíaco (CORDELL *et al.*, 2001), além de espécies contendo agentes com atividade anti-reumáticos, antidiarreicos, laxativos, no tratamento de úlceras gástricas, urticárias e gastrites (MOURA *et al.*, 2006).

O gênero *Randia* é composto de 250 espécies, estritamente neotropicais. Suas espécies são empregadas na alimentação, como plantas ornamentais e no uso medicinal (JUDD *et al.*, 2008).

Já o gênero *Tocoyena* possui cerca de 30 espécies com distribuição neotropical, ocorrendo na América Central e América do Sul (GOTTSBERGER; EHRENDORFER, 1992) e possui relato de atividade antifúngica (BOLZANI *et al.*, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa de espécies vegetais coletadas no Pantanal de Mato Grosso do Sul.

3.2. Objetivos Específicos

Realizar uma triagem da atividade antiproliferativa de dez extratos polares e apolares de espécimes coletados no Pantanal Sul-Mato-Grossense, utilizando seis linhagens de células neoplásicas humanas e uma não neoplásica murina.

Realizar o fracionamento dos extratos considerados ativos e avaliar a atividade antiproliferativa das frações em seis linhagens de células neoplásicas humanas e uma não neoplásica murina.

Realizar a identificação dos compostos presentes nas frações ativas, através da análise por HPLC-DAD.

4. REFERÊNCIAS

- ABDON, M.M.; SILVA, J.S.V.; SOUZA, I.M.; ROMON, V.T.; RAMPAZZO, J.; FERRARI, D.L. Desmatamento no bioma pantanal até o ano de 2002: Relações com a fitofisionomia e limites municipais. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 59, p. 17-24, 2007.
- ALHO, C.J.R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 957-966, 2008.
- ALMEIDA, V.D.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVES, E.M. **Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas Floresta e Laranjeira, do alto rio Paraná**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1-20, 2011.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Strategic Action Program for the Integrated Management of the Pantanal and the Upper Paraguay River Basin**. Brasília, DF: ANA/GEF/PNUMA/OEA, p. 315, 2004.
- ANDRADE, M.A.; MARANHO, L.T.; PREUSSLER, K.H.; CUBAS, S. Organização estrutural da raiz e folha de *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht Alismataceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 117-119, 2007.
- ANI, V.; NAIDU, A.K. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cummin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. **European Food Research Technology**, v. 226, p. 897-903, 2008.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; CAMPOS, D. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit.(Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 334-339, 2008.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN R.; CAMPOS, D. A.; SILVA, P. A.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; SANT'ANA A.E.G.; BLANK, A. F. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 298-303, 2005

BISOLI, E.; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L.; TIEPPO, C.; GARCEZ, F.R. Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. **Molecules**, v. 13, p. 2717–2728, 2008.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI, E. M.; BOMFIM, K. B. R.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; MORENO, M. P. N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81-86, 2001.

BOLZANI V.D.S.; IZUMISAWA C.M.; YOUNG M.C.M.; TREVISAN L.M.V.; KINGSTON D.G.I.; GUNATILAKA A.L. Iridoids from *Tocoyena formosa*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 305-308, 1997.

BRAGGIO, M.M.; LIMA, M.E.L.; VEASEY, E.A.; HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 69, n. 4, p. 49-53, 2002.

BRIGHENTI, F.L.; SALVADOR, M.J.; DELBEM, A.C.B.; OLIVEIRA, M.A.C.; SOARES, C.P.; FREITAS, L.S.F.; KOGA-ITO, C.Y. Systematic Screening of Plant Extracts from the Brazilian Pantanal with Antimicrobial Activity against Bacteria with Cariogenic Relevance. **Caries research**, v. 48, n. 5, p. 353-360, 2014.

BRUNETON, J. **Farmacognosia**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

BUZNEGO, M. T.; PÉREZ-SAAD, H. Behavioral and antiepileptic effect of acute administration of the extract of the aquatic plant *Echinodorus berteroi* (Sprengel) Fassett. **Epilepsy & Behavior**, v. 9, n. 1, p. 40-45, 2006.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CÂMARA, P.E.A.; VITAL, D.M. Briófitas do Município de Poconé, Pantanal de Mato Grosso, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 881-886, 2004.

- CARDOSO-LOPES, E.M.; PAULA, D.M.B.D.; BARBO, F.E.; SOUZA, A.D.; BLATT, C.T.T.; TORRES, L.M.B. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 4, p. 819-825, 2009.
- COELHO, F.R.G.O. Controle do câncer. In: **Bases da Oncologia** BRENTANI, M.N.; COELHO, F.R.G.; IYEYASU, H.; KOWALSKI, L.P., ed. – 1ª ed., São Paulo: Editora Marina, 1998. p. 1-21.
- COMPAGNONE, R.S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Methods**, v. 2, p. 101-108, 2010.
- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.
- COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- COUTINHO, M.P.; CARNEIRO, J.G. de A.; BARROSO, D.G.; RODRIGUES, L.A.; FIGUEIREDO, F.A.M.M.A.; MENDONÇA, A.V.R.; NOVAES, A.B. Crescimento de mudas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Plantas em uma área degradada por extração de argila. **Floresta**, v. 35, n. 2, p. 231-239, 2005.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, v.17, n. 2, p. 153-163. 1999.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.
- CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A.B.S. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 4, p. 669-682, 2009.
- DA SILVA, C. J.; GIRARD, P. New challenges in the management of the Brazilian Pantanal and catchment area. **Wetlands Ecology and Management**, v. 12, n. 6, p. 553-561, 2004.

DA SILVA, J.D.S.V.; ABDON, M.M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 13, p. 1703-1711, 1998.

DELPRETE, P.G. Rubiaceae. In **Flowering Plant Families of the American Tropics**, SMITH, N.P.; HEALD, S.V.; HENDERSON, A.; MORI, S.A.; STEVENSON, D.W. New York: Princeton University Press/New York Botanical Garden Press, p. 328–333, 2004.

DUTRA, R.C.; TAVARES, Z.C.; FERRAZ, S.O.; SOUSA, O.V.; PIMENTA, D.S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.4, p.469-474, 2006.

ECOIA – **Projeto Ecologia e Ação**. Disponível em: www.riosvivos.org.br/Canal/Pantanal. Acessado em 29 de julho de 2014.

EFFERTH, T. Personalized Cancer Medicine: From Molecular Diagnostics to Targeted Therapy with Natural Products. **Planta Medica**, v.76, p. 1143–1154, 2010.

ESSER, H.J. Tribes Hippomaneae, Pachystromateae & Huraeae. In: RADCLIFFE-SMITH, A. (ed). **Genera Euphorbiacearum**. Kew, Royal Botanic Gardens, p. 352-397, 2001.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; DUTRA, L.B; BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FANTIN-CRUZ, I.; LOVERDE-OLIVEIRA, S. M.; GIRARD, P. Morphometric characterization and its limnological implications in Northern Pantanal lakes. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, p. 133–140, 2008.

