



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA
GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



THAIS LATANSIO DE OLIVEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO LÁTEX DE
Synadenium grantii Hook. f. (Euphorbiaceae)**

PONTA GROSSA

2013

THAIS LATANSIO DE OLIVEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO LÁTEX DE
Synadenium grantii Hook. f. (Euphorbiaceae)**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Título de Mestre na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

O48 Oliveira, Thais Latansio de
 Estudo fitoquímico e avaliação
 antitumoral do latex de *Synadenium grantii*
 Hook. f. (Euphorbiaceae)/ Thais Latansio
 de Oliveira. Ponta Grossa, 2012.
 44f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Farmacêuticas - Área de Concentração:
 Fármacos, Medicamentos e Biociências
 Aplicadas à Farmácia), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís
 Beltrame.

 1. *Synadenium grantii*. 2. Euphorbiaceae.
 3. Antitumoral. 4. Eufol. 5. Citrostadienol.
 I. Beltrame, Flávio Luís. II. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
 Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD: 615.4



Pos-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 11/2013

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA THAIS LATANSIO DE OLIVEIRA, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 27 DE FEVEREIRO DE 2013, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, às 9 h, no Auditório de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Theis Latansio de Oliveira. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação química e biológica de produtos naturais. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Francinete Ramos Campos / UFPR e Prof. Dr. Giovanni Marino Fávero / UEPG, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi "**Estudo fitoquímico e avaliação antitumoral do látex de *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae)**". Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata aprovada. Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Rubyan Lucas Santos Piazzetta, [assinatura] secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG, Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2013.

Observação (se necessária):

[assinatura]
Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame

[assinatura]
Profa. Dra. Francinete Ramos Campos

[assinatura]
Prof. Dr. Giovanni Marino Fávero

*Não apenas este trabalho,
mas todas as minhas
conquistas que ainda virão
eu dedico a meus pais
responsáveis direto por tudo
que sou.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que permitiu a realização desse projeto iluminando cada passo nessa caminhada.

Aos meus pais, José Luiz e Maria Angela, pelo incentivo, pelo amor incondicional, por me darem força e estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, André e Natalia, por sempre me incentivarem e apoiarem.

Ao meu namorado, Luiz Gustavo, por seu carinho, paciência, por acreditar nas minhas escolhas e me apoiar durante o caminho.

Ao Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame por ter me aceito, pela excelente orientação recebida, por dividir seus conhecimentos e sua experiência auxiliando em minha formação acadêmica e crescimento científico, pela atenção dispensada, pela dedicação e por todas as críticas e sugestões que contribuíram para o meu crescimento e realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Giovane Marino Fávero pelo auxílio na execução dos experimentos e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli pela solicitude e atenção nos experimentos finais.

Aos alunos do grupo de pesquisa do Prof. Flávio, Antônio, Bruno, Bruna e Luiza pelos bons momentos de convivência e ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, muito obrigada pela amizade, carinho, incentivo.

À minha querida amiga Yvanna Carla Salgado pelo incentivo, apoio e pelo convívio agradável.

Aos colegas de mestrado pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos.

A técnica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Maria Aparecida Ribeiro da Luz pela atenção dedicada ao laboratório.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A espécie *Synadenium grantii* Hook. f. é uma planta pertencente a família Euphorbiaceae, sendo conhecida popularmente como cega-olho, leitossinha, janaúba, cola-nota e outros. Seu látex tem sido usado tradicionalmente na região dos Campos Gerais na forma de uma “garrafada”, obtida da diluição deste em água (18 gotas em 1 litro). Suas aplicações medicinais são muito difundidas na cultura popular brasileira para a cura de vários tipos de câncer, além de outras enfermidades, como inflamações e úlcera. No entanto, não existem estudos científicos que comprovem esses efeitos além de pouco se saber sobre a constituição química da espécie. Assim, os objetivos deste trabalho foram realizar um estudo fitoquímico do látex de *S. grantii*; avaliar sua atividade antitumoral *in vitro* frente a linhagem celular de melanoma (B16F10); analisar as modificações na distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular e ainda avaliar a atividade antitumoral do látex *in vivo* bem como as alterações histológicas dos animais tratados com a forma popular de uso do látex da planta. A avaliação fitoquímica do látex foi realizada através de procedimentos cromatográficos (cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada) e espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C) da qual se obteve o isolamento e caracterização de um triterpeno e um esteroide identificados como eufol e citrostadienol respectivamente. A avaliação da citotoxicidade foi determinada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e pelo método de exclusão com Azul de Trypan. Para a realização dos ensaios *in vitro*, foram testadas concentrações do látex entre 1,7 $\mu\text{g/poço}$ a 4,88 mg/poço e também as duas substâncias isoladas (Eufol e Citrostadienol) nas concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ - 250 $\mu\text{g/mL}$. Para avaliação das modificações no ciclo celular, as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo e a avaliação histológica foi realizada através da coloração hematoxilina-eosina. Os ensaios citotóxicos demonstraram que o látex de *S. grantii* foi capaz de diminuir o crescimento e a viabilidade das linhagens celulares em estudo apresentando efeito concentração e tempo dependentes nas duas metodologias avaliadas. Além disso, induziu parada do ciclo celular na fase S-G2/M. Das substâncias isoladas somente o citrostadienol apresentou uma reduzida atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagem B16F10. Nos ensaios *in vivo* pode se observar uma diminuição em 40% no tamanho dos tumores dos camundongos tratados com a forma popular de uso do látex mas a avaliação histológica dos órgãos analisados (tumor, pulmão, fígado e linfonodos) foi semelhante no grupo tratado e não tratado.

PALAVRAS-CHAVE: *Synadenium grantii*; Euphorbiaceae; antitumoral; eufol; citrostadienol

ABSTRACT

The *Synadenium grantii* Hook f. species is a plant of the Euphorbiaceae family and is popularly known as cega-olho, leitossinha, janaúba, cola-nota among other names. Its latex has been used traditionally in the region of “Campos Gerais” as "garrafada", obtained from this dilution in water (18 drops into 1 liter). Its medicinal applications are widespread in Brazilian popular culture to cure various types of cancer, among other diseases, such as inflammation and ulcers. However, there are no scientific studies that prove these effects besides little is known about the chemical constitution of the species. The aims of this study was to conduct a phytochemical study of *S. grantii* latex; evaluate its antitumor activity *in vitro* against melanoma cell line (B16F10); analyze the changes in the distribution of tumor cells in cell cycle phases and also to evaluate the antitumor activity of latex *in vivo* and histological changes in animals treated with the popular way to use latex plant. The evaluation phytochemical latex was carried out by chromatographic procedures (column chromatography and thin layer chromatography) and spectroscopic procedures (¹H NMR and ¹³C) from which was obtained the isolation and characterization of a triterpenoid and steroid identified as euphol respectively and citrostadienol. Evaluation of the cytotoxicity was determined by the reduction method of MTT ([3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) and by exclusion with Trypan Blue. For the tests *in vitro*, látex concentrations of 0.012 µg/well to 48.8 mg/well were tested and also two isolated compounds (Euphol and Citrostadienol) at concentrations of 2.5 mg/mL - 250µg/mL. To assess changes in the cell cycle, the cells were analyzed by flow cytometry and histological evaluation was performed by hematoxylin-eosin. The cytotoxic assays demonstrated that the *S. grantii* latex was able to reduce the growth and viability of the cell lines showing concentration and time dependent effect in both methodologies evaluated. In addition, induced cell cycle arrest in S- G2/M phase. Isolated substances only citrostadienol showed a reduced cytotoxic activity *in vitro* against B16F10 lineage. *In vivo* assays demonstrated a reduction of 40% in the size of tumours in mice treated with the popular way to use latex but the histological evaluation of organs analyzed (tumor, lung, liver and lymph nodes) was similar in the treated and untreated animals.

KEY WORDS: *Synadenium grantii*; Euphorbiaceae; antitumoural; euphol and citrostadienol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- *Synadenium grantii* Hook. f. no habitat.....16

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure 1. Histograms of B16F10 cells after 24 hours of incubation with *S. grantii* latex (*garrafada* and fresh latex) demonstrating increased concentration-dependent cell death. 32

Figure 2. Inhibition in tumour volume in melanoma-bearing mice, induced by the administration of *garrafada* of *S. grantii*. ** p = 0.0029..... 33

Figure 3. Representative photomicrographs of the tumours of treated animals and control. (A) shows an overview of the tumour of a treated animal, showing high cellularity (Ce) and large areas of necrosis (Ne). (B) shows the tumour of an untreated animal showing the same issues previously described. (C) shows tumorous cells, deposition of melanin and the presence of eosinophilic material consistent with the inflammatory exudates in the lungs of animals of the treated group. Note the tumorous cells within the blood vessels (V). (D) shows the presence of a tumorous island with a necrotic centre (arrow), in the lungs of animals of the untreated group (HE, A, B and C: 200X - 400X highlights; D: 400X)..... 34

Figure 4. ^1H (top) and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (bottom) NMR spectra of hexane fraction from the fresh latex of *S. grantii*..... 35

Figure 5. Molecular structure of compounds isolated from the hexane fraction of *S. grantii* fresh latex. 35

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1.1 INTRODUÇÃO	10
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.2.1 Família Euphorbiaceae Juss.	12
1.2.2 Gênero <i>Synadenium</i>	13
1.2.3 <i>Synadenium grantii</i> Hook. f.	14
1.2.4 Estudo Fitoquímico e Biológico de Produtos Naturais	16
1.2.5 Ensaios Antitumorais	18
1.3 OBJETIVOS	19
1.3.1 Geral	19
1.3.2 Específicos	19
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
1.5 REFERENCIAS	21
CAPÍTULO 2	26
2.1 ARTIGO	27
CAPÍTULO 3	42
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
ANEXO A – PARECER CEUA UEPG	44

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano. No Brasil, a utilização de plantas medicinais está, em sua maioria, fundamentada no uso popular que foi sendo acumulado e passado empiricamente de geração para geração (YUNES et al., 2001; CARRENHO, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para tratar enfermidades, baseando-se em uma história de utilização prolongada (WHO, 2003).

