



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



FABIO BAHLS MACHADO

Atividade Antiproliferativa das Folhas de *Arctium lappa* L.

MARINGÁ, 2010

FABIO BAHLS MACHADO

Atividade Antiproliferativa das Folhas de *Arctium lappa* L.

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (área de concentração – Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

MARINGÁ, 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, força e oportunidade de evoluir.

Aos meus pais Maria Aparecida de Oliveira Bahls e Dario Machado, pela educação a mim concedida, incentivo aos estudos, apoio tanto moral quanto financeiro e aos meus irmãos Fabiana Bahls Machado e Dario Machado Júnior.

Ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello por sua orientação, dedicação e pelos ensinamentos prestados ao longo do mestrado.

Ao professor Dr. Celso Vataru Nakamura pela co-orientação deste trabalho.

A professora Dra. Cássia Mônica Sakuragui, pela identificação botânica.

Ao professor Dr. Wagner Vilegas da UNESP de Araraquara pela disponibilidade em me receber em seu laboratório.

A coordenação e aos professores do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo profissionalismo e dedicação.

Ao Dr. Heinrich Luftmann do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pela realização dos espectros de massas.

À Dra. Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pela realização dos espectros de ressonância e identificação das substâncias.

Ao técnico Cláudio Roberto Novello pela colaboração no isolamento das substâncias.

Aos amigos (as) Andrea Mayumi Koroishi, Cleyton Eduardo Mendes de Toledo, Eliana Harue Endo, Érika Gobi dos Santos, Fernanda Giacomini Bueno, Gisely Cristiny Lopes, Helena Francisca Mesquita de Carvalho, Helena Teru Takahashi, Luciana Grandis Wolf, Renata Longhini, Renato Bráz, Traudi Klein, Vanessa da Silva Carrara.

A Capes pela bolsa de demanda social e suporte financeiro.

A todas aquelas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.



FABIO BAHLS MACHADO

Data de nascimento: 17/02/1980

Naturalidade: Campo Mourão, PR

Filiação: Dario Machado

Maria Aparecida de Oliveira Bahls

Estado Civil: Solteiro

1998 - Segundo Grau: Instituto de Educação Estadual de Maringá, Maringá, PR.

2003 - 2006 – Graduação em Farmácia: Centro Universitário de Maringá, Maringá, PR.

2006 – 2007 – Especialização em Farmacologia: Centro Universitário de Maringá, Maringá, PR.

2008 - 2010 – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração – Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

2008 – 2009 – Participou do Projeto de Ensino intitulado “Aprimoramento de Técnicas Homeopáticas”, perfazendo a carga horária total de 240 h/a, Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

2009 - 2010 – Bolsista CAPES em nível de mestrado.

Desde 10/2009 – Coordenador e Professor das disciplinas de Homeopatia e Fitoterapia do Curso de Farmácia da Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, GO. Em 2010 assumiu também a disciplina de Farmacognosia.

Apresentação de parte do trabalho em congresso:

In vitro antiproliferative evaluation of onopordopicrin isolated from leaves of *Arctium lappa* L. Mello J, Machado F, Zanolli K, Novello C, Schuquel I, Nakamura T, Dias Filho B, Nakamura C. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, 29th August-2nd September 2010.

“A sorte é a soma da preparação com a perspicácia.”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Família <i>Asteraceae</i>	11
2.2 Gênero <i>Arctium</i>	11
2.3 <i>Arctium lappa</i>	12
2.4 Atividades Farmacológicas.....	14
2.4.1 Antioxidante	14
2.4.2 Antimicrobiana	14
2.4.3 Antiinflamatória.....	15
2.4.4 Antitumoral.....	15
2.4.5 Hipoglicemiante.....	17
2.4.6 Antiviral.....	17
2.4.7 Hepatoproteção	17
2.4.8 Trato gastrointestinal	18
2.4.9 Sistema Renal	18
2.4.10 Aplicações em dermatologia.....	18
2.4.11 Atividades diversas	19
3 OBJETIVOS	20
CAPÍTULO II.....	21
Introdução	24
Materiais e Métodos	24
Material vegetal	24
Extração e isolamento.....	25
Ensaio de atividade antiproliferativa	26

Análise estatística	27
Resultados e Discussão	27
Referências	32
Referências	32
ANEXOS	34
CAPÍTULO III.....	41
4 DISCUSSÃO GERAL	42
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da arctigenina (1) e arctiina (2).....	10
Figura 2 - <i>Arctium lappa</i> , folhas. Foto: Fabio Bahls Machado, 2009.....	12
Figura 3 - Estrutura química da onopordopicrina (3), arctiopicrina (4) e um derivado de arctiopicrina (5).....	14
Figura 1 – Substâncias isoladas onopordopicrina (1), dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2), dehidromelitensina (3), melitensina (4), dehidrovomifoliol (5) e loliolida (6).....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EB	Extrato Bruto
EBC	Extrato Bruto Clorofórmico
EBE	Extrato Bruto Etanólico
EBM	Extrato Bruto Metanólico
FAE	Fração Acetato de etila
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
MelQx	2-Amino-3,8-dimetilimidazo[4,5]quinoxalina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PhlP	2-Amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5] piridina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
VIH	vírus da imunodeficiência humana

RESUMO

Arctium lappa L. pertencente à família *Asteraceae* é uma planta introduzida do Japão e aclimatada no Brasil, e é utilizada na medicina popular em todo mundo na cura de diversas doenças. Estudos mostram que as partes estudadas são as raízes e frutos, sendo que estes apresentam diversas atividades biológicas dentre elas antitumoral, antioxidante, antiviral, capacidade hepatoprotetora, entre outras. Porém estudos com suas folhas são escassos. Este trabalho teve por objetivo coletar e identificar a espécie vegetal, assim como a avaliação antiproliferativa *in vitro* de extratos bruto (EB) e semipurificado, e de substâncias isoladas em células Caco-2. A espécie vegetal foi confirmada por comparação com o tipo nomenclatural como sendo *Arctium lappa* L. A partir das folhas secas e cominuídas de *A. lappa*, produziu-se o EB com solução hidroetanólica 50%, por turboextração durante 15 min. O ensaio em células Caco-2 resultou em atividade de CC₅₀ 347,6 µg/mL. Em seguida o EB foi particionado com hexano, acetato de etila e *n*-butanol, sendo que a fração acetato de etila (FAE) apresentou atividade antiproliferativa de CC₅₀ 24,7 µg/mL. A FAE foi submetida à cromatografia líquida à vácuo (CLV) contendo gel de sílica, empregando-se diversos sistemas eluente de polaridade crescente, sendo que a subfração acetato de etila apresentou o melhor resultado com CC₅₀ 21,9 µg/mL frente às células Caco-2. A subfração foi novamente cromatografada por meio de cromatografia “flash” em gel de sílica, isolando-se as substâncias onopordopicina (1), dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2), dehidromelitensina (3), melitensina (4), dehidrovomifoliol (5) e loliolida (6). As substâncias 2, 3, 4 e 5 foram identificadas pela primeira vez na espécie. A substância onopordopicina apresentou CC₅₀ 19,7 µg/mL, demonstrando ser uma possível droga de eleição para novos estudos em outras linhagens de células.

Palavras-chave: *Arctium lappa*, *Asteraceae*, células Caco-2, onopordopicina, lactonas sesquiterpênicas.

ABSTRACT

Arctium lappa L. the *Asteraceae* family is a plant introduced from Japan and cultivated in Brazil, and is used in folk medicine around the world in “curing” various diseases. Studies show that the parties studied are the roots and fruits, since they show various biological activities among them anticancer, antioxidant, antiviral, hepatoprotective capacity, among others. But studies of their leaves are scarce. This study aims to collect and identify plant species, as well as evaluation of in vitro antiproliferative crude (CE) and semipurified extracts, and isolated compounds in Caco-2 cells. The plant species was confirmed by comparison with the nomenclatural type as *Arctium lappa* L. From the dry and comminuted leaves *A. lappa*, produced to the CE solution with 50% hydro, for turboextraction for 15 min. The test in Caco-2 cells showed activity of CC_{50} 347.6 mg/mL. Then the CE was partitioned with hexane, ethyl acetate and *n*-butanol. The ethyl acetate fraction (EAF) showed antiproliferative activity of CC_{50} 24.7 g/mL. The EAF was submitted to vacuum liquid chromatography (VLC) containing silicagel, using various solvent systems of increasing polarity, and the ethyl acetate subfraction (EAFS) showed the best result with CC_{50} 21.9 g/mL against the Caco-2. The subfraction EAFS was further chromatographed by chromatography "flash" silicagel, and the compounds isolated was onopordopicrin (**1**), dehidromelitensin-8-(4'-hidroxy-metacrylate) (**2**), dehidromelitensin (**3**), melitensin (**4**), dehidrovomifoliol (**5**) and loliolide (**6**) weve isolated. The compounds 2, 3, 4 and 5 were first identified in the species. The compound onopordopicrin showed a CC_{50} of 19.7 g/mL, demonstrating to be a possible drug of choice for further studies in other cell lines.

Keywords: *Arctium lappa*, *Asteraceae*, Caco-2 cells, onopordopicrin, sesquiterpene lactones.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem na prevenção e no tratamento de diversas doenças, desde a antiguidade aos tempos modernos (YAMASHITA, 2006). As propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram descobertas e propagadas pelas gerações, por meio da observação e da experimentação pelos povos primitivos, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA, 2004). Os principais produtos ativos com propriedades medicinais são oriundos, principalmente, do metabolismo secundário vegetal. As plantas medicinais se destacam como grande fonte de novos recursos terapêuticos, e é a partir destas que a indústria farmacêutica desenvolve os medicamentos (SANTOS, 2007).

Nas duas últimas décadas, a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos tem provocado o aumento do uso de produtos medicinais à base de plantas em diversos países (TUROLLA, 2004; YAMASHITA, 2006). Este aumento tem instigado consumidores, governos, profissionais da área de saúde a buscarem informações sobre eficácia, qualidade e a segurança do uso destas plantas. Isto tem incentivado pesquisas científicas em diversas áreas do conhecimento com o objetivo de avaliar a toxicidade, efeitos colaterais, contra-indicações, mutagenicidade, entre outras, de plantas medicinais, bem como realizar ensaios farmacológicos e clínicos que comprovem sua eficácia (YAMASHITA, 2006).

Grande número de empresas farmacêuticas, incluindo alguns dos maiores grupos farmacêuticos mundiais, está investindo neste segmento. Por esta razão, as plantas medicinais desempenham hoje um papel muito importante na pesquisa farmacológica, não apenas pela utilização direta de seus constituintes como agentes terapêuticos, mas como precursores na síntese de novas drogas e de compostos farmacologicamente ativos (TUROLLA, 2004).

Outro fator relevante é que mesmo com o crescimento dos laboratórios farmacêuticos e o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permanecem como uma forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo. Sendo assim, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos e sua produção em escala industrial. O novo avanço dos medicamentos fitoterápicos, longe de ser uma volta ao passado, caracteriza-se pela busca de uma produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizaram os estágios iniciais de sua utilização (TUROLLA, 2004).

O “renascimento” dos fitoterápicos cria oportunidades para a indústria farmacêutica brasileira. Desde a expansão dos fármacos sintéticos a partir de grandes laboratórios que os produzem em escala mundial, o Brasil esteve à margem do processo de desenvolvimento de novos fármacos. Nas últimas décadas, a indústria farmacêutica instalada no país tornou-se bem desenvolvida na produção de especialidades farmacêuticas, mas é quase ausente o desenvolvimento e produção de novos fármacos, já que o elevado volume de capital envolvido nesta área está concentrado em grandes companhias com base mundial de produção, o que impõe barreiras de difícil transposição à entrada de novas empresas. Para o desenvolvimento de fitofármacos, entretanto, a situação pode ser diferente.

O Brasil, por sua vez possui a maior biodiversidade em plantas do planeta (TUROLLA, 2004; BIAZÚS, 2008), ou seja, cerca de 20% do número total de espécies do mundo, pode, desta forma, sobressair-se no cenário mundial da produção de fitomedicamentos (SANTOS, 2007). Também possui conhecimento popular em relação à propriedade medicinal de muitas ervas e plantas que poderiam balizar o desenvolvimento de novos medicamentos. Além disso, diversas universidades brasileiras possuem grupos de pesquisas em fitoterápicos, que estudam as plantas de suas regiões e descobrem suas propriedades farmacológicas em laboratório (BIAZÚS, 2008). Além da capacidade científica que poderá permitir o seu avanço em direção ao desenvolvimento de fitoterápicos, este é um segmento promissor da indústria farmacêutica mundial. Outro fator é que, o aspecto econômico justifica a intensificação dos esforços de pesquisa de fitoterápicos no Brasil (TUROLLA, 2004), pois este é um dos setores que mais cresce, e representa cerca de 24% do faturamento bruto das indústrias (SANTOS, 2007).

O crescente mercado de fitoterápicos, aliado ao potencial natural brasileiro com a sua biodiversidade e o conhecimento popular, pode permitir o desenvolvimento de novos produtos e medicamentos inovadores (BIAZÚS, 2008).

A importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos fica evidente quando se observa que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais (25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais) (SANTOS, 2007).

A indústria pode encontrar na natureza uma fonte inesgotável de novas estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência, desenvolver novos medicamentos que serão possíveis alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou tratamento adequado (SANTOS, 2007).

Por outro lado, a industrialização e a urbanização são acompanhadas de modificações nos hábitos de vida das pessoas. Os aspectos referentes ao estilo de vida das populações devem receber atenção quanto a sua possível participação em processos carcinogênicos; a persistência, a intensificação e a introdução de novos hábitos podem colaborar com o desenvolvimento das neoplasias malignas (VACCAREZZA, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano surgem nove milhões de novos casos de câncer no mundo. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, mais de 500 mil novos casos de câncer surgem por ano, e aproximadamente 100 mil pessoas morrem anualmente (INCA, 2007). Contudo, apesar da variedade de fármacos existentes para o tratamento de diferentes tipos de câncer, problemas referentes à baixa seletividade dos antineoplásicos e ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas dão sustentação para a busca por novas moléculas com propriedades antiproliferativas (FROTA JUNIOR, 2008). Com este intuito tem-se que mais de 60% dos agentes quimioterápicos aprovados e 60-80% das novas drogas antibacterianas e anticâncer derivaram de produtos naturais (SANTOS, 2007).

Devido à necessidade de busca de novas drogas para o combate ao câncer, a *Arctium lappa* L. (*Asteraceae*) vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa. O primeiro relato da literatura envolvido com atividade antitumoral foi realizado por Földeák e Dombrádi (1964). Em teste de carcinogênese tumoral em camundongos, induzido por 7,12-dimetil-benzatraceno, a bardana apresentou efeito antitumoral (WANG et al., 2005). Este efeito deve-se provavelmente a presença das lignanas arctigenina (**1**) e arctiina (**2**) (Figura 1) (LIMA et al., 2006). Recentemente, foi relatado que a arctiina induz a inibição do crescimento do câncer de próstata em células PC-3 em humanos. A proteína ciclina D1, a qual é expressa em vários tipos de células tumorais humanas, pode ser regulada pela arctiina, contribuindo assim pelo menos em parte para seu efeito anti-proliferativo (MATSUZAKI et al., 2008).

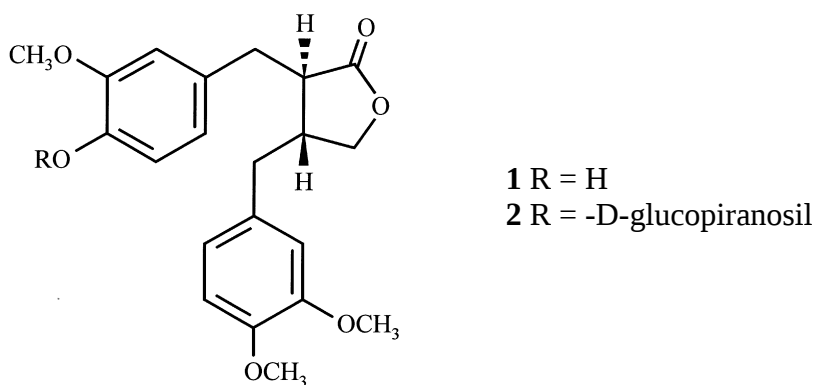


Figura 1 - Estrutura química da arctigenina (**1**) e arctiina (**2**).

Com base nestes dados este trabalho propõe produzir extratos, purificar e isolar substâncias das folhas de *Arctium lappa* L. e avaliar suas propriedades antiproliferativas em células Caco-2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

Esta família compreende cerca de 1.600 gêneros com aproximadamente 23.000 espécies. No Brasil a família também está bem representada, ocorrendo aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), sendo, portanto a maior família das Angiospermas. As plantas são de hábito muito variado, apresentando-se como: ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente árvores. A grande maioria dos gêneros (cerca de 98%) é constituída por plantas de pequeno porte (JOLY, 2005).

No entanto a *Asteraceae* é particularmente comum nas formações abertas do Brasil, principalmente no cerrado, onde se destacam espécies de *Colea* e *Aspilia*. Nos campos são frequentes espécies de *Vernonia*, *Baccharis* e *Senecio*. Nos campos rupestres destaca-se *Lychnophora*, com porte geralmente arbustivo e folhas rígidas, sendo um dos elementos de maior destaque neste tipo de vegetação. No interior das florestas densas as *Asteraceae* são pouco comuns e apenas alguns gêneros, como *Adenostemma*, podem ser encontrados. Já em florestas secundárias podem ser relativamente comuns, especialmente espécies arbustivas ou arbóreas de *Vernonia*, como assa-peixe (*V. polyanthes*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Dentre alguns gêneros que foram introduzidos no Brasil temos o *Arctium* (SOUZA; LORENZI, 2005), uma espécie deste gênero produz longas raízes tuberosas, conhecida como bardana ou ainda “gobo” pelos japoneses (JOLY, 2005).

2.2 GÊNERO ARCTIUM

Kharlamov et al. (1968), realizaram os primeiros estudos farmacognósticos de *Arctium tomentosum* Mill., e *Arctium leiospermum* Juz. et Serg. Em 1971, Saleh e Bohm detectaram flavonóides em *Arctium minus* (Hill) Bernh. (*Compositae*).

Elevada quantidade de substâncias pécticas, cerca de 1,9% de massa úmida, foi detectada nas folhas e caules de *Arctium* sp. A pectina em pó obtida apresentou-se na cor cinza claro, onde a produção total foi de 17% da massa seca da matéria-prima (MKRTCHIAN; SNAPIAN; NIKOGOSIAN, 1998).

As sementes de *A. tomentosum* apresentaram efeitos sobre a secreção gástrica em ratos, onde diferenças na ação sobre a musculatura lisa do estômago e do intestino foram detectadas (OS´KINA et al., 1999).

Óleo das sementes de *A. minus* foi analisado para verificação de ácidos graxos em sua composição (TSEVEGSÜREN; AITZETMÜLLER; VOSMANN, 1999).

Uma formulação tópica contendo extrato das raízes de *A. majus* apresentou baixa capacidade antioxidante e na captura de radicais livres (DI MAMBRO; FONSECA, 2005).

2.3 ARCTIUM LAPPA

A *Articum lappa* L. é conhecida no Brasil como bardana, erva-dos-tinhosos, pegamassa (HOLETZ et al., 2002; SANTOS, 2007), carrapicho-de-carneiro e carrapicho-grande (HOLETZ et al., 2002), orelha de gigante, bardana-maior (Figura 2). É distinguida no Japão como gobo e, denominada nos países de língua espanhola como lampazo, bardane na França e burdock nos países de língua inglesa (SANTOS, 2007). No Brasil seu crescimento é vigoroso, sendo considerada uma espécie daninha em pomares e em terrenos baldios na região sul (HOLETZ et al., 2002).



Figura 2 - *Arctium lappa*, folhas. Foto: Fabio Bahls Machado, 2009.

Em 1955, Browinska-Szmalowa apresentou um estudo sobre a diferenciação macroscópica de *A. lappa* L. Esta é uma planta perene, originária da Europa, pertencente à

família *Asteraceae* (HOLETZ et al., 2002), cresce preferencialmente em regiões com temperatura média de 16 e 22 °C (HOLETZ et al., 2003) e é cultivada há muito tempo no Japão e Taiwan, sendo consumida *in natura* (LIMA et al., 2006).

A bardana caracteriza-se por apresentar folhas grandes e flores arroxeadas, chegando até 2,5 metros de altura (HOLETZ et al., 2002). Suas folhas podem medir até 40 cm de comprimento, já as raízes podem chegar a 1,2 m de profundidade no solo com diâmetro de 1 cm, sendo carnosas, fusiformes, brancas internamente e pardas externamente. A coleta deve ser realizada antes da floração, pois as propriedades terapêuticas são reduzidas com o amadurecimento das raízes. Os autores divergem quanto ao período adequado para a coleta. Enquanto Holetz e colaboradores (2003) defendem que a planta necessita de períodos frios para florescer, Santos (2007) propõe que a floração geralmente ocorra no verão. Por sua vez as flores e frutos são formados após o segundo ano de cultivo (SANTOS, 2007).

Esta planta contém diversos constituintes, principalmente as lignanas arctiina (2), e arctigenina (1) (OMAKI; YAKUGAKU, 1935; YAMANOUCHI et al., 1976; HAN et al., 1992; SUN; SHA; GAO, 1992; SUN; SHA; YUAN, 1993; HAN et al., 1994; MORITANI et al., 1996; MING et al., 2004; LÜ et al., 2007) em menor quantidade. Um dos primeiros relatos da substância arctigenina foi em 1929 por Shinoda e Yakugaku. Arctiina e arctigenina obtidas das sementes foram caracterizadas e usadas como padrões para determinação em droga bruta por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). (SUN; SHA; GAO, 1992).

Das sementes isolaram-se também as lignanas: diarctigenina (HAN et al., 1994; PARK et al., 2007), neoarctina (WANG; YANG, 1993; YONG; GU; QIU, 2007), lappaol, matairesinol, daucosterol (WANG; YANG, 1993), lappaol C, lappaol D e lappaol F (PARK et al., 2007). Suas raízes contêm inulina (45-60%), mucilagens, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos (ácido cafeico e derivados, ácido clorogênico e isoclorogênico), óleo essencial, poliacetilenos (ácido arético, arctinona, arctinol, arctinal), taninos e flavonóides (baicalina) (SANTOS, 2007). Das folhas foram isolados diversos compostos dentre eles estão os germacranolídeos onopordopicrina (3) (BARBOSA-FILHO et al., 1993; SAVINA et al., 2006), arctiopicrina (4) e um derivado da arctiopicrina (5) (Figura 3) (SAVINA et al., 2006).

Variações de ácido clorogênico e ácido cafeico provindos da raiz com casca da bardana, com e sem tratamento de calor, raiz descascada com e sem tratamento de calor foram analisados por CLAE. Verificou-se que estes componentes estão presentes em maior quantidade na pele da raiz da bardana e que o índice de ácido clorogênico era mais elevado que o do ácido cafeico (CHEN; WU; CHEN, 2004).

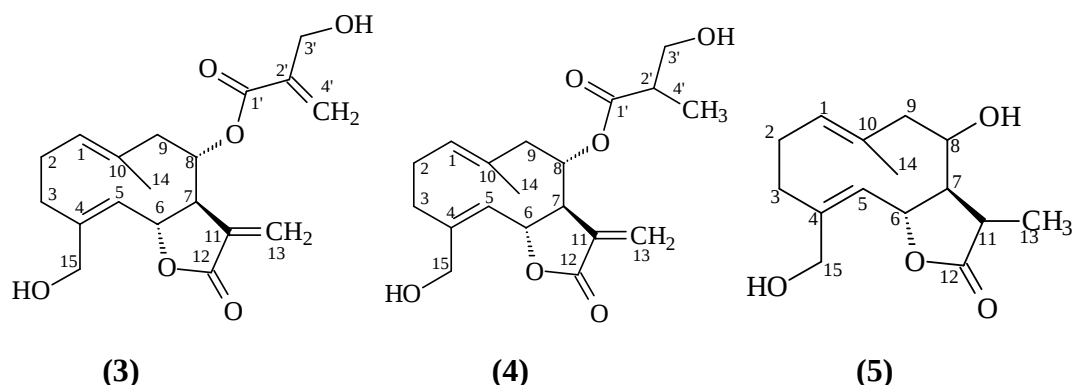


Figura 3 - Estrutura química da onopordopicrina (3), arctiopicroina (4) e um derivado de arctiopicroina (5).

2.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

2.4.1 Antioxidante

Várias evidências experimentais apontam atividade antioxidante para a bardana. Esta ação foi considerada como o mecanismo responsável pela hepatoproteção observada após hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno, tetracloreto de carbono (CCl_4) e etanol em ratos (SANTOS, 2007).

O extrato metanólico da bardana e seus componentes, ácido clorogênico e ácido cafeico mostraram atividade antioxidante significativa frente a macrófagos RAW 264,7 (WANG et al., 2006). Observou-se atividade antioxidante dos extratos das raízes da bardana onde o extrato bruto etanólico foi mais potente que o extrato bruto clorofórmico na capacidade sequestradora de radicais livres, sobre o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (SANTOS, 2007). Produtos isolados como as lignanas arctigenina (1) e arctiina (2) encontradas predominantemente nas raízes e frutos apresentaram propriedade antioxidante, bem como o extrato etanólico das folhas (LIMA et al., 2006).

De acordo com Chen e colaboradores (2004), a bardana possui atividade significativa no seqüestro de radicais livres, sendo que esta foi atribuída aos ácidos clorogênico e caféico, apresentando atividade mais elevada que a vitamina E.

2.4.2 Antimicrobiana

A planta possui propriedades antibacteriana (MORITANI et al., 1996; KARDOSHOVÁ et al., 2003) e antifúngica (MORITANI et al., 1996), em especial anticandida (HOLETZ et al., 2002). Os extratos etanólicos das folhas e das flores da bardana apresentam atividade

contra bactérias Gram-positivas como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos *Shigella sonnei* e *Shigella flexnei*, enquanto o mesmo extrato obtido da raiz só apresentou atividade contra cepas Gram-negativas (HOLETZ et al., 2003). Brasileiro et al. (2006) confirmaram a atividade contra *Staphylococcus aureus*. A atividade antibacteriana também foi demonstrada para a raiz (CHEN et al., 2004).

Segundo Pereira et al. (2005) os constituintes das folhas da fração hexânica a partir do extrato bruto e suas sub-frações exibiram grande potencial de inibição microbiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, microrganismos comumente encontrados em infecções endodônticas. Fração acetato de etila obtida das folhas de *A. lappa* inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (GENTIL et al., 2006).

2.4.3 Antiinflamatória

A bardana também é empregada no tratamento de doenças inflamatórias (MORITANI et al., 1996; HOLETZ et al., 2002; CHEN et al., 2004; LIMA et al., 2006). Para Park et al. (2007), algumas lignanas isoladas desta planta podem ser candidatas valiosas no tratamento de várias doenças inflamatórias. O extrato bruto de suas raízes apresentou diminuição significativa em edemas de patas de ratos e atividade na captura de radicais livres (LIN et al., 1996; CHEN et al., 2004; SANTOS, 2007), sendo este efeito atribuído a alguns compostos predominantes nas raízes e frutos da planta, como as lignanas arctigenina (1) e a arctiina (2) (LIMA et al., 2006). Ela também é usada na medicina popular para alívio de garganta inflamada e na diminuição de inchaço (WANG et al., 2005).

Seu extrato bruto metanólico (EBM) suprimiu significativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7, podendo desta forma influenciar na atividade antiinflamatória em paredes vasculares e prevenir a evolução da aterosclerose. Provavelmente o EBM pode modular a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a produção de óxido nítrico no organismo humano (WANG et al., 2006).

2.4.4 Antitumoral

A atividade antitumoral de suas frações foi inicialmente descrita por Földeák e Dombrádi (1964). O efeito é atribuído provavelmente a presença das lignanas arctigenina (1) e arctiina (2) (LIMA et al., 2006). A arctiina isolada das sementes desta planta foi avaliada

quanto à capacidade quimioprotetora, apresentando efeito protetor na carcinogênese de glândula mamária de ratas, induzida por PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5] piridina). Observou-se pouca influência na hepatocarcinogênese induzida em ratos por MelQx (2-amino-3, 8-dimetilimidazol [4,5] quinoxalina), sendo que o PhIP é considerado um carcinógeno pancreático fraco (HIROSE et al., 2000). Acredita-se que o ácido clorogênico potencialize a citotoxicidade da arctigenina (MORITANI et al., 1996).