FERRAZ, L. **Dinâmica de nutrientes em um campo alagável: velocidade de liberação causada pela inundação**. Dissertação de Mestrado, IB/UFMT, Cuiabá, MT, 2003.

FORERO, J. E., AVILA, L., TABORDA, N., TABARES, P., LÓPEZ, A., TORRES, F. *In vitro* anti-influenza screening of several Euphorbiaceae species: structure of a bioactive Cyanoglucoside from *Codiaeum variegatum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 16, p. 2815-2819, 2008.

FRESHNEY, I.R. **Culture of Animal Cells**. A manual of Basic Technique. 5º ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

FUNK, V.A.; BAYER, R.J.; KEELEY, S.; CHAN, R.; WATSON, L.; GEMEINHOLZER, B.; SCHILLING, E.; PANERO, J.L.; BALDWIN, B.G.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; JANSEN, R.K. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, v. 55, p. 343-374, 2005.

GBOLADE, A.A.; DZAMIC, A.M.; RISTIC, M.S.; MARIN, P.D. Essential oil composition of *Centratherum punctatum* from Nigeria. **Chemistry of natural compounds**, v. 45, n. 1, p. 118-119, 2009.

GOTTSBERGER G.; EHRENDORFER F. Hybrid speciation and radiation in the neotropical woody genus *Tocoyena* (Rubiaceae). **Plant systematics and evolution**, v. 181, p. 143-169, 1992.

GOVAERTS, R.; FRODIN, R. D.; RADCLIFFE-SMITH, A.; CARTER, S. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Royal Botanical Gardens, Kew, 2000.

HAMILTON, S. K.; SIPPEL, S. J.; MELACK, J. M. Comparison of inundation patterns among major South American floodplains. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres** (1984–2012), 107(D20), LBA-5, 2002.

HARLEY, R.M.; ATKINS, S.; BUDANTSEV, A.L.; CANTINO, P.D.; CONN, B.J.; GRAYER, R.; HARLEY, M. M.; DE KOK, R.; KRESTOVSKAJA, T.; MORALES, R.; PATON, A. J.; RYDING, O.; UPSON, T. Labiatae. In **Flowering Plants• Dicotyledons**. KUBITZKI, K.; KADEREIT, J.W. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p.167-275.

HOLBECK, S.L. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 785-793, 2004.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C.. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10576-10581, 2010.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Editora EDUFSCAR, 2003, 152 p.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.

- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Incidência de Câncer no Brasil**, 2014. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2014. Acessado em 29 de julho de 2014.
- JO, O.; LA, O.; EO, O. Insecticidal potency of *Hyptis spicigera* preparations against *Sitophilus zeamais* (L.) and *Tribolium castaneum* (herbst) on stored maize grains. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p.187-192, 2009.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 3ª ed., 2008.
- JUNK, W.J.; CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRUSSMANN, C.; MARQUES, M.I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Sciences**, v. 68, p. 278–309, 2006.
- KLITGAARD, B. B.; LAVIN, M. Tribe Dalbergieae sens. lat. In: **Legumes of the world**. LEWIS, G.P., SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Eds.). Kew: Royal Botanic Gardens. p. 307-335, 2005.
- KRISHNAVENI, M.; MIRUNALINI, S. Therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (amla): the ayurvedic wonder. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 93-105, 2010.
- LADAN, Z.; AMUPITAN, J. O.; OKONKWO, E. M.; AIMOLA, I. A.; HABILA, N. Antimicrobial potency of *Hyptis spicigera* leaf extracts against some pathogenic microorganisms. **Journal of medicinal plant research**, v. 3, n. 11, p. 905-908, 2009.
- LAMBLIN, F.; HANO, C.; FINIAUX, O.; MESNARD, F.; FLINIAUX, MA.; LAINE, E. Interest of lignans in prevention and treatment of cancers. **Medicine science**, v. 24, n. 5, p. 511-519, 2008.
- LESSA, M.A.; ARAÚJO, C.V.; KAPLAN, M.A.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M.R.; TIBIRIÇA, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 161-168, 2008.
- LIMA, L. R.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect . *Lamprocroton* (Müll . Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropical**, v. 8, n. 2, p. 177-231, 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002.

MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.; LETÍCIA, V.C.; LOTUFO, L.V.C.; MAGALHÃES, H.I.F.; MORAES, M.O.; LIMA, D.P.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 456-464, 2011.

MENDOZA, H.; BERNARDO, R.; RAMÍREZ, P.; JIMÉNEZ, L.C. **Rubiaceae de Colômbia: guía ilustrada de géneros**. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexandre von Humboldt, 2004. p. 351.

MMA, Ministério do Meio Ambiente - **Biodiversidade Brasileira**, 2014. Disponível em: www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira. Acesso em 29 de julho de 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAUL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High- Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOURA, V.M.; SANTOS, D.P.; SANTIN, S.M.O.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 29, p. 452-455, 2006.

NAKAJIMA, J.N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 471-478, 2001.

NCI, **Nacional Cancer Institute**. Disponível em: www.cancer.gov. Acesso em 29 de julho de 2014.

NISHA, K.M.; PAILY, K.P.; ABIDHA; VANAMAIL, P.; BALARAMAN, K. *In vitro* screening of medicinal plant extracts for macrofilaricidal activity. **Parasitology Research**, v. 100, p. 575-579, 2007.

NOGUEIRA, F.; COUTO, E.G.; BERNARDI, C. J. Geostatistics as a tool to improve sampling and statistical analysis in wetlands: a case study on dynamics of organic matter distribution in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4B, p. 861-870, 2002.

PINTO, A.C.; REGO, G.C.; SIQUEIRA A.M.; CARDOSO, C.C.; REIS, P.A.; MARQUES, E.A.; COELHO, M.G.P.; SABINO, K.C.C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 435-9, 2007.

PRAXEDES, P.G.; ZERLIN, J.K.; DIAS, L.O.; PESSONI, R.A.B. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.(Leguminosae-Faboideae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p. 687-692, 2011.

POTT, A.; OLIVEIRA, A.K.M.; DAMASCENO-JUNIOR, G.A.; SILVA, J.S.V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 265-273, 2011.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000.

POTT, V.J.; POTT, A. **Plantas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA-CPAP, 1994.

REBELLATO, L.; CUNHA, C.N.D. Efeito do “fluxo sazonal mínimo da inundação” sobre a composição e estrutura de um campo inundável no Pantanal de Poconé, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 4, p. 789-799, 2005.

RIVERO, S.A.; ATAHUACHI, M.; SARAIVA, E.; LÓPEZ, A. Diversidad florística medicinal y potencial etnofarmacológico de las plantas de los Valles Secos de Cochabamba - Bolivia. **Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental**, v. 12, p. 53-85, 2002.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Salvador: EDUFBA, 2008. 73 p.

ROUHI, A.M.; WASHINGTON, C. Rediscovering natural products. **Chemical & Engineering News**, v.81, n. 41, p. 77-91, 2003.