Tradicionalmente, acredita-se que produtos formulados a base de plantas produzem a ação desejada causando menos efeitos tóxicos que as de origem sintética, levando ao emprego crescente dos mesmos como terapêuticos (YAMAMOTO *et al.*, 2004). Por outro lado, apesar dos benefícios associados ao uso correto de plantas medicinais no tratamento de enfermidades, seu uso empírico e sem respaldo científico, se mostra inadequado (SOFIATI, 2009).

Dessa maneira é fundamental o estudo de plantas medicinais para avaliar as características de seus extratos, sua segurança e eficácia, através do exame de suas ações por testes farmacológicos e toxicológicos em cultura de células e animais e, finalmente, a análise da eficácia e segurança no homem (VALADARES, CASTRO, CUNHA, 2007). Estes estudos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos oriundos de plantas medicinais (plantas, extratos e fitoterápicos), por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular destes serve como validação da eficácia (CUNHA *et al.*, 2009). Além disso, grande parte dos medicamentos encontrados no mercado derivam direta ou indiretamente de produtos naturais, mostrando que essa fonte é muito importante nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2000; CHIN *et al.*, 2006).

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atual tem-se o ácido acetil-salicílico, princípio ativo da Aspirina,[®] isolado inicialmente de uma Salicaceae; a escopolamina, alcaloide isolado de uma Solanaceae e modificado constituindo o princípio ativo do Buscopan[®], medicamento analgésico indicado para dores, cólicas e desconfortos abdominais (FELIU, 2011). Ainda pode-se mencionar o diterpeno anticancerígeno Taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico para o

tratamento de câncer em ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; CECHINEL FILHO, YUNES, 1998).

Neste sentido, metodologias recentes cada vez mais modernas de isolamento e identificação de compostos de fontes naturais têm propiciado aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para inúmeras indicações terapêuticas (BRANDAO *et al.*, 2010, BRAZ-FILHO, 2010).

Para tanto, o estudo fitoquímico que compreende as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, as quais podem relacionar-se com uma ação biológica através da utilização de metodologias simples de cromatografias (cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia planar preparativa, entre outros), associadas a um conjunto de técnicas espectrais como UV, IV, RMN, ¹H e ¹³C (1D e 2 D) e massas agregadas aos ensaios de atividade biológica, permitem caracterizar as frações ou substâncias bioativas e levantar possíveis moléculas novas para o arsenal terapêutico já existente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998, BRANDÃO *et al.*, 2009).

Uma planta medicinal bastante utilizada pela população do sul do Brasil, principalmente no leste do Paraná é *Synadenium grantii* Hook. f. uma espécie vegetal que pertence à família Euphorbiaceae. Popularmente é conhecida por “cola-nota”, “janaúba”, “tiborna”, “leiterinha”, dependendo da região onde se encontra (OLIVEIRA JR. *et al.*, 2005).

Seu látex é utilizado empiricamente para o tratamento de várias enfermidades tais como alergia, hemorragias internas, impotência sexual, lepra, cólicas menstruais, na redução de verrugas, no tratamento de doenças gástricas e também para o tratamento do câncer. Sua atividade biológica é atribuída aos constituintes químicos que em seus extratos/látex são encontrados como diterpenos, alcaloides, flavonoides entre outros (MACHADO, 2008; COSTA *et al.*, 2012).

Considerando a vasta diversidade da flora brasileira e o frequente uso dessas plantas como recurso terapêutico, pesquisas relacionadas à identificação de propriedades químicas e farmacológicas de plantas medicinais tornam-se essenciais para respaldar cientificamente a utilização/crença popular. Estas pesquisas possibilitam ainda a obtenção de novas estruturas químicas de interesse para a indústria farmacêutica, sendo possível encontrar substâncias mais eficazes e menos tóxicas do que as já

existentes e isolar e identificar compostos com atividades farmacológicas específicas, que futuramente possam contribuir para seu emprego no uso farmacêutico.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Família Euphorbiaceae Juss.

A família Euphorbiaceae, que pertence a um ramo superior, as Malpighiales, possui cerca de 300 gêneros e mais de 7000 espécies identificadas, sendo a maioria delas localizadas na América e na África tropical (BITTNER *et al.*, 2001). São plantas de hábito variado, existindo ervas, subarbustos e árvores, com folhas alternadas inteiras ou partidas, em geral com estípulas, latescentes ou não, flores em geral pequenas dotadas de estames e frutos deiscentes ou não, entre outras características (JOLY, 1977). Está entre as famílias de maior importância econômica, e no Brasil se destaca pelo valor nutricional, econômico e social. Muitas Euphorbiaceas são usadas com finalidade alimentar, ornamental e como fonte de precursores químicos, lubrificantes e ativos medicinais. Apresenta como seus principais produtos a borracha (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), sendo a seringueira um exemplar histórico na economia nacional, da qual é extraído o látex usado para a manufatura de borracha natural, a resina (*Croton lechleri* Müll. Arg.), e óleos fixos (*Ricinus communis* L.) de grande aplicação (SOFIATI, 2009; FELIU, 2011).

Essa família tem sido pesquisada fitoquimicamente, em especial na determinação de novos compostos biologicamente ativos (MACHADO, 2008), que revelaram a presença de flavonoides, saponinas, terpenos (di e triterpenoides), ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (BITTNER *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2005; RAJESH *et al.*, 2006; ROGÉRIO *et al.*, 2007).

Aproximadamente 90% das espécies da família Euphorbiaceae estudadas até o momento apresentam principalmente como compostos biologicamente ativos os terpenoides (BITTNER *et al.*, 2001), mas além destes compostos, os alcaloides e flavonoides também são considerados como possíveis determinantes na ação farmacológica, sendo uma das ações mais apontadas pela população a antitumoral, ação

esta que deriva, na maioria dos casos, da potencial ação citotóxica que estes compostos exibem (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Na medicina tradicional, o uso da família Euphorbiaceae é muito comum ao longo do desenvolvimento da própria humanidade (WATSON, 2008). Um exemplo é a espécie *Euphorbia fischeriana* Steud., que vêm sendo utilizada há mais de 2000 anos na China para o tratamento do câncer (DEI-JI *et al.*, 1991).

Outro gênero bastante conhecido e explorado desta família é o *Croton*, que apresenta relevante atividade citotóxica *in vitro* e *in vivo*, além de acentuada ação anti-inflamatória e cicatrizante (VAISBERG *et al.*, 1989; ITOKAWA *et al.*, 1991). *Manihot* também é um gênero bem estudado fitoquimicamente, possivelmente por ser comum nos trópicos e por ser o gênero de uma das mais populares fontes de carboidratos da América Latina – o aipim ou mandioca (MACHADO, 2008).

As euforbiáceas também são conhecidas pelo grande número de espécies tóxicas, dentre elas pode-se citar *Euphorbia pulcherrima* Willd ex Klotzsch (bico-de-papagaio), *Euphorbia milii* Des Moul. (coroa-de-cristo) e *Euphorbia tirucalli* L. (avelós) (SOFIATI, 2009).

1.2.2 Gênero *Synadenium*

Segundo Kinghorn (1980), este gênero compreende 15 plantas nativas do Oeste da África que foram trazidas para as Américas e para a Europa com a finalidade de serem usadas como plantas ornamentais. Na África e na Ásia, porém, são bastante utilizadas como cercas-vivas em propriedades rurais, pois o contato do gado com o látex da planta causa lesões dérmicas, podendo inclusive levar o animal a cegueira caso entre em contato com os olhos deste. Esta característica tóxica que o látex apresenta é atribuída aos ésteres diterpenos que o mesmo apresenta (BAGAVATHI *et al.*, 1988).

As espécies do gênero *Synadenium* têm sido historicamente utilizadas pelas populações de vários países como remédio para um grande e diversificado número de doenças (GRUPO, 1998; MACHADO, 2011). Este gênero é formado por cerca de 20 espécies: *Synadenium angolense* N.E. Br., *Synadenium arborescens* Boiss., *Synadenium ballyi* Werderm. ex Ball, *Synadenium calycinum* S. Carter, *Synadenium cameronii* N.E. Br., *Synadenium carinatum* Boiss., *Synadenium compactum* N.E. Br., *Synadenium*

cupulare L.C. Wheeler, *Synadenium cymosum* N.E. Br., *Synadenium gazense* N.E. Br., *Synadenium glabratum* S. Carter, *Synadenium glaucescens* Pax, *Synadenium grantii* Hook. f., *Synadenium halipedicola* L.C. Leach, *Synadenium kirkii* N.E. Br. & Oliv., *Synadenium molle* Pax, *Synadenium piscatorium* Pax, *Synadenium umbellatum* Pax, *Synadenium volkensisii* J. Paxson (GRUPO, 1998).

A grande maioria dos estudos fitoquímicos que se desenvolveram até o momento, com este gênero foram realizados até o final da década de 80. Além disso, muitos trabalhos recentes apontam para a necessidade de maiores estudos sobre a família Euphorbiaceae, e em especial, o gênero *Synadenium* (BITTNER *et al.*, 2001; SOUZA-FAGUNDES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Os escassos estudos encontrados recentemente na literatura demonstram potencial atividade biológica de algumas espécies do gênero, dentre elas *S. umbellatum*, *S. carinatum* e *S. cupulare*. Souza *et al.* (2005) isolaram do látex de *S. carinatum* uma lecitina responsável pelos efeitos anti-inflamatórios que a planta apresenta. Da mesma forma, *S. cupulare* apresentou, em estudos *in vitro*, inibição da síntese de prostaglandina justificando seu uso como anti-inflamatória (JAGER, HUTCHINGS, STADEN, 1996). Além disso, a espécie *S. umbellatum* apresentou *in vitro* promissores efeitos antitumorais (NOGUEIRA *et al.*, 2007)

1.2.3 *Synadenium grantii* Hook. f.

A espécie *S. grantii* (Figura 1), popularmente conhecida no Brasil como janaúba ou leitossinha, vem sendo usada pela medicina popular há muitos anos. Seu uso é tradicional entre a população, que utiliza a “garrafada”, obtida através de diluição do látex da planta em água pura e fresca – 18 gotas do látex em 1 litro de água (ORTENCIO, 1997). Suas aplicações foram bastante difundidas para a cura de variados tipos de câncer, mas há relatos de populares utilizando a planta para outras enfermidades, tais como inflamações e úlceras.