As células tumorais geralmente proliferam-se rapidamente e sua exigência de nutrientes essenciais, assim como oxigênio, sempre excede o estoque devido ao crescimento desregulado e ao estoque vascular insuficiente e impróprio para isto (AWALE et al., 2006). Porém, células cancerígenas mostram uma capacidade inerente de tolerar condições extremas, modulando seu metabolismo energético. Desta maneira, privar células cancerígenas de nutrientes pode ser uma estratégia no desenvolvimento de uma droga anticancerígena.

Awale e col. (2006) demonstraram que o extrato diclorometano de *A. lappa* exibiu 100% de citotoxicidade na privação nutricional numa concentração de 50 µg/mL. Após isolamento, a substância identificada como citotóxica foi a arctigenina (**1**) e esta apresentou 100% de citotoxicidade em células privadas de nutrientes na concentração de 0,01 µg/mL. A lignana arctigenina atenuou a proliferação de linfócitos B e T, e a produção de TNF- α (fator alfa de necrose tumoral) estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) em macrófagos (SANTOS, 2007). Esta por sua vez mostrou-se com uma potente atividade antiproliferativa contra células MH60 (IC₅₀: 1,0 µM) e esta atividade foi sugerida devido a apoptose (MATSUMOTO; HOSONO-NISHIYAMA; YAMADA, 2006). Segundo Ishihara et al. (2006), arctigenina (**1**) pareceu ser um novo regulador da supressão de resposta ao choque, podendo ser útil para hipertermia na terapia do câncer.

No entanto, a arctiina (**2**) não apresentou efeito significativo na carcinogênese de próstata em ratos transgênicos SV 40 Tag (ZENG et al., 2005).

Ming e colaboradores (2004) relataram que a arctiina causa inibição do crescimento do câncer de próstata em células PC-3 em humanos. Embora, o mecanismo de inibição do crescimento da arctiina sobre esta linhagem de células, permanece desconhecido. Em outro experimento em células de câncer de próstata o extrato metanólico das sementes apresentou atividade contra linhagem celular LNCaP. Após fracionamento bioguiado verificou-se sua citotoxicidade, chegando-se às substâncias lappaol C, lappaol A, arctignan E, lappaol F e arctiina (**2**). As substâncias lappaol C, A e F apresentaram atividade com valores de IC₅₀ de 8, 16 e 40 µg/mL, respectivamente.

2.4.5 Hipoglicemiante

A busca por drogas hipoglicemiantes, especialmente de plantas medicinais usadas pela medicina popular vem sendo estudadas (BARBOSA-FILHO et al., 2006). A bardana, utilizada popularmente com atividade hipoglicemiante (CAVALLI et al., 2007), em um teste realizado em camundongos os quais foram tornados diabéticos por estreptozoocina, a condição diabética dos animais foi agravada após 28 dias em tratamento (SWANSTON-FLATT et al., 1989). Foi determinado então, que suas raízes e folhas quando não apresentam florescimento, possuem propriedades hipoglicêmicas (HOLETZ et al., 2003).

2.4.6 Antiviral

Diversos produtos vegetais são usados por pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em alguns países sem nenhuma comprovação científica de possuir atividade anti-VIH (vírus da imunodeficiência humana) (OMS, 1989). A arctigenina por sua vez, apresentou ação inibitória sobre a replicação do VIH, e este efeito foi caracterizado pela redução da expressão de proteínas do VIH e na redução da transcriptase reversa em 80-90%. A baicalina presente na planta também possui atividade inibitória sobre a replicação do VIH, principalmente quando associada ao zinco, diminuindo a atividade recombinante da transcriptase reversa e a entrada do VIH nas células hospedeiras (SANTOS, 2007).

De fato, componentes presentes na bardana, como a arctina (2) e o ácido clorogênico foram encontrados em “Yinqiaosan” planta originária da China, e estes apresentaram atividade frente ao vírus influenza (SHI et al., 2003). A arctigenina (1) isolada da bardana foi utilizada na concentração de 100 µg/kg, onde prolongou a sobrevivência dos ratos submetidos à infecção pelo vírus influenza, podendo, desta forma ser eficaz para o tratamento deste vírus (YANG et al., 2005). Esta substância também apresentou atividade neuroprotetora, antiinflamatória e foi capaz de reduzir a severidade do vírus da encefalite japonesa tanto *in vivo* como *in vitro* (SWARUP et al., 2008).

2.4.7 Hepatoproteção

A bardana também é utilizada como bebida para tratamento de hepatite (LIMA et al., 2006), apresentando eficácia hepatoprotetora, sendo esta associada com a capacidade de capturar radicais livres (CHEN et al., 2004). Em outro experimento, onde realizou-se administração crônica de etanol, a bardana apresentou efeito hepatoprotetor (LIMA et al.,

2006). O mecanismo de hepatoproteção poderia ser atribuído à atividade antioxidante, pois esta diminui a tensão de oxidação dos hepatócitos ou então a outros mecanismos protetores desconhecidos (LIN et al., 2002).

2.4.8 Trato gastrointestinal

Em 2007, Santos avaliou os efeitos das raízes da bardana sobre o trato gastrointestinal, usando os extratos brutos: etanólico (EBE) e clorofórmico (EBC). Estes extratos apresentaram efeitos gastroprotetores em lesão aguda induzida por etanol e em lesão crônica induzida pelo ácido acético. O EBC apresentou maior efetividade na mucosa lesionada pelo etanol, enquanto que o EBE proporcionou uma ação cicatrizante mais evidente.

Na avaliação gastrointestinal foi observado que a via colinérgica não está envolvida de forma significativa no mecanismo de ação gastroprotetor dos extratos da bardana (SANTOS, 2007).

Novamente, o extrato clorofórmico das raízes de *A. lappa* foi avaliado e este protegeu ratos de lesões gástricas, reduzindo secreção gástrica via inibição gástrica de H⁺, K⁺ -ATPase (SANTOS, 2008).

2.4.9 Sistema Renal

Quando as raízes e folhas da bardana não estão florescendo, esta planta possui propriedades diuréticas (HOLETZ et al., 2003; BARBOSA-FILHO et al., 2006), sendo utilizada *in natura* como bebida para hipertensão (LIMA et al., 2006). Esta propriedade diurética está relacionada à capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina, desta forma sendo um alvo terapêutico para o tratamento da hipertensão arterial (BARBOSA-FILHO et al., 2006). Além disto, a bardana apresenta aplicações como depurativo (HOLETZ et al., 2002). Finalmente, infusões da planta mostraram efeitos benéficos em urolitíases (GRASES et al., 1994).

2.4.10 Aplicações em dermatologia

Popularmente, a raiz e as folhas da bardana são empregadas em doenças da pele (MORITANI et al., 1996), podendo ser utilizada com outras ervas para clarear a pele (HOLETZ et al., 2002). Sua aplicação estende-se a outras afecções da pele tais como;

tratamento de abscessos, erupções cutâneas, picaduras de insetos, micoses, afecções genitais, furúnculos (HOLETZ et al., 2003) e em psoríase (SANTOS, 2007).

No entanto, dermatites de contato devido à bardana foram relatadas por Rodrigues e col. (1995), assim como anafilaxias (SASAKI et al., 2003).

2.4.11 Atividades diversas

O efeito de um polissacarídeo tipo inulina, presente nas raízes da bardana, caracterizou-se como supressor da tosse. Esta ação foi equivalente a alguns medicamentos não narcóticos usados na prática clínica para o tratamento da tosse. Esta substância apresenta resposta significativa frente aos testes de atividade mitogênica e comitogênica, comparável ao Zymosan (imunomodulador), confirmando a atividade imunológica (SANTOS, 2007). Polissacarídeos de algumas plantas, dentre elas a bardana, tiveram ação antitussígena (SUTOVSKA et al., 2007).

O extrato aquoso da bardana mostrou atividade significativa no fator de agregação plaquetária (PAF) em plaquetas de coelhos (IWAKAMI et al., 1992).

As raízes são utilizadas, popularmente, como antipirético (LIN et al., 2002), onde a baicalina presente na bardana seria o responsável por esta atividade (SANTOS, 2007), além da infusão das folhas ser utilizada com a mesma finalidade (LIMA et al., 2006).

O extrato bruto etanólico obtido das raízes da bardana e da fração clorofórmica deste extrato, causaram efeitos depressores sobre o sistema nervoso central (SNC), provavelmente envolvendo o sistema gabaérgico (SANTOS, 2007).

A bardana é utilizada como uma verdura em Taiwan para uso dietético. Tornou-se uma bebida popular em Taiwan na década passada (CHEN et al., 2004), sendo usada como digestiva. Esta também não é recomendada no período gestacional, devido à presença de uma atividade estimulante uterina (SANTOS, 2007).

Finalmente, evidências experimentais da bardana indicam apresentar atividade como diaforética (SANTOS, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil antiproliferativo *in vitro* do extrato hidroalcoólico, frações semipurificadas e substâncias isoladas das folhas de *Arctium lappa* L. frente às células Caco-2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Coletar e identificar taxonomicamente a espécie vegetal.

3.2.3 Purificar, isolar e caracterizar substâncias a partir de extratos e/ou frações semipurificadas.

3.2.4 Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do extrato bruto, semipurificado e substâncias isoladas em células Caco-2.

CAPÍTULO II

Atividade Antiproliferativa das Folhas de *Arctium lappa* L. (manuscrito a ser submetido à avaliação e possível publicação)

Atividade Antiproliferativa das Folhas de *Arctium lappa* L.

Fabio Bahls Machado¹, Karine Zanolli¹, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel², Cláudio Roberto Novello², Cássia Mônica Sakuragui³, Heinrich Luftmann⁴, Celso Vataru Nakamura¹, Tânia Ueda Nakamura¹, Benedito Prado Dias Filho¹, João Carlos Palazzo de Mello^{1*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá-PR, Brasil.

² Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá-PR, Brasil.

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pedro Calmon, 550, BR-21941-901, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Organisch-Chemisches Institut, Universität Münster, D-48149, Münster, Alemanha.

*** Endereço para correspondência**

Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia
Avenida Colombo, 5790
Maringá – PR
BR-87020-900 – Brazil
Fone/Fax: (+55-44-3011-4816/5050)
E-mail: mello@uem.br

Resumo

Arctium lappa, *Asteraceae*, é utilizada na medicina popular em todo mundo. Esta apresenta diversas atividades biológicas, em especial atividade antitumoral em diversas linhagens de células *in vitro*. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antiproliferativa, por meio de biomonitoramento em células Caco-2 *in vitro*, do extrato bruto, fração semipurificada e substâncias isoladas das folhas de *A. lappa*. O extrato bruto foi obtido com solução hidroetanólica 50% e em seguida particionado com hexano, acetato de etila e *n*-butanol, sendo que a fração acetato de etila (FAE) apresentou atividade antiproliferativa mais significativa que as demais testadas. A FAE foi submetida à cromatografia em coluna sequencial com gel de sílica obtendo-se assim, onopordopicina (**1**), uma mistura contendo onopordopicina (**1**) com dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (**2**), dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (**2**) com dehidromelitensina (**3**), onopordopicina (**1**) com melitensina (**4**), dehidrovomifoliol (**5**) e loliolida (**6**). As substâncias foram identificadas por métodos espectroscópicos (RMN, EM) e comparação com dados de literatura. As substâncias **2**, **3**, **4** e **5** foram descritas pela primeira vez na espécie vegetal. O resultado frente às células Caco-2 forneceu as seguintes CC₅₀ (µg/mL): onopordopicina (**1**) 19,9, a mistura dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (**2**) com onopordopicina 24,6, enquanto que a substância (**5**) não apresentou atividade. A mistura das substâncias dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (**2**) com dehidromelitensina (**3**), bem como as substâncias (**4**) e (**6**) não foram avaliadas.

Palavras-chave: *Asteraceae*, *Arctium lappa* L., antiproliferativa, onopordopicina, dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato), dehidromelitensina, melitensina, dehidrovomifoliol, loliolida.

Abreviações:

FAE Fração acetato de etila

FAQ Fração aquosa

FH Fração Hexano

FNB Fração *n*-butanol

Introdução

Arctium lappa L., *Asteraceae*, é uma planta introduzida do Japão e aclimatada no Brasil, sendo extensamente utilizada na medicina popular [1]. O primeiro relato encontrado envolvendo atividade antitumoral foi realizado por Foldeak e Dombradi [2]. Teste realizado em células de câncer de próstata mostrou que o extrato metanólico das sementes apresentou atividade contra linhagem celular LNCaP. Em fracionamento bioguiado frente à citotoxicidade, isolaram-se as substâncias lappaol A, C e F, arctignana E e arctiina, sendo que lappaol A, C e F apresentaram atividade com valores de IC₅₀ de 8, 16 e 40 µg/mL, respectivamente [3]. As raízes contêm inulina (45-60%), mucilagens, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, óleo essencial, poliacetilenos, taninos [4], flavonóides [5], e os frutos lignana [6]. Lactonas sesquiterpênicas são características em *Asteraceae* possuindo atividades citotóxica, antitumoral, entre outras [7]. A onopordopicrina (lactona sesquiterpênica), isolada das folhas de *A. lappa* [8], apresentou IC₅₀ de 15 µM em MTT e PTP em linhagem de leucemia promielocítica (HL60) [9]. Em outro experimento a onopordopicrina inibiu o fator de necrose tumoral [10]. Este trabalho avaliou a atividade antiproliferativa bioguiada frente a células Caco-2 em extrato bruto, fração semipurificada até obtenção de substâncias com atividade, das folhas de *A. lappa*.

Materiais e Métodos

Geral

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian, Mercury Plus 300 BB, 300 MHz, operando a 300,060 MHz para ¹H e 75,457 MHz para ¹³C, empregando-se solventes deuterados (CDCl₃ e/ou CD₃OD/CDCl₃). Os espectros de massas foram obtidos em HR-ESI-TOF por MicroTof (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, com o Dr. Heinrich Luftmann.

Material vegetal

As folhas de *Arctium lappa* L. foram coletadas em fevereiro de 2008 (17,3 kg), na Chácara Dois Irmãos, Marialva, PR, Brasil (S23°27'47,0"; W051°45'52,0"; h:523 m). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número RFA 35777. A identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui, por comparação com o tipo nomenclatural. Após a secagem (2886 g), as folhas (DV) foram moídas em moinho de martelos (Tigre ASN-6).

Extração e isolamento

A droga vegetal seca (DV; 2886 g) foi desengordurada com hexano na proporção 1:5 (m/v) com 4 extrações de 8 h cada. A DV desengordurada (2766 g), na proporção 1:10 (m/v) em etanol/água (1:1; v/v), foi extraída em Ultra-turrax® UTC115KT por 15 min ($t < 40$ °C). A seguir, filtrou-se e concentrou-se o turbolizado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, seguido de liofilização, obtendo-se o extrato bruto (EB; 603,8 g). O EB foi solubilizado em água (50 g em 500 mL) e particionado com hexano, acetato de etila e *n*-butanol (500 mL de cada solvente; 12 vezes). As fases orgânicas (hexano, acetato de etila e *n*-butanol) foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se FH, FAE e FNB, respectivamente, e fração aquosa restante (FAQ). A FAE (22 g) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (CLV), empregando-se coluna (h: 200 mm Ø 65 mm) contendo gel de sílica 60 (0,063-0,200mm) Merck® como fase estacionária e a sequência de fase móvel de polaridade crescente, em proporção volumétrica: HEX (880 mL; 0,05 g), CH₂Cl₂ (1100 mL; 0,53 g), AcOEt (1780 mL; 12,7 g), MeOH (1870 mL; 7,7 g) e MeOH:H₂O (1:1; 1760 mL; 0,59 g). A subfração acetato de etila (FAE#3; 12,7 g) foi submetida por quatro vezes à CLV, coluna (h: 200 mm, Ø 65 mm; h: 350 mm, Ø 27 mm) nas condições anteriores com o sistema eluente (v/v): CHCl₃ (1350 mL), CHCl₃:MeOH (8:2; 600 mL), CHCl₃:MeOH (6:4; 450 mL), MeOH (525 mL) e *n*-butanol (1760 mL). A subfração CHCl₃:MeOH (8:2), denominada FAE#3#2 (4,7 g), foi submetida à CLV com: HEX:AcOEt (60:40; 1000 mL), HEX:AcOEt (55:45; 500 mL), HEX:AcOEt (50:50; 900 mL), HEX:AcOEt:MeOH (50:49:1; 400 mL), HEX:AcOEt:MeOH (50:48:2; 200 mL), HEX:AcOEt:MeOH (50:45:5; 2200 mL), HEX:AcOEt:MeOH (50:40:10; 200 mL), HEX:AcOEt:MeOH (50:30:20; 200 mL), AcOEt:MeOH (50:50; 300 mL) e MeOH (400 mL). O monitoramento das frações foi realizado por meio de cromatografia camada delgada analítica (CCDA) utilizando cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) e como sistema eluente, HEX:AcOEt:MeOH (50:40:10; v/v). Essas frações foram visualizadas sob luz UV a 365 nm, fornecendo 22 frações por semelhança cromatográfica, as quais foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congeladas e liofilizadas.

As 22 subfrações obtidas da FAE#3#2 foram biomonitoradas em células tumorais Caco-2. As subfrações 12 (898 mg), 13 (636 mg) e 14 (269 mg) foram submetidas à cromatografia “flash” com gel de sílica (0,040-0,063 mm) Merck® empregando-se o sistema eluente: HEX:AcOEt (60:40 v/v), HEX:AcOEt (58:42; v/v), HEX:AcOEt (55:45; v/v), HEX:AcOEt (50:50; v/v), HEX:AcOEt:MeOH (50:40:10; v/v) e MeOH para purificação, rendendo na subfração 12 as substâncias onopordopicrina (1) e dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) (116,7 mg), na subfração 13 onopordopicrina (1) (95,6 mg), uma mistura de dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) com dehidromelitensina (18,8 mg) (3), outra mistura contendo onopordopicrina (1) em maior quantidade com melitensina (3,4 mg) (4), dehidrovomifoliol (3,5 mg) (5), além de uma mistura contendo loliolida (4,0 mg) (6), e na

subfração 14 onopordopirina (**1**) (22,8 mg) (Figura 1). As substâncias isoladas foram caracterizadas pela análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D, massas, e por comparação com dados da literatura [11-15].

Cultura de células

Para a realização dos experimentos foram utilizadas células Caco-2 (células epiteliais do intestino humano, derivadas do carcinoma colorretal). Elas foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina. A cultura foi incubada a 37 °C em estufa úmida com tensão de 5% de CO₂ (Fischer Scientific®, Isotemp). Posteriormente as células foram observadas em microscópio invertido (Zeiss®, Axiovert 25) diariamente e o meio trocado quando o pH apresentou-se ácido.

A manutenção das células ocorreu sempre que houve a formação de uma monocamada de células confluentes. Na sequência foi adicionado solução de tripsina (Gibco®) a 37 °C, que foi removida assim que as células tornaram-se arredondadas. O aspecto das células foi observado em microscópio invertido. Em seguida, as células foram ressuspensas em DMEM, sendo que 1/6 desta suspensão foi incubada nas mesmas condições iniciais.

Ensaio de atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa foi avaliada pelo método colorimétrico da sulforodamina B (Sigma®) em placa de 96 poços, com pequenas modificações, descrito por Skehan et al. [16], que baseia-se na afinidade do corante sulforodamina B pelas proteínas celulares propiciando uma avaliação colorimétrica diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Para realização deste experimento foi preparada uma suspensão de células Caco-2 em DMEM acrescido de 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina. A suspensão foi distribuída em microplaca de 96 poços (TPP®) na concentração de 5×10^5 células/mL com volume final de 100 µL/poço. A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ por 24 h até a formação da monocamada confluyente. Após a formação da monocamada, o meio foi retirado e 100 µL das várias concentrações dos extratos, frações e substâncias isoladas foram adicionados em triplicata. Inicialmente foram testadas as concentrações de 500, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 1 µg/mL. Foi realizado controle de células, onde, não há adição dos extratos.

A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ durante 48 h. Em seguida, o meio dos poços foi removido, o tapete lavado com PBS e fixado com ácido tricloroacético a 10% (SYNTH®) no volume de 50 µL/poço por 1 h sob refrigeração. A placa foi lavada 4x em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secar.

Em cada poço foram adicionados 50 µL de uma solução 4% de sulforodamina B em ácido acético à 1%, a placa foi incubada novamente por 30 min sob refrigeração e ao abrigo da luz. O corante foi retirado e a placa lavada 4x com ácido acético glacial a 1% para remoção do corante em excesso. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10 mM. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek®, Power Wave XS) à 530 nm.

Posterior à leitura, foi realizado cálculos para determinação das concentrações dos extratos capazes de destruir 50% da monocamada celular (CC₅₀).

A atividade antiproliferativa foi determinada de acordo com a seguinte fórmula: % de destruição celular = 1 - (DO_{tr}/DO_{cc}), onde: DO_{tr}=densidade óptica do tratado e DO_{cc}=densidade óptica do controle de células.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® (Graphpad Software Inc, Microsoft Corp.). Os resultados foram expressos como a média±desvio padrão da média e foram analisados utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Tukey e P<0,05 foi considerado como critério de significância.

Resultados e Discussão

Em busca de novas drogas para o combate ao câncer, numerosos derivados fitoquímicos têm sido relacionados com a prevenção desta doença [17]. Assim, foi realizado o isolamento de substâncias por meio de biomonitoramento em células tumorais Caco-2. O desengorduramento das folhas (2886 g) realizado com hexano rendeu 119,12 g (4,13%) de uma fração lipofílica, que não apresentou atividade sobre as células Caco-2. Com o restante da droga vegetal desengordurada (2766 g) preparou-se o extrato bruto (EB) com rendimento de 21,8% (603,85 g). A partição do EB (575 g) rendeu 3,05 g (0,53%), 25,46 g (4,43%), 60,37 g (10,5%) e 461,84 g (80,32%) das frações hexano, acetato de etila (FAE), *n*-butanol e fração aquosa, respectivamente.

O EB apresentou CC₅₀ de 347,5 µg/mL, a FAE 24,7 µg/mL e das 22 subfrações obtidas a partir da FAE#3#2, apenas três mostraram-se ativas frente às células Caco-2 (CC₅₀ µg/mL): subfrações 12 (23,8), 13 (25,06) e 14 (25,0) (Tabela 1).

A substância onopordopicroina (1), obtida pura das subfrações 13 e 14, apresentou 19,9±3,4 µg/mL, sendo que a mesma foi relatada anteriormente como citotóxica *in vitro* contra linhagem de células KB (carcinoma epidermóide humano da nasofaringe) [18]. Esta substância mostra-se promissora para algumas linhagens de células tumorais, incluindo a testada neste experimento. Outro

fator relevante é que esta lactona sesquiterpênica foi encontrada nas frações como componente majoritário, haja vista que a mesma foi isolada em todas as frações mais ativas e em quantidade considerável, principalmente na fração 13 (95,6 mg). Assim, é possível sugerir que a substância responsável pela atividade antiproliferativa do extrato na linhagem de células analisada é a onopordopicrina (1).

A subfração 12, com a mistura de onopordopicrina (1) e dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2), apresentou CC_{50} de $24,6 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$. Provavelmente este resultado esteja relacionado com a substância onopordopicrina (1), pois amostras contendo a mesma apresentaram resultados semelhantes tais como a própria FAE. No entanto, a substância (1) isoladamente apresentou melhor resultado do que esta mistura, como demonstrado anteriormente.

Na subfração 13, a mistura contendo (2) (dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato)) e (3) (dehidromelitensina) não foi testada contra as células Caco-2, assim como a mistura contendo onopordopicrina (1) em maior quantidade com melitensina (3,4 mg) (4). Enquanto a substância dehidrovomifoliol (5) não apresentou resultados significativos com atividade antiproliferativa superior a $100 \mu\text{g/mL}$. Em contrapartida, esta mesma substância foi avaliada para sua atividade citotóxica contra as linhagens de células cancerígenas HONE-1 (carcinoma de nasofaringe humano), KB (carcinoma epidermóide oral) e HT29 (carcinoma colorretal) usando o corante azul de metileno e drogas anticâncer etoposídeo e cisplatina, ambas como controle positivo, apresentando significativa atividade citotóxica com CC_{50} de 4,8; 4,0 e $5,7 \mu\text{M}$, respectivamente [19]. A substância loliolida (6) também não foi testada neste experimento.

As substâncias dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2), dehidromelitensina (3), melitensina (4) e dehidrovomifoliol (5) foram isoladas pela primeira vez em *A. lappa*.

Em estudo anterior determinou-se que a quantidade de onopordopicrina variou entre 0,035-0,005% na fração acetato de etila, a partir de suco das folhas de *A. lappa*, com teor total de sesquiterpenos de aproximadamente 0,01% [20]. Neste trabalho a substância isolada correspondeu a 0,02% (118,4 mg) do extrato bruto (575 g). Assim, a substância (1) pode ser utilizada para estudos de validação de metodologia analítica, na preparação de uma formulação, estudos para determinar mecanismo de ação, bem como para avaliar a toxicidade, podendo ser considerada como marcador biológico. Segundo Rocha [21] há ressalvas no uso oral de lactonas sesquiterpênicas para fins terapêuticos devido a sua toxicidade.

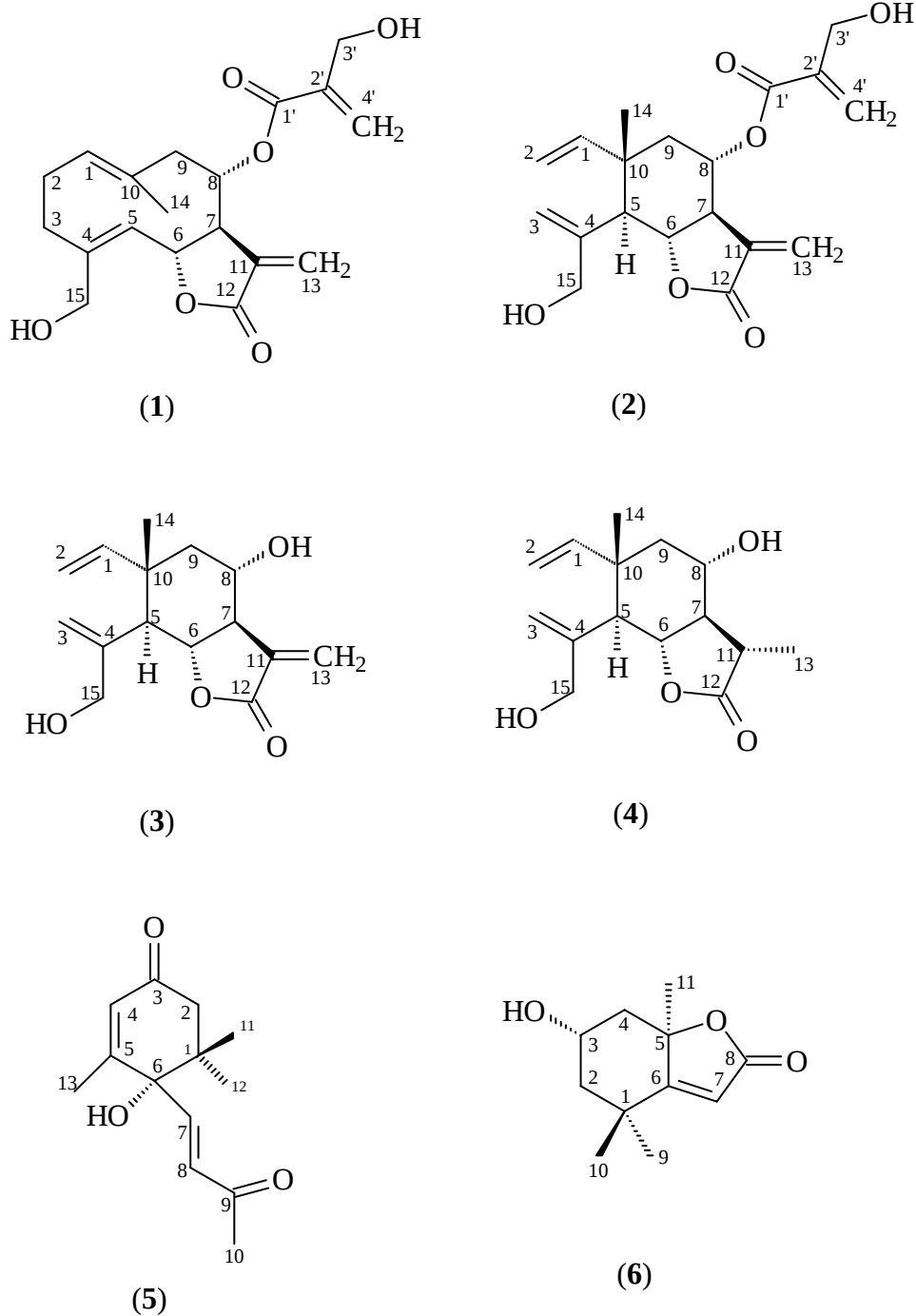


Figura 1 – Substâncias isoladas onopordopicrina (1), dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2), dehidromelitensina (3), melitensina (4), dehidrovomifoliol (5) e loliolida (6).