RUBIN, R.; STRAYER, D.S.; RUBIN, E. (Eds.). **Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

- RUDD, V.E. **The american species of Aeschynomene**. Bulletin of the United States National Herbarium, v. 32, p. 1-172, 1955.
- SANTOS, L.B. DOS; SOUZA, J.K.; PAPASSONI, B.; BORGES, D.G.L.; DAMASCENO JUNIOR, G.A.; SOUZA, J.M.E. DE; CAROLLO, C.A.; BORGES, F.A. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 532-538, 2013.
- SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Review - Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, p. 462–471, 2010.
- SHUGUANG, J.; WEIJUN, S.; YANG ZHONGYI, Y. Enhanced adaptability of *Sesbania rostrata* to Pb/Zn tailings via stem nodulation. **Journal of Environmental Sciences**, n. 21, p. 1135–1141, 2009.
- SILVA, J. G.; FARIA, M. T.; OLIVEIRA, É. R.; REZENDE, M. H.; RIBEIRO, D. G.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Chemotaxonomic significance of volatile constituents in *Hyptenia* (Mart. ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 955-960, 2011.
- SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; MOREL, A.F.; ROPPI, N.R.; RAPOSO JÚNIOR, J.L.; STUKER, C.Z. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 879-885, 2007.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007.
- SIMPSON, M. G. **Plant Systematics**. Academic Press. e-book, p. 590, 2006.
- SIU, D. Natural products and their role in cancer therapy. **Medical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 888-900, 2011.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1118, 1990.

SOUZA, M.A.A.; SOUZA, S.R.; VEIGA JR, V.F.; CORTEZ, J.K.P.C.; LEAL, R.D.S.; DANTAS, T.N.C. Artigo Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Supl.), p. 599-610, 2006.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435-440, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 704, 2008.

TANUS-RANGEL, E.; SANTOS, S.R.; LIMA, J.C.; LOPES, L.; NOLDIN, V.; MONACHE, F.D.; CECHINEL-FILHO, V.; MARTINS, D.T. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 1, p. 1161-1166, 2010.

TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 25, p.743-753, 2001.

ULIBARRI, E.A.; SOSA, E.V.G.; CIALDELLA, A.M.; FORTUNATO, R.H.; BAZZANO, D. Leguminosas: nativas e exóticas. In: **Biota riplatense VII**. HURREL, J.A.; LAHITTE, H.B. Buenos Aires: L.O.L.A, 2002. 320 p.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

ZELLNER, B. D.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P. D.; ALVES, R. J.; BARBOSA, J. P.; COSTA, G. L. D.; REZENDE, C. M. Screening of the odour-activity and bioactivity of the essential oils of leaves and flowers of *Hyptis Passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 322-332, 2009.

WURDACK, K.J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL trnF sequences. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1397-1420, 2005.

5. CAPÍTULO I – Pantanal brasileiro como fonte de espécies com atividade antiproliferativa

Marillin C. Cunha¹, Carlos A. Carollo¹, Renata T. Perdomo¹, Ana Lúcia T. G. Ruiz², João E. de Carvalho², Maria de Fatima C. Matos¹

¹ Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

² Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Brasil

Resumo

A atividade antiproliferativa de 10 espécies coletadas no Pantanal de Mato Grosso do Sul (*Sesbania virgata*, *Centratherum punctatum*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Aeschynomene histrix*, *Sebastiania hispida*, *Croton glandulosus*, *Hyptis brevipes*, *Tocoyena formosa* e *Randia armata*) foi avaliada frente a seis linhagens de células neoplásicas (786-0, PC-3, HT-29, MCF-7, NCI/ ADR-RES, Hep G2) e uma linhagem não neoplásica (NHI/ 3T3). Foram preparados extratos polares e apolares e o fracionamento para cada espécie utilizando um extrator de fluido pressurizado e as amostras testadas em quatro concentrações, que variaram de 0,25 a 250 µg/mL, utilizando o método da Sulforrodamina B. Os extratos apolares de *Centratherum punctatum* e *Hyptis brevipes* se destacaram, com valores de GI₅₀ menores que 30 µg/mL. Após o fracionamento destes extratos a atividade foi aprimorada em ambas as espécies nas frações acetato de etila, com valores de GI₅₀ até seis vezes menores que o extrato. As frações ativas foram avaliadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), sugerindo a presença de classe de substâncias já relatadas para *C. punctatum* e *H. brevipes*, relacionadas à atividade citotóxica.

Palavras-chave: Pantanal, Atividade Antiproliferativa, Sulforrodamina B.

1. Introdução

O Brasil possui aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em cinco biomas principais: Pantanal, Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia e Pampa (Fiaschi and Pirani, 2009).

O Pantanal é reconhecidamente o maior ecossistema de zonas úmidas do mundo e considerado Reserva da Biosfera Mundial pela UNESCO (Rylands and Brandon, 2005) com uma combinação de vegetação úmida e seca crescendo lado a lado devido à inundação sazonal (Alho,

2008). Estas variações levam as espécies a desenvolverem avançados mecanismos de sobrevivência, diretamente relacionados com a produção ou alteração na quantidade e composição dos metabólitos secundários bioativos (Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

Espécies coletadas no Pantanal já demonstraram possuir diversas atividades biológicas, como citotoxicidade de *Tabebuia heptaphylla* e *Attalea phalerata* (Mahmoud et al., 2011), antiinflamatória de *Echinodorus macrophyllus* (Tanus-Rangel et al., 2010), antifúngica de *Combretum laxum* (Bisoli et al., 2008), anticariogênica de *Croton doctoris* (Brighenti et al., 2014) e acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* das espécies *Aeschynomene denticulata* e *Hyptis mutabilis* (Santos et al., 2013). Porém, apesar do potencial, a maioria das espécies deste bioma permanece sem estudos do ponto de vista químico/biológico, podendo ser uma promissora fonte de novas substâncias com potencial farmacológico, como demonstrado no presente trabalho.

Assim, 10 espécies coletadas no Pantanal de Mato Grosso do Sul (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers., *Centratherum punctatum* Cass., *Echinodorus paniculatus* Micheli, *Caperonia castaneifolia* (L.) A. St.-Hil., *Aeschynomene histrix* Poir., *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax ex Engl., *Croton glandulosus* L., *Hyptis brevipes* Poit., *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. e *Randia armata* (Sw.) DC.) foram biomonitoradas quanto a sua atividade antiproliferativa, por meio do teste da Sulforrodamina B (SRB) frente a linhagens de células neoplásicas.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

O material vegetal de 10 espécies foi coletado em março de 2012, pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Botânica - UFMS, e identificados pelo Professor Geraldo Alves Damasceno Junior, com acesso e autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético/Ministério do Meio Ambiente (CGEN/MMA) 010273/2013-1. De cada espécie foi preparada uma exsicata que foi depositada no Herbário da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Herbário CGMS (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de coleta e registro do material vegetal.