Esta espécie apresenta glicosídeos cianogênicos ou cianogénéticos, que são potencialmente tóxicos a um grande número de organismos vivos, demonstrando o risco da administração de extratos desta planta (GRUPO, 1998; FRANCISCO e PINOTTI, 2000).

Se por um lado foi demonstrado que *S. grantii* possui em sua constituição compostos tóxicos, também ficou claro que há outros tantos compostos químicos interessantes com possível ação farmacológica, entre eles terpenos, alcalóides, flavonóides entre outros (COSTA *et al.*, 2012).

Em 2001, Durgawale *et al.* isolaram e purificaram uma proteína presente no látex de *S. grantii* por cromatografia de afinidade. Essa proteína, uma lecitina, é apontada por este mesmo trabalho como um potente agente de aglutinação de eritrócitos humanos.

Outros trabalhos também conseguiram isolar através de precipitação por ação de calor (desnaturação) e cromatografia de permeação em gel e de trocas iônicas uma glicoproteína com atividade fibrinolítica e enzimas proteolíticas a partir do látex da planta, o que pode nos levar a crer que a distribuição de certo tipo de padrão de proteínas de látex seja característico deste grupo vegetal (RAJESH *et al.*, 2006; MRILANILI *et al.*, 2002)

Além disso, algumas propriedades biológicas da lectina também foram detectadas, dentre elas, a supressão do crescimento tumoral do fibrosarcoma e inibição da síntese de proteína em células de sarcoma ascites Yoshida (PREMARATNA *et al.* 1981).

Em 2011, Hartmann *et al.* demonstraram ainda que o extrato das folhas de *S. grantii* apresentou atividade moluscicida promissora, sendo, segundo os autores, o primeiro relato desta atividade para espécies do gênero *Synadenium*.

Recentemente ainda foi relatada para a espécie *S. grantii* atividade citotóxica sobre linhagem de fibroblastos pulmonares humanos a partir do extrato clorofórmio das folhas da planta e também atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum*. Esse trabalho ainda isolou dois novos ésteres de forbol a partir do extrato clorofórmio da planta que foram identificados como 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato e 4-deoxiforbol-12,13-ditiglate (HASSAN *et al.*, 2012).

Outra atividade recentemente relatada por Costa *et al.* (2012) é a de proteção gástrica apresentada pelo látex da planta, sendo ainda um importante aspecto ressaltado na pesquisa a alta toxicidade que o látex apresenta, demonstrando a necessidade de maiores estudos sobre a espécie.

Figura 1 - *Synadenium grantii* Hook. f. no habitat



1.2.4 Estudo Fitoquímico e Biológico de Produtos Naturais

Os metabólitos secundários são caracterizados por um grande grupo de compostos orgânicos, não sendo obrigatoriamente necessários aos processos básicos de crescimento do organismo, mas de caráter essencial em sua sobrevivência e interação com o ambiente, principalmente em relação a patógenos, herbívoros, polinizadores e

dispersores (VEERPORTE, ALFERMANN, 2000; TAIZ, ZEIGER, 2004, HARTMANN *et al.*, 2007), podendo não ser produzidos dependendo das condições ambientais ou fase de vida do organismo (DEWICK, 2009). As principais classes de metabólitos secundários, tanto em número de compostos como em importância farmacológica e ambiental, são alcalóides, terpenóides, flavonóides e óleos essenciais (VEERPORTE, ALFERMANN, 2000).

Vários destes compostos orgânicos produtos do metabolismo secundário são biologicamente ativos, isto é, tem ação analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida etc. Essas atividades biológicas apresentadas por plantas usadas na medicina caseira e de substâncias delas extraídas e purificadas vem sendo demonstradas por meio de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (MACHADO *et al.*, 2006).

De particular interesse são aquelas direcionadas ao estudo das atividades imunomodulatórias, devido ao crescente número de espécies vegetais utilizadas para o tratamento de doenças que comprometem o sistema imunitário, especialmente aquelas associadas ao câncer (HIRAZUMI *et al.*, 1996).

A grande maioria dos quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer é proveniente, direta ou indiretamente, de fontes naturais, como plantas, microrganismos e organismos marinhos (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, pode-se mencionar o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* Thunb. e *Taxus brevifolia* Nutt.), em 1971 (WANI *et al.*, 1971). Estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional. Como essa substância teria que ser extraída de espécies que levam décadas para o seu crescimento, a introdução dessa droga na terapêutica teve que esperar pelo desenvolvimento da síntese química, de extrema complexidade, e pela descoberta de precursores obtidos de fontes renováveis. Essas dificuldades adiaram a introdução do paclitaxel e do docetaxel na terapêutica para a década de 90 (ROWINSKY *et al.*, 1995).

Outra descoberta importante foi a partir da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida como Vinca rósea, utilizada no tratamento da Diabetes mellitus. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos desta espécie produziram granulocitopenia e a supressão da medula óssea, bloqueando células em mitose

(HANSEN, NISSEN, 1972, MANN, 2002). Esses extratos produziram quatro alcaloides diméricos ativos conhecidos como alcaloides da vinca: a vimblastina, a vincristina, a vinleurosina e a vinrosidina. Os alcaloides purificados causaram regressão da leucemia linfocítica aguda em camundongos. A vimblastina e a vincristina são agentes clínicos importantes no tratamento de leucemias, linfomas e do câncer testicular (MANN, 2002; NOBLE *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2010)

1.2.5 Ensaios Antitumorais

A maioria dos quimioterápicos usados na terapêutica foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Desta forma, o ensaio de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas é considerado um parâmetro consistente para a detecção da atividade antitumoral. A taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007; BOGO, 2012).

A citotoxicidade das drogas pode ser estabelecida em culturas de células tumorais de várias linhagens através das variações da morfologia celular, viabilidade celular utilizando corantes como o azul de tripan, que se baseia na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a penetração do corante, contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos como aquele que utiliza um sal amarelo de tetrazolina (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), conhecido como ensaio do MTT (MACIEL *et al.*, 2002; HENRIKSSON *et al.*, 2006).

O MTT é um ensaio de proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis de reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Os resultados são lidos em espectrofotômetro. A medida por colorimetria do formazan reflete diretamente o número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

O modelo *in vivo* tem a importância de confirmar a atividade anticâncer observada em cultura de células, superando as limitações dos modelos *in vitro* (SMITH *et al.*, 2005). Um dos modelos mais utilizados em estudos de atividade antitumoral é o

melanoma murino, neoplasia altamente maligna, que tem origem no melanoblasto da pele e apresenta boa similaridade com a neoplasia humana (VAN DYKE, JACKS, 2002). Este modelo permite o desenvolvimento e a avaliação de novas drogas e procedimentos terapêuticos (TIETZE, CHIN, 2000). A inoculação subcutânea das células de melanoma provoca o desenvolvimento de um nódulo hipodérmico que se torna palpável em torno de uma a duas semanas, sendo facilmente mensurado. Esse nódulo evolui para um tumor sólido, podendo chegar a grandes dimensões (JUNQUEIRA *et al.*, 1997; BOGO, 2012).

As células de melanoma murino B16-F10 constituem uma ferramenta experimental muito utilizada para o estudo do melanoma, cujo crescimento se dá tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo desenvolvido em camundongos C57BL6. Esta linhagem foi estabelecida por Fidler (1973) oriunda de melanoma de ocorrência natural em camundongos C57BL6 que por meio de seleção progressiva, obteve o isolamento de variantes com diferentes graus de potencial metastático (BOGO, 2012).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

Realizar estudo fitoquímico e avaliação antitumoral do látex de *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae).

1.3.2 Específicos

Avaliar a citotoxicidade do látex de *Synadenium grantii* Hook f. através do método de redução do MTT e exclusão do Azul de Trypan, frente às células de melanoma (B16F10).

Analisar as modificações na distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

Avaliar *in vivo* os efeitos anti-tumorais do látex de *Synadenium grantii* Hook f. em camundongos portadores de melanoma B16F10 e alterações histológicas nos órgãos dos mesmos.

Realizar estudo fitoquímico do látex de *Synadenium grantii* Hook f.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados nesta pesquisa, bem como os resultados obtidos, são descritos no artigo originado a partir deste trabalho. A dissertação é apresentada na forma deste artigo no Capítulo 2, de acordo com as opções de formato apresentadas pelo regulamento do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

O protocolo de estudo foi aprovado na Comissão de Ética do Uso de Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa, conforme parecer 19326/2011.

1.4.1 Artigo: *Antitumoural effect of Synadenium grantii Hook f. (Euphorbiaceae) látex*

Este artigo apresenta o efeito antitumoral do látex de *Synadenium grantii* frente à linhagem de células de melanoma (B16F10) usando modelos *in vitro* e *in vivo*. O mesmo será submetido para avaliação pelo corpo editorial da revista científica *Journal of Ethnopharmacology* (Qualis A2 na área de farmácia e JCR 2011: 2.755)

1.5 REFERENCIAS

ALMEIDA, V.L. LEITÃO; A., REINA, L.C.R., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L., LOPES, M.T. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, 2005.

BAGAVATHI, R; SORG,B.;Hecker,E. Tigliane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, vol. 54, p.506-510,1988.

BITTNER, M. *et al.* Estudio quimico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, Concepción, v. 46, n. 4, p. 1-15, 2001.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de liquens**. 2012. p.110. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2012.

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

BRANDÃO,M.G.L. et al. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian official Pharmacopoeia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v. 19 ,p. 478-487, 2009.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.

CARRENHO, L.Z.B **Avaliação dos efeitos da subfração acetato de etila III de Vernonia scorpioides em modelo de melanoma murino in vivo e in vitro**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug Discovery From Natural Sources. **AAPS Journal**.vol.8, no.2. 2006.

COSTA, L.L.G.; DAVID, V.C.; PINTO, R.M.C.; MINOZZO, B.R.; KOZLOWSKI JUNIOR, V.A.; CAMPOS, L.A.; SILVA, R.Z.; BELTRAME, F.L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.22 no.5. 2012.