Onopordopicrina (1)

($C_{19}H_{24}O_6$) HR-ESI-MS m/z (intensidade relativa) = 348 ($M^+ - C_6H_{11}O_4$, 31), ($M^+ - C_4H_7O_4$, 73), ($M^+ - C_4H_5O_3$, 100); Dados de RMN de 1H ($CDCl_3/CD_3OD$, 300,060 MHz): δ_H = 6,23 (H-4'_a; q; J = 1,5 Hz); 6,18 (H-13_b; d; J = 3,3 Hz); 5,93 (H-4'_a; q; J = 1,5 Hz); 5,74 (H-13_b; d; J = 2,7 Hz); 5,11

(H-6; d; $J = 9,6$ Hz); 5,08 (H-8; m); 4,96 (H-1; t; $J = 9,0$); 4,78 (H-5; d; $J = 9,6$ Hz); 4,22 (H-3'; q; $J = 1,5$ Hz); 4,18 (H-15_a; dd; $J = 14,1$ e $1,0$ Hz); 3,95 (H-15_b; dd; $J = 14,1$ e $0,7$ Hz); 3,07 (H-7; m); 2,54 (H-3; dt; $J = 11,7$ e $3,6$ Hz); 2,48-2,41 (H-9_{a,b}; m); 2,24-2,10 (H-2_{a,b}; m); 1,91 (H-3; m); 1,44 (H-14; sl). Dados de RMN de ^{13}C (75,457 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $\delta_c = 170,6$ (C-12); 165,0 (C-1'); 144,4 (C-4); 139,8 (C-2'); 135,3 (C-11); 131,8 (C-10); 129,6 (C-1); 127,9 (C-5); 125,2 (C-4'); 125,2 (C-13); 77,1 (C-6); 72,8 (C-8); 60,4 (C-3'); 60,0 (C-15); 52,8 (C-7); 48,7 (C-9); 34,1 (C-3); 25,8 (C-2); 16,3 (C-14). Estes dados estão de acordo com Tundis et al. [11].

Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)

($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$) HR-ESI-MS m/z (intensidade relativa) = 348 ($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_4$, 15), ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9\text{O}$, 48), ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7\text{O}$, 100); Dados de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,060 MHz): $\delta_H = 6,23$ (H-4', m); 6,09 (H-13; d; $J = 3,0$ Hz); 5,88 (H-4'; m); 5,70 (H-1; dd; $J = 17,4$ e $10,8$ Hz); 5,52 (H-13; d; $J = 2,7$ Hz); 5,36 (H-3_a; t; $J = 1,5$ Hz); 5,23 (H-8; td; $J = 10,8$ e $4,2$ Hz); 4,99 (H-2_a; d; $J = 10,8$ Hz); 4,94 (H-2_b; d; $J = 17,4$ Hz); 4,91 (H-3_b; sl); 4,30 (H-3'; t; $J = 1,2$ Hz); 4,18 (H-6; t; $J = 11,7$ Hz); 4,04 (H-15_a; d; $J = 14,4$ Hz); 3,99 (H-15_b; d; $J = 14,4$ Hz); 2,90 (H-7; tt; $J = 10,8$ e $3,0$ Hz); 2,51 (H-5; d; $J = 11,7$ Hz); 2,00 (H-9_b; dd; $J = 12,7$ e $4,2$ Hz); 1,61 (H-9_a; dd; $J = 12,7$ e $10,8$ Hz); 1,12 (H-14; s). RMN de ^{13}C (75,457 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $\delta_c = 169,4$ (C-12); 165,5 (C-1'); 145,8 (C-1); 143,9 (C-4); 139,4 (C-2'); 136,8 (C-11); 126,9 (C-4'); 120,4 (C-13); 115,4 (C-3); 113,4 (C-2); 78,9 (C-6); 69,9 (C-8); 67,6 (C-15); 62,5 (C-3'); 52,6 (C-7); 50,8 (C-5); 45,3 (C-9); 41,9 (C-10); 18,9 (C-14), conforme [12].

Dehidromelitensina (3)

Dados de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,060 MHz): $\delta_H = 6,07$ (H-13; d; $J = 3,0$ Hz); 5,95 (H-13; d; $J = 2,4$ Hz); 5,70 (H-1; dd; $J = 17,4$ e $10,5$ Hz); 5,31 (H-3_a; sl); 4,97 (H-2_a; m); 4,93 (H-3_b; sl); 4,83 (H-2_b; m); 4,09 (H-6; t; $J = 11,7$ Hz); 3,93 (H-15_{a,b}; m); 3,80 (H-8; m); 2,75 (H-7; tt; $J = 10,8$ e $3,0$ Hz); 2,39 (H-5; d; $J = 11,7$ Hz); 1,75 (H-9_b; dd; $J = 13,5$ e $4,2$ Hz); 1,55 (H-9_a; dd; $J = 13,5$ e $10,5$ Hz); 1,01 (H-14; s). RMN de ^{13}C (75,457 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $\delta_c = 170,1$ (C-12); 146,6 (C-1); 144,2 (C-4); 137,9 (C-11); 120,45 (C-13); 114,4 (C-3); 111,8 (C-2); 79,6 (C-6); 66,7 (C-8); 66,5 (C-15); 55,1 (C-7); 50,5 (C-5); 49,3 (C-9); 41,8 (C-10); 18,7 (C-14), conforme [12].

Melitensina (4)

Dados de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,060 MHz): $\delta_H = 5,69$ (H-1; dd; $J = 17,4$ e $10,8$ Hz); 5,29 (H-3_a; sl); 4,93 (H-2_a; m); 4,89 (H-2_b; d; $J = 17,4$ Hz); 4,83 (H-3_b; sl); 4,15 (H-6; m); 4,03 (H-15_a; m); 3,85 (H-15_b; d; $J = 13,8$ Hz); 3,78 (H-8; ddd; $J = 10,5$; $10,2$ e $4,2$ Hz); 2,59-2,50 (H-11;

m); 2,25 (H-5; d; $J = 11,7$ Hz); 1,71 (H-9_β; dd; $J = 13,2$ e $4,2$ Hz); 1,70 (H-7; m); 1,50 (H-9_α; dd; $J = 13,2$ e $10,8$ Hz); 1,29 (H-13; d; $J = 6,9$ Hz); 1,02 (H-14; s), conforme [13].

Dehidrovomifoliol (5)

(C₁₃H₁₈O₃) HR-ESI-MS m/z (intensidade relativa) = 222 ($M^+ - C_3H_5O$, 98), ($M^+ - CH_5$, 100); Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 300,060 MHz): $\delta_H = 6,77$ (H-7; d; $J = 15,9$ Hz); 6,40 (H-8; d; $J = 15,9$ Hz); 5,89 (H-4; quint; $J = 1,2$ Hz); 2,44 (H-2_a; d; $J = 17,1$ Hz); 2,27 (H-2_b; dd; $J = 17,1$ e $1,2$ Hz); 2,24 (H-10; s); 1,82 (H-13; d; $J = 1,2$ Hz); 1,04 (H-11; s); 0,96 (H-12; s). RMN de ¹³C (75,457 MHz, CDCl₃): $\delta_c = 197,5$ (C-9); 197,1 (C-3); 160,4 (C-5); 145,1 (C-7); 130,6 (C-8); 128,1 (C-4); 79,6 (C-6); 49,8 (C-2); 41,6 (C-1); 28,6 (C-10); 24,6 (C-12); 23,2 (C-11); 18,9 (C-13), conforme [14].

Loliolida (6)

Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 300,060 MHz): $\delta_H = 5,63$ (H-7; s); 4,27 (H-3; quint; $J = 3,6$ Hz); 2,39 (H-4_b; dt; $J = 14,1$ e $2,7$ Hz); 1,91 (H-2_b; dd; $J = 14,4$ e $2,7$ Hz); 1,72 (H-4_a; m); 1,71 (H-11; s); 1,47 (H-2_a; dd; $J = 14,4$ e $3,6$ Hz); 1,40 (H-10; s); 1,21 (H-9; s). RMN de ¹³C (75,457 MHz, CDCl₃): $\delta_c = 182,6$ (C-6); 174,1 (C-8); 113,2 (C-7); 87,0 (C-5); 67,1 (C-3); 47,6 (C-2); 45,9 (C-4); 36,1 (C-1); 30,9 (C-9); 27,2 (C-11); 26,7 (C-10), conforme [15].

Agradecimentos

Ao apoio técnico de Admir Arantes. À CAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudos. Aos órgãos de fomento CNPq, FINEP, INCT_if e Fundação Araucária.

Referências

- ¹ Predes F S, Monteiro JC, Paula TAR, Matta SLP. Evaluation of rat testes treated with *Arctium lappa* L: morphometric study. Brazilian Journal of Morphological Sciences 2007; 24: 112-7.
- ² Foldeak S, Dombradi GA. Tumor-growth inhibiting substances of plant origin. I. Isolation of the active principle of *Arctium lappa*. Acta Physica et Chemica 1964; 10: 91-3.
- ³ Ming DS, Guns E, Eberding A, Towers NGH. Isolation and Characterization of Compounds with Anti-prostate Cancer Activity from *Arctium lappa* L. Using Bioactivity-guided Fractionation. Pharmaceutical Biology 2004; 42: 44-8.
- ⁴ Cunha AP, SILVA AP, ROQUE OR. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003: 23-35.
- ⁵ Uchiyama Y, Tagami J, Kamisuki S, Kasai N, Oshige M, Chiku H, Ibe S, Koiwai O, Sugawara F, Sakagushi K. Selective inhibitors of terminal deoxyribonucleotidyltransferase (TdT): Baicalin and genistin. Biochimica et Biophysica acta 2005; 1725: 298-304.
- ⁶ Cho MK, JANG YP, KIM YC, KIM SG. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF-inhibition. International Immunopharmacology 2004; 4: 1419-29.
- ⁷ Koukoulitsa C, Geromichalos GD, Skaltsa H. Volsurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from *Greek centaurea* sp. Journal of Computer-Aided Molecular Design 2005; 19: 617-23.
- ⁸ Barbosa-Filho JM, Costa M, Gomes C, Trolin G. Isolation of onopordopicrin, the toxic constituent of *Arctium lappa* L. Journal of the Brazilian Chemical Society 1993; 4: 186-7.
- ⁹ Almeida ABA. Atividade antiulcerogênica e antiinflamatória intestinal da *Arctium lappa* [doutorado]. Instituto de Biologia: Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo - Brasil [s.n.], 2004.
- ¹⁰ Smith M, Boon HS. Counseling cancer patients about herbal medicine. Patient Education and Counseling 1999; 38: 109-20.
- ¹¹ Tundis R, Statti G, Menichini F, Monache FD. Arctiin and onopordopicrin from *Carduus micropterus* ssp. *perspinosus*. Fitoterapia 2000; 71: 600-1.
- ¹² Cardona ML, Garcia B, Pedro JR, Sinisterra JF. Sesquiterpene lactones and an elemene derivative from *Onopordon corymbosum*. Phytochemistry 1989; 28: 1264-7.
- ¹³ Medjroubi K, Bouderdara N, Benayache F. Sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*. Chemistry of Natural Compounds 2003; 39: 944-5.
- ¹⁴ Kim I, Chin YW, Lim SW, Kim YC, Kim J. Norisoprenoids and Hepatoprotective flavone glycosides from the aerial parts of *Beta vulgaris* var. *cicla*. Arch Pharm Res 2004; 27: 600-3.
- ¹⁵ Hattab ME, Culioli G, Valls R, Richou M, Piovetti L. Apo-fucoanthinoids and loliolide from the brown alga *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* (Heterokonta, Sphacelariales). Biochemical Systematics and Ecology 2008; 36: 447-51.

- ¹⁶ Skehan P, Storeng R, Scudeiro D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 1990; 82: 1107-12.
- ¹⁷ Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica* 2008; 74: 1560 – 69.
- ¹⁸ Lonergan G, Routsis E, Georgiadis T, Agelis G, Hondrelis J, Matsoukas J, Larsen LK, Caplan FR. Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. *Journal of Natural Products* 1992; 55: 225-8.
- ¹⁹ Ren Y, Shen L, Zhang DW, Dai SJ. Two new sesquiterpenoids from *Solanum lyratum* with cytotoxic activities. *Chem. Pharm. Bull.* 2009; 57: 408-10.
- ²⁰ Savina AA, Sheichenko VI, Stikhin YV, Stikhin VA, Sokol'skaya TA, Anisimova OS, Kopyt'ko YF, Grodnitskaya EI, Cherkasov OA. Sesquiterpene lactones in juice of great burdock leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2006; 40: 43-5.
- ²¹ Rocha BA. Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina C [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2009.

ANEXOS

Tabela 1 – Dados de CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para as subfrações da fração FAE#3#2 testadas em células Caco-2.

Frações	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	>100
2	>100
3	52 ($\pm 15,5$)
4	64,5 ($\pm 19,09$)
5	47 ($\pm 26,9$)
6	66 ($\pm 7,07$)
7	>100
8	>100
9	>100
10	>100
11	78 ($\pm 4,2$)
12	23,8 ($\pm 2,9$)
13	25,1 ($\pm 4,3$)
14	25 ($\pm 0,0$)
15	29,3 ($\pm 3,2$)
16	29,9 ($\pm 5,3$)
17	59,1 ($\pm 12,9$)
18	73,5 ($\pm 2,1$)
19	74 ($\pm 2,8$)
20	74 ($\pm 0,0$)
21	>100
22	>100

Os dados representam média $\pm$ desvio padrão.

Onopordopicrina (1)

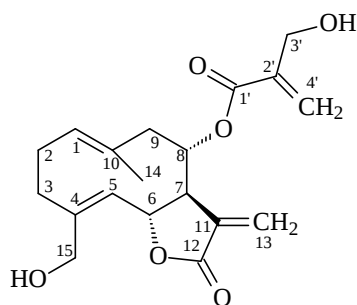


Tabela 2 – Dados de RMN (CDCl₃/CD₃OD, 300,060 MHz para ¹H e 75,457 MHz para ¹³C) para a substância onopordopicrina (1) [17].

No. C	δ ¹³ C/DEPT	gHSQC δ ¹ H (nH; m, J em Hz)	gCOSY ¹ Hx ¹ H	gHMBC ¹ H→ ¹³ C
1	129,6/CH	4,96 (1H; t; 9,0)	H ₁₄ ; H ₂	C ₃ ; C ₉ ; C ₁₄
2	25,8/CH ₂	2,24-2,10 (2H; m)	H _{3a,b} ; H ₁	C ₃ ; C ₄ ; C ₁₀
3	34,1/CH ₂	2,54 (1H; dt; 11,7; 3,6)	H _{3b} ; H _{2ab}	C ₂ ; C ₄
		1,91 (1H; m)	H _{3a} ; H _{2a,b}	C ₂ ; C ₄
4	144,4/C	-	-	-
5	127,9/CH	4,78 (1H; d; 9,6)	H ₆	C ₇ ; C ₁₅
6	77,1/CH	5,11 (1H; d; 9,6)	H ₅	
7	52,8/CH	3,07 (1H; m)	H ₈ ; H _{13a,b}	
8	72,8/CH	5,08 (1H; m)	H ₇ ; H _{8a,b}	
9	48,7/CH ₂	2,48-2,41 (2H; m)	H ₈	C ₁ ; C ₇ ; C ₈ ; C ₁₀ ; C ₁₄
10	131,8/C	-	-	-
11	135,3/C	-	-	-
12	170,6/C	-	-	-
13	125,2/CH ₂	5,74 (1H; d; 2,7)	H ₇	C ₇ ; C ₁₂
		6,18 (1H; d; 3,3)	H ₇	C ₇ ; C ₁₁ ; C ₁₂
14	16,3/CH ₃	1,44 (3H; s)	-	C ₁ ; C ₉ ; C ₁₀
15	60,0/CH ₂	3,95 (1H; dd; 14,1; 0,7)	H _{15b}	C ₃ ; C ₄ ; C ₅
		4,18 (1H; dd; 14,1; 1,0)	H _{15a}	C ₃ ; C ₄ ; C ₅
1'	165,0/C	-	-	-
2'	139,8/C	-	-	-
3'	60,4/CH ₂	4,22 (2H; q; 1,5)	H _{4'a,b}	C _{1'} ; C _{4'}
4'	125,2/CH ₂	5,93 (1H; q; 1,5)	H _{3'} ; H _{4'b}	C _{1'} ; C _{2'} ; C _{3'}
		6,23 (1H; q; 1,5)	H _{3'} ; H _{4'a}	C _{1'} ; C _{2'} ; C _{3'}

Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)

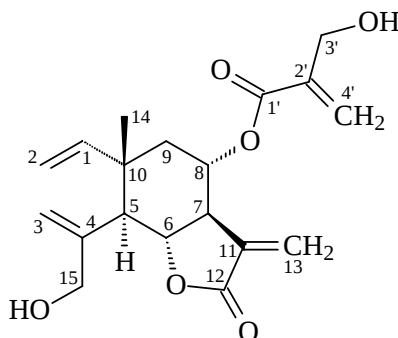


Tabela 3 – Dados de RMN (CDCl₃/CD₃OD, 300,060 MHz para ¹H e 75,457 MHz para ¹³C) para a substância dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) [18]

No. C	$\delta^{13}\text{C}/\text{DEPT}$	gHSQC $\delta^1\text{H}$ (nH; m, J em Hz)	gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$	gHMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	145,8/CH	5,70 (1H; dd; 17,4; 10,8)	H _{2a,b}	C ₄
2	113,4/CH ₂	α 4,99 (1H; d; 10,8) β 4,94 (1H; d; 17,4)	H ₁ H ₁	C ₁ ; C ₉ C ₁ ; C ₉
3	115,4/CH ₂	α 5,36 (1H; t; 1,5) β 4,91 (1H; sl)		C ₅ C ₅
4	143,9/C	-	-	
5	50,8/CH	2,51 (1H; d; 11,7)	H ₆	C ₃ ; C ₄ ; C ₆ ; C ₇ ; C ₁₀ ; C ₁₄
6	78,9/CH	4,18 (1H; t; 11,7)	H ₅ ; H ₇	
7	52,6/CH	2,90 (1H; tt; 10,8; 3,0)	H _{13a,b} ; H ₆ ; H ₈	
8	69,9/CH	5,23 (1H; td; 10,8; 4,2)	H _{9\beta} ; H ₇	
9	45,3/CH ₂	α 1,61 (1H; dd; 12,7; 10,8) β 2,00 (1H; dd; 12,7; 4,2)	H _{9\beta} ; H ₈ H _{9\alpha} ; H ₈	C ₁ ; C ₈ C ₅ ; C ₈
10	41,9/C	-	-	-
11	136,8/C	-	-	-
12	169,4/C	-	-	-
13	120,4/CH ₂	6,09 (1H; d; 3,0) 5,52 (1H; d; 2,7)	H _{13b} ; H ₇ H _{13a} ; H ₇	C ₇ ; C ₁₂
14	18,9/CH ₃	1,12 (3H; s)	-	C ₁ ; C ₅ ; C ₉ ; C ₁₀
15	67,6/CH ₂	4,04 (1H; d; 14,4) 3,99 (1H; d; 14,4)	H _{15b} ; H _{3\alpha} H _{15a}	C ₃ ; C ₄ C ₃ ; C ₄ ; C ₅
1'	165,5/C	-	-	-
2'	139,4/C	-	-	-
3'	62,5/CH ₂	4,30 (2H; t; 1,2)	H _{4'a,b}	C _{1'} ; C _{2'} ; C _{4'}
4'	126,9/CH ₂	6,23 (1H; m) 5,88 (1H; m)	H _{3'} ; H _{4'b} H _{3'} ; H _{4'a}	C _{1'} ; C _{2'} ; C _{4'} C _{1'} ; C _{2'} ; C _{4'}

Dehidromelitensina (3)

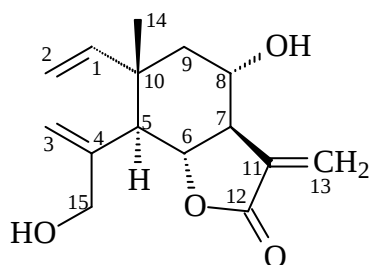


Tabela 4 – Dados de RMN (CDCl₃/CD₃OD, 300,060 MHz para ¹H e 75,457 MHz para ¹³C) para a substância dehidromelitensina (3) [12]

No. C	δ ¹³ C/DEPT	gHSQC δ ¹ H (nH; m, J em Hz)	gCOSY ¹ Hx ¹ H	gHMBC ¹ H→ ¹³ C
1	146,6/CH	5,70 (1H; dd; 17,4; 10,5)		C ₁₀
2	111,8/CH ₂	α 4,97 (1H; m) β 4,83 (1H; m)		C ₁
3	114,4/CH ₂	α 5,31 (1H; sl) β 4,93 (1H; sl)	H _{3β} H _{3α}	C ₁₅ C ₁₅
4	144,2/C	-	-	
5	50,5/CH	2,39 (1H; d; 11,7)	H ₆	C ₁ ; C ₄ ; C ₆ ; C ₁₅
6	79,6 /CH	4,09 (1H; t; 11,7)	H ₅ ; H ₇	C ₁₀ ; C ₁₁
7	55,1/CH	2,75 (1H; tt; 10,8; 3,0)	H _{13a,b} ; H ₆ ; H ₈	
8	66,7/CH	3,80 (1H; m)	H _{9β} ; H ₇ ; H _{9α}	
9	49,3/CH ₂	α 1,55 (1H; dd; 13,5; 10,5) β 1,75 (1H; dd; 13,5; 4,2)	H _{9β} ; H ₈ H _{9α} ; H ₈	
10	41,8/C	-	-	-
11	137,9/C	-	-	-
12	170,1/C	-	-	-
13	120,5/CH ₂	5,95 (1H; d; 2,4 6,07 (1H; d; 3,0)	H _{13b} ; H ₇ H _{13a} ; H ₇	
14	18,7/CH ₃	1,01 (3H; s)	-	C ₁ ; C ₉ ; C ₁₀
15	66,5/CH ₂	3,93 (2H, m)		

Melitensina (4)

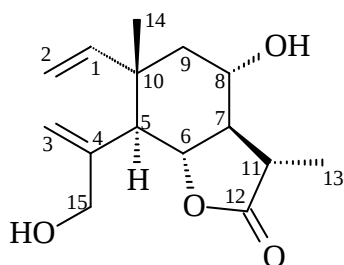


Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300,060 MHz) para a substância melitensina (4) [13]

No. C	$\delta^1\text{H}$ (nH; m, <i>J</i> em Hz)	gCOSY $^1\text{H}_\text{x}^1\text{H}$	Melitensina [13]*
1	5,69 (1H; dd; 17,4; 10,8)	$\text{H}_{2\alpha}$; $\text{H}_{2\beta}$	5,75 (dd; 17; 11)
2	α 4,93 (1H; m)	H_1	5,05 (d; 11)
	β 4,89 (1H; d; 17,4)	H_1	5,01 (d; 17)
3	α 5,29 (1H; sl)	$\text{H}_{3\beta}$	5,38 (s)
	β 4,83 (1H; sl)	$\text{H}_{3\alpha}$	4,95 (s)
5	2,25 (1H; d; 11,7)	H_6	2,40 (d; 11)
6	4,15 (1H; m)	H_5 ; H_7	4,15 (t; 11)
7	1,70 (1H; m)	H_{11} ; H_6 ; H_8	1,85 (m)
8	3,78 (1H; ddd; 10,5; 10,2; 4,2)	$\text{H}_{9\beta}$; H_7 ; $\text{H}_{9\alpha}$	3,95 (brddd; 10,5; 5,3)
9	α 1,50 (1H; dd; 13,2; 10,8)	$\text{H}_{9\beta}$; H_8	1,62 (d; 12)
	β 1,71 (1H; dd; 13,2; 4,2)	$\text{H}_{9\alpha}$; H_8	1,80 (m)
11	2,59-2,50 (1H; m)	H_7 ; H_{13}	2,62 (dq; 12; 7)
13	1,29 (3H; d; 6,9)	H_{11}	1,41 (d; 7)
14	1,02 (3H; s)	-	1,11 (s)
15	4,03 (1H; m)		4,08 (d; 14)
	3,85 (1H; d; 13,8)		3,98 (d; 14)

*Medjroubi et al., 2003, dados de RMN de ^1H em CDCl_3 ; 300 MHz

Dehidrovomifoliol (5)

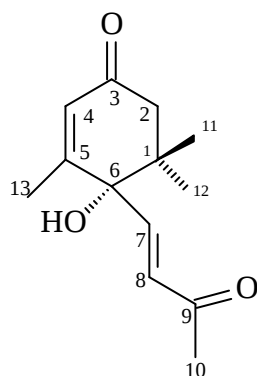


Tabela 6 – Dados de RMN (CDCl₃, 300,060 MHz para ¹H e 75,457 MHz para ¹³C) para a substância dehidrovomifoliol (5) [14].

No. C	$\delta^{13}\text{C}/\text{DEPT}$	gHSQC $\delta^1\text{H}$ (nH; m, <i>J</i> em Hz)	gCOSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$	gHMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	41,6/C	-	-	-
2	49,8/CH ₂	2,44 (1H; d; 17,1) 2,27 (1H; dd; 17,1; 1,2)	H _{2b} H _{2a}	C ₃ ; C ₆ ; C ₁₁ C ₃
3	197,1/C	-	-	-
4	128,1/CH	5,89 (1H; quint; 1,2)	H ₁₃	-
5	160,4/C	-	-	-
6	*79,6/C	-	-	-
7	145,1/CH	6,77 (1H; d; 15,9)	H ₈	C ₆ ; C ₉
8	130,6/CH	6,40 (1H; d; 15,9)	H ₇	-
9	197,5/C	-	-	-
10	28,6/CH ₃	2,24 (3H; s)	-	-
11	23,2/CH ₃	1,04 (3H; s)	-	C ₁ ; C ₂ ; C ₆ ; C ₁₂
12	24,6/CH ₃	0,96 (3H; s)	-	C ₁ ; C ₂ ; C ₆ ; C ₁₁
13	18,9/CH ₃	1,82 (3H; d; 1,2)	H ₄	C ₄ ; C ₅ ; C ₆

*sinal observado somente no espectro gHMBC

NOESY: 6,77 (H₇) x 2,44 (H_{2a})

6,77 (H₇) x 1,04 (H₁₁)

(+)-Loliolida (6)

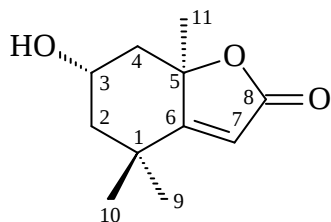


Tabela 7 – Dados de RMN (CDCl₃, 300,060 MHz para ¹H e 75,457 MHz para ¹³C) para a substância loliolida (6) [15].