Espécie	Família	Parte coletada	Registro Herbário	Coordenadas
<i>Sesbania virgata</i>	Fabaceae	RF/FO/FR	CGMS 34909	19°37'5"S 57°2'4"O
<i>Centratherum punctatum</i>	Asteraceae	PA/FL	CGMS 34910	19°37'5"S 57°2'4"O
<i>Echinodorus paniculatus</i>	Alismataceae	PA/FL	CGMS 34917	19°34'37"S 57°1'11"O
<i>Caperonia castaneifolia</i>	Euphorbiaceae	PA/FL	CGMS 34915	19°34'35"S 57°1'9"O

<i>Aeschynomene histrix</i>	Fabaceae	PA/FL	CGMS 34922	19°34'8"S 57°1'12"O
<i>Sebastiania hispida</i>	Euphorbiaceae	PA	CGMS 34923	19°34'7"S 57°1'15"O
<i>Croton glandulosus</i>	Euphorbiaceae	PA/FL	CGMS 34927	19°34'7"S 57°1'15"O
<i>Hyptis brevipes</i>	Lamiaceae	PT/FL	CGMS 34918	19°34'8"S 57°1'10"O
<i>Tocoyena formosa</i>	Rubiaceae	RF/FO	CGMS 34946	19°29'2"S 57°2'16"O
<i>Randia armata</i>	Rubiaceae	RF/FO/FR	CGMS 34943	19°29'2"S 57°2'16"O

RF: ramos finos; PA: parte aérea (inclui folha, ramo fino e caule); PT: parte total (inclui raiz, folhas e ramos finos); FL: flor; FR: fruto; FO: folha.

2.2 Preparação e análise dos extratos

Os materiais coletados foram pulverizados em moinho de facas e tamisados (20 mesh). Foi realizado um processo automatizado para a obtenção dos extratos, usando um extrator de solvente acelerado ASE 150 (Dionex).

Para a obtenção do extrato apolar, aproximadamente 20g de material vegetal foram extraídos com hexano: acetona (8:2) (3 x 5 minutos cada), 100% de volume de lavagem, tempo de purga de 60 segundos e temperatura de extração de 125° C. Os extratos foram secos utilizando rotaevaporador com pressão reduzida.

Em sequência foi obtido o extrato polar, utilizando-se como solvente etanol: água (7:3), com dois ciclos de 5 minutos, 80% de volume de lavagem, tempo de purga de 60 segundos e temperatura de extração de 125° C. Os extratos foram secos utilizando rotaevaporador com pressão reduzida.

Os extratos ativos foram fracionados utilizando-se o mesmo extrator de fluido acelerado ASE 150 (Dionex), com diferentes solventes. O extrato foi adsorvido à 20g de sílica e cada fração foi obtida com solvente hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente, a partir de duas extrações a temperatura de 125° C, durante três ciclos de 5 minutos cada, 100% de volume de lavagem, tempo de purga de 60 segundos e secagem com rotaevaporador de pressão reduzida.

2.3 CLAE - DAD

As frações mais ativas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu SPD-M20A, Japão) acoplada a detector de arranjo de diodo (DAD) utilizando uma coluna monolítica C18 (Onix Monolithic C18, Phenomenex), água como solvente A e metanol como solvente B, com o seguinte programa: de 0 a 5 minutos 40% de solvente B; de 5 a 35 minutos gradiente de 40% a 100% de solvente B; e 12 minutos de lavagem e estabilização retornando a 40% de solvente B. O fluxo de solvente foi de 1 mL.min⁻¹ e a detecção em 270 nm ou 320 nm.

2.4 Teste biológico

2.4.1 Cultura de células

Foram utilizadas seis linhagens celulares de adenocarcinoma humano MCF-7 (ATCC-HTB-22, mama), 786-0 (ATCC-CRL-1932, rim), PC-3 (ATCC-CRL-1435, próstata), NCI/ ADR-RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), HT-29 (ATCC HTB-38, cólon), doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) UNICAMP e HepG2 (ATCC HB-8065, hepatocelular), doada pela Prof^a Dr^a Ilce Mara de Syllos Cólus, da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Também foi utilizada uma linhagem de células não neoplásica (NIH/3T3 ATCC-CRL 1658, fibroblasto murino), adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio contendo RPMI 1640 suplementado com penicilina-estreptomicina 1% e Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, mantidas em incubadora umidificada a 37° C e 5 % de CO₂.

2.4.2 Teste de atividade antiproliferativa

Para este teste, as células foram semeadas em placas de 96 cavidades (placa-teste e placa T0) e após 24 horas, expostas a quatro concentrações das amostras-teste (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ mL) durante 48 horas. As amostras foram previamente dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO concentração final de 0,25 %), que não afeta a viabilidade celular. No momento da adição das amostras foi realizada a fixação das células da placa T0 com 100 µL por cavidade de ácido tricloroacético (TCA) 20 % durante meia hora a 4° C.

Após o tempo de exposição de 48 horas às amostras, as células foram fixadas com adição de 100 µL por cavidade de ácido tricloroacético (TCA) 20 % durante meia hora a 4° C e coradas pela Sulforrodamina B (SRB) de acordo com a metodologia descrita por Skehan et al. (1990).

Foram obtidas três leituras de absorbância, a saber, no tempo zero (T0) e após 48 h tanto para o controle negativo (C) quanto para células tratadas com as amostras-teste (T). Quando $C > T \geq T0$ o crescimento, expresso em porcentagem, foi determinado usando a equação $100 \times [(T - T0) / (C - T0)]$ (efeito citostático) e quando $T < T0$, o crescimento, expresso em porcentagem, foi determinado usando a equação $100 \times [(T-T0)/(T0)]$ (efeito citocida) (Monks et al., 1991). Os experimentos foram realizados em triplicata e os cálculos das porcentagens de crescimento feitos em programa Excel 2003/2007.

A dose que inibiu 50% do crescimento celular (GI₅₀) foi determinada por análise de regressão não linear no *software Origin* (Versão 6.0).

3. Resultados

Todos os extratos (apolar e polar) das 10 plantas coletadas foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa, expressa em valores de GI_{50} (concentração que inibiu 50% do crescimento celular) (Tabela 2). Ambos os extratos das espécies *Sesbania virgata*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Sebastiania hispida*, *Aeschynomene histrix*, *Croton glandulosus*, *Tocoyena formosa* e *Randia armata* apresentaram moderada atividade ou foram inativos (GI_{50} de 42,71 a $\geq 250 \mu\text{g/mL}$) em todas as linhagens avaliadas.

Por sua vez, os extratos apolares de *Centratherum punctatum* e *Hyptis brevipes* foram potencialmente ativos (Itharat et al., 2004), com valores de GI_{50} menores que $30 \mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens neoplásicas testadas (Tabela 2).

A partir desses resultados, priorizou-se o fracionamento dos extratos apolares de *C. punctatum* (Figura 1A) e *H. brevipes* (Figura 1C) por partição, sendo as frações resultantes avaliadas frente o mesmo painel de células (Tabela 2). Em ambos os casos, a fração acetato de etila apresentou um aumento na atividade antiproliferativa (menores valores de GI_{50}) sugerindo uma maior concentração de substâncias ativas nessas frações (Figuras 1B e 1D). A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento celular em função das diferentes concentrações dos extratos apolares e suas respectivas frações acetato de etila. Todas as amostras demonstraram tanto atividade citostática (inibição do crescimento celular, pontos da curva acima do ponto zero) - quanto efeito citocida (morte celular, pontos da curva abaixo do ponto zero).