CUNHA, L.C., AZEREDO, F.S., MENDONÇA, A.C.V., VIEIRA,M.S., PUCCI, L.L., VALADARES, M.Z., FREITAS, H.O.G., SENA, A.A.S., JUNIOR, R.S.L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(2A): 403-411 p. 2009.

DEI-JI, P et al. Kanmiphorin-C and D citotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 3, p. 1018-1020, 1991.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Product – A biosynthetic approach. **Chichester**. 3 ed. 2009.

FELIU, D.A. **Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)**. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosides in plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 5, p. 24-27, 2000.

FIDLER, I.J. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. **Nature New Biology**. v. 242, p. 148-149, 1973.

GRUPO, L. R. P. **Contribuição ao estudo anatômico, fitoquímico e farmacológico de *Synadenium carinatum* Hook f. (Euphorbiaceae)**. 1998. 78 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

HANSEN, I., NISSEN, N. I. Vinca alkaloids, a newer group of anti-neoplastic drugs. **Ugeskr Laeger**, v. 134, n. 25, p. 1315-1321, 1972.

HARTMANN *et al.* From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, vol.68. p22-24. 2007.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTROM, J.H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**. vol.42. p.320-323. 2006.

HIRAZUMI A, FURUSAWA E, CHOU SC, HOKAMA Y. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, 39: 7-9. 1996.

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

ITOKAWA, H. et al., A citotoxic substance from Sangre de Dagro. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Boston, v. 39, p. 1041, 1991.

JAGER, A.KM; HUTCHINGS, A.; STADEN, V.J. Screenig of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 52, p 95-100, 1996.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 4. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1977. 87p.

OLIVEIRA JR, R.J., MENEZES, C.S.R., BERNARDES, L.S., SILVEIRA, E.P. Viabilidade celular e citotoxicidade de células neoplásicas de camundongos tratadas com látex de *Synadenium grantii* Hook. **Anais da 57^a Reunião Anual da SBPC** - Fortaleza, 2005.

JUNQUEIRA, G.; BRAGA, L.M.G.M.; MOTTA, M.S.; PILLA, H.S. Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, vol.72, p.487-9, 1997.

KINGSTON, D. G. I. The chemistry of taxol. **Pharmacology & Therapeutics – Journal**, vol. 52, n. 1. 1991.

MACHADO JR, J.C.; FLORÃO, A.; MATTANA, F.V.R.; ROCHA, F.H.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A.M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas Medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Vol 16: 645-655. 2006.

MACHADO, A. A., NAKASHIMA T., SILVA W. A., KRÜGER E. R. Contribuição ao estudo fitoquímico e citotóxico de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol 9 (2), 1 – 24, 2011.

MACHADO, A.A. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae)**. 2008. 78p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Curitiba, Curitiba, 2008.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 23. P.429-438, 2002.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews (Cancer)** 2: 143-148, 2002.

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.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, vol.17. no.3. p 215–234. 2000.

NOBLE C. O., GUO Z., HAYES M. E., MARKS J. D., PARK J. W., BENZ C. C., KIRPOTIN D. B., Drummond D. C. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 64, n. 4, p 741-751, Set. 2009.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B.B.; VIEIRA, M.S.; BENFICA, P.L.; BOZINIS, M.C.V. Efeito citotóxico do *synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 4, n. 2,p 50-53, 2007.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, suplemento, 2005.

ORTÊNCIO, W.B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2nd edition. Thesaurus, Brasília, 322p, 1997.

PREMARATNA, A. *et al.* Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 32-35, 1981.

RAJESH, R., *et al.* Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, **Biochimie**, vol. 88, p. 1313–1322, 2006.

ROGERIO, A.P., *et al.* Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex, **Glycobiology**, v.17, p. 795-804, 2007.

ROWINSKY, E.K.; GILBERT, M.; MCGUERE, W.P.; NOE, D.A.; GROCHOW, L.B.; FORASTIERE, A.A.; ETTINGER, D.S.; LUBEJKO, B.G.; CLARK, B.; SARTORIUS, S.E.; CORNBLATH, D.R.; HENDRICKS, C.B.; DONEHOWER, R.C. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. **Journal of Clinical Oncology**, vol.9. p.1692-1703, 1995.

SOFIATI, F. T. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* h.b.k. (polygonaceae) e *Synadenium carinatum* boiss (euphorbiaceae)**. 2009. 100 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Araraquara, 2009.

SOUZA, M.A., *et al.* Isolation and partial characterization of d-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 705-716, 2005.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. *et al.* Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, dez. 2002.

TAIZ, ZEIGER, 2004, **Fisiologia vegetal**, 3ª edição, porto alegre. Editora Artmed. 719p

TARFUT, G.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E.E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales em emulsiones degradadas por radiación ultravioleta, **Revista Colombiana de Química, Bogotá**, vol. 34, n. 1, 2005.

TIETZE, M.K.; CHIN, L. Murine models of malignant melanoma. **Mol. Medicine Today**. vol. 6. p.408-410. 2000.

VAISBERG, A. J.; MILLA, M.; PLANAS, M. C.; CORDOVA, J. L.; DE AGUSTI, E. R.; FERREYRA, R.; MUSTIGA, M. C.; CARLIN, L.; HAMMOND, G. B. Taspine is

the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, vol. 55, n.2, p.140-143, 1989.

VALADARES, M.C., CASTRO, N.C.C., CUNHA, L.C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, vol.43. n.4. São Paulo. 2007.

VAN DYKE, T.; JACKS, T. Cancer modelling in the modern era: progress and challenges. **Cell**. vol.108, p.135-44. 2002

VEERPORTE, ALFERMANN; Metabolic engineering of plant secondary metabolism. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 2000.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGOON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agent.VI.The isolation and struture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* **Journal of the American Chemical Society**, vol.93, p.2325-2327, 1971.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J.The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, 2008.Versão: 25/11/2008.<http://delta-intkey.com>.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices**. Geneva, p. 79, 2003.

YAMAMOTO, C. H.; PINTO, T. J. A.; MEURER, V. M.; CARVALHO, A. M.; REZENDE, P. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte, 2004.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no brasil. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

CAPÍTULO 2

(ARTIGO)

2.1 ARTIGO

Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex

Thais Latansio de Oliveira^a; Antônio Carlos Mattar Munhoz^a, Bruna Mikulis Lemes^a;
Bruno Rodrigo Minozzo^a; Angelita Nepel^b; Andersson Barison^b; Giovani Marino
Fávero^c; Eduardo Bauml Campagnoli^d; Flávio Luís Beltrame^{a,*}

^a *Laboratory of Pharmaceutical Technology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná Brazil.*

^b *Nuclear Magnetic Resonance Center, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.*

^c *Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná Brazil.*

^d *Laboratory of Histopathology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná Brazil.*

* Corresponding author. Email: flaviobeltra@gmail.com, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná Brazil, General Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Postal Code: 84030-900, telephone: 55 42 3220-3782.

Ethnopharmacological relevance: *Synadenium grantii* Hook f. has traditionally been used to treat various neoplastic diseases in southern Brazil.

Aim of study: Evaluation of the antitumoural potential of *S. grantii* latex against B16F10 melanoma cell line using *in vitro* and *in vivo* models, as well as a phytochemical study of the latex.

Materials and methods: The *in vitro* antitumoural activity was performed using MTT and trypan blue assays with different latex concentrations (1.7µg-7.0µg/well and 1.22mg-4.88mg/well). Flow cytometry was used to determine the progression of the cell cycle. The *in vivo* activity was performed by subcutaneously injecting melanoma cells in the dorsum of C57BL6 mice, followed by treating the mice with a popular form of use of the latex (*garrafada*) administered orally. After sacrificing the animals, histological analysis of the organs was performed by hematoxylin-eosin staining. The phytochemical study of the latex was performed by NMR and chromatographic procedures and the extracts and isolated substances were evaluated by 1D and 2D NMR analysis.

Results: *S. grantii* latex exhibited decreased cell viability of the melanoma line in a concentration and time-dependent manner, and also cell cycle arrest in the S-G2/M phase. The latex caused a 40% reduction in the volume of tumours of the mice with melanomas. Histological examination of the organs of these animals showed no differences between groups. The phytochemical investigation resulted in the isolation and identification of the triterpene euphol and the steroid citrostadienol which were tested against the strain of melanoma. Euphol showed no antitumoural activity, while the steroid, citrostadienol showed reduced cytotoxic activity.

Conclusion: The latex of *S. grantii* presented *in vitro* and *in vivo* cytotoxic effects with antitumoural activity against B16F10 melanoma cell.

Keywords: *Synadenium grantii*; Euphorbiaceae; antitumoural; cytotoxicity; euphol; citrostadienol.

1. Introduction

The Euphorbiaceae family is complex and heterogeneous and contains approximately 300 genera and 7000 species that have been identified worldwide (Bittner *et al.*, 2001). Previous phytochemical investigations on this family, mainly in the search for new biologically active compounds revealed the presence of flavonoids, saponins, terpenes, esters, alkaloids, cyanogenic glycosides, tannins, lectins and glycoproteins (Premaratna *et al.*, 1981; Bittner *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2005; Rajesh *et al.*, 2006; Rogério *et al.*, 2007).

The *Synadenium* genus, which belongs to this family has been linked to some pharmacological properties such as antitumoural (Premaratna *et al.*, 1981), anti-inflammatory (Souza *et al.*, 2005), fibrinolytic action (Rajesh *et al.*, 2006) and immunoregulation (Rogério *et al.*, 2007). Nogueira *et al.* (2008), demonstrated that ethanol extract of the leaves of *S. umbellatum* is an effective antitumoural agent and *in vivo* presents an anti-angiogenic effect. On the other hand, chloroform extract of the leaves of *S. grantii* was recently described (Hassan *et al.* 2012) to have cytotoxic activity in human lung fibroblast strain.

Synadenium grantii Hook f. – the object of the present study – is widely used by the population of southern Brazil and is popularly known as *tiborna* or *cola-nota* (Oliveira *et al.*, 2005). Its latex is used empirically in the treatment of various diseases such as allergies, gastric disorders, and especially, cancer (Ortencio, 1997). In the east of the state of Paraná, people use *S. grantii* latex as a home preparation named *garrafada*. They mix 18 drops of collected latex in 1 liter of water, keep it in the refrigerator and take a goblet of this solution 3 times a day.. Like other species of the Euphorbiaceae family, it is known that its latex is rich in nonpolar compounds (Costa *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2012) and that it demonstrates activity against tumour cells (Block *et al.*, 2005; Jassbi, 2006; Aliabadi *et al.*, 2009).