No. C	$\delta^{13}\text{C}/\text{DEPT}$	$\delta^1\text{H}$ (nH; m, <i>J</i> em Hz)	gCOSY ¹ Hx ¹ H	gHMBC ¹ H→ ¹³ C
1	*36,1/C	-	-	-
2	47,6/CH ₂	1,47 (1H; dd; 14,4; 3,6) 1,91 (1H; dd; 14,4; 2,7)	H _{2b} ; H ₃ H _{2a}	
3	67,1/CH	4,27 (1H; quint; 3,6)	H _{2a}	-
4	45,9 /CH ₂	1,72 (1H; m) 2,39 (1H; dt; 14,1; 2,7)	H _{4b} H _{4a}	
5	*87,0/C	-	-	-
6	*182,6/C	-	-	-
7	113,2/CH	5,63 (1H; s)	-	C ₈
8	174,1/C	-	-	-
9	30,9/ CH ₃	1,21 (3H; s)	-	C ₆ ; C ₁₀ ; C ₁ ; C ₂
10	26,7/CH ₃	1,40 (3H; s)	-	C ₂ ; C ₉ ; C ₁ ; C ₆
11	27,2/CH ₃	1,71 (3H; s)	-	C ₅ ; C ₄ ; C ₆

*sinais observados somente no espectro gHMBC

CAPÍTULO III

4 DISCUSSÃO GERAL

Um dos fatores mais importantes da saúde pública e das práticas médicas do novo século é a prevenção ao câncer. Muito progresso foi feito neste campo, mas ainda há muito que se fazer. Neste contexto tem-se a quimioprevenção que é definida como a inibição, inversão e retardo do progresso do câncer. Estratégias para desenvolver medicamentos para uso quimiopreventivo têm evoluído por muitos anos. Desta forma, tem-se analisado o potencial quimiopreventivo de uma grande variedade de produtos naturais e sintéticos (STEELE, 2004). Estes agentes quimiopreventivos podem ser definidos como produtos químicos ou combinação de produtos químicos que podem alterar ou inverter a expressão ou função de um alvo molecular responsável pela transformação das células normais ou apoiar a proliferação das células transformadas. Por sua vez, o agente impede ou atrasa a carcinogênese (MEHTA; PEZZUTO, 2004).

Muitos agentes quimioterápicos utilizados na clínica são derivados de produtos naturais ou desenvolvidos tendo eles como base. Os exemplos incluem taxol, camptotecina, vincristina, entre outros. Das cerca de 250.000 plantas conhecidas parece provável que o valor medicinal de muitas plantas ainda desconhecido será valorizado no futuro. É uma tarefa árdua identificar uma substância química ativa entre o complexo de substâncias presentes em uma planta, estabelecer sua eficácia, compreendendo os possíveis mecanismos de ação e executar as etapas requeridas para um possível ensaio clínico (MEHTA; PEZZUTO, 2004).

Segundo Steele (2004), um único composto é isolado como fração ativa ou pode ter mais de uma atividade. Em seguida, este composto é sintetizado e testado em paralelo com o extrato bruto. Se o composto purificado e o extrato bruto apresentarem eficácia similar, então o extrato bruto é desenvolvido como um agente de baixo custo para ensaios clínicos, pois o composto puro pode ser tóxico, e geralmente seu custo de produção é mais caro.

O desafio atual é realizar uma criteriosa seleção de plantas da biodiversidade brasileira para posterior avaliação e descoberta de novos agentes quimiopreventivos, pois o processo de seleção e avaliação de plantas baseia-se na literatura disponível, dados epidemiológicos, o uso medicinal e tradicional dos povos de uma região onde a planta está disponível. Além disso, sempre que possível, deve ser dada prioridade às plantas comestíveis. Várias partes da planta, como folhas, raízes, caules, ou frutos, são extraídos com acetato de etila e avaliados para o potencial quimiopreventivo usando vários bioensaios (MEHTA; PEZZUTO, 2004).

A planta aqui estudada apresenta diversas atividades biológicas, em especial em algumas linhagens de células cancerígenas, porém com extratos das folhas têm-se poucos estudos. A bardana é utilizada em especial pelos orientais como alimento e também como uma espécie de elixir para combater e prevenir diversas doenças.

Para verificação da atividade antiproliferativa, produziu-se o extrato e o mesmo foi purificado e a partir de cada processo de purificação as frações foram biomonitoradas com intuito de chegar a uma substância ou grupo delas, responsável(is) pela citotoxicidade em células Caco-2. A partir dos resultados obtidos observa-se que houve pouca variação em relação à FAE (24,7 µg/mL) com a substância isolada onopordopirina (**1**) (19,9 µg/mL). Tanto uma quanto a outra apresentaram resultados promissores para a linhagem testada, sugerindo que a FAE torna-se um objeto de estudo promissor, após posteriores avaliações quanto à toxicidade e melhor via de administração, entre outros estudos farmacológicos, por apresentar menor custo na sua produção.

A mistura das substâncias onopordopirina (**1**) com dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (**2**) apresentou CC₅₀ em 24,6 µg/mL ou seja, apresentaram praticamente o mesmo resultado da FAE. Porém é de interesse isolar a substância ativa para poder verificar possíveis mecanismos de ação, toxicidade, vias de administração e posteriormente realização de ensaios clínicos. Já a substância dehidrovomifoliol (**5**) não apresentou atividade neste experimento.

Segundo Mehta e Pezzuto (2004), é de grande importância realizar análise de novos agentes quimiopreventivos com modelos de carcinogênese *in vivo*, e síntese de análogos com grupos funcionais alterados para reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia, determinação do mecanismo de ação dos novos agentes, conseqüentemente, o desenvolvimento de novos agentes para ensaios clínicos.

Neste experimento pode-se verificar que as substâncias dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (**2**), dehidromelitensina (**3**), melitensina (**4**) e dehidrovomifoliol (**5**) foram encontradas pela primeira vez em *A. lappa*. Todas as substâncias aqui identificadas tiveram seus dados espectroscópicos comparados com os da literatura. Pode-se verificar que a substância onopordopirina (**1**) apresentou-se como composto majoritário nas frações mais ativas, sendo provavelmente a substância responsável pela atividade da FAE, pois a mesma apresentou resultados semelhantes à da substância isolada.

Do ponto de vista quimiotaxonômico, as substâncias dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato), dehidromelitensina, melitensina e dehidrovomifoliol já foram isoladas em

diversos gêneros da família *Asteraceae*, entre eles podem ser citados: *Onopordum* (COLLADO et al., 1984; CARDONA et al., 1989; GARCIA et al., 1996), *Centaurea* (GONZALES et al., 1971; GONZALES et al., 1975; GONZALES et al., 1980; PICHER et al., 1984; BARRERO et al., 1988; TORTAJADA et al. 1988; BARRERO et al., 1989; MARCO et al., 1992; BRUNO et al., 1995; ASLAN; OKSUZ, 1999; BRUNO et al., 2001; SALAN; OEKSUEZ et al., 2003; MEDJROUBI et al., 2003); *Helianthus* (HERZ; BRUNO, 1986), *Bupthalmum* (HEILMANN; MULLER; MERFORT, 1999), *Cirsium* (CHUNG et al., 2002) e *Ixeris* (ZHANG et al., 2007), justificando assim, a presença destas substâncias no gênero *Arctium*, como neste trabalho.

5 CONCLUSÕES

A planta foi identificada como sendo *Arctium lappa* L. por comparação com o tipo nomenclatural.

As substâncias onopordopirina, dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato), dehidromelitensina, melitensina, dehidrovomifoliol e loliolida foram isoladas e identificadas.

Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato), dehidromelitensina, melitensina, dehidrovomifoliol foram identificadas pela primeira vez em *A. lappa*.

A atividade antiproliferativa frente às células Caco-2 do EB foi de CC₅₀ de 347,6 µg/mL, enquanto a FAE apresentou 24,7 µg/mL. Já a substância onopordopirina apresentou uma CC₅₀ de 19,7 µg/mL, enquanto dehidrovomifoliol não apresentou resultados significativos.

A subfração contendo uma mistura de onopordopirina com dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) apresentou CC₅₀ 24,6 µg/mL.

A substância onopordopirina apresentou-se como componente majoritário nas frações mais ativas frente às células Caco-2.

A mistura contendo onopordopirina e dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) apresentou menor atividade antiproliferativa em células Caco-2, que a substância onopordopirina isolada.

REFERÊNCIAS

- ASLAN, U.; OKSUZ, S. Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Journal of Chemistry*, v. 23, p. 15-20, 1999.
- AWALE, S.; LU, J.; KALAUNI, S. K.; KURASHIMA, Y.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.; ESUMI, H. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Research*, v. 66, n. 3, p. 1751-1757, 2006.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; COSTA, M.; GOMES, C.; TROLIN, G. Isolation of onopordopicrin, the toxic constituent of *Arctium lappa* L. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 4, n. 3, p. 186-187, 1993.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 3, p. 421-446, 2006.
- BARRERO, A. F.; SANCHES, J. F.; RODRIGUEZ, I. Germacranolides from *Centaurea melitensis*. *Phytochemistry*, v. 28, p. 1975-1976, 1989.
- BARRERO, A. F.; SANCHES, J. F.; RODRIGUEZ, I.; SANZ, C. S. Germacranolides of *Centaurea malacitana*. *Quimica Organica y Bioquimica*, v. 84, p. 344-347, 1988.
- BIAZÚS, M. A. Estrutura e organização da cadeia de suprimento de insumos para fitoterápicos. / Mateus Arioli Biazús. Porto Alegre, 2008. 100 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Administração da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=38681>. Acesso em 21 set. 2008.
- BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Triagem das atividades antimicrobiana e citotóxica de algumas plantas medicinais brasileiras usadas na cidade de Governador Valadares. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.2, p.195-202, 2006.
- BROWINSKA-SZMALOWA, Z. Macroscopic differentiation of *Tussilago farfara* L. from *Arctium lappa* L. and *Petasites officinalis* Moench. *Farmacja Polska*, v. 11, n. 1, p. 12, 1955.

- BRUNO, M.; FAZIO, C.; PATERNOSTRO, M. P.; DIAZ, J.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea napifolia*. *Planta Medica*, v. 61, p. 374-375, 1995.
- BRUNO, M.; MAGGIO, A.; PATERNOSTRO, M. P.; ROSSELLI, S.; ARNOLD, N. A.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of three Cardueae from Cyprus. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 29, p. 433-435, 2001.
- CARDONA, M. L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R.; SINITERRA, J. F. Sesquiterpene lactones and an elemene derivative from *Onopordon corymbosum*. *Phytochemistry*, v. 28, p. 1264-1267, 1989.
- CAVALLI, V. L. L. O.; SORDI, C.; TONINI, K.; GRANDO, A.; MUNERON, T.; GUIGI, A.; ROMAN JÚNIOR, W. A. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2007.
- CHEN, F.-A.; WU, A.-B.; CHEN, C.-Y. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chemistry*, v. 86, p. 479-484, 2004.
- CHUNG, A. K.; KWON, H. C.; CHOI, S. Z.; MIN, Y. D.; LEE, S. O.; LEE, W. B.; YANG, M. C.; LEE, K. H.; NAM, J. H.; KWAK, J. H.; LEE, K. R. Norisoprenoids from *Cirsium rhinoceros*. *Saengyak Hakhoechi*, v. 33, p. 81-84, 2002.
- COLLADO, I. G.; MARCIAS, F. A.; MASSANET, G. M.; OLIVA, J. M.; LUIS, F. R.; VERGARA, C. Chemical components of *Onopordum nervosum* Boiss. *Quimica Organica y Bioquimica*, v. 80, p. 100-101, 1984.
- DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 37, n. 2, p. 287-295, 2005.
- FÖLDEÁK, S.; DOMBRÁDI, C. A. Tumor-growth inhibiting substances of plant origin. I. Isolation of the active principle of *Arctium lappa*. *Acta Physica et Chemica*, v. 10, p. 91-93, 1964.
- FROTA JUNIOR, M. L. C. Esponja marinha *Polymastia janeirensis* como fonte de novos fármacos contra o câncer. / Mário Luiz Conte da Frota Junior. Porto Alegre, 2008. 43 f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

- GARCIA, B.; SKALTSA, H.; NAVARRO, F. I.; PEDRO, J. R.; LAZARI, D. Sesquiterpene lactones and elemene derivatives from *Onopordon myriacanthum*. *Phytochemistry*, v. 41, p. 111, 1996.
- GENTIL, M.; PEREIRA, J. V.; SOUSA, Y. T. C. S.; PIETRO, R.; NETO, M. D. S.; VANSAN, L. P.; FRANÇA, S. C. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytotherapy Research: PTR*, v. 20, n. 3, p. 184-186, 2006.
- GONZALES, G. A.; ARTEAGA, J. M.; BERMEJO, M. J.; BRETON, F. J. L. Compound chemistry. XIII. Melitensina, new sesquiterpene lactone from *Centaurea melitensis*. *Anales de Quimica*, v. 67, p. 1243-1244, 1971.
- GONZALES, G. A.; ARTEAGA, J. M.; BRETON, F. J. L. Constituents of the Compositae. 27. Elemnanolides from *Centaurea melitensis*. *Phytochemistry*, v. 14, p. 2039-2041, 1975.
- GONZALES, A. G.; BERMEJO, J.; ZARAGOZA, T.; VELASQUEZ, R. Compound chemistry. XLIII. Sesquiterpene lactones from *Centaurea amara* L. (amarin and dihydroamarin). *Quimica Organica y Bioquimica*, v. 76, p. 296-297, 1980.
- GRASES, F.; MELERO, G.; COSTA-BAUZÁ, A.; PRIETO, R.; MARCH, J. G. Urolithiasis and phytotherapy. *International Urology and Nephrology*, v. 26, n. 5, p. 507-511, 1994.
- HAN, G.; BAI, G.; WANG, X.; LIESCH, J. M.; ZINK, D. L.; HWANG, S. B. Isolation and identification of platelet activating factor (PAF) antagonists from great burdock (*Arctium lappa*). *Zhongcaoyao*, v. 23, n. 11, p. 563-566, 1992.
- HAN, B. H.; KANG, Y. H.; YANG, H. O.; PARK, M. K. A butyrolactone lignan dimer from *Arctium lappa*. *Phytochemistry*, v. 37, n. 4, p. 1161-1163, 1994.
- HEILMANN, J.; MULLER, E.; MERFORT, I. Flavonoid glucosides and dicaffeoylquinic acids from flowerheads of *Bupthalmum salicifolium*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 713-718, 1999.
- HERZ, W.; BRUNO, M. Heliangolides, kauranes and other constituents of *Helianthus heterophyllus*. *Phytochemistry*, v. 25, p. 1913-1916, 1986.
- HIROSE, M.; YAMAGUCHI, T.; LIN, C.; KIMOTO, N.; FUTAKUCHI, M.; KONO, T.; NISHIBE, S.; SHIRAI, T. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Letters*, v. 155, n. 1, p. 79-88, 2000.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

- HOLETZ, F. B. Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento, diferenciação e ultraestrutura de *Herpetomonas samuelesoi*. / Fabíola Barbieri Holetz. Maringá. [s. n.], 2003. 80 f.: il., Figs., tabs. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, 2003.
- INCA. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. *Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf> >. Acesso em 18 set. 2008.
- INCA. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. *Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>. Acesso em 11 mar. 2010.
- ISHIHARA, K.; YAMAGISHI, N.; SAITO, Y.; TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; HATAYAMA, T. Arctigenin from Fructus Arctii is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones*, v. 11, n. 2, p. 154-161, 2006.
- IWAKAMI, S.; WU, J. B.; EBIZUKA, Y.; SANKAWA, U. Platelet activating factor (PAF) antagonists contained in medicinal plants: lignans and sesquiterpenes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n. 5, p. 1196-1198, 1992.
- JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo. Companhia Editora Nacional. 13 ed. p.628-638. 2005.
- KARDOŠOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFÖLDI, J.; NOSÁL'OVÁ, G.; FRAŇNOVÁ, S.; HŤR'IBALOVÁ, V. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *herkules*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 33, n. 1-3, p. 135-140, 2003.
- KHARLAMOV, I. A. KHAZANOVICH, P. L.; KHALMATOVI, K. K. Pharmacognostic study of *Arctium tomentosum* Mill. and *Arctium leiospermum* Juz. et Serg. growing in Uzbekistan. *Farmatsiia*, v. 17, n. 3, p. 45-49, 1968.
- LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, G. M. C. P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16 n. 4, p. 531-536, 2006.
- LIN, C. C.; LU, J. M.; YANG, J. J.; CHUANG, S. C.; UJIIE, T. Anti-inflammatory and radical scavenge effects of *Arctium lappa*. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 24, n. 2, p. 127-137, 1996.
- LIN, S.-C., LIN, C.-H.; LIN, C.-C.; LIN, Y.-H.; CHEN, C.-F.; CHEN, I.-C.; WANG, L.-Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. *Journal of Biomedical Science*, v. 9, n. 5, p. 401-409, 2002.

- LÜ, W.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; DING, X.; CHEN, H.; LIU, M. Microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of arctiin and arctigenin in Fructus Arctii and its herbal preparations. *Journal of chromatography B*, v. 860, n. 1, p. 127-133, 2007.
- MARCO, J. A.; SANZ, J. F.; SANCENON, F.; SUSANNA, A.; RUSTAIYAN, A.; SABERI, M. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea species*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 3527-3530, 1992.
- MATSUMOTO, T.; HOSONO-NISHIYAMA, K.; YAMADA, H. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Medica*, v. 72, n. 3, p. 276-278, 2006.
- MATSUZAKI, Y.; KOYAMA, M.; HITOMI, T.; YOKOTA, T.; KAWANAKA, M.; NISHIKAWA, A.; GERMAIN, D.; SAKAI, T. Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. *Oncology reports*, v.19, n.3, p.721-7, 2008.
- MEDJROUBI, K.; BOUDERDARA, N.; BENAYACHE, F.; AKKAL, S.; SEGUIN, E.; TILLEQUIN, F. Sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 39, p. 506-507, 2003.
- MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M. Phytochemicals as potential cancer chemopreventive agents. In: *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. Bagchi D, Preuss HG. CRC Series in Modern Nutrition Science, p. 237-246, 2004.
- MING, D. S.; GUNS, E.; EBERDING, A.; TOWERS, N. G. H., Isolation and characterization of compounds with anti-prostate cancer activity from *Arctium lappa* L. using bioactivity-guided fractionation. *Pharmaceutical Biology*, v. 42, n. 1, p. 44-48, 2004.
- MKRTCHIAN, T. A.; SNAPIAN, G. G.; NIKOGOSIAN, G. A. Pectin production from burdock (*Arctium* sp.)). *Ukr biokhim zh*, v. 70, n. 1, p. 98-105, 1998.
- MORITANI, S.; NOMURA, M.; TAKEDA, Y.; MIYAMOTO, Ken-ichi. Cytotoxic components of bardanae fructus (Goboshi). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, n. 11, p. 1515-1517, 1996.
- OMAKI, I. T.; YAKUGAKU, Z. Arctiin, a constituent of the seeds of *Arctium lappa* L. *Chemisches Zentralblatt*, v. 55, p. 816-827, 1935.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS); BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): in vitro screening of traditional medicines for anti-HIV activity: memorandum from a WHO meeting, v. 67, n. 6, p. 613-618, 1989.

- OS'KINA, O. A.; PASHINSKIĬ, V. G.; KANAKINA, T. A.; POVET'EVA, T. N.; GRIBEL', N. V. The mechanisms of the anti-ulcer action of plant drug agents. *Eksp Klin Farmakol*, v. 62, n. 4, 37-39, 1999.
- PARK, S. Y.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; LEE, D.; RO, J. S.; HWANG, B. Y. Lignans from *Arctium lappa* and Their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, n. 1, p. 150-152, 2007.
- PEREIRA, J. V.; BERGAMO, D. C. B.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C.; PIETRO, R. C. L. R.; SILVA-SOUSA, Y. T. C. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Brazilian Dental Journal*, v. 16, n. 3, p. 192-196, 2005.
- PICHER, M. T.; SEOANE, E.; TORTAJADA, A. Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* var. *stenophylla*. *Phytochemistry*, v. 23, p. 1995-1998, 1984)
- RODRIGUEZ, P.; BLANCO, J.; JUSTE, S.; GARCÉS, M.; PÉREZ, R.; ALONSO, L.; MARCOS, M. Allergic contact dermatitis due to burdock (*Arctium lappa*). *Contact Dermatitis*, v. 33, n. 2, p. 134-135, 1995.
- RODRIGUEZ, H.; CASE, D. Epidemiology of cancer: an overview. In: *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. CRC Series in Modern Nutrition Science, p. 3-14, 2004.
- SALAN, U; OEKSUEZ, S. Sesquiterpene lactones, a cyclohexenone and aromatic compounds from *Centaurea salonitana*. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, p. 36-36, 2003.
- SALEH, N. A.; BOHM, B. A. Flavonoids of *Arctium minus* (Compositae). *Experientia*, v. 27, n. 12, p. 1494, 1971.
- SANTOS, A. C. Mecanismos de ação envolvidos nos efeitos da bardana (*Arctium lappa* L.) sobre o trato gastrointestinal. / Ana Cristina dos Santos. Curitiba, 2007. 104 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2007.
- SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; LEPIESZYNSKI, J.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; MISSAU, F. C.; DOS SANTOS, E. P.; PIZZOLATTI, M. G.; MARQUES, M. C. Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.60, n.6, p.795-801, 2008.
- SASAKI, Y.; KIMURA, Y.; TSUNODA, T.; TAGAMI, H. Anaphylaxis due to burdock. *International Journal of Dermatology*, v. 42, n. 6, p. 472-473, 2003.

- SAVINA, A. A.; SHEICHENKO, V. I.; STIKHIN, Y. V.; STIKHIN, V. A.; SOKOL'SKAYA, T. A.; ANISIMOVA, O. S.; KOPYT'KO, Y. F.; GRODNITSKAYA, E. I.; CHERKASOV, O. A. Sesquiterpene lactones in juice of great burdock leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 40, n. 11, p. 43-45, 2006.
- SHI, Y.; SHI, R.-b.; LIU, B.; LU, Y.-r.; DU, L.-j. Isolation and elucidation of chemical constituents with antiviral action from yinqiaosan on influenza virus. *Journal of Chinese Materia Medica*, v. 28, n. 1, p. 43-47, 2003.
- SHINODA, J.; YAKUGAKU, Z. Constitution of *Arctium lappa*, L. II. *Ykkzaj*, v. 49, p. 1165-1169, 1929.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica e sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: SP, 2005, p. 572-578.
- STEELE, V. E. Development of selected phytochemicals for cancer chemoprevention. In: *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. Bagchi D, Preuss HG. CRC Series in Modern Nutrition Science, p. 229-36, 2004.
- SUN, W. J.; SHA, Z. F.; GAO, H. Determination of arctiin and arctigenin in Fructus Arctii by reverse-phase HPLC. *Acta Pharmaceutical Sinica*, v. 27, n. 7, p. 549-551, 1992.
- SUN, W. J.; SHA, Z. F.; YUAN, Y. Determination of arctiin and arctigenin in Fructus Arctii by a TLC scanning method. *Yaowu Fenxi Zazhi*, v. 13, n. 3, p. 178-180, 1993.
- SUTOVSKA, M.; NOSALOVA, G.; FRANOVA, S.; KARDOSOVA, A. The antitussive activity of polysaccharides from *Althaea officinalis* L., var. *robusta*, *Arctium lappa* L., var. *herkules*, and *Prunus persica* L. Batsch. *Bratisl Lek Listy*, v. 108, n. 2, p. 93-99, 2007.
- SWANSTON-FLATT, S. K.; DAY, C.; FLATT, P. R.; GOULD, B. J.; BAILEY, C. J. Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research (Edinburgh, Lothian)*, v. 10, n. 2, p. 69-73, 1989.
- SWARUP, V.; GHOSH, J.; MISHARA, M. K.; BASU, A. Novel strategy for treatment of Japanese encephalitis using arctigenin, a plant lignan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.61, n.3, p.679-88, 2008.
- TAKASUGI, M.; KAWASHIMA, S.; KATSUI, N.; SHIRATA, A. Two polyacetylenic phytoalexins from *Arctium lappa*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 11, p. 2957-2958, 1987.
- TORTAJADA, A.; PICHER, M. T.; REVENTOS, M. M.; AMIGO, J. M. Structure and stereochemistry of melitensin, an elemanolide from *Centaurea aspera* var. *stenophylla*. *Phytochemistry*, v. 27, p. 3549-3550, 1988.

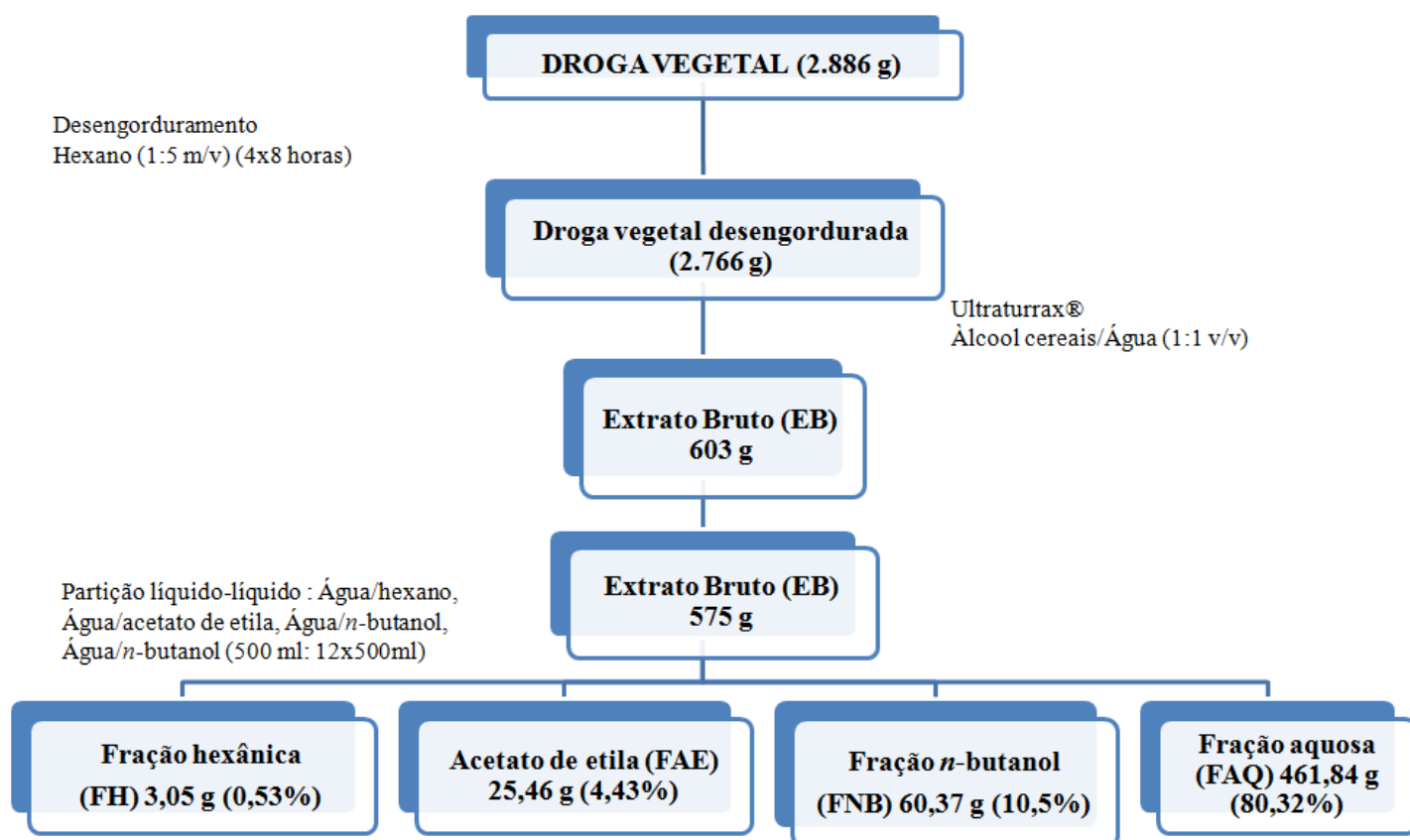
- TSEVEGSÜREN, N.; AITZETMÜLLER, K.; VOSMANN, K. Occurrence of gamma-linolenic acid in compositae: a study of *Youngia tenuicaulis* seed oil. *Lipids*, v. 35, n. 5, p. 525-529, 1999.
- TUNDIS, R.; STATTI, G.; MENICHINI, F.; MONACHE, F. D. Arctiin and onopordopicrin from *Carduus micropterus* ssp. *perspinosus*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 600-1, 2000.
- TUROLLA, M. S. R. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. / Monica Silva dos Reis Turolla. São Paulo, 2004. 145 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, 2004.
- VACCAREZZA, G. F. Condições orais e câncer de boca em fumantes. / Gabriela Furst Vaccarezza. São Paulo, 2007. 59 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- WANG, X.; LI, F.; SUNA, Q.; YUANA, J.; JIANG, T.; ZHENG, C. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of arctiin from Fructus Arctii. *Journal of Chromatography A*, v. 1063, n. 1-2, p. 247-251, 2005.
- WANG, H. Y.; YANG, J. S. Chemical constituents of *Arctium lappa* L. *Yaoxue* WANG, B.-S.; YEN, G.-C.; CHANG, L.-W.; YEN, W.-J.; DUH, P.-D. Protective effects of burdock (*Arctium lappa* Linne) on oxidation of low-density lipoprotein and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, v. 101, p. 729-738, 2006.
- YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; SANKAWA, U.; SHIBATA, S. Constituents of the fruit of *Arctium lappa*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 96, n. 12, p. 1492-1493, 1976.
- YAMASHITA, C. I. Estudo sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero *Casearia* coletadas em regiões distintas da Mata Atlântica, SP./ Celina Izumi Yamashita. São Paulo, 2006. 130 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2006.
- YANG, Z.; LIU, N.; HUANG, B.; WANG, Y.; HU, Y.; ZHU, Y. Effect of anti-influenza virus of arctigenin in vivo. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, v. 28, n. 11, p. 1012-1014, 2005.
- YONG, M.; KUN, G.; QIU, M.-H. A new lignan from the seeds of *Arctium lappa*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 9, n. 6, p. 541-544, 2007.
- ZENG, Y.; YOKOHIRA, M.; TAKEUCHI, H.; SAOO, K.; YAMAKAWA, K.; MATSUDA Y.; HOSOKAWA, K.; LI, J. Q.; IKEDA, M.; IMAIDA, K. Lack of significant modifying

effect of arctiin on prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats. *Cancer Letters*, v. 222, p. 145-151, 2005.