Tabela 2 – Atividade antiproliferativa (GI_{50} , $\mu\text{g/mL}$) dos extratos apolares e polares e das frações de *Centratherum punctatum* e *Hyptis brevipes* coletados no Pantanal sul-mato-grossense.

	Rendimento (%)	786-0	HT-29	PC-3	MCF-7	NCI/ADR-RES	Hep G2	NHI/ 3T3
<i>Centratherum punctatum</i>								
Extrato Apolar	4,17	18,20	24,49	21,67	22,20	8,49	23,28	34,04
Fração hexânica	11,82*	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Fração clorofórmica	36,36*	>250	>250	>250	201,28	63,21	78,45	>250
Fração ac. de etila	35,45*	5,07	8,16	8,58	4,53	22,74	8,35	9,89
Extrato Polar	15,67	64,51	52,84	47,37	71,28	207,02	186,90	56,76
<i>Hyptis brevipes</i>								
Extrato Apolar	6,00	24,78	29,74	18,40	24,70	27,23	24,98	30,99
Fração hexânica	9,50*	>250	>250	>250	43,24	>250	>250	>250
Fração clorofórmica	27,35*	226,28	>250	>250	63,47	62,60	>250	>250
Fração ac. de etila	41,90*	3,93	17,01	3,12	3,15	24,54	16,78	8,63
Extrato Polar	14,29	188,33	206,64	203,37	73,32	226,12	216,84	60,42
Doxorrubicina		0,28	0,26	0,25	0,17	2,66	0,25	0,82

GI_{50} : Dose que inibe 50% do crescimento celular, Doxorrubicina: controle positivo. Linhagens de células neoplásicas humanas: PC-3 (próstata), 786-0 (rim), HT-29 (cólon), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário resistente a múltiplos fármacos) e Hep G2 (hepatocelular); linhagem não neoplásica murina: NHI/ 3T3 (fibroblasto).

*Rendimento em relação ao extrato apolar.

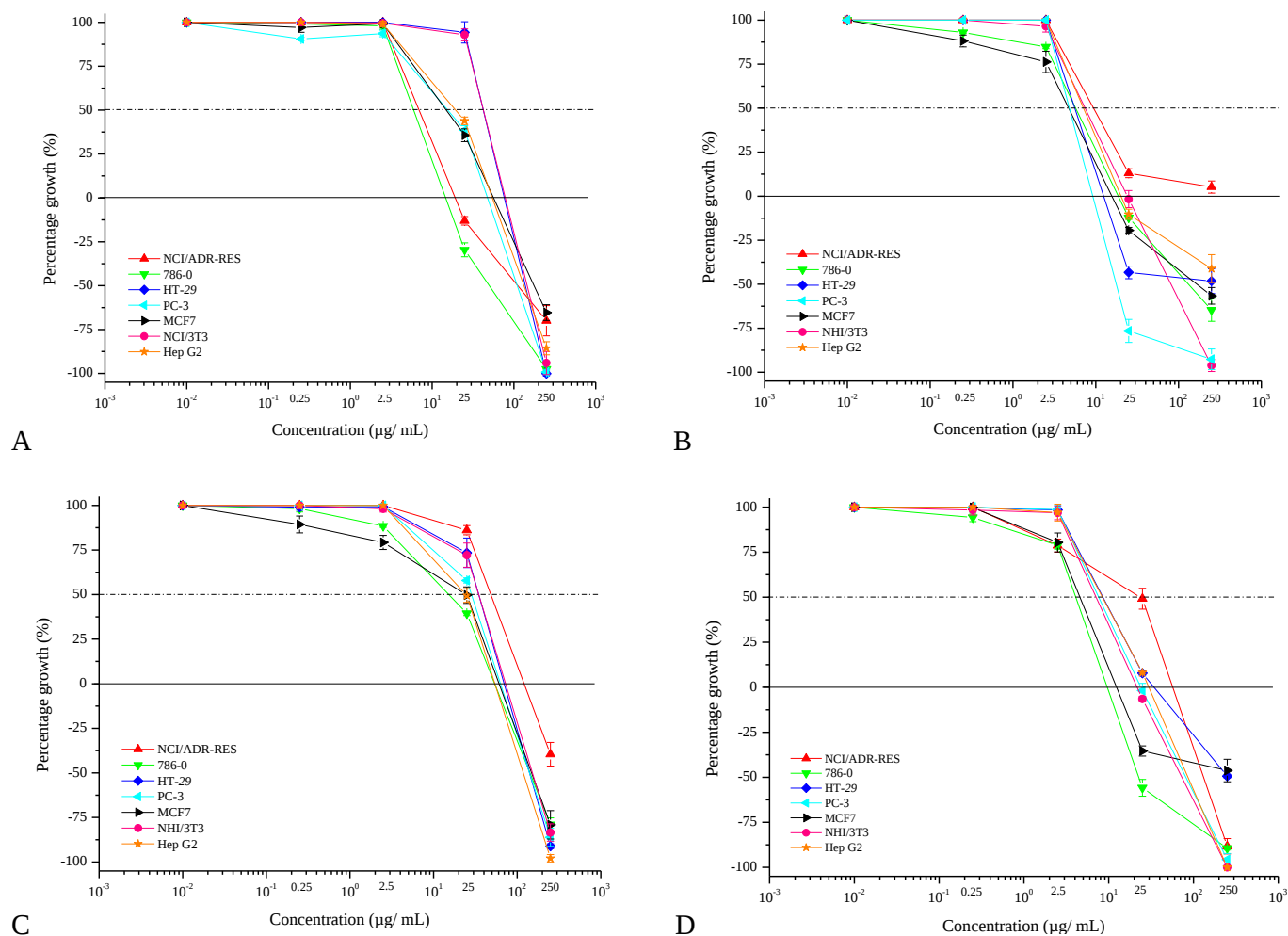


Figura 1 - Curvas de crescimento celular (%) das sete linhagens testadas em função da concentração do extrato apolar de (A) *Centratherum punctatum* e (C) *Hyptis brevipes* e suas respectivas frações acetato de etila (B) e (D).

Linhagens de células neoplásicas humanas: PC-3 (próstata), 786-0 (rim), HT-29 (cólon), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário resistente a múltiplos fármacos) e Hep G2 (hepatocelular); linhagem não neoplásica murina: NHI/ 3T3 (fibroblasto). Tempo de exposição = 48 horas.

Por apresentarem resultados mais promissores, as frações acetato de etila de *C. punctatum* e *H. brevipes* foram então submetidas à análise de seu perfil químico por CLAE - DAD (Figura 2).