Therefore, the aim of this work were to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antitumoural activity of the latex of *S. grantii* as well as to determine the chemical composition of the latex that could be responsible for this activity.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Equipment

Ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (AcOEt), chloroform (CHCl₃), n-hexane (Hex) and xylene were purchased from Biotec[®] (Pinhais, PR, BR). Deuterated chloroform was purchased from Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA.). All reagents used in the analyses were of analytical grade. Kieselgel[®] 60M silica, 35-70 mesh and 230-400 mesh were purchased from Merck[®] (Darmstadt, HE, DE), RPMI 1640 medium was purchased from Gibco-BRL[®] (Grand Island, NY, USA), 5-fluorouracil from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and fetal bovine serum from Cripion[®] (Andradina, SP, BR). 1D and 2D NMR analysis were performed on a Bruker[®] Avance III HD 600 NMR spectrometer, operating at 14.1 Tesla, observing ¹H and ¹³C at 600.13 and 150.90 MHz, respectively. Flow cytometry was performed on a Beckman Coulter[®] FC500 MPL model flow cytometer. IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 1420 spectrometer. The extracts were concentrated on a Fisatom[®] 558 evaporator coupled to a Marconi[®] MA053 vacuum pump, and histological analysis was performed with a

Leica[®] TP1020 tissue processor with Leica[®] EG1120 support and a Leica[®] RM2125RT microtome. The histological slides were analysed using an Olympus[®] CX31 photomicroscope.

2.2. Plant material and garrafada preparation

Synadenium grantii Hook f. latex was collected in Ponta Grossa, Paraná, Brazil (975 meters altitude, 25°05'38" S, 50° 09'30" W), in April 2010. A voucher specimen (# 363509) was identified and deposited at the Herbarium of Municipal Botanical Museum of Curitiba. The *garrafada* was prepared added 18 drops of the latex in 1 liter of distilled water (0.747g/1L, w/v).

2.3. Extraction and isolation

Fresh latex (48 g, density: 1.22 g/mL) was partitioned in a vacuum chromatographic column (VCC - 60 silica gel, 35-70 mesh) eluted with Hex, followed by CHCl₃, AcOEt and MeOH as solvents (increasing polarity), getting 28.02%, 5.00%, 6.40% and 0.21% (w/w) of extraction yield respectively. The resulting respective fractions were kept under refrigeration (4 °C) prior use. The hexane fraction was further subjected to a liquid-liquid partitioning with hexane (FH) and methanol (FM).

Part of the FH (8 g) was subjected to chromatographic column (CC) containing 35-70 mesh silica (61g) eluted with Hex, followed by CHCl₃, AcOEt and MeOH to give 207 sub-fractions. The fractions were evaluated and pooled according (TLC analysis), based on the similarity of the retention factor R_f of the spots that were observed. The FH sub-fraction 46-59 (0.45 g, 5.6%, w/w) was subjected to flash chromatography using elution mode and this procedure resulted in substance 1 (citrostadienol – 0.150 g, chloroform:ethyl acetate, 5:5, v/v). Similarly, the FH sub-fraction 1-26 (0.96 g, 12%, w/w), was partitioned once more into CC with 35-70 mesh silica, generating 142 sub-fractions. From the sub-fraction 118-122 (0.12 g, 12.5%, w/w), after chromatography using the flash elution mode, substance 2 (euphol - 0.030 g, hexane-dichloromethane, 7:3, v/v) was obtained. The structures of the compounds were determined by extensive analysis of IR and 1D and 2D NMR data, as well as by comparison with literature data (Zhang *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2010).

The fresh latex and the fractions were analysed using NMR to provide a *fingerprinting* profile and to identify the chemical classes of compounds present in these materials.

2.4. Cytotoxicity assays

2.4.1. Tumour lineage

B16F10 melanoma cells were used from cultures maintained in the laboratory of the State University of Ponta Grossa, through continuous expansion in RPMI[®] 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin and amikacin in an incubator at 37 °C with humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.4.2. MTT reduction assay

In this test, 4×10^4 cells were seeded in a 96 well plate incubated with the popular form of use of latex (*garrafada*) and fresh latex at different concentrations (1.7 μg -7.0 μg /well and 1.22 mg -4.88 mg/well, respectively). For the reading, the medium was discarded and replaced with 200 μL of MTT solution. The plates were incubated at 37 °C for 4 hours. The resulting formazan crystals were solubilised in 100 μL of dimethylsulfoxide (DMSO). The optical density was read at 560 nm with ELISA plate reader. Using this methodology, both the isolated substances (euphol and citrostadienol) were also tested at concentrations of 2.5, 25, 125 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with incubations at 24 and 48 hours (Bagalkotkar *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2013).

2.4.3. Trypan blue exclusion assay

In this assay, 4×10^6 cells were distributed into 24 well plates and incubated in culture conditions with different aliquots of *garrafada* and latex for 24 to 48 hours giving the respectively concentrations, (1.7 μg -7.0 μg /well and 1.22 mg -4.88 mg/well). After this time, an aliquot of 10 μL of cell suspension was removed and homogenised in 10 μL of 0.2% trypan blue. The cells were analysed with aid of a Neubauer chamber.

2.5. Analysis of cellular cycle

After treatment of the B16F10 line with different concentrations of latex (1.7 μg -7.0 μg /well and 1.22 mg -4.88 mg/well) for 24 and 48 hours the cell cycle analysis was determined by flow cytometry. For this purpose, 2×10^6 cells were trypsinized, washed three times with PBS, fixed in 70% ethanol and stained with propidium iodide (PI). The PI red fluorescence was acquired through a 585/42 nm filter and the signals were measured on a linear scale of 1024 channels. For each sample, 10,000 events were acquired and the data were analysed using appropriate software (CellQuest[®], Becton Dickinson, San Jose, CA; WinMDI[®] 2.8).

2.6. In vivo assays

Male, nine-week old, C57BL6 mice, weighing approximately 20 g, were obtained from the vivarium of the Federal University of Paraná. Aliquots of 5×10^4 B16F10 cells were subcutaneously injected in the dorsum of these animals. On the 10th day after cell injection, the animals were divided into two groups (control and treated) and treatment started with 50 μL of the *garrafada* per animal (corresponding to the popular use of the latex proportional to the weight of the mouse) orally 3 times daily. The tumours were measured using a calliper and their size in mm^3 was calculated as follows (Plowman *et al.*, 1997):

$$\text{Volume of tumour} = \text{longitudinal (head-tail)} \times \text{transverse (paw-paw)} \times \frac{3}{4} \text{ p.}$$

This study was approved by the Ethics Committee on the use of animals (n° 19326/2011 CEUA) and all procedures followed the rules and conducts of research and animal experimentation.

2.7. *Histological analysis*

After the animals were sacrificed, part of the tumour, liver, lungs and mediastinal lymph nodes were removed. The specimens were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and then the histological processing was performed and the material was placed in paraffin blocks. Then, histological sections, 5 μm in thickness, were obtained and they were stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were analysed using light microscopy and the histological images were captured with the aid of a light microscope.

2.8. *Statistical analysis*

The experimental values were expressed as mean \pm standard deviation. The *in vitro* cytotoxicity assays were analysed by the difference of experimental statistical significance using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test and the *in vivo* tests were analysed using Student's t-test. The data were analysed using Graph Pad Prism 4.0 software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The level of $P \leq 0.05$ was used to determine statistical significance.

3. Results

3.1. *In vitro cytotoxicity assays*

Using the trypan blue method, a 98% cellular inhibition for the *garrafada* and 100% for the latex was obtained, after 48 hours of incubation, and for the MTT technique, the percentage of cellular inhibition was up to 40% for the *garrafada* and up to 64% for the fresh latex after 48 hours of incubation (data not shown).

The isolated compounds, euphol and citrostadienol, was tested against the strain of melanoma (B16F10) by the MTT method. The readings after 24 and 48 hours of incubation of the B16F10 cells with the substances demonstrated that the euphol did not demonstrate the ability to decrease cell viability, indicating that in the studied concentrations this substance showed no cytotoxic activity. The steroid, citrostadienol showed reduced cytotoxic activity, causing an 8% decrease in cell viability at a concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2. *Effects on cellular cycle*

The effect of *S. grantii* latex on the cell cycle progression of the B16F10 cell line was determined by flow cytometry. The latex induced a dose-dependent cell death (Figure 1) followed by a reduction in the number of cells in the S-G2/M phase, as shown in Table 1.

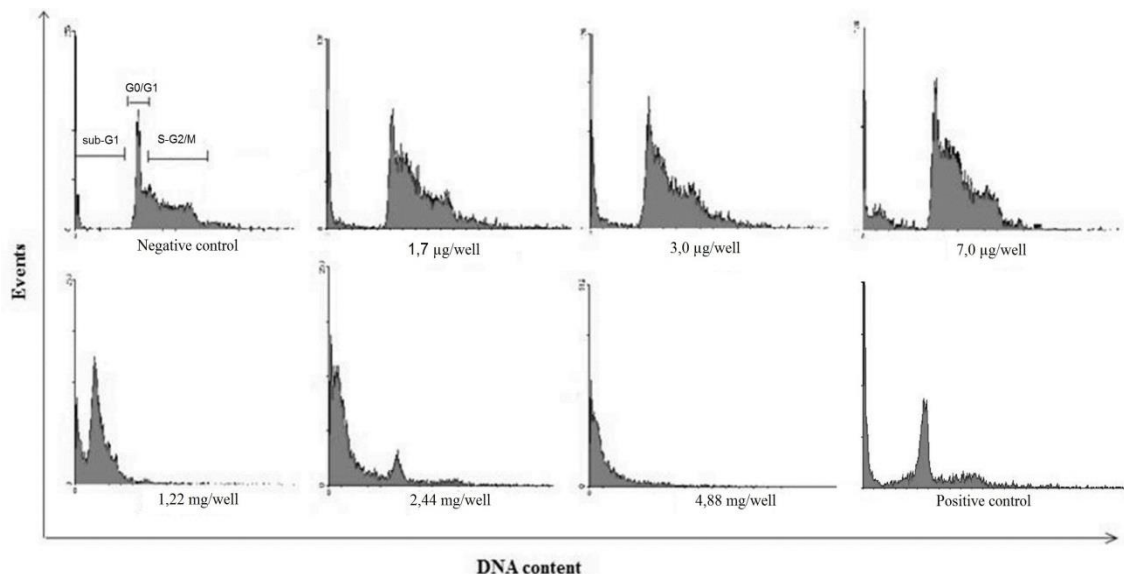


Figure 1. Histograms of B16F10 cells after 24 hours of incubation with *S. grantii* latex (*garrafada* and fresh latex) demonstrating increased concentration-dependent cell death.

