

SELEÇÃO, EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DROGAS NOVAS ANTICÂNCER DE PLANTAS BRASILEIRAS

Selection, extraction and identification of new anti-cancer drugs from Brazilian plants

RIAD N. YOUNES¹ ANTONIO D. VARELLA² IVANA B. SUFFREDINI³

A descoberta de novas drogas antineoplásicas com atividade principalmente contra tumores sólidos é fundamental, pois os resultados obtidos com os quimioterápicos disponíveis são limitados. As plantas representam fonte importante de substâncias com atividade terapêutica para diferentes processos patológicos, incluindo câncer. O presente trabalho apresenta o racional por trás dos programas de coleta, extração e teste destes extratos derivados de plantas, além de descrever detalhadamente a metodologia utilizada.

Unitermos: Novas Drogas Anticâncer - Plantas.

Keywords: New antineoplastic drugs - Plants.

1 - Chefe do Departamento de Cirurgia Torácica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo.

2 - Faculdade de Medicina da USP.

3 - UNIP-Universidade Paulista.

Introdução

Tumores malignos são responsáveis por um número expressivo de pacientes em todo o mundo, e representam a segunda causa de morte da população. O tratamento do câncer baseia-se, de forma geral, na ressecção cirúrgica de tumores sólidos localizados, radioterapia para tumores em pacientes sem condições clínicas ou possibilidades técnicas de ressecção completa, e quimioterapia nos casos de tumores não sólidos ou de tumores sólidos disseminados. Estas indicações clássicas sofreram recentemente alterações significativas, com a introdução do conceito de tratamentos adjuvantes. A quimioterapia, radioterapia e cirurgia tornaram-se métodos terapêuticos de emprego intensivo e associado em muitos pacientes portadores de neoplasias, melhorando desta forma os resultados obtidos. O tratamento adjuvante, com quimioterapia ou radioterapia, somente se estabeleceu para as neoplasias que respondem a estas modalidades terapêuticas.

Endereço para correspondência: Hospital do Câncer - R. Prof. Antonio Prudente, 211 - São Paulo - SP - CEP 01509-010.

Radioterapias mais precisas, com doses administradas