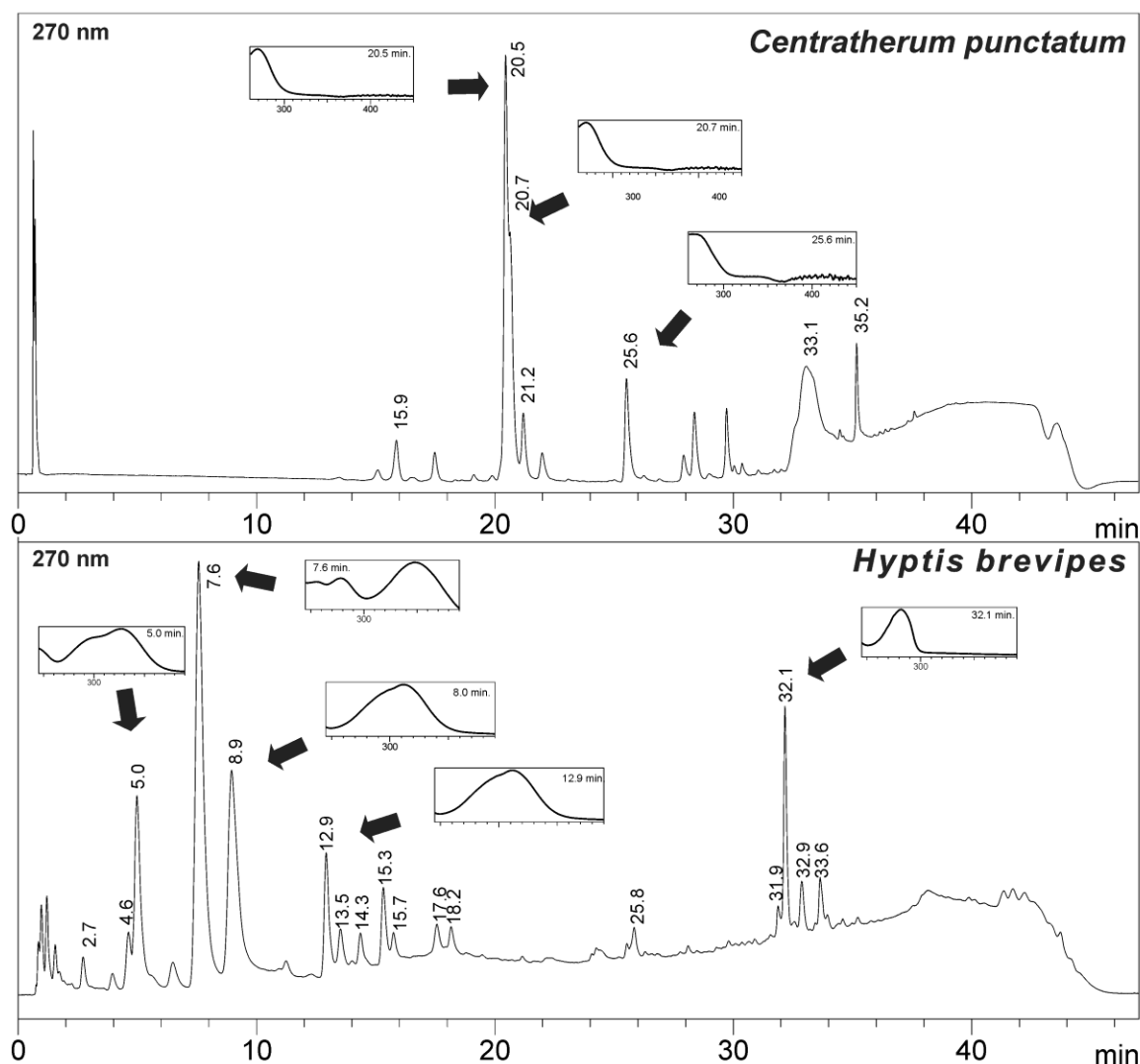


Figura 2 – Cromatograma de HPLC das frações acetato de etila de *Centratherum punctatum* (A) e de *Hyptis brevipes* (B) e os respectivos espectros de UV dos principais picos.

4. Discussão

A eficiência de uma extração é muito influenciada por fatores como a composição do líquido extrator, o líquido extrator em relação à fase sólida, temperatura, tempo e método de extração (Fulzele and Satdive, 2005). A obtenção dos extratos e das frações no presente trabalho foi realizada em sistema fechado, por meio de um extrator de fluido acelerado, que é considerado altamente eficiente e utiliza menor quantidade de solvente em comparação a outros métodos de extração (Falkenberg et al., 2010), além de possuir alta capacidade de reprodutibilidade. A utilização do extrator de fluido acelerado já foi confirmada como uma ferramenta adequada para a padronização ou controle qualidade dos produtos à base de plantas (Upadhy et al., 2014), sendo essa otimização experimental essencial para a validação e a aplicação comercial da metodologia, que pode ser empregada como um novo e promissor modelo na extração de produtos naturais. Quando aplicado mais de um ciclo nas extrações, as concentrações obtidas são maiores que aquelas

conseguidas com soxhlet, que é o método mais comumente empregado (Sporring et al., 2005), sendo a baixa degradação e reprodutibilidade do extrator de fluido acelerado empregado um fator que pode explicar os bons rendimentos obtidos para os extratos e as frações (Tabela 2).

Todos os extratos obtidos foram então avaliados quanto à atividade antiproliferativa em painel de seis linhagens de células neoplásicas humanas. Destes, os extratos polares e apolares das espécies *Sesbania virgata*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Aeschynomene histrix*, *Sebastiania hispida*, *Croton glandulosus*, *Tocoyena formosa* e *Randia armata* apresentaram moderada atividade ou foram inativos até a maior concentração testada (dados não apresentados). Já os extratos apolares de *Centratherum punctatum* e *Hyptis brevipes* foram os que apresentaram a atividade mais promissora (Tabela 2).

Um levantamento realizado por Melo et al. (2011) mostrou que de um total de 84 espécies de plantas medicinais descritas na literatura etnobotânica/etnofarmacológicas com indicação para o tratamento e/ou prevenção de câncer e tumores, as famílias botânicas mais representadas foram Euphorbiaceae, Fabaceae, Apocynaceae, Asteraceae e Vitaceae. No presente trabalho, as espécies foram obtidas a partir de coleta aleatória em uma área específica do Pantanal sul mato-grossense e pertencem às famílias Alismataceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae e Rubiaceae, sendo que as duas espécies que se mostraram mais promissoras no teste de atividade antiproliferativa *C. punctatum* e *H. brevipes* pertencem, respectivamente, às famílias Asteraceae e Lamiaceae.

O extrato apolar de *Hyptis brevipes* apresentou atividade antiproliferativa com valores de GI_{50} entre 18,40 e 29,74 $\mu\text{g/mL}$, sendo que fração acetato de etila obtida a partir desse extrato mostrou-se ainda mais ativa com valores de GI_{50} entre 3,12 e 24,54 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2) sugerindo que as substâncias ativas presentes no extrato apolar foram concentradas na fração acetato de etila. Corroborando com essa hipótese, as frações clorofórmio e hexânica foram inativas, com valores de GI_{50} acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ (maior concentração testada) para a maioria das linhagens testadas.