Table 1: Values of means of cell populations in the phases of the cycle of B16F10 melanoma cells after 24 hours of treatment with *S. grantii* latex (*garrafada* and fresh latex).

Concentration (mg/well)	Sub G1	G0/G1	S-G2/M
Negative Control	13.70 ± 0.28	34.55 ± 1.62	51.75 ± 1.34
Positive Control	52 ± 9.12	25.72 ± 7.40	12.61 ± 5.10
0.0017	28.20 ± 1.75	24.60 ± 1.21	47.20 ± 1.08
0.003	27.57 ± 1.40	25.67 ± 4.47	46.77 ± 4.33
0.007	23.20 ± 1.13	20.70 ± 1.95	49.90 ± 9.00
1.22	19.00 ± 0.5	46.83 ± 16.37	23.23 ± 5.03 ***
2.44	71.50 ± 12.02 ***	28.33 ± 18.58	13.33 ± 6.02 ***
4.88	50.33 ± 10.02 ***	31.00 ± 11.53	18.67 ± 3.05 ***

Values represent the mean ± standard deviation of triplicates. *** p < 0.001, Positive Control: 5-fluorouracil 16µM.

3.3. In vivo antitumoural evaluation

After treating the mice for seven days, orally 3 times a day, with a solution corresponding to the popular use (*garrafada*) of *S. grantii* there was a 40% inhibition of tumour growth in comparison with the untreated control group, as can be seen in Figure 2.

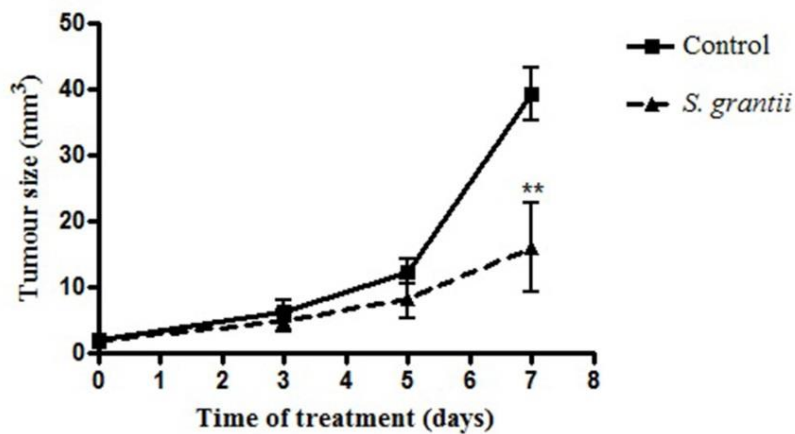


Figure 2. Inhibition in tumour volume in melanoma-bearing mice, induced by the administration of *garrafada* of *S. grantii*. ** $p = 0.0029$.

3.4. Histological evaluation

The histological evaluation of the analysed organs was similar in both the treated and the control group. The melanoma tumours presented areas that contained a great number of cells and other areas of necrosis. The tumour cells exhibited nuclear hyperchromaticism, pleomorphism and eosinophilic cytoplasm (Figure 3). The deposition of both intra- and extracellular melanin was also observed, as well as atypical mitosis. Metastasis in the lung tissue, associated with extensive inflammation, was histologically identified in both the treated and untreated group (Figure 3). Metastasis was macroscopically observed in the mediastinal lymph nodes in both groups, the suspicion of which was confirmed histologically.

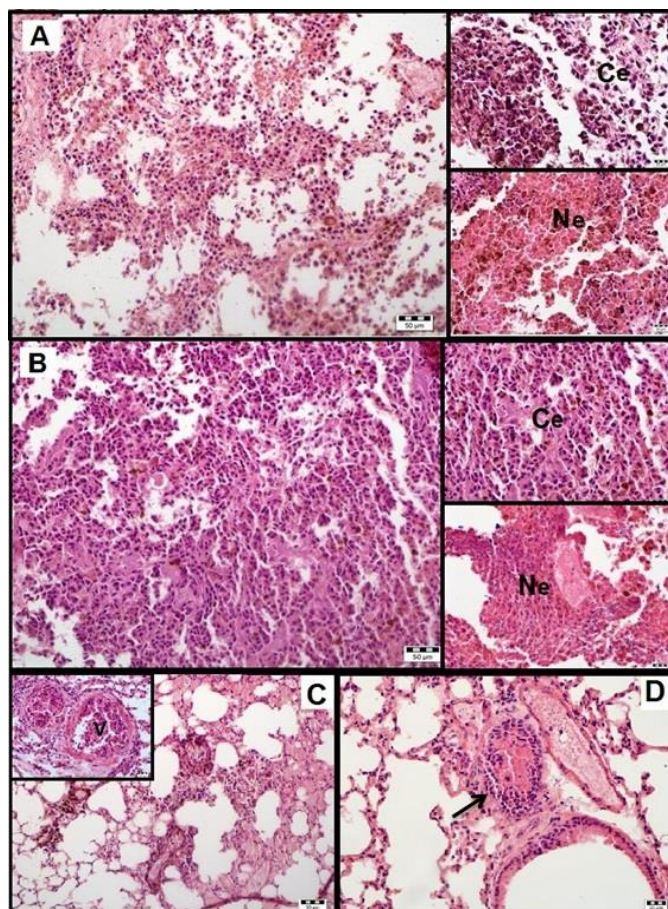


Figure 3. Representative photomicrographs of the tumours of treated animals and control. (A) shows an overview of the tumour of a treated animal, showing high cellularity (Ce) and large areas of necrosis (Ne). (B) shows the tumour of an untreated animal showing the same issues previously described. (C) shows tumorous cells, deposition of melanin and the presence of eosinophilic material consistent with the inflammatory exudates in the lungs of animals of the treated group. Note the tumorous cells within the blood vessels (V). (D) shows the presence of a tumorous island with a necrotic centre (arrow), in the lungs of animals of the untreated group (HE, A, B and C: 200X - 400X highlights; D: 400X).

3.5. NMR fingerprinting and isolation of compounds

The ^1H and ^{13}C NMR analysis of the latex and hexane, chloroform and ethyl acetate fractions showed characteristic signal due to terpenes (Figure 4).

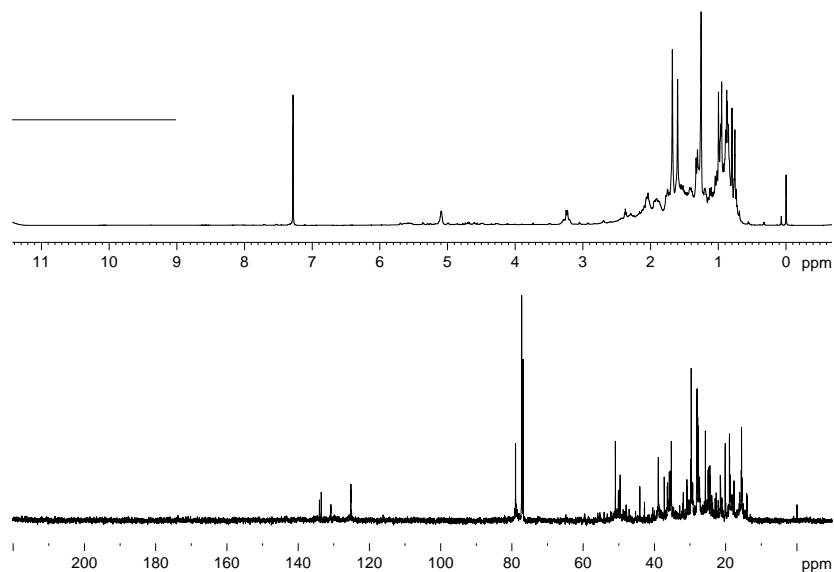


Figure 4. ^1H (top) and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (bottom) NMR spectra of hexane fraction from the fresh latex of *S. grantii*.

The hexane fraction obtained from the fractionation of the *S. grantii* fresh latex was subjected to chromatographic processes, from which the triterpene, euphol and a steroid citrostadienol were isolated and identified (Figure 5) (Zhang *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2010).

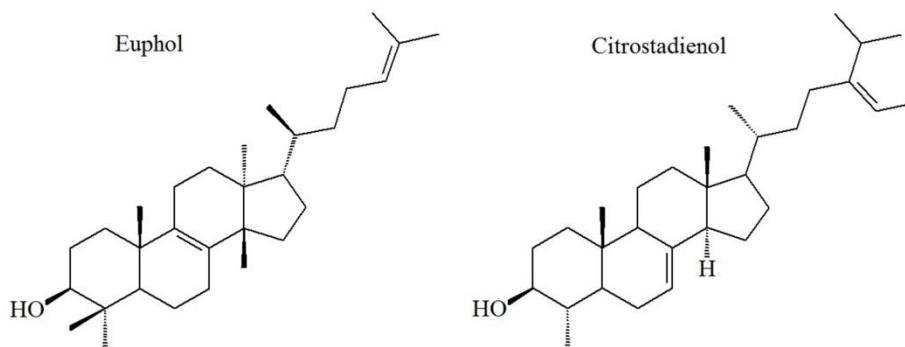


Figure 5. Molecular structure of compounds isolated from the hexane fraction of *S. grantii* fresh latex.

4. Discussion

The development of new strategies and the search for new substances to treat cancer has been the subject of much research. In this regard, *in vitro* cytotoxicity assays have been shown to be a consistent and rapid method for screening natural and synthetic products with antitumoural potential. (Rahmat *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2009; Momtaz *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011).