ZHANG, N.; LU, A. L.; WANG, D.; CHEN, G.; DANG, Q.; PEI, Y. H. Chemical constituents of *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*, v. 24, p. 549-551, 2007).

ZHENG, Y.-M.; CAI, S.-X.; XU, X.-Y.; FU, S.-Q. Dyamical studies on metabolic chemistry of lignan from seeds of *Arctium lappa*. *Journal of Chinese Materia Medica*, v. 30, n. 16, p. 1287-1289, 2005.

ANEXOS



Fluxograma 1: Procedimento empregado para obtenção das frações hexânica, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa a partir do EB de *A. lappa*.

Tabela 1: Volume e quantidade obtida por CLV das frações a partir da FAE

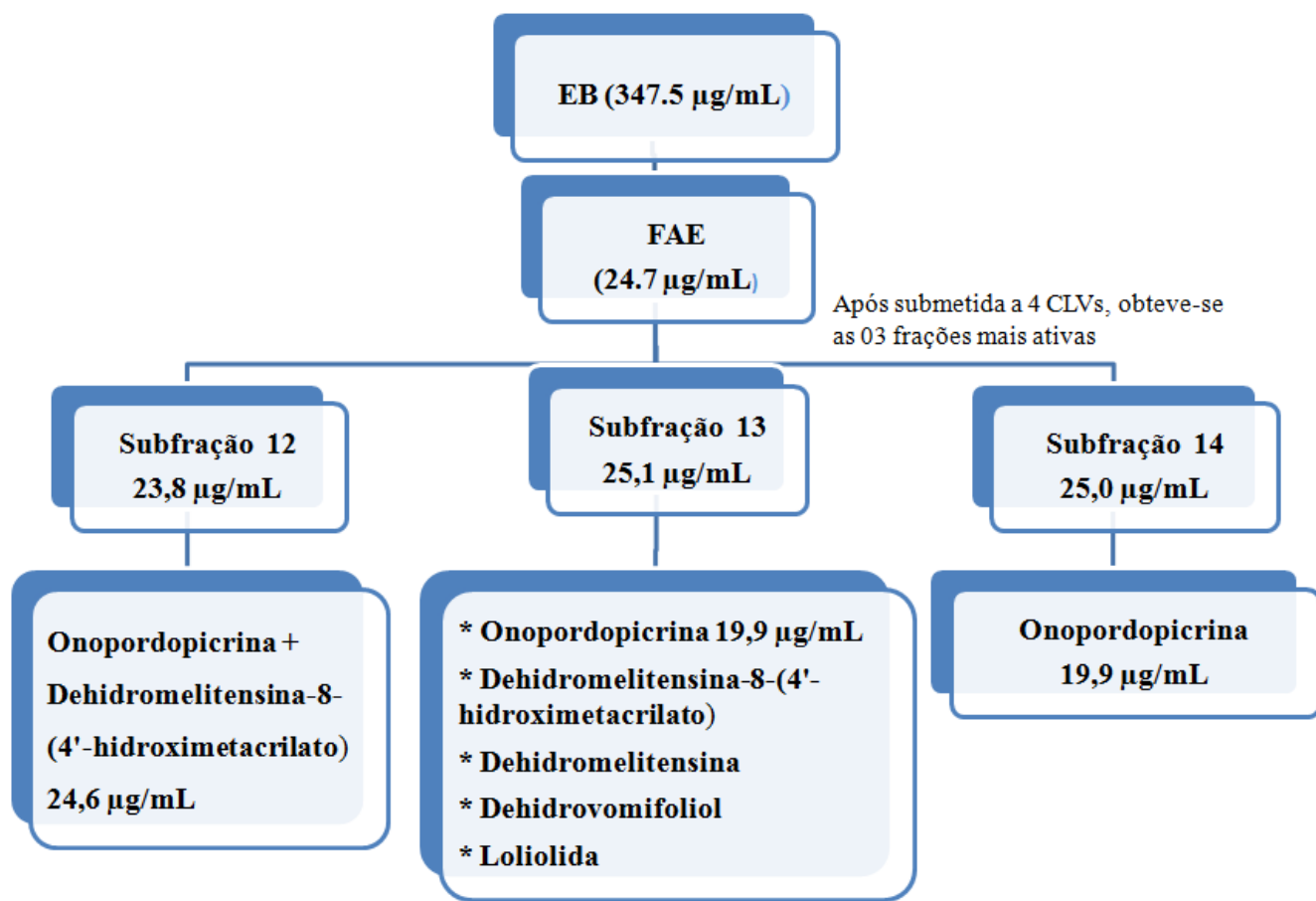
Fração	Volume (mL)	Quantidade (g)
Hexano	880	0,05
Diclorometano	1100	0,53
Acetato de etila	1870	12,70
Metanol	1870	7,70
Metanol/água (1:1)	1760	0,59

Tabela 2: Volume e quantidade obtida por CLV das frações a partir da FAE#3

Solvente	Volume (mL)	Quantidade (g)
Clorofórmio	1350	2,055
Clorofórmio:metanol (8:2)	600	4,683
Clorofórmio:metanol (6:4)	450	5,002
Metanol	525	0,331
<i>n</i> -butanol	1760	0,072

Tabela 3: Volume e quantidade obtida por CLV das frações a partir da FAE#3#2

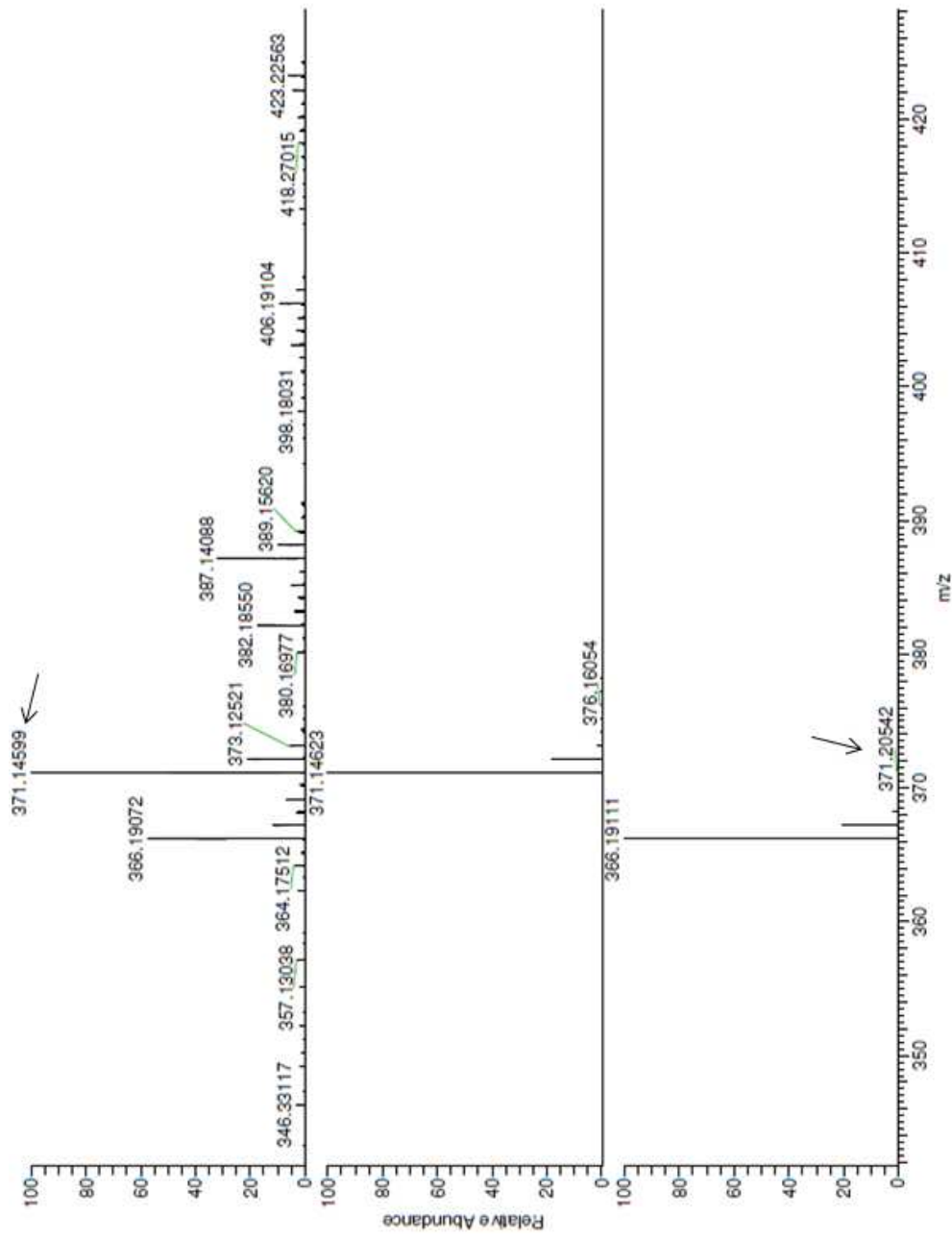
Solvente (v/v)	Frações (inicial-final) (mL)	Quantidade (g)
Hexano:acetato de etila (60:40)	1-80 (800)	1,603
Hexano:acetato de etila (55:45)	81-129(500)	0,158
Hexano:acetato de etila (50:50)	130-219 (900)	1,093
Hexano:acetato de etila:MeOH (50:49:1)	220-248 (400)	0,636
Hexano:acetato de etila:MeOH (50:49:2)	249-273 (200)	0,269
Hexano:acetato de etila:MeOH (50:45:5)	274-437 (2200)	0.530
Hexano:acetato de etila:MeOH (50:40:10)	438-453 (200)	0,158
Hexano:acetato de etila:MeOH (50:40:10)	454-477 (200)	0,262
Acetato de etila:MeOH (50:50)	478-500 (300)	0,255
MeOH	501-600 (950)	0,112



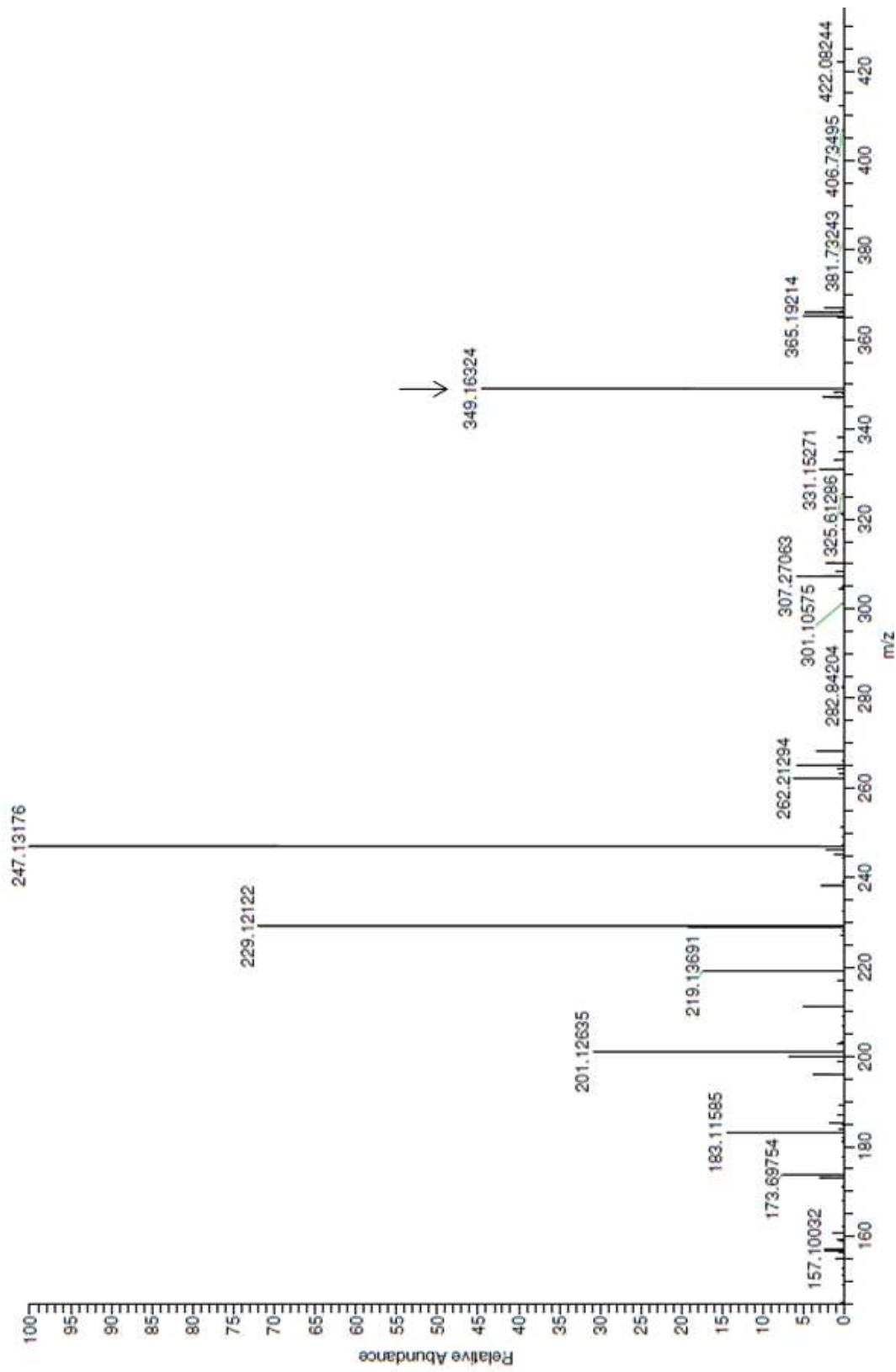
Fluxograma 2: Procedimento empregado para obtenção das substâncias isoladas a partir das subfrações; 12, 13 e 14, provindas da FAE.

- Anexo 1** - Espectro de massas (HR-ESI-MS) da substância **onopordopocrina (1)** com adição de Na⁺.
- Anexo 2** - Espectro de massas (HR-ESI-MS) da substância **onopordopocrina (1)** com adição de H⁺.
- Anexo 3** - Espectro de RMN ¹H da substância **Onopordopocrina (1)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 4** - Espectro 2D-COSY ¹Hx¹H da substância **Onopordopocrina (1)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 5** - Espectro de RMN de ¹³C/DEPT da substância **Onopordopocrina (1)** (CDCl₃/CD₃OD; 75,457 MHz; ppm).
- Anexo 6** - Espectro 2D-HMQC ¹Hx¹³C da substância **Onopordopocrina (1)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 7** - Espectro 2D-HMBC ¹Hx¹³C da substância **Onopordopocrina (1)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 8** - Espectro 2D-NOESY ¹Hx¹H da substância **Onopordopocrina (1)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 9** - Espectro de massas (HR-ESI-MS) uma mistura de substâncias contendo **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** com adição de Na⁺.
- Anexo 10** - Espectro de RMN ¹H da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** (CDCl₃/CD₃OD 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 11** - Espectro 2D-COSY ¹Hx¹H da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** (CDCl₃/CD₃OD 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 12** - Espectro de RMN de ¹³C/DEPT da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** (CDCl₃/CD₃OD; 75,457 MHz; ppm).
- Anexo 13** - Espectro 2D-gHSQC ¹Hx¹³C da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 14** - Espectro 2D-gHMBC ¹Hx¹³C da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).

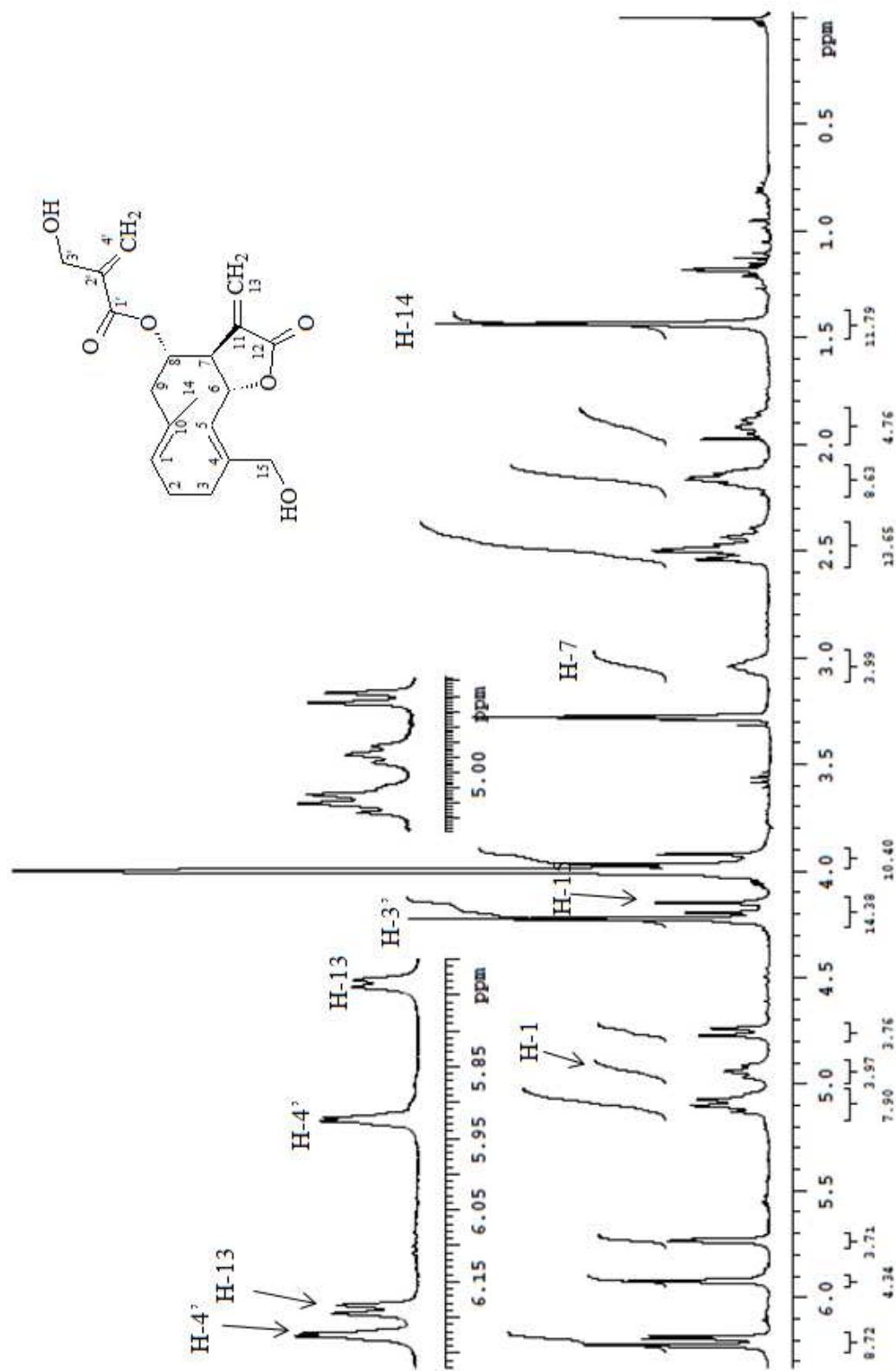
- Anexo 15** - Espectro 2D-NOESY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 16** - Espectro de RMN ^1H da mistura de **Melitensina (4)** com **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 17** - Espectro de RMN 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da substância **Melitensina (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 18** - Espectro de massas (HR-ESI-MS) da substância **dehidrovomifoliol (5)** com adição de H^+ .
- Anexo 19** - Espectro de RMN ^1H da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 20** - Espectro de RMN 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 21** - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 75,457 MHz; ppm).
- Anexo 22** - Espectro de RMN 2D-gHSQC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 23** - Espectro RMN 2D-gHMBC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 24** - Espectro de RMN ^1H da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 25** - Espectro de RMN 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).
- Anexo 26** - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 75,457 MHz; ppm).
- Anexo 27** - Espectro RMN 2D-gHMBC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).



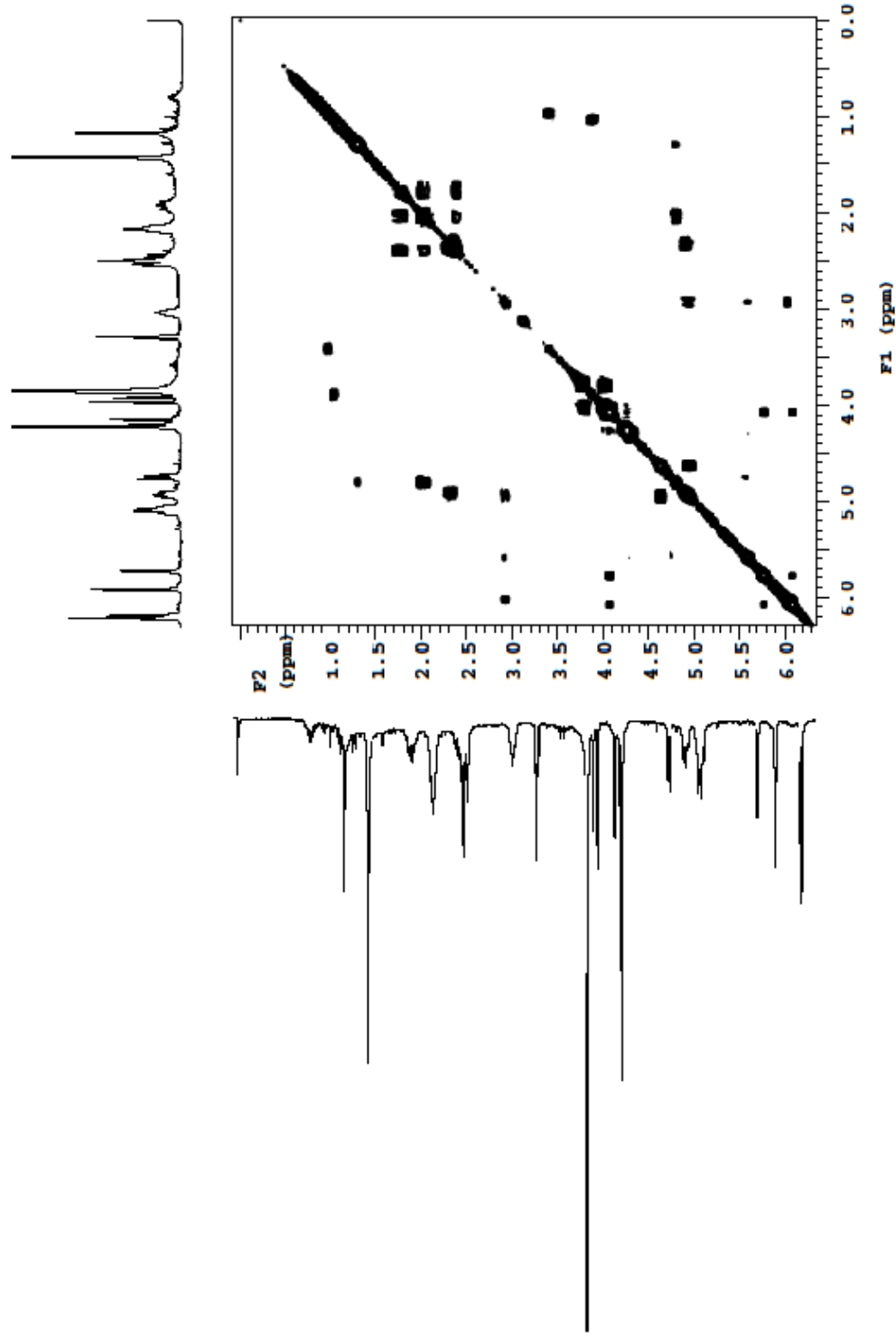
Anexo 1 - Espectro de massas (HR-ESI-MS) da substância **onopordopicrina (1)** com adição de Na^+ .



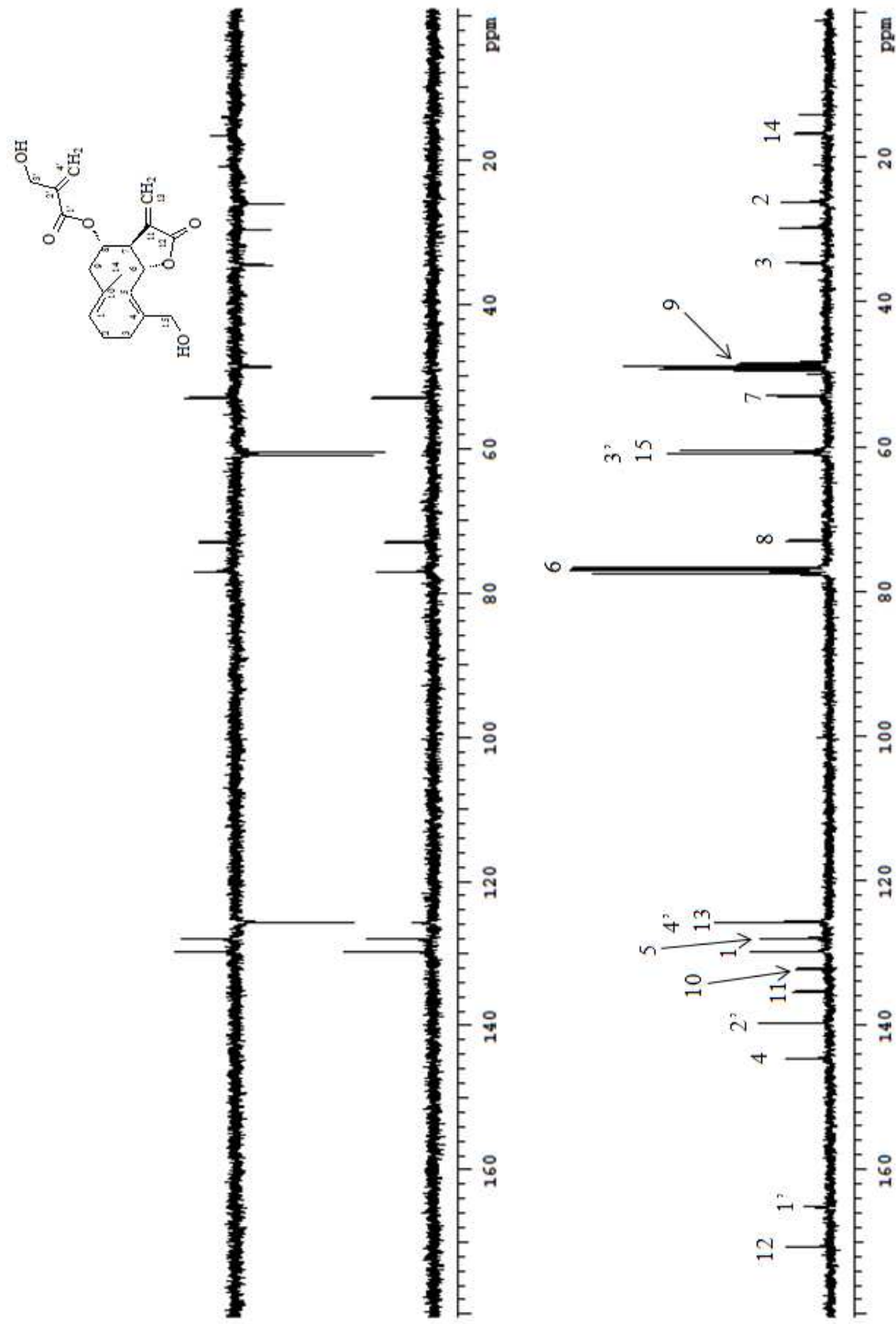
Anexo 2 - Espectro de massas (HR-ESI-MS) da substância **onopordopicrina (1)** com adição de H^+ .