Há relatos de estudos farmacológicos das folhas de espécies do gênero *Hyptis* tais como atividades antioxidante do extrato etanólico (Shirwaikar et al., 2003) e antiinflamatória da fração clorofórmica (Grassi et al., 2006), e especificamente a espécie *H. brevipes* demonstrou nos extratos metanólico e diclorometano de suas partes aéreas atividades antimicrobiana e antifúngica (Goun et al., 2003). Do extrato diclorometânico de *H. brevipes* (planta inteira) derivados 5,6-dihidro- α -pyrone conhecidos como brevipolides foram bioativos frente a células de câncer de mama (MCF-7) e cólon (HT-29) utilizando o método MTT (Deng et al., 2009) e de nasofaringe (KB) pelo método da SRB (Suárez-Ortiz et al., 2013).

A análise por HPLC/DAD da fração acetato de etila de *H. brevipes* mostrou a presença de vários compostos (Figura 2). A partir dos espectros de UV obtidos e levando-se em conta que

derivados do ácido cumárico é uma faixa de absorção máxima em 308 nm (Achamlale, Rezzonico and Grignon-Dubois, 2009) e que derivados do ácido cafeico possuem máximo de absorção entre 299 e 325 nm (Grassi-Zampieron et al., 2010), foi possível propor que os picos 5 e 7 (tempo de retenção 2,72 e 4,98 min, Figura 2) podem ser derivados do ácido cafeico. Já os picos 6, 9 e 10 (tempo de retenção 4,62; 8,94 e 12,92 min) apresentaram características de absorção no espectro de UV que sugerem derivados do ácido cumárico. Finalmente, os picos 7, 9 e 10 foram os majoritários (proporção relativa entre os picos) e seus espectros de UV apresentam máximos de absorção em concordância com os descrito por Deng et al. (2009) e Suárez-Ortiz et al. (2013) para os brevipolides que possuem em sua estrutura um grupo fenil propanóide.

Já o extrato apolar e a fração acetato de etila de *Centratherum punctatum* (Asteraceae) também foram ativos quanto ao efeito antiproliferativo, sendo a fração mais ativa (GI_{50} entre 4,53 e 22,74 $\mu\text{g/mL}$; Tabela 2) do que o extrato (GI_{50} entre 8,49 e 24,49 $\mu\text{g/mL}$; Tabela 2). De maneira semelhante ao observado para *H. brevipes*, o extrato polar, bem como as frações clorofórmica e hexânica do extrato apolar de *C. punctatum* foram inativas em todas as linhagens testadas (Tabela 2).

Outra atividade biológica já demonstrada para extrato etanólico das partes aéreas e flores de *C. punctatum* foi a acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Santos et al., 2013).

Uma triagem *in vitro* de atividade anticâncer, realizada com vários extratos de diferentes espécies, mostrou que o maior número de espécies vegetais com atividade era da família Asteraceae, que é rico em lactonas sesquiterpênicas (Fouche et al., 2008). Alguns compostos sesquiterpênicos como centratherinas, 5-epi-isocentratherina, goiazensolidios, lichnophorolidios A e B, 14-carboxil-15-dimetil- costunolide, eremantina, 8 α -iso-valeroil-oxi-dehidro-costuslactona e (13)-dehidro-1-saussurea lactona já foram isolados de diversas partes de *C. punctatum* (Ohno, Cormickande and Mabry, 1979; Valdes et al., 1998). Bevelle et al. (1981) também relataram, na fração clorofórmica das partes aéreas desta mesma espécie, a presença de uma lactona sesquiterpênica conhecida como Isocentraterina, com conhecida atividade anti-helmíntica, antifilariase e anti-hiperglicêmica. A fração acetato de etila analisada neste trabalho, que demonstrou forte atividade antineoplásica, é compatível com a absorção de UV (Figura 2) gerada pela análise desta lactona, provavelmente se tratando da mesma classe de substâncias, com comprovada atividade citotóxica (Huo et al., 2004).

Finalmente, na pesquisa por novos agentes quimioterápicos, o ideal seria encontrar substâncias que demonstrassem especificidade por determinado tipo de linhagem neoplásica e ao mesmo tempo fossem menos tóxicas o possível para as células não neoplásicas (Chabner and Roberts, 2005). Neste contexto, destaca-se o valor da GI_{50} do extrato apolar de *Centratherum punctatum* em NIH/3T3 (34,04 $\mu\text{g/mL}$) com relação às seis linhagens neoplásicas, com seletividade

para as células neoplásicas em relação à não neoplásica, em especial para as células NCI/ ADR – RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, $GI_{50} = 8,49 \mu\text{g/mL}$), na qual o extrato apolar foi 4 vezes mais citotóxico. Assim também, na fração acetato de etila o valor de GI_{50} da amostra sobre as células não neoplásicas NIH/3T3 ($GI_{50} = 9,89 \mu\text{g/mL}$) foi 2 vezes maior que o valor de GI_{50} encontrado frente ao adenocarcinoma de mama ($GI_{50} = 4,53 \mu\text{g/mL}$). Isto demonstra um grande potencial antitumoral *in vitro* diante de diferentes tipos de câncer, assim como diversas espécies da família Asteraceae (Carvalho et al., 2013)

De maneira muito similar, a fração acetato de etila de *Hyptis brevipes* também inibiu a proliferação das células não neoplásicas NIH/3T3 ($GI_{50} = 8,63 \mu\text{g/mL}$); entretanto, esse efeito foi pelo menos duas vezes maior do que o observado para as células de adenocarcinoma de rim (786-0, $GI_{50} = 3,93 \mu\text{g/mL}$), próstata (PC-3, $GI_{50} = 3,12 \mu\text{g/mL}$) e mama (MCF-7, $GI_{50} = 3,15 \mu\text{g/mL}$) o que aponta para uma possível ação seletiva sobre células neoplásicas, tendo um promissor potencial para a continuidade em estudos *in vivo* (Suffness and Pezzuto, 1991).

Os materiais utilizados neste estudo foram coletados no Pantanal de Mato Grosso do Sul e indicam ter classes semelhantes de constituintes de plantas da mesma espécie coletadas e estudadas em outros locais, como São Paulo e Rio de Janeiro (Ohno, Cormickande and Mabry, 1979), Argentina (Valdes et al., 1998) e Índia (Pawar and Arumugam, 2011) para *Centratherum punctatum* e México (Suárez-Ortiz et al., 2013) e Indonésia (Deng et al., 2009) para *Hyptis brevipes*. Como os metabólitos secundários representam uma conexão entre as plantas e o ambiente onde estão localizadas, sua produção é constantemente afetada por condições ambientais (Gobbo-Neto and Lopes, 2007), mas neste caso, foi possível verificar a conservação dos metabólitos em diferentes biomas. Tal fato contribui para obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis

5. Conclusão

Dentre a triagem realizada para avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos polares e apolares de dez espécies do Pantanal de Mato Grosso do Sul, foi possível evidenciar que os extratos apolares de *Centratherum punctatum* e *Hyptis brevipes* apresentaram potencial atividade antiproliferativa. O fracionamento desses extratos resultou em frações acetato de etila, de ambas as espécies, com atividade antineoplásica mais potente do que os extratos originais frente às seis linhagens de carcinoma humano testadas. Atribui-se às moléculas já isoladas nessas espécies, isocentraterina e brevipolideos (respectivamente), essa atividade, sendo uma opção para estas classes a produção de um extrato enriquecido, o que permitiria seu isolamento ou até uma utilização futura como fitoterápico.