Kauffmann *et al.* (2004) release that the medical benefits of medicinal plants commonly result from the combination of actions of secondary metabolites (synergic effect) present in extracts of these plants. However, the isolation and identification of active compounds present in these extracts, and the further study of the therapeutic capacity of these substances and the evaluation of potential mechanisms of action, constitute a great challenge for pharmacology, biochemistry and chemistry (Gebhardt,

2000). Therefore, considering the ethnopharmacological use of *S. grantii*, the latex of this plant was initially assessed against its potential to cause the inhibition of the proliferation of B16F10 cells by two distinct methodologies. Different concentrations of the *garrafada* and fresh latex were tested. Two concentrations more diluted (1.7 µg and 3.0 µg/well) than the concentration recommended (7.0 µg/well) in popular use – *garrafada* - and other three more concentrated preparations (1.22 mg, 2.44 mg e 4.88 mg/well) – fresh latex - were prepared and tested, since it is desired to study the results of higher concentrations compared to the models evaluated. It can be seen that this strain showed an *in vitro* decrease in concentration and time-dependent cell viability during the studied time periods, with the best results achieved using the trypan blue assay. According to Valadares *et al.* (2007), due to the different principles of the methods employed in this assessment of cytotoxicity, differences in the inhibition of cell values can be expected; this was also observed in the results of the *in vitro* experiments in the present study. Other cell lines were also tested by these methods and similar results were obtained (data not shown).

The cytotoxic activity of the Euphorbiaceae family has been reported for different species. Aliabadi *et al.* (2009) demonstrated that different extracts of *Euphorbia macroclada* Boiss. latex showed cytotoxicity against the breast adenocarcinoma cell line, and the dichloromethane extract was the most efficient, since it caused 50% of cellular death at a concentration of 30 µg/mL; the methanol extract showed no activity. *Euphorbia tirucalli* L. latex also showed *in vitro* toxicity when evaluated in relation to the culture of melanoma cells, even at high dilutions (homeopathic doses) (Silva *et al.* 2011). Likewise, the ethanolic extract of the leaves of *Synadenium umbellatum* Pax. demonstrated the ability to decrease *in vitro* cell viability in Ehrlich ascites tumour cell culture and also acute myeloid leukemia, presenting the death of 50% of tumour cells at concentrations of 0.4, 0.1, and 0.08 mg/mL for the crude extract, chloroform fraction and hexane fraction, respectively (Nogueira *et al.*, 2008).

The toxicity of the *Synadenium* genus has been demonstrated, mainly based on the evaluation of extracts from the aerial parts of the plant (Castro, 2005; Valadares *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2012), but few studies have reported the potential effect of the latex, which is popularly used for therapeutic purposes, as reported in this present study. Melo-Reis *et al.* (2011) showed that *S. umbellatum* latex presents cytotoxic and mutagenic potential (concentration-dependent), and in the same species Oliveira *et al.* (2005) showed a relatively low LD50 value (110-168 mg/Kg), which shows that substantial care should be taken in its empirical use due to its high toxicity.

Even more relevant to the subject of the present research is the fact that the toxicity of the *S. grantii* species has also been reported, evaluated by *Artemia salina*, presenting an LD50 value of 26.58 µg/mL for latex from the plant (Costa *et al.*, 2012).

In this work it was demonstrate *S. grantii* latex, in the tested concentrations, the death of specific cells in the proliferative phase of the cell cycle (S-G2/M). This findings is supported by other studies that showed that plants of the Euphorbiaceae family present the ability to cause accentuated cell death in tumour cell lines after treatment with their extracts (Giridharan *et al.*, 2002; Harikumar *et al.*, 2009).

To confirm the results obtained in the *in vitro* study, an *in vivo* experiment was conducted to evaluate the diluted form of use of *S. grantii*. The induction of melanoma in mice followed by the treatment of these animals with the *garrafada*, 3 times a day as related for popular use, showed a 40% inhibition of tumour growth compared with the

control group. According to the National Cancer Institute (NCI), values of T/C (treated/control) less than 40% are indicative of significant antitumoural activity (Plowman *et al.*, 1997). This result allows us to infer that the latex (*garrafada*) of *S. grantii* present potential antitumoural activity. Others studies with different extracts of other plants belonging to Euphorbiaceae family showed similar results. Bezerra *et al.* (2009) obtained 31.8% inhibition of growth of sarcoma in mice using the essential oil from leaves of *Croton regelianus* Müll. Arg., while Alonso-Castro *et al.* (2012) obtained 59% inhibition of the human epithelial carcinoma cell line using the methanol extract of the leaves of *Croton lechleri* Müll. Arg.

However, histological analysis of liver tissue showed no significant difference between treated animals that receiving the *garrafada* of *S. grantii* and those of control group (untreated). There was no evidence of damage to liver tissue from use of the *garrafada* of *S. grantii*. This result is in agreement with results obtained by Costa *et al.* (2012), who, when evaluating hepatic biochemical parameters in rats treated with *garrafada* of *S. grantii*, found no significant difference between the treated group and the control group; however, these same authors reported that in the highest concentrations of the latex, significant changes in biochemical parameters were found.

On the other hand, the leukocyte infiltration observed in the lungs of mice in both groups was also reported by Cunha *et al.* (2009), who, when evaluating the acute and sub-acute toxicity of latex and ethanol extract of the leaves of *S. umbellatum* in rats, noted congestion and inflammatory infiltration only in animals treated with the latex. As well as the process of metastasis observed in the lungs, this leukocyte migration may be attributed to the presence of lectins, which are potent agglutinins for erythrocytes that are mainly present in the latex of the plant (Mrinalini *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2005; Rajesh *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2009).

The significant antitumoural activity observed in the *in vitro* and *in vivo* assays supports previously founds to species from the Euphorbiaceae family.

Block *et al.* (2005), Jassbi *et al.* (2006) and Aliabadi *et al.* (2009) attribute this antitumoural activity to nonpolar constituents such as terpenoids that are very abundant in the chemical constitution of the Euphorbiaceae family. Terpenes that are present in latex as well as other parts of several species of the genus *Synadenium* are described to be present cytotoxic activity (Bagavathi, 1988; Olivier *et al.*, 1992; Bittner *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2012). The ¹H and ¹³C NMR spectra of hexane, chloroform and ethyl acetate fractions of the latex showed characteristic signal due to terpenes. Moreover, these signals were too evident in both hexane and chloroform fractions. The tetracyclic triterpene euphol is widely described as a major constituent in species of the family Euphorbiaceae. (Yasukawa *et al.*, 2000; Dutra *et al.*, 2011; Mata *et al.*, 2011; Tsopmo *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2012). Moreira *et al.* (2010) found euphol in the methanolic extract of the latex of *S. carinatum* Boiss. Hassan *et al.* (2012) isolated this and four other terpenes from chloroform extract of the leaves of *S. grantii*. Additionally, several important biological activities were assigned to these compounds, such as anti-inflammatory. In this, euphol was effective against intestinal diseases and improve autoimmune of the central nervous system in rats (Dutra *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2012). Mata *et al.* (2011) showed molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*, while Yusukawa *et al.* (2000) showed anti-inflammatory activity to 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin, as well as antitumoural by topically application of euphol in animals.

The steroids, such as citrostadienol found the latex of *S. grantii* has also several antitumoural activities and duo to its high structural diversity, they have a great ability

to interact with several biological targets (Salvador *et al.*, 2013). In the present work, citrostadienol showed low antitumoral activity. However, similar compounds have shown to be effective in treating some types of cancer (Salvador *et al.*, 2013).

5. Conclusion

The *in vitro* assays demonstrated that both fresh latex and *garrafada* from the latex of *S. grantii* have concentration and time-dependent cytotoxic effect against B16F10 melanoma cells lines. They also showed deleterious effects on the cellular replication, inducing cell death and cell cycle arrest in the S-G2/M phase. Additionally, *in vivo* assays showed significant reduction in tumour volume in melanoma-bearing mice.

The phytochemical investigation yielding in the isolation and identification of euphol and citrostadienol for the first time in latex of *S. grantii*. The latter showed reduced cytotoxic activity when tested *in vitro* against the strain of melanoma.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação Araucária (Research Grant 14/2009) and the Postgraduate Pharmaceutical Sciences programme and UEPG for financial support and fellowships.

References

- Abonia, R., Insuasty, D., Castillo, J., Insuasty, B., Quiroga, J., Nogueras, M., Cobo, J., 2012. Synthesis of novel quinoline-2-one based chalcones of potential anti-tumor activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 57, 29 – 40.
- Aliabadi, H.S., Sajjadib, S.E., Khodamoradic, M., 2009. Cytotoxicity of *Euphorbia macroclada* on MDA-MB-468 Breast Cancer Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 5, 103-108.
- Alonso-Castro, A.J.; Sánchez, E.O.; Domínguez, F.; Toledo, G.L.; Chávez, M.; Tello, A.J.O.; Carrancá, A.G., 2012. Antitumoural effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 140, 438– 442.
- Bagavathi, R, Sorg, B., Hecker, E., 1988. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. *Planta Medica* 54, 506-510.
- Bagalkotkar, G., Chuan, T.S., Khalivulla, S.I., Hamzah, A.S., Shaari, K., Lajis, N.H., Saad, M.S., Stanslas, J., 2011. Isolation and cytotoxicity of triterpenes from the roots of *Phyllanthus pulcher* Wall. ex Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(2), 183-188.
- Bezerra, D.P., Marinho Filho, J.D., Alves, A.P., Pessoa, C., De Moraes, M.O., Pessoa, O.D., Torres, M.C., Silveira, E.R., Viana, F.A., Costa-Lotuf, L.V., 2009. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chemistry and Biodiversity* 6, 1224–1231.
- Bittner, M., Alarcón, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernández, V., Hoeneisen, M., Silva, M., 2001. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. *Boletín De La Sociedad Chilena De Química*. 46, 1-15.
- Block, S., Gerken, P., Peulen, O., Jolois, O., Mingeot-Leclercq, M.P, De Pauw-Gillet, M.C., Quetin-Leclercq, J., 2005. Induction of apoptosis in human promyelocytic

- leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. *Anticancer Research* 25, 363-368.
- Castro, N. C.; Valadares, M. C., 2005. Estudo da atividade citotóxica do *Synadenium umbellatum*. In: Congresso de pesquisa, ensino e extensão da UFG - Conpeex, 2.
- Costa, L.G., David, V.C., Pinto, R.M.C., Minozzo, B.R., Kozłowski Junior, V.A., Campos, L.A., Silva, R.Z., Beltrame, F.L., 2012. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22, 1070-1078.
- Cunha, L.C., Azeredo, F.S., Mendonça, A.C.V., Vieira, M.S., Pucci, L.L., Valadares, M.Z., Freitas, H.O.G., Sena, A.A.S., Junior, R.S.L., 2009. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 403-411.
- Dutra, R.C., Claudino, R.F., Bento, A.F., Marcon, R., Schmidt, É.C., Bouzon, Z.L., Pianowski, L.F., Calixto, J.B., 2011. Preventive and Therapeutic Euphol Treatment Attenuates Experimental Colitis in Mice. *PLoS ONE* 6(11): e27122. doi:10.1371/journal.pone.0027122.
- Dutra, R.C., Souza, P.R.C., Bento, A.F., Marcon, R., Bicca, M.A., Pianowski, L.F., Calixto, J.B., 2012. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 83, 531–542.
- Gebhardt, R., 2000. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Medica* 66, 99-105.
- Giridharan, P., Somasundaram, S.T., Perumal, K., Vishwakarma, R.A., Karthikeyan, N.P., Velmurugan, R., Balakrishnan, A., 2002. Novel substituted methylenedioxy lignin suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of c-myc and caspases leading to apoptosis. *British Journal of Cancer* 87, 98–105.
- Harikumar, K.B., Kuttan, G., Kuttan, R., 2009. *Phyllanthus amarus* inhibits cell growth and induces apoptosis in Dalton's lymphoma ascites cells through activation of caspase-3 and down regulation of Bcl-2. *Integrative Cancer Therapies* 8, 190–194.
- Hassan, E.M., Mohammed, M.M.D., Mohamed, S.M., 2012. Two New Phorbol-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii* Hook f. Leaves. *Records of Natural Products*. 6, 255-262.
- Jassbi, A.R., 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* 67, 1977-84.
- Kauffmann, C., Machado, A. M., Fleck, J. D., Provensi, G., Pires, V. S., Guillaume, D., Sonnet, P., Reginatto, F. H., Schenkel, E. P., Gosmann, G., 2004. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural Product Reports* 18, 153-157.
- Lee, C.W., Hong, D.H., Han, S.B., Jong, S.H., Kim, H.C., Fine, R.L., Lee, S.H., Kim, H.M., 2002. A novel stereo-selective sulfonylurea, 1-[1-(4-aminobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-6-sulfonyl]-4-phenyl-imidazolidin-2-one, has antitumoural efficacy in in vitro and in vivo tumor models. *Biochemical Pharmacology* 64, 473-480.
- Mata, R.S.C., Mendonça, D.I.M.D., Vieira, L., Santos, A.F., Silva, L.A., Gaspar, J.F., Martins, C., Rueff, J., Sant'Ana, A.E.G., 2011. Molluscicidal Activity of Compounds Isolated from *Euphorbia conspicua* N. E. *Br. Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 1880-1887.

- Melo-Reis, P.R., Bezerra, L.S.A., Vale, M.A.A.B., Canhête, R.F.R., Chen-Chen, L., 2011. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology* 71, 169-174.
- Momtaz, S., Lall, N., Hussein, A., Ostad, S.N., Abdollahi, M., 2010. Investigation of the possible biological activities of a poisonous South African plant *Hyaenanche globosa* (Euphorbiaceae). *Pharmacognosy Magazine* 21, 34-41.
- Moreira, C.P. S., Zani, C.L.; Alves, T.M.A., 2010. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* boiss. (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* e isolamento do constituinte majoritário. *Revista eletrônica de Farmácia* 7, 16-27.
- Mota, M.F.; Benfica, P.L.; Batista, A.C.; Martins, F.S.; Paula, J.R.; Valadares, M.C., 2012. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of Ethnopharmacology* 139, 319-329.
- Mrinalini, P.J.M., Vithayathil, S.M., Raju, C.S., 2002. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook. *Plant Science* 163, 131-139.
- Nogueira, I.A.L.; Leão, A.B.B.; Vieira, M.S.; Benfica, P.L.; Cunha, L.C.; Valadares, M.C., 2008. Antitumoural and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 474-478.
- Oliveira, R.B., Cunha, L.C., Valadares, M.C., Filho, M.J.P., Araújo, D.M., Paula, J.R., Bastos, M.A., 2005. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2, 143-145.
- Olivier, G.W., Rowan, M. G., Branch, S. K., Mohan, M. F., Molloy, K.C., 1992. Two esters of synadenol, a new lathyrane diterpenoid, from the latex of *Synadenium compactum* (Euphorbiaceae): a crystal structure analysis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1831-1835.
- Ortêncio, W.B., 1997. *Medicina popular do Centro-Oeste*. 2nd edition. Thesaurus, 322p.
- Peng, Q., Li, G., Maa, Y., Huang, J., Wei, X., Wang, J., 2012. Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. *Biochemical Systematics and Ecology* 43, 64-66.
- Plowman, J., Dykes, D.J., Hollingshead, M., Simpson-Herren, L., Alley, M.C. 1997. Human tumor xenograft models in NCI drug development. In: Teicher B.A., ed. *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval*. Totowa, NJ: Humana Press, 101 - 125.
- Premaratna, A., Shadaksharaswamy, M., Nanjappa, S., 1981. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 18, 32-35.
- Rahmat, A., Kumar, V., Fong, L.M., Endrini, S., Sani, H.A., 2003. Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 12, 292-5.
- Rajesh, R., Natarajua, A., Gowdaa, C.D.R., Freyb, B.M., Freyb, F.J., Vishwanath, B.S., 2006. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, *Biochimie* 88, 1313-1322.
- Rogério, A.P., Cardoso, C.R., Fontanari, C., Souza, M.A., Afonso-Cardoso, S.R., Silva, E.V.G., Koyama, N.S., Basei, F.L., Soares, E.G., Calixto, J.B., Stowell, S.R., Baruffi, M.D., Faccioli, L.H., 2007. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology* 17, 795-804.

- Salvador, J.A.R., Carvalho, J.F.S., Neves, M.A.C., Silvestre, S.M., Leitão, A.J., Silva, M.M.C., Melo, M.L.S., 2013. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Natural Product Reports* 30, 205–376.
- Silva, R.M.R.J., Teixeira, D.F., Sampaio A.L.F., Leitão, T.C.A., 2011. Analysis of in vitro activity of high dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. in human melanoma cells. *International Journal of High Dilution Research* 10, 183-193.
- Souza, M.A., Amancio-Pereira, F., Cardoso, C.R.B., 2005. Isolation and partial characterization of a D-galactose binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 705-716.
- Suárez, A.I., Chavez, K., Mateu, E., Compagnone, R.S., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F., Mijares, M., De Sanctis, J.B., 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Natural Product Communications*. 4, 1547-50.
- Tsopmo A., Kamnaing, P., 2011. Terpenoids constituents of *Euphorbia sapinii*. *Phytochemistry Letters* 4, 218–221.
- Valadares, M.C., Castro, N.C.C., Cunha, L.C., 2007. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas* 43, 631-38.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Yoshida, Z.A., Takido, M., 2000. Inhibitory Effect of Euphol, a Triterpene Alcohol from the Roots of *Euphorbia kansui*, on Tumour Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-stage Carcinogenesis in Mouse Skin. *Journal of Pharm and Pharmacology* 52, 119–124.
- Yue, G.G.L., Chan, B.C.L., Kwoka, H.F., Wong, Y.L., Leung, H.W., Ji, C.J., Fung, K.P., Leung, P.C., Tan, N.H., Lau, C.B.S., 2013. Anti-angiogenesis and immunomodulatory activities of an anti-tumor sesquiterpene bigelovin isolated from *Inula helianthus-aquatica*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 243-252.
- Zhang, X., Cambrai, A., Miesch, M., Roussi, S., Raul, F., Aoude-Werner, D., Marchioni, E., 2006. Separation of Delta5- and Delta7-phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1196-202.
- Zhong, Z.G., Huang, J.L., Liang, H., Zhong, Y.N., Zhang, W.Y., Wu, D.P., Zeng, C.L., Wang, J.S., Wei, Y.H., 2009. The effect of gallic acid extracted from leaves of *Phyllanthus emblica* on apoptosis of human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells. *Zhong Yao Cai* 32, 1097-101.

CAPÍTULO 3

3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados demonstraram que o látex de *S. grantii* apresenta efeito citotóxico concentração e tempo dependentes sobre as células de melanoma e apresentou ainda parada do ciclo celular na fase S-G2/M.

Nos ensaios *in vivo* o látex de *S. grantii* demonstrou redução significativa no volume do tumor de camundongos portadores de melanoma tratados com a forma popular de uso, mas as análises histológicas dos órgãos avaliados foram semelhantes no grupo tratado e não tratado.

O estudo cromatográfico e espectroscópico do látex da planta permitiu o isolamento e identificação do triterpeno eufol e do esteroide citrostadenol que apresentou reduzida atividade citotóxica frente à linhagem de melanoma pela metodologia do MTT.

Esses resultados reforçam a necessidade da continuidade desses estudos visando à elucidação dos mecanismos de ação antitumorais e comprovação de sua eficácia clínica. É importante ainda que seja continuado o estudo fitoquímico dessa espécie, ainda mais considerando que pouco se sabe sobre a química do gênero *Synadenium*.

ANEXO A – PARECER CEUA UEPG



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO**Processo CEUA – 03/2012**

Protocolo UEPG – 19326/2011

Título - “*Synadenium grantii* Hook (Euphorbiaceae): Uma avaliação Químico Biológica da espécie”**Interessado** – Flávio Luís Beltrame**Data de Entrada** – 01/03/2012**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.**
04/04/2014**Considerações**

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 40 camundongos C57/Bl6..

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

Professor Giovanni Marino Favero
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264