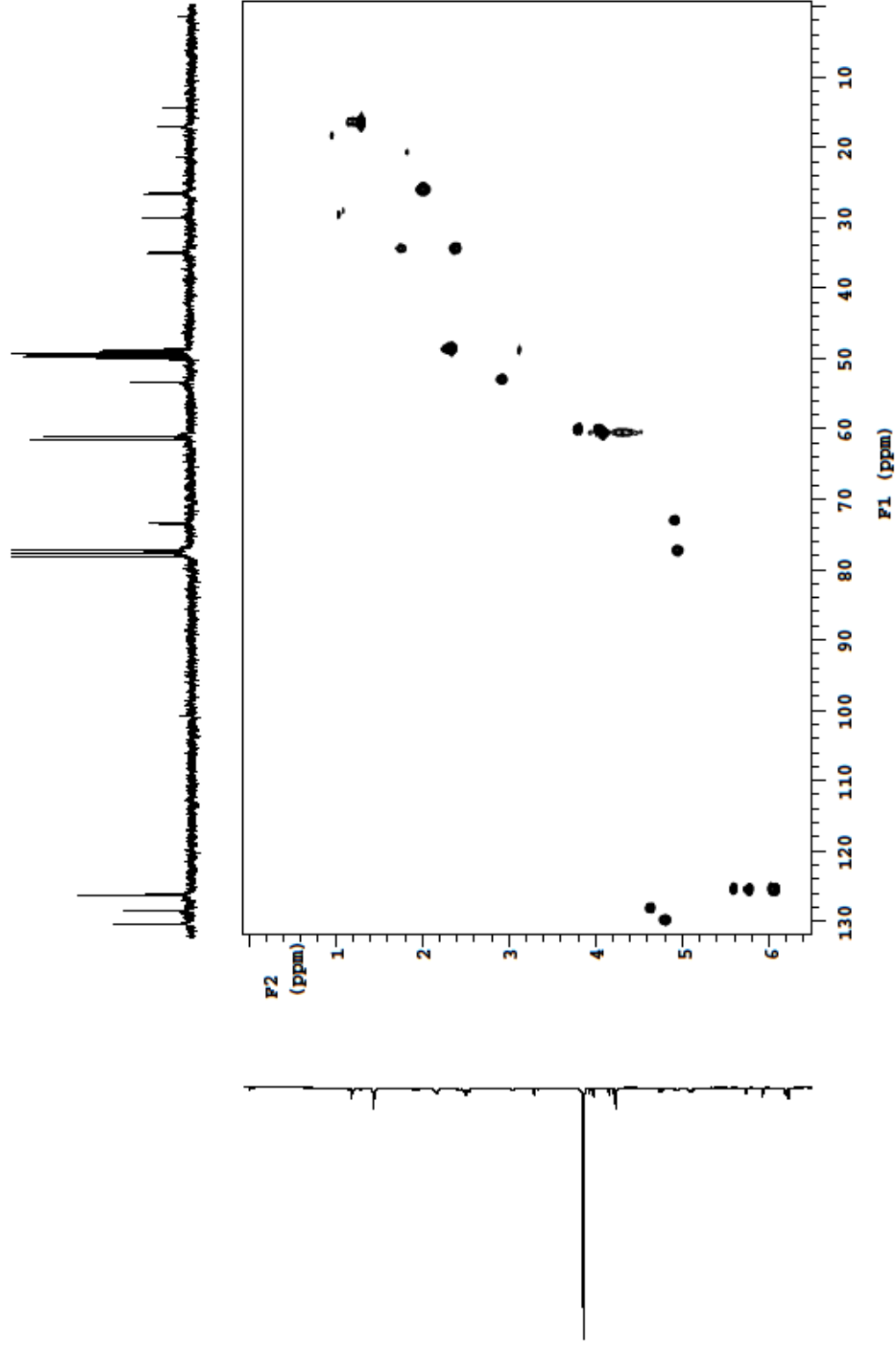
Anexo 3 - Espectro de RMN ^1H da substância **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,06 MHz; ppm).



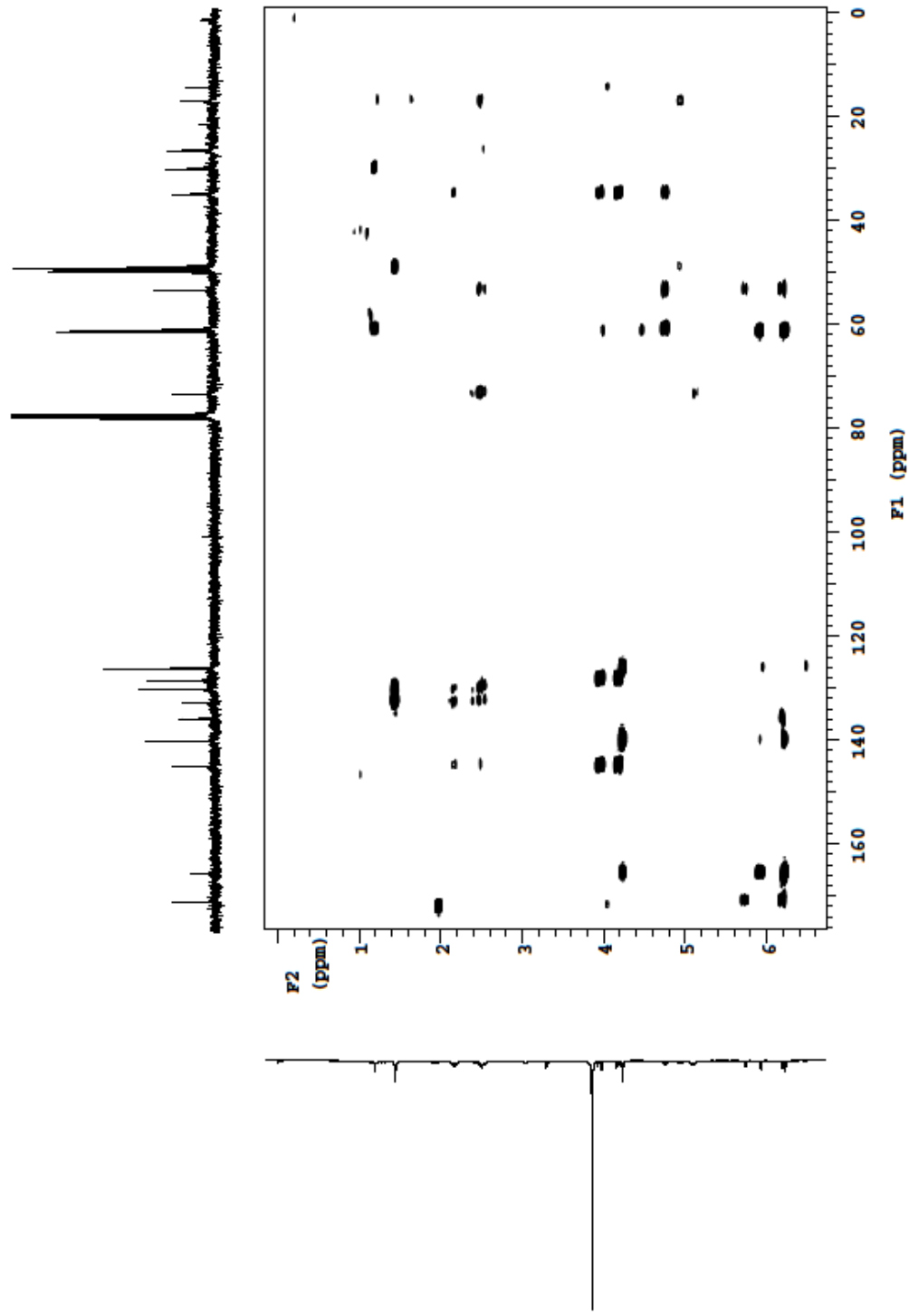
Anexo 4 - Espectro 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da substância **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



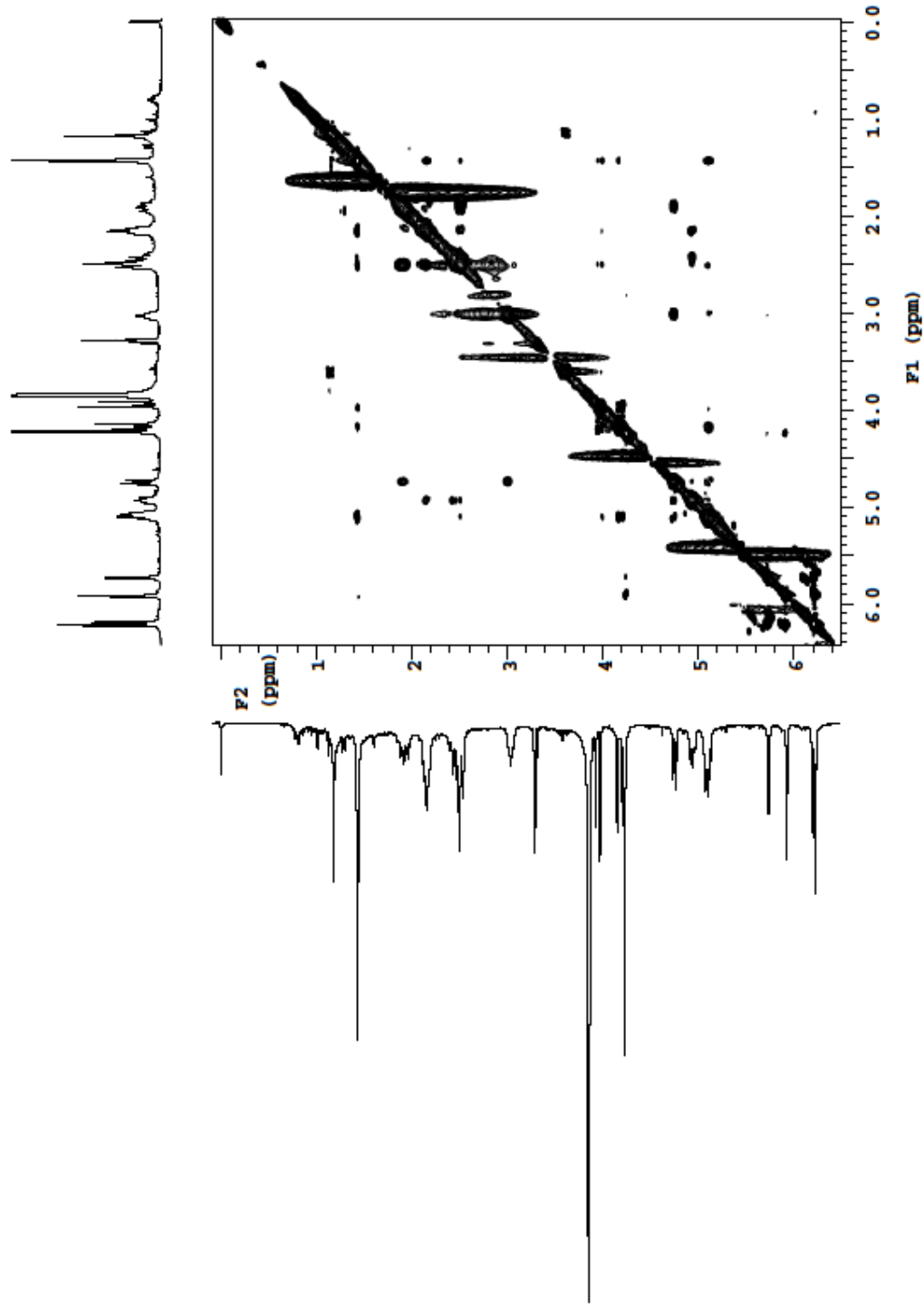
Anexo 5 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 75,457 MHz; ppm).



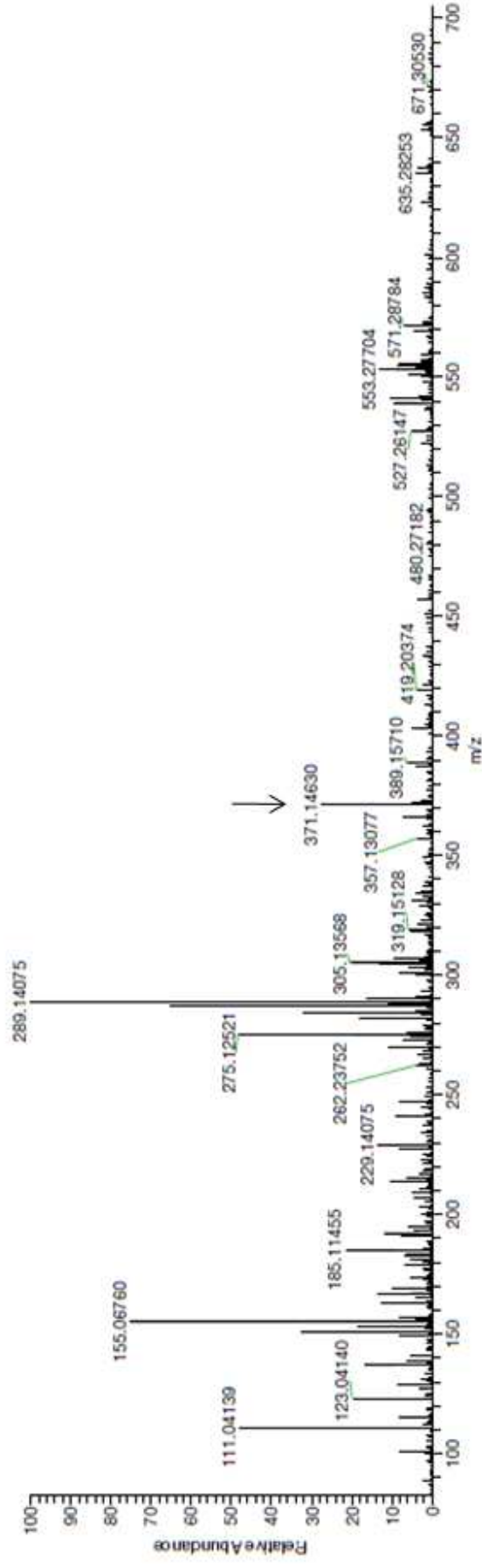
Anexo 6 - Espectro 2D-HMQC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância Onopordopicrina (1) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



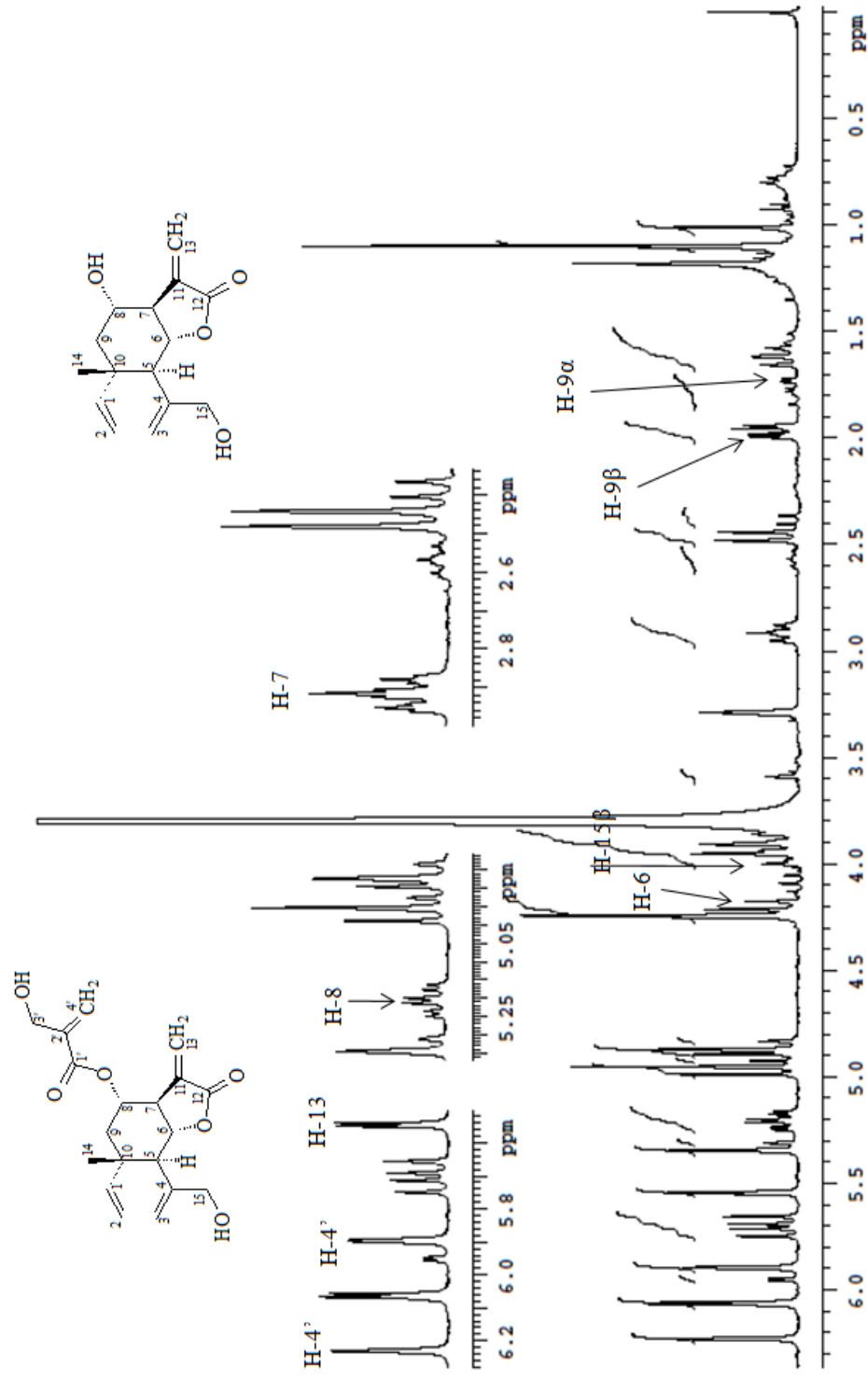
Anexo 7 - Espectro 2D-HMBC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



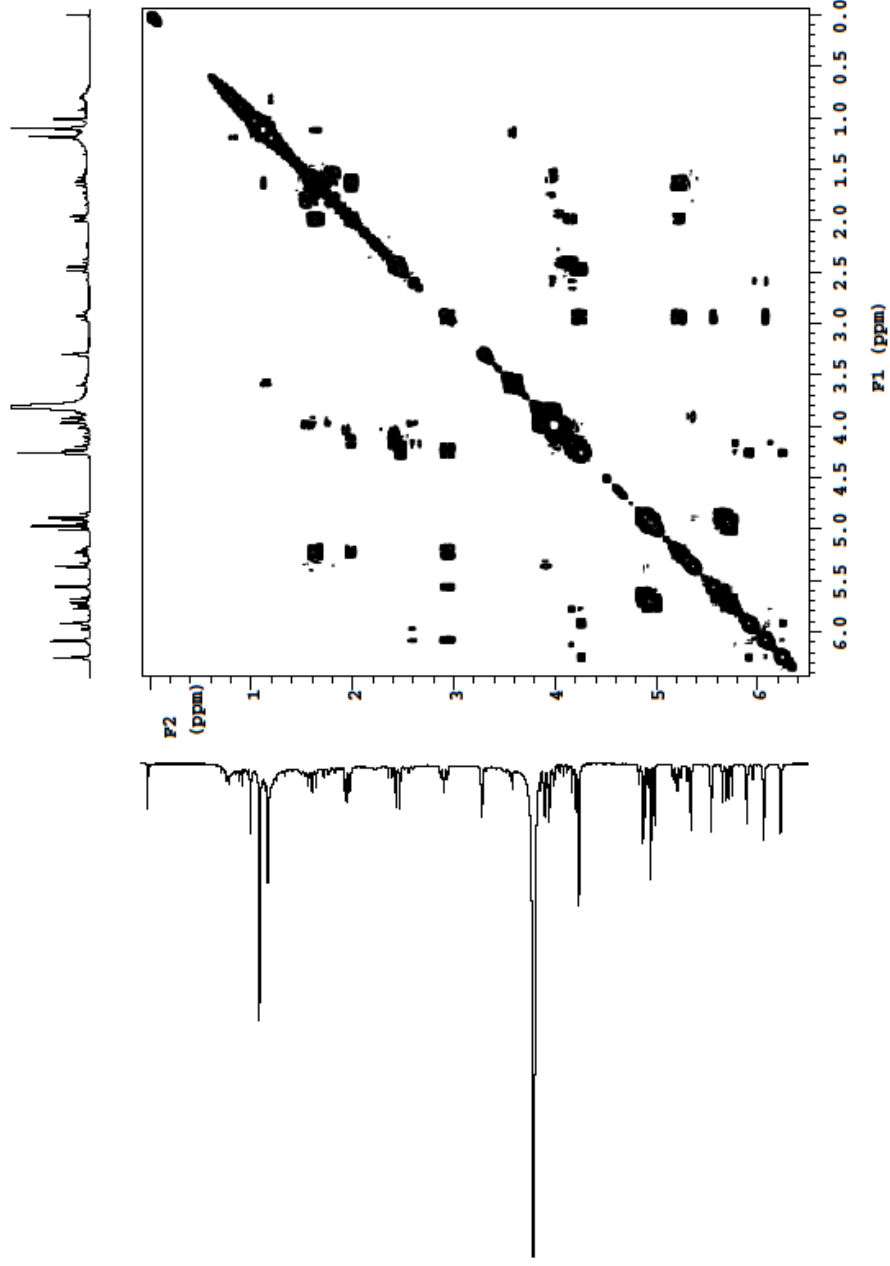
Anexo 8 - Espectro 2D-NOESY $^1\text{Hx}^1\text{H}$ da substância **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



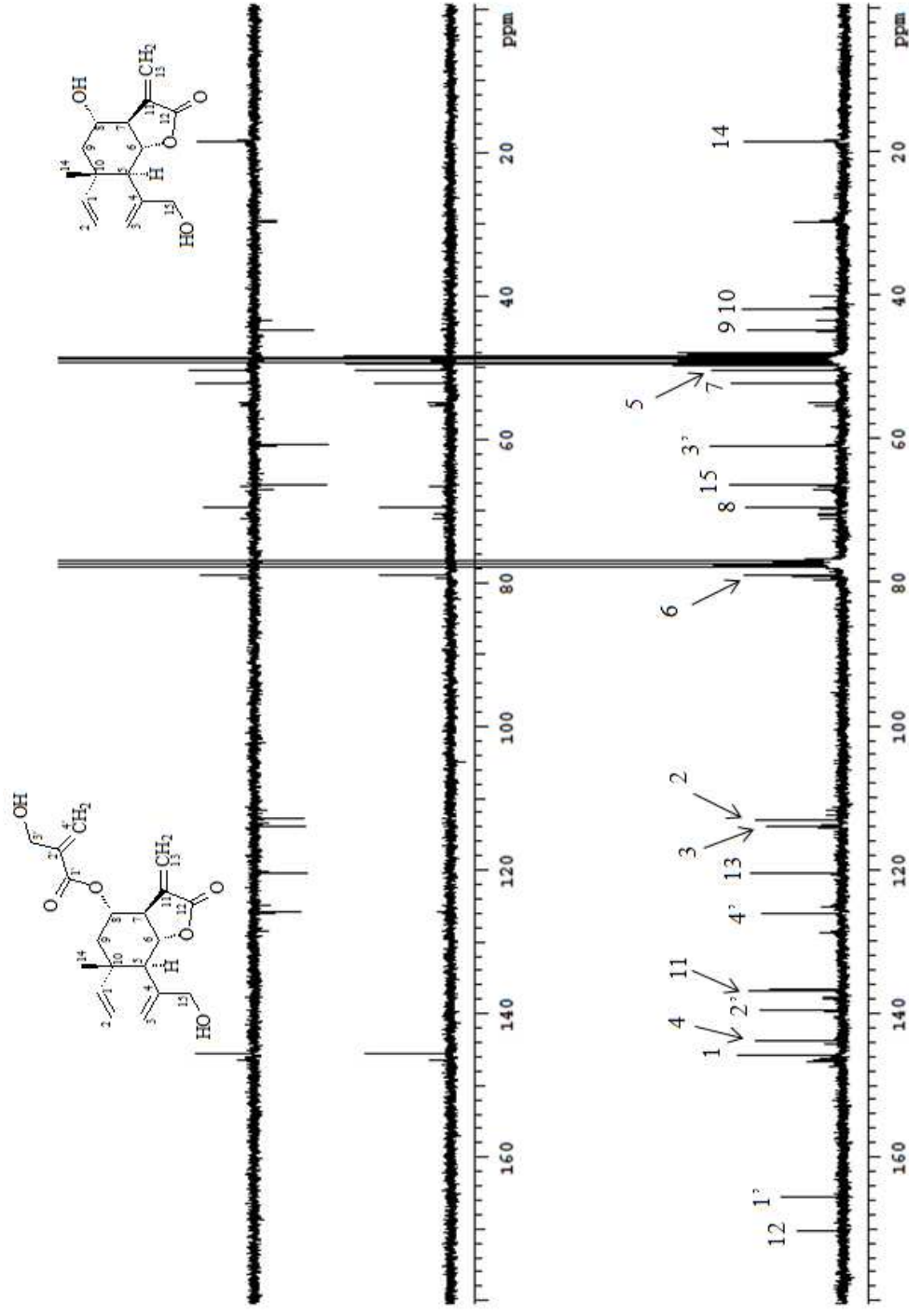
Anexo 9 - Espectro de massas (HR-ESI-MS) com uma mistura de substâncias contendo **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** com adição de Na^+ .