6. Agradecimentos

A Dr^a Ilce Mara de Syllos Cólus, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela doação da linhagem de células Hep G2. À FUNDECT/MS e a CAPES pelo apoio financeiro.

7. Referências

- Achamlale, S., Rezzonico, B. and Grignon-Dubois, M., Evaluation of *Zostera detritus* as a potential new source of zosteric acid. *J. Appl. Phycol.*, 21, 347-352 (2009).
- Alho, C.J.R., Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Braz. J. Biol.*, 68, 957-966 (2008).
- Bevelle, C.A., Handy, G.A., Segal, R.A., Cordell, T.G.A. and Farnsworth, N.R., Isocentratherin, a cytotoxic germacranolide from *Centratherum Punctatum* (Compositae). *Phytochemistry*, 20, 1605-1607 (1981).
- Bisoli, E., Garcez, W.S., Hamerski, L., Tieppo, C. and Garcez, F.R., Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, 13, 2717-2728 (2008).
- Brighenti, F.L., Salvador, M.J., Delbem, A.C.B., Oliveira, M.A.C., Soares, C.P., Freitas, L.S.F. and Koga-Ito, C.Y., Systematic Screening of Plant Extracts from the Brazilian Pantanal with Antimicrobial Activity against Bacteria with Cariogenic Relevance. *Caries res.*, 48, 353-360 (2014).
- Carvalho, C.C., Machado, K.N., Ferreira, P.M.P., Pessoa, C., Fonseca, T.H.S., Gomes, M.A. and do Nascimento, A.M.. Biological screening of extracts of Brazilian Asteraceae plants. *Afr. J. Pharm. Pharm.*, 7, 2000-2005 (2013).
- Chabner, B.A. and Roberts, T.G., Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 65-72 (2005).
- Deng, Y., Balunas, M.J., Kim, J.A., Lantvit, D.D., Chin, Y.W., Chai, H., Sugiarso, S., Kardono, L.B.S., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M., Swanson, S.M., de Blanco, E.J.C. and Kinghorn, A.D., Bioactive 5,6-Dihydro-r-pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*. *J. Nat. Prod.*, 72, 1165-1169 (2009).

- Falkenberg, M.B., Santos, R.I., Simões, C.M.O., Análise fitoquímica, In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6.ed. Editora da UFSC, Florianópolis, (2010).
- Fiaschi, P. and Pirani, J.R., Review of plant biogeographic studies in Brazil. J. Syst. Evol., 47, 477-496 (2009).
- Fouche, G., Cragg, G.M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V.J., Senabe, J., *In vitro* anticancer screening of South African plants. J. Ethnopharmacol., 119, 455-461 (2008).
- Fulzele, D.P. and Satdive, R.K., Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*, J. Chromatogr., 1063, 9-13 (2005).
- Grassi, P., Reyes, T.S.U., Sosa, S., Tubaro, A., Hofer, O. and Zitterl-Eglseer, K., Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador, Z. Naturforsch., 61, 165-170 (2006).
- Grassi-Zampieron, R., França, L.V., Carollo, C.A., Vieira, M.D.C., Oliveros-Bastidas, A. and Siqueira, J.M.D., Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. and *A. satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. Rev. Bras. Farmacogn., 20, 575-579 (2010).
- Gobbo-Neto, L. and Lopes, N.P., Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim. Nova, 30, 374-381 (2007).
- Goun, E., Cunningham, G., Chu, D., Nguyen, C. and Miles, D., Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. Fitoterapia, 76, 592-596 (2003).
- Huo, J., Yang, S.P., Ding, J. and Yue, J.M., Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium lindleyanum*. J. Nat. Prod., 67, 1470-1475 (2004).
- Itharat, A., Houghton, P.J., Eno-Amooquaye, E., Burke, P.J., Sampson, J.H. and Raman, A. *In vitro* cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. J. Ethnopharmacol., 90, 33-38 (2004).
- Mahmoud, T.S., Marques, M.R., QPessoa, C., Leticia, V.C., Lotufo, L.V.C., Magalhães, H.I.F., Moraes, M.O., Lima, D.P., Tininis, A.G. and Oliveira, J.E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. Rev. Bras. Farmacogn., 21, 456-464 (2011).

- Melo, J.G., Santos, A.G., Amorim, E.L.C., Nascimento, S.C. and Albuquerque, U.P. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, vol 2011 (2011).
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 83, 757-766 (1991).
- Ohno, N., Cormickand, S.M.C. and Mabry, T.J. Centratherin, a newgermacranolide from *Centrathium punctatum*. *Phytochemistry*, 18, 681-682 (1979).
- Pawar, N.K. and Arumugam, N. Leaf extract of *Centrathium punctatum* exhibits antimicrobial, antioxidant and anti proliferative properties. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 4, 71-76 (2011).
- Rylands, A.B. and Brandon, K. Unidades de conservação brasileiras. *Megadiversidade*, 1, 27-35 (2005).
- Santos, L.B., Souza, J.K., Papassoni, B., Borges, D.G.L., Damasceno-Junior, G.A., Souza, J.M.E., Carollo, C.A., Borges, F.A. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22, 532-538 (2013).
- Shirwaikar, A., Shenoy, R., Udupa, A.L., Udupa, S.L. and Shetty, S. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian J. Exp. Biol.*, 41, 238-241 (2003).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, 82, 1107-1120 (1990).
- Sporring, S., Bøwadt, S., Svensmark, B. and Björklund, E. Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *J. Chromatogr. A*, 1090, 1-9 (2005).
- Suárez-Ortiz, A.G., Cerda-García-Rojas, C.M., Hernández-Rojas, A., Pereda-Miranda, R. Absolute Configuration and Conformational Analysis of Brevipolides, Bioactive 5,6-Dihydro- α -pyrones from *Hyptis brevipes*. *J. Nat. Prod.*, 76, 72-78 (2013).

Suffness, S.M. and Pezzuto, J.M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. In: Methods of Plant Biochemistry, Academic Press, London, 71-133 (1991).

Tanus-Rangel, E., Santos, S.R., Lima, J.C., Lopes, L., Noldin, V., Monache, F.D., Cechinel-Filho, V. and Martins, D.T. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). J. Med. Food., 1, 1161-1166 (2010).

Upadhya, V., Pai, S.R., Sharma, A.K., Hegde, H.V., Kholkute, S.D. and Joshi, R.K. Compound Specific Extraction of Camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* and Piperine from *Piper nigrum* Using Accelerated Solvent Extractor. J. Anal. Methods Chem. (2014).

Valdes, D.A., Bardon, A., Catalan, T.E.G and Herz, W. Goyazensolides and Isogoyazensolides from Argentine *Centratherum punctatum* ssp. *punctatum*. Biochem. Syst. Ecol., 26, 805-808 (1998).