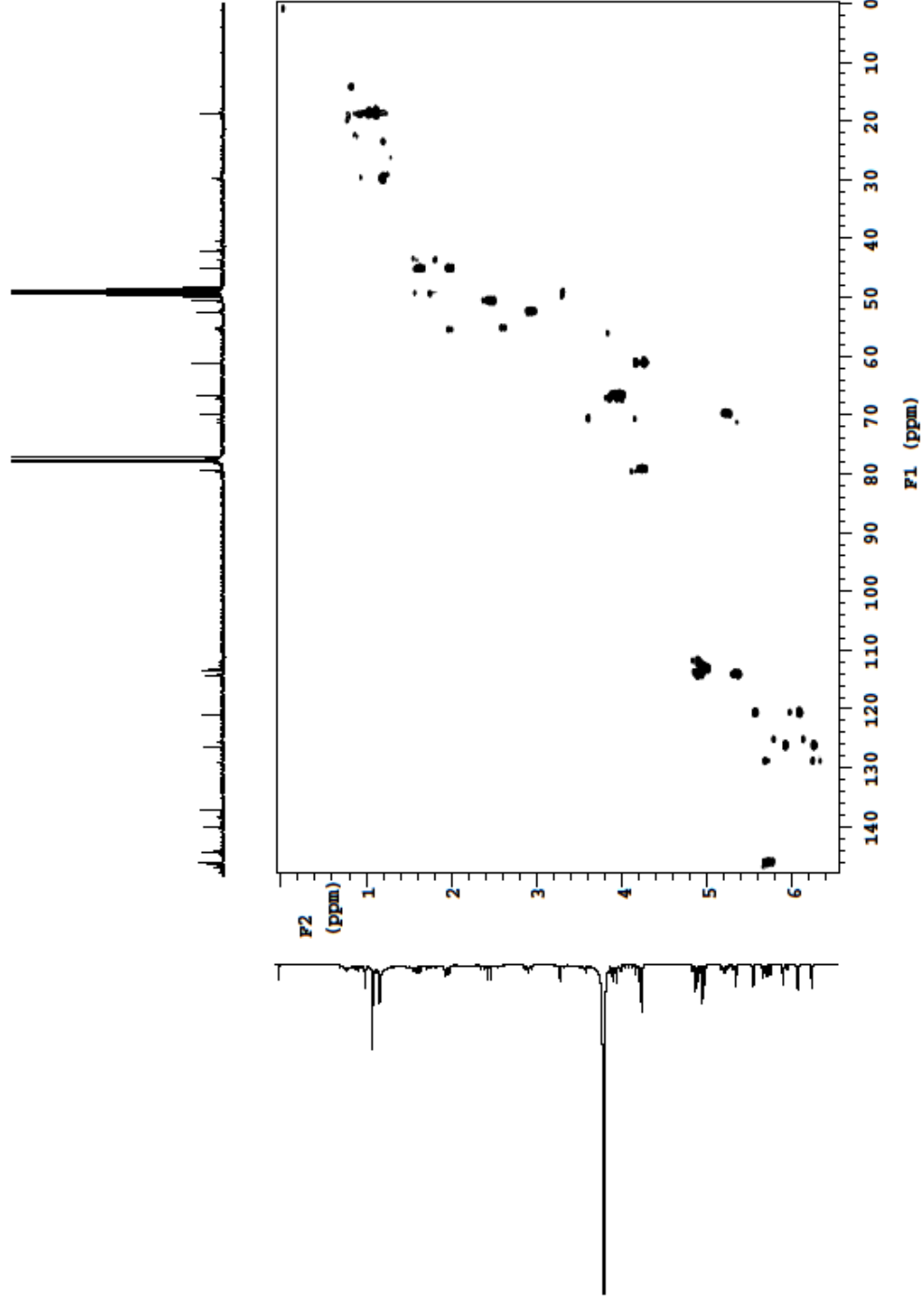
Anexo 10 - Espectro de RMN ^1H da mistura de Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) e Dehidromelitensina (3) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 300,060 MHz; ppm).



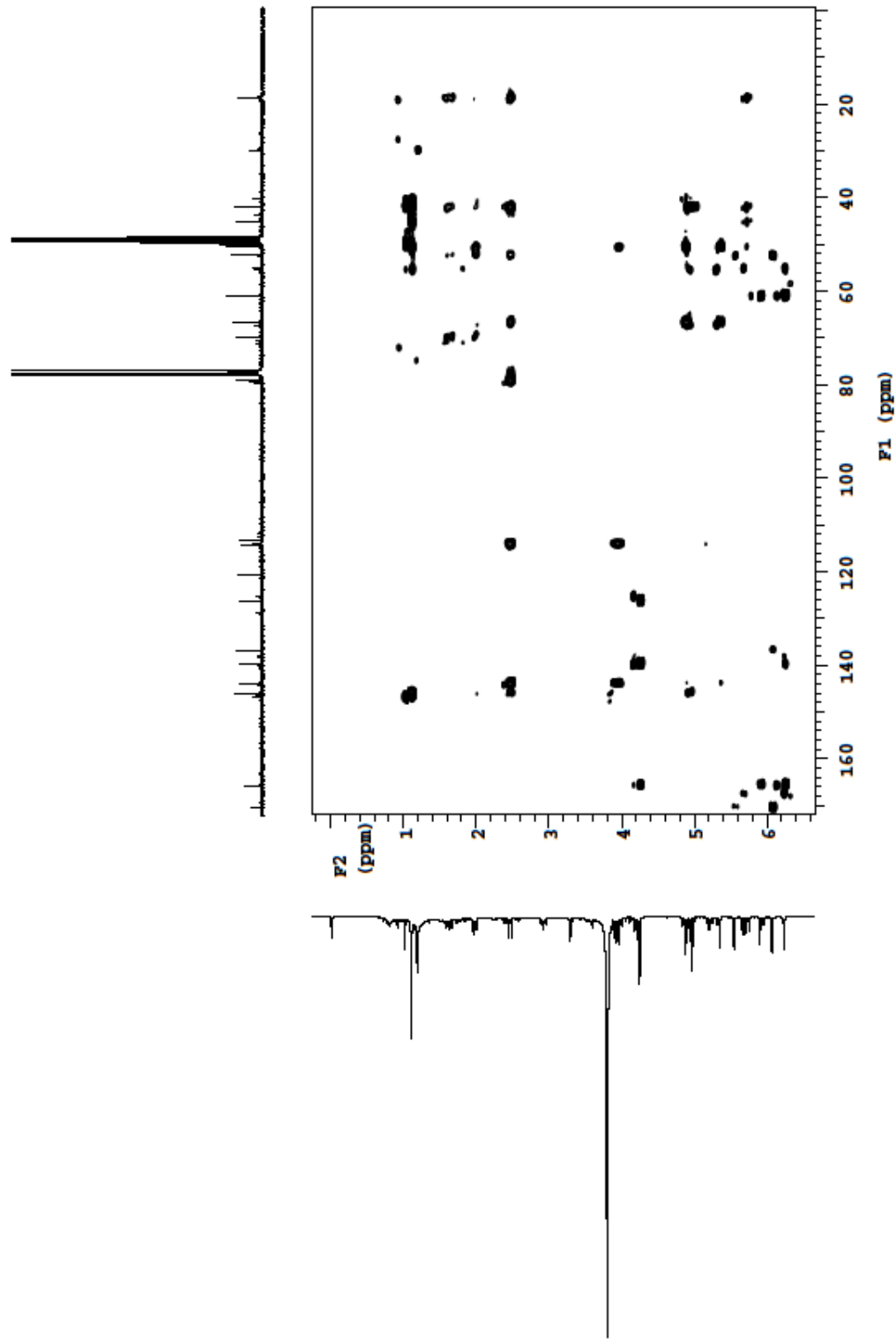
Anexo 11 - Espectro 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da mistura de Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) e Dehidromelitensina (3)($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



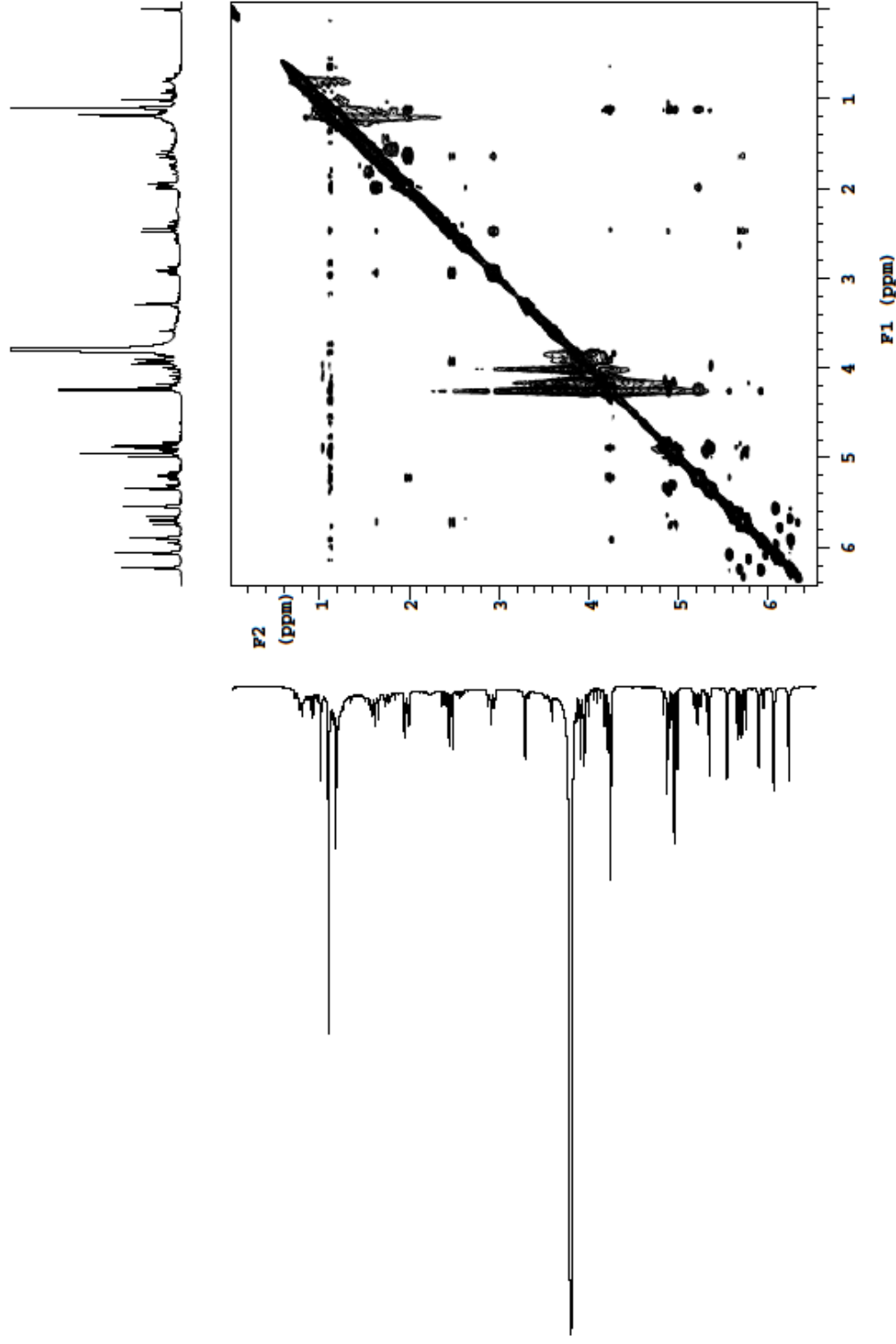
Anexo 12 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 75,457 MHz; ppm).



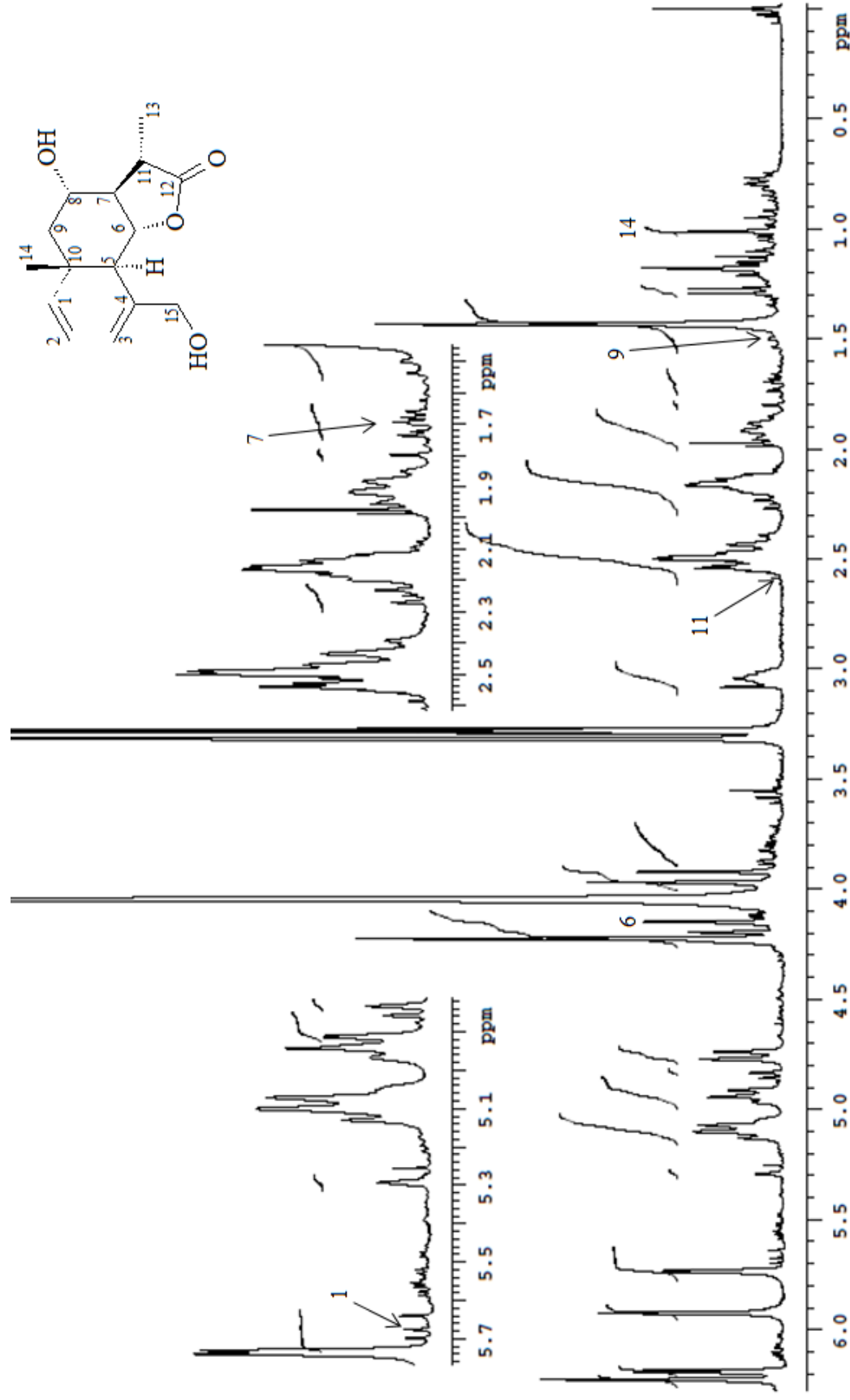
Anexo 13 - Espectro 2D-gHSQC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da mistura de Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) e Dehidromelitensina (3) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



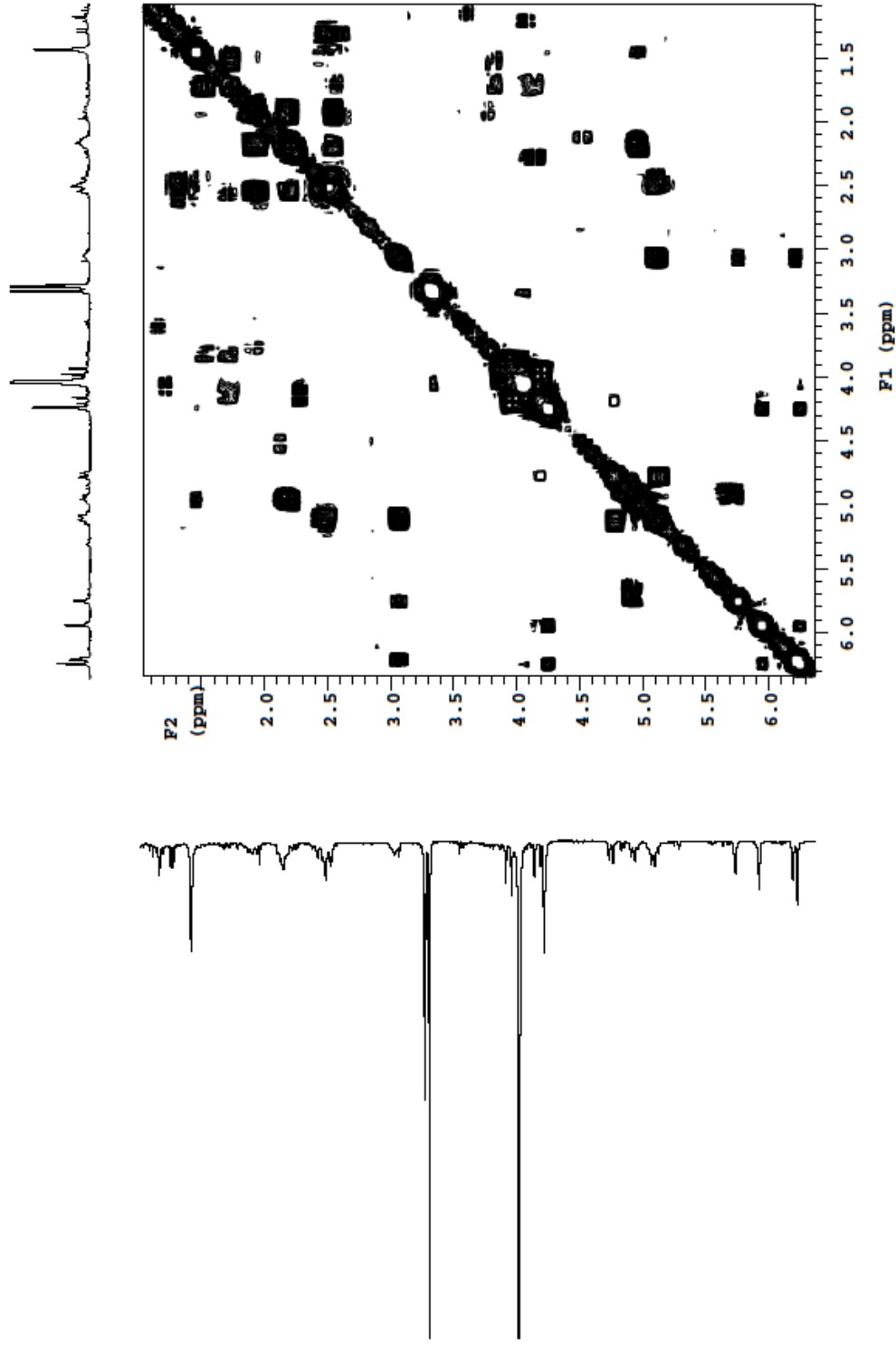
Anexo 14 - Espectro 2D-gHMBC $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ da mistura de Delhidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2) e Delhidromelitensina (3) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



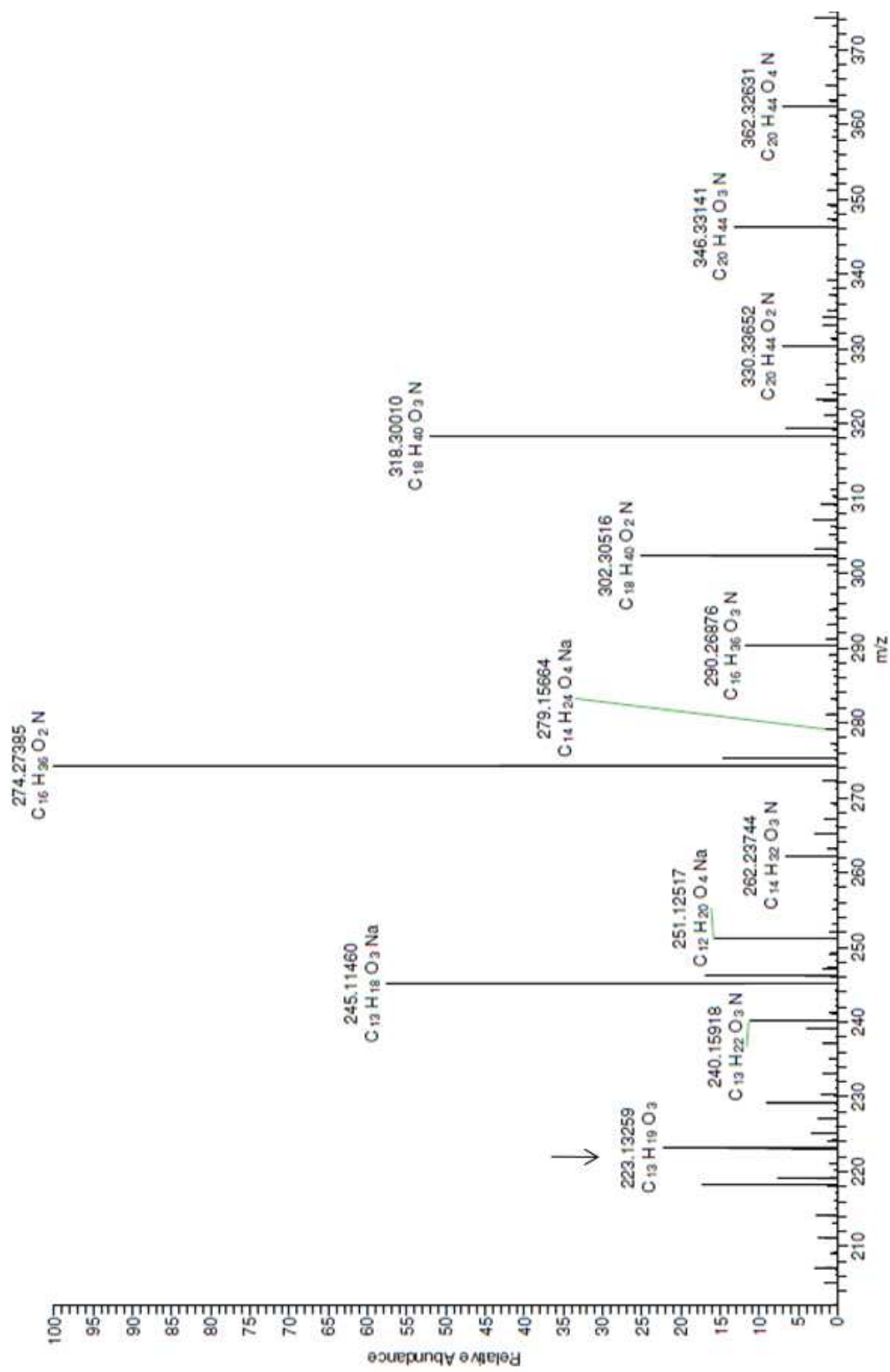
Anexo 15 - Espectro 2D-NOESY ¹Hx¹H da mistura de **Dehidromelitensina-8-(4'-hidroximetacrilato) (2)** e **Dehidromelitensina (3)** (CDCl₃/CD₃OD; 300,060 MHz; ppm).



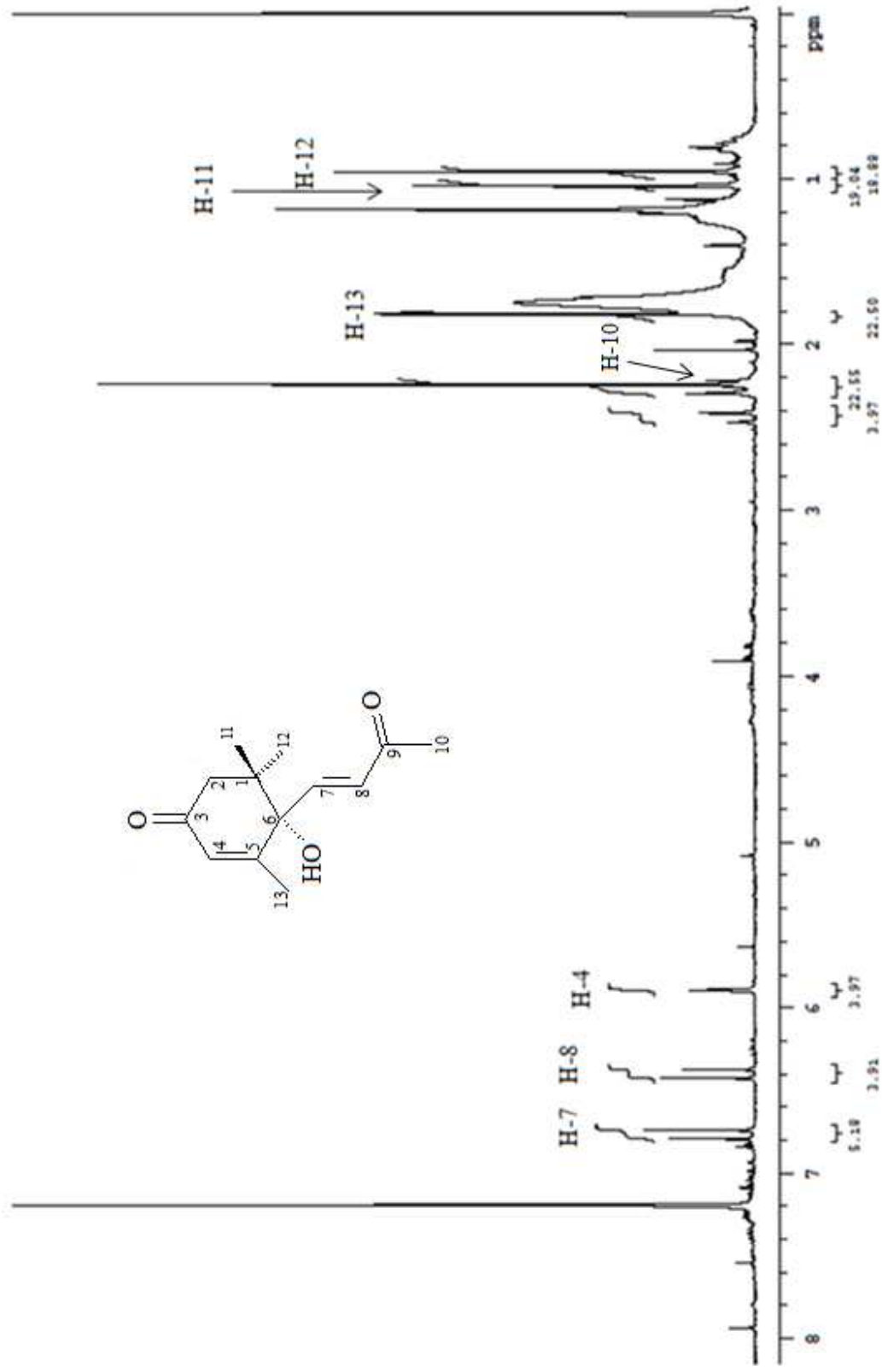
Anexo 16 - Espectro 2D-NOESY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ da mistura de **Melitensina (4)** com **Onopordopicrina (1)** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,060 MHz; ppm).



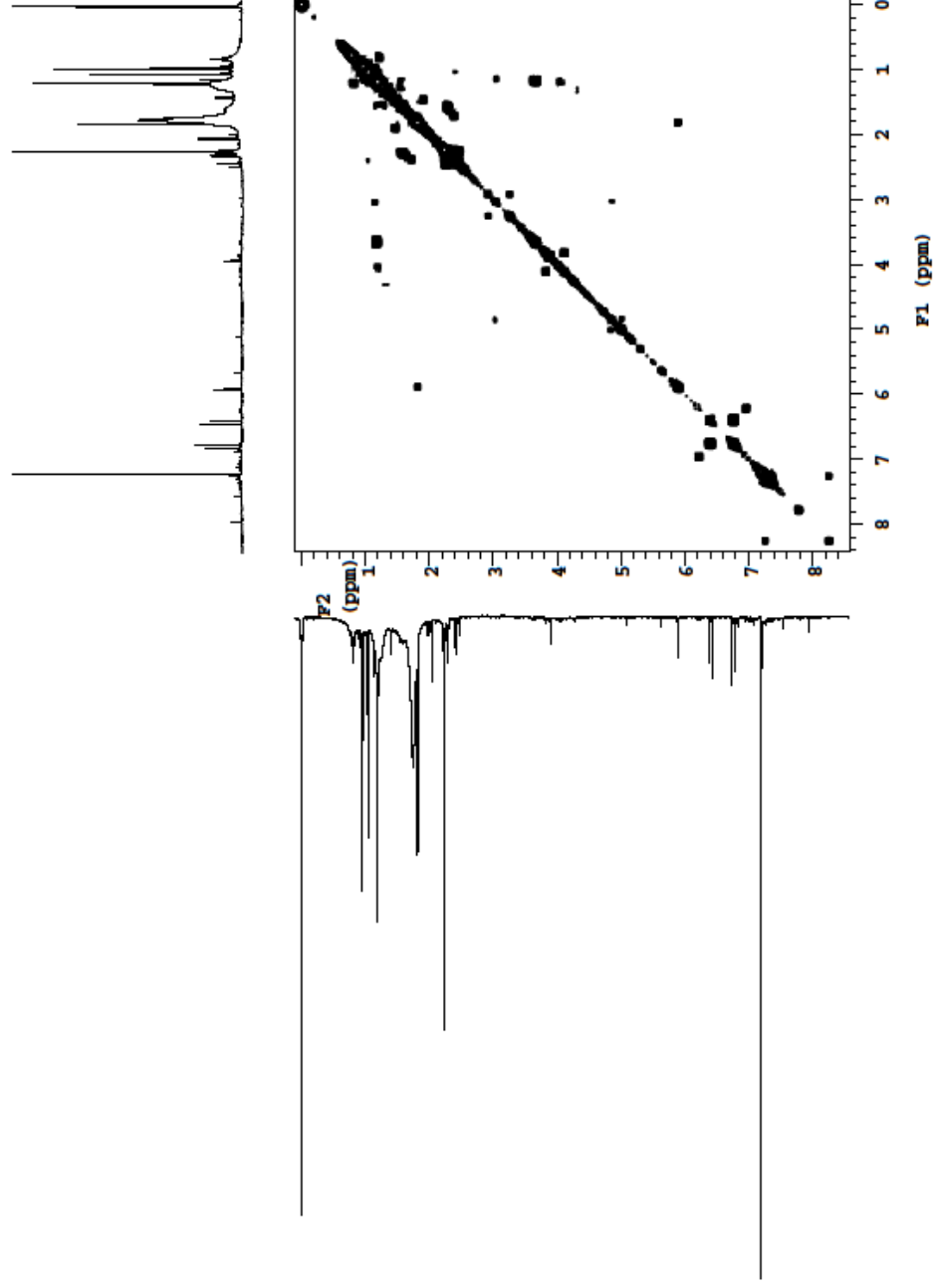
Anexo 17 - Espectro de RMN 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da substância **Melitensina (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).



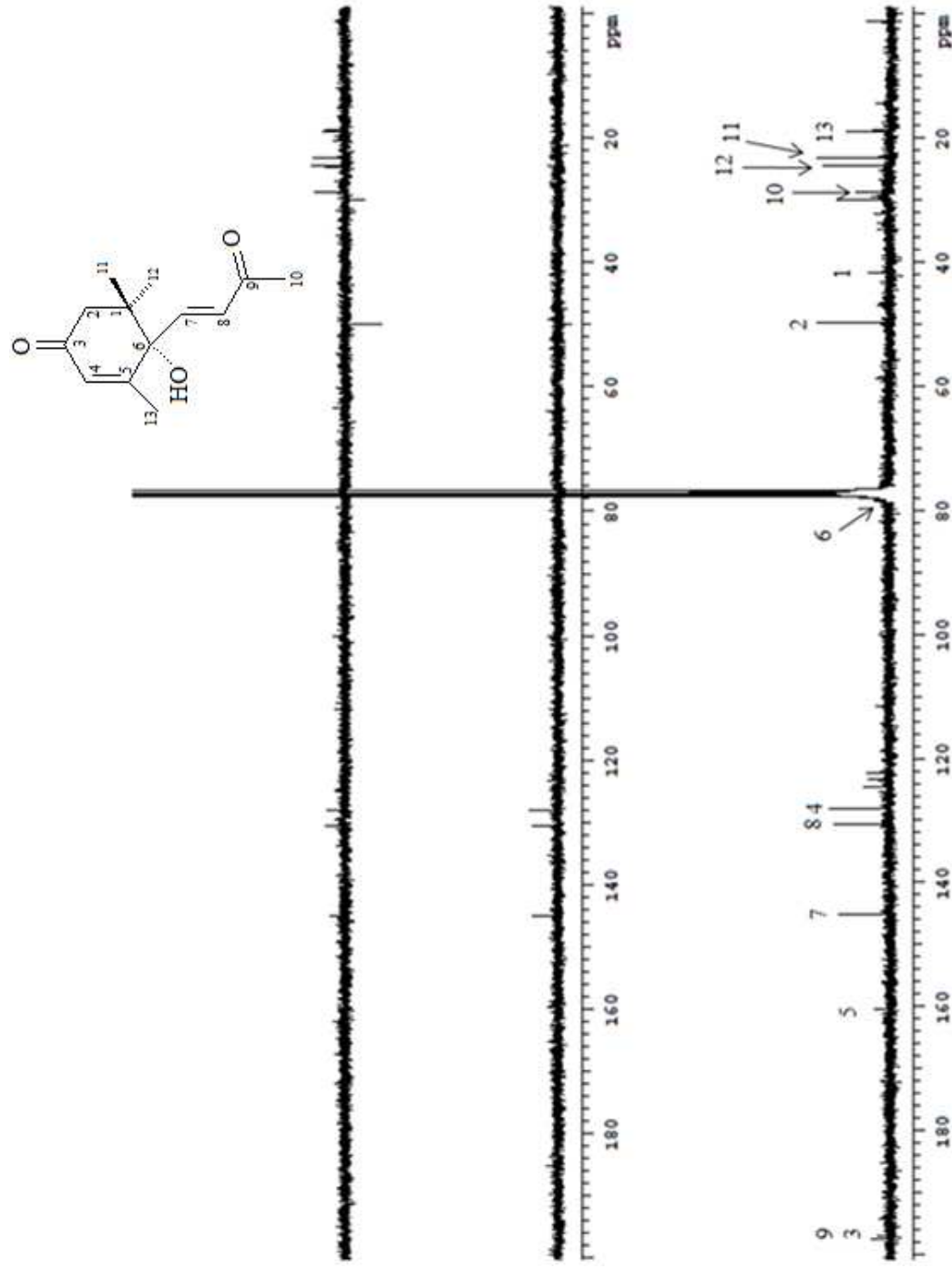
Anexo 18 - Espectro de massas (HR-ESI-MS) da substância **dehydrovomifoliol (5)** com adição de H^+ .



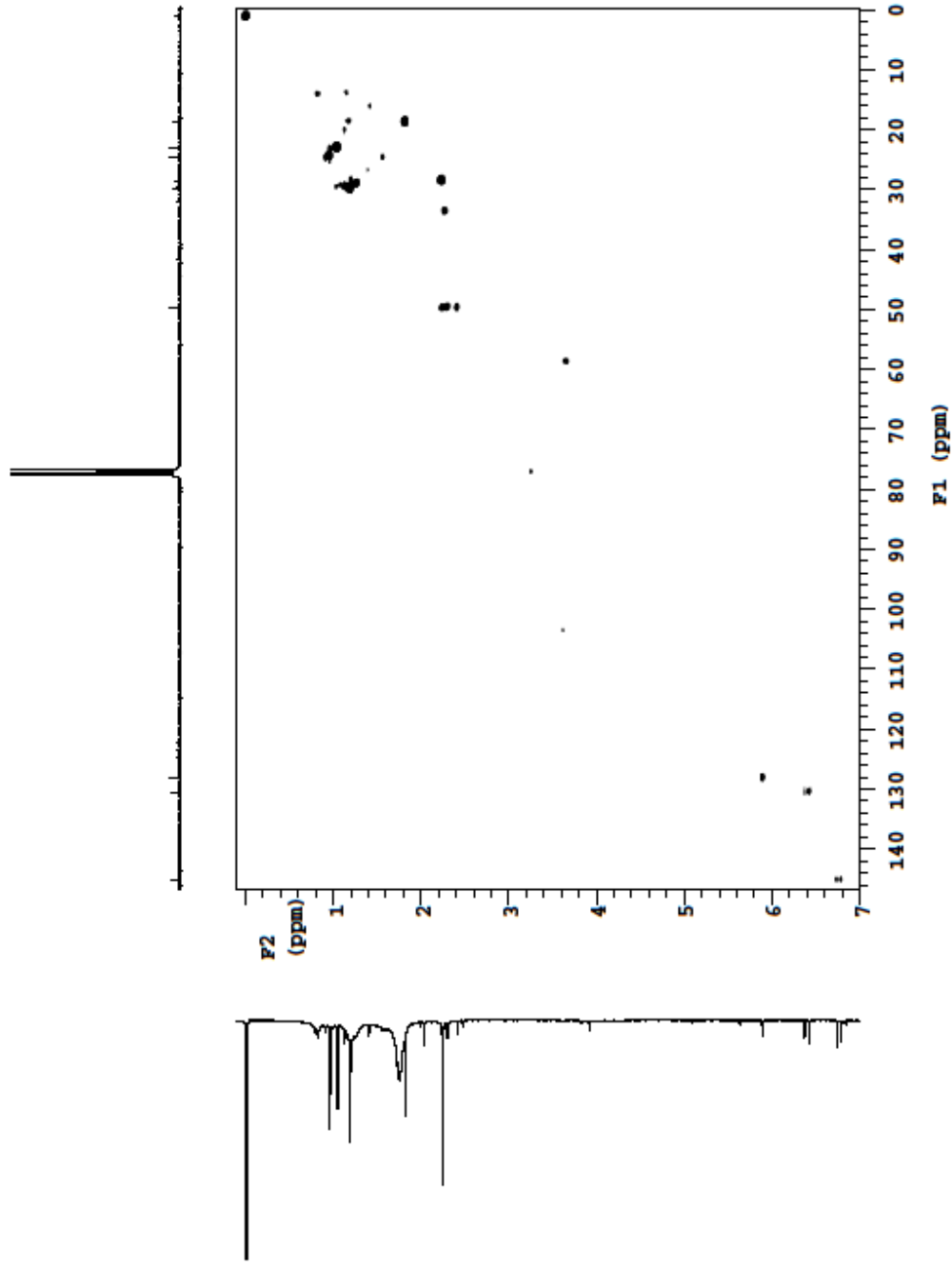
Anexo 19 - Espectro de RMN ¹H da substância **Dehidrovomifolol (5)** (CDCl₃; 300,060 MHz; ppm).



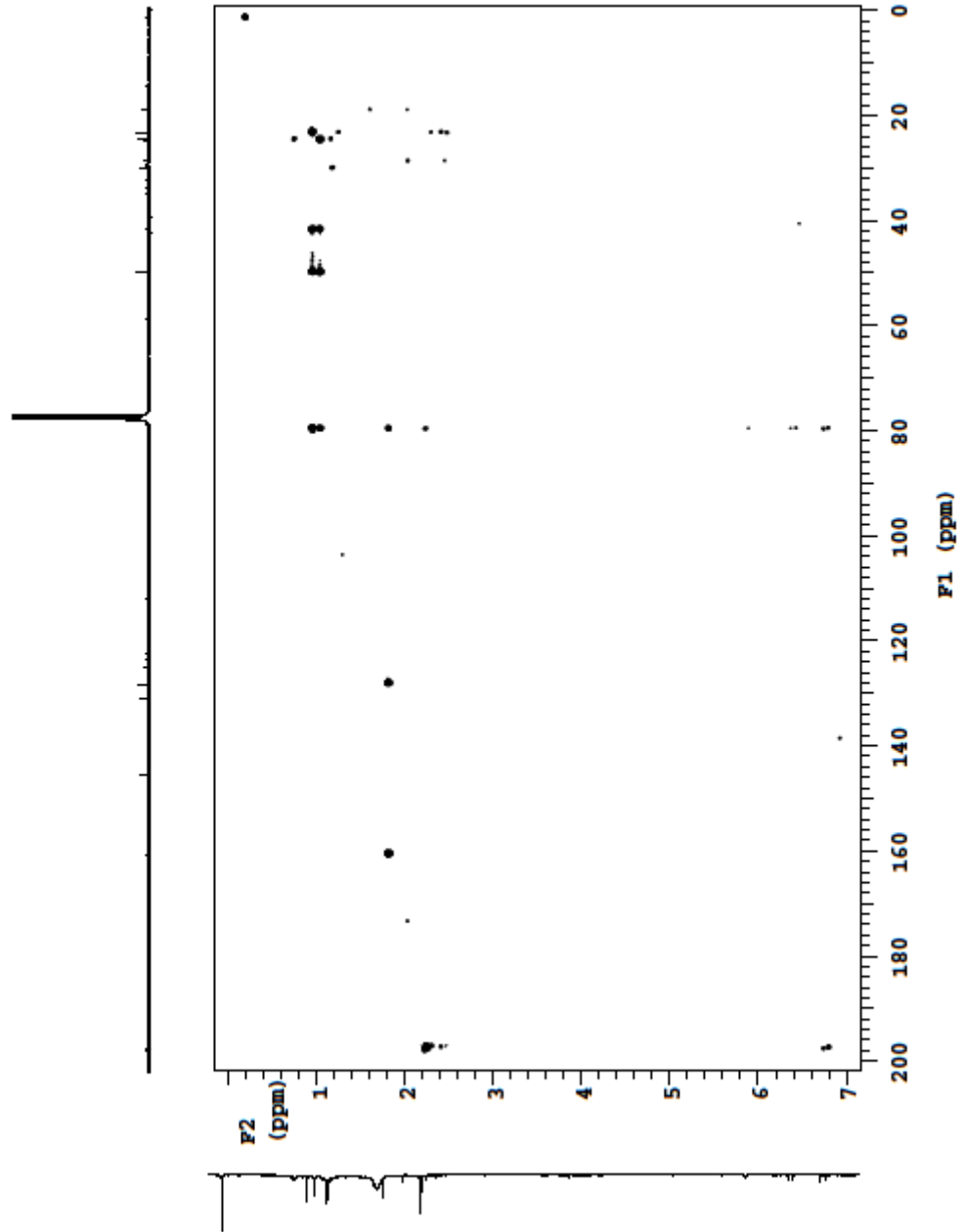
Anexo 20 - Espectro de RMN 2D-COSY ¹Hx¹H da substância **Delidrovomifoliol (5)** (CDCl₃; 300,060 MHz; ppm).



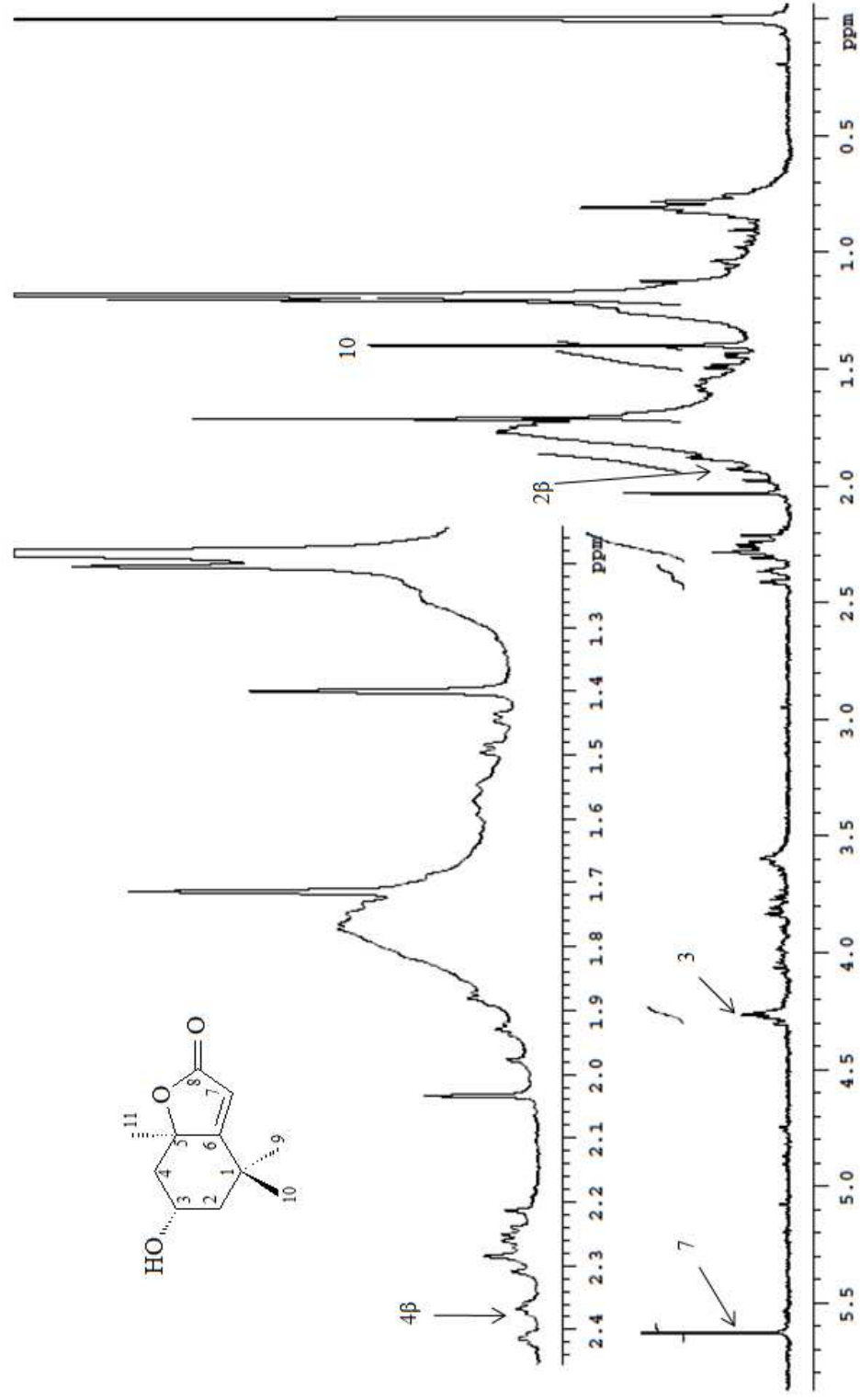
Anexo 21 - Espectro de RMN de ¹³C/DEPT da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl₃; 75,457 MHz; ppm).



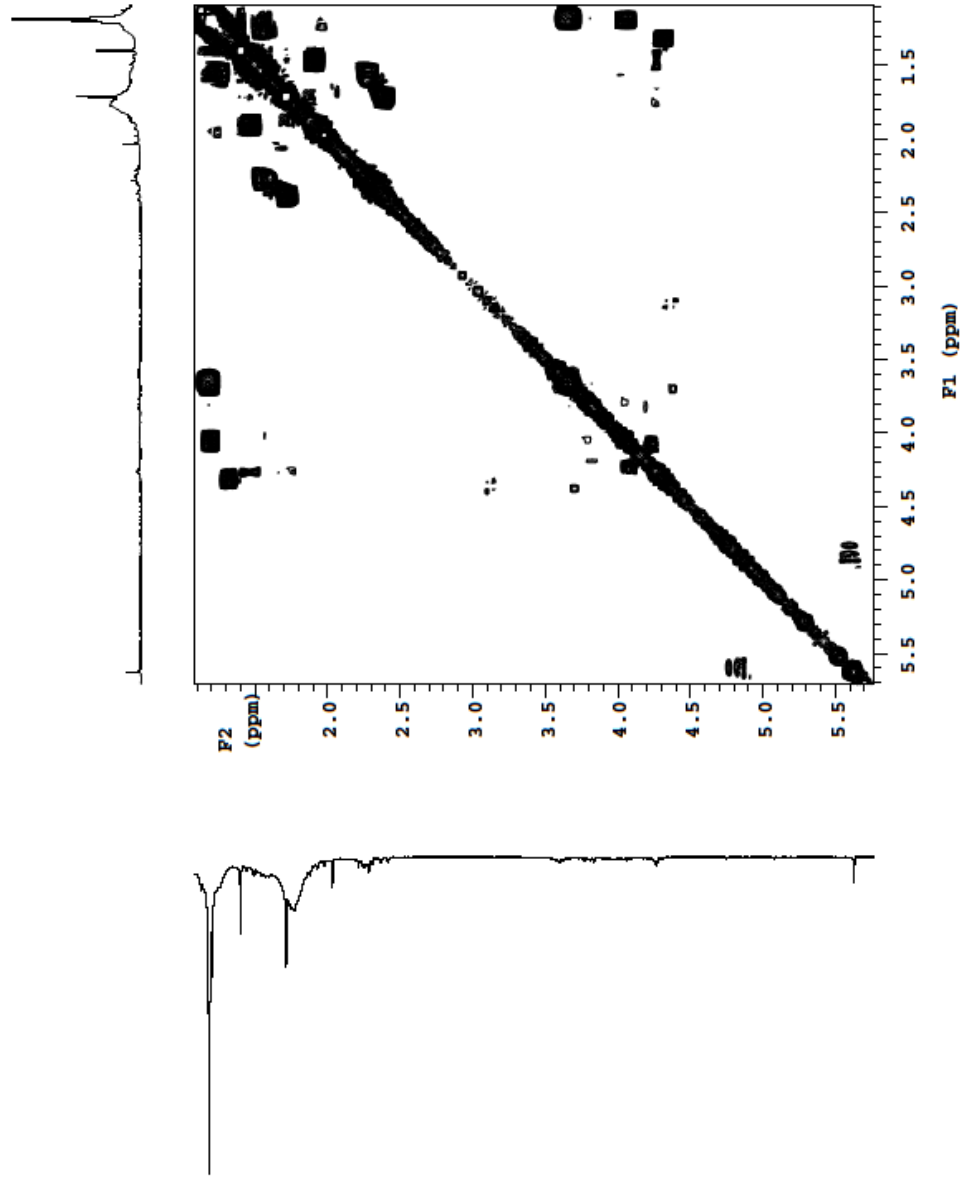
Anexo 22 - Espectro de RMN 2D-gHSQC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Dehidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).



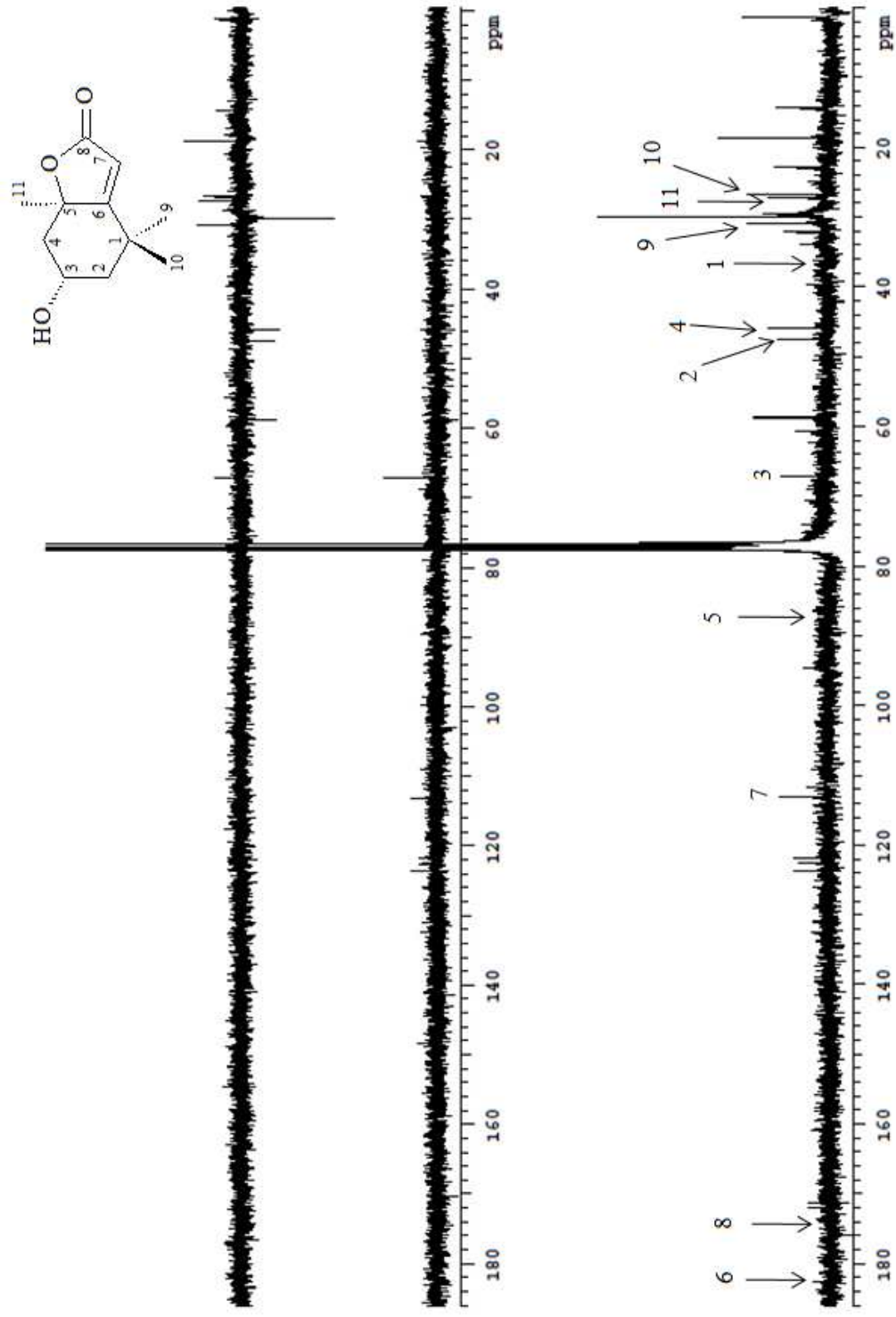
Anexo 23 - Espectro RMN 2D-gHMBC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Delidrovomifoliol (5)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).



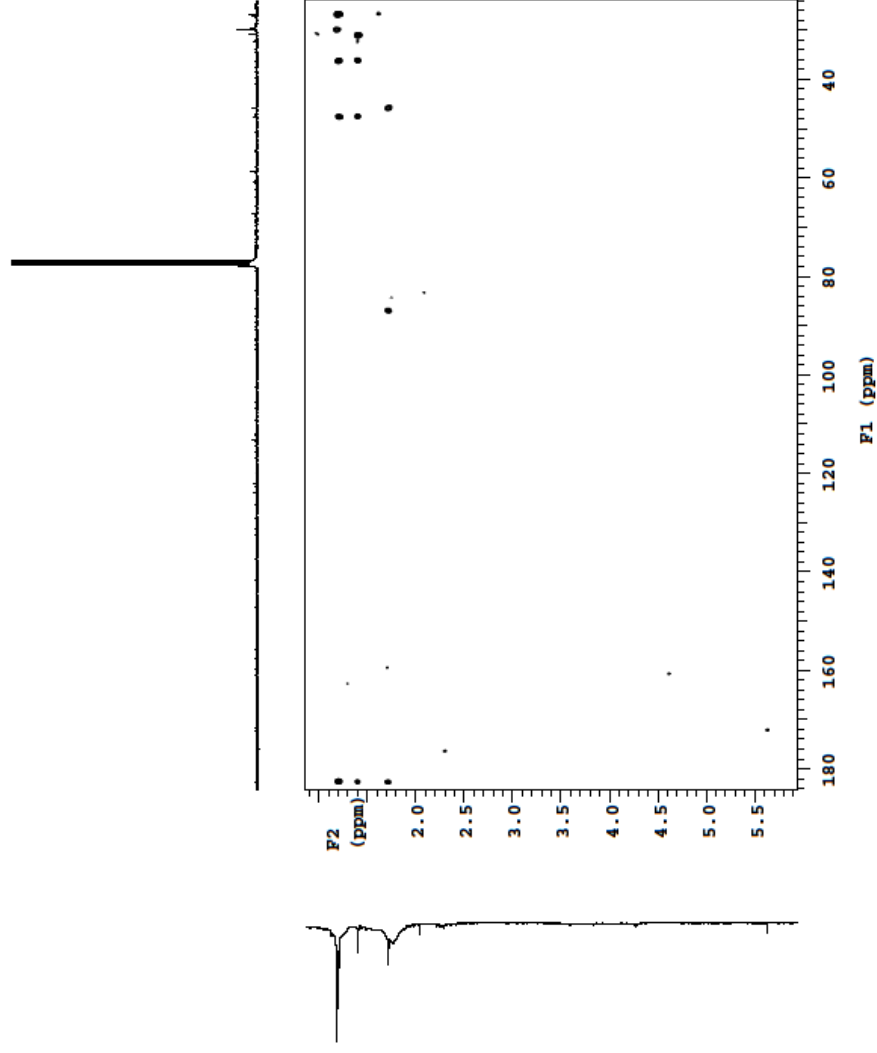
Anexo 24 - Espectro de RMN ^1H da substância **Lolilida (6)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).



Anexo 25 - Espectro de RMN 2D-COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).



Anexo 26 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 75,457 MHz; ppm).



Anexo 27 - Espectro RMN 2D-gHMBC $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ da substância **Loliolida (6)** (CDCl_3 ; 300,060 MHz; ppm).

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M149a Machado, Fabio Bahls, 1980-
Atividade antiproliferativa das folhas de *Arctium lappa* L. / Fabio Bahls Machado. -- Maringá, 2010.
54 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Co-orientador : Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, 2010.

1. Bardana (*Arctium lappa*) - Atividades biológicas. 2. Bardana (*Arctium lappa*) - Atividade antiproliferativa. 3. Bardana (*Arctium lappa*) - Células Caco-2. 4. Bardana (*Arctium lappa*) - Onopordopicrina. 5. Bardana (*Arctium lappa*) - Lactonas sesquiterpênicas. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Nakamura, Celso Vataru, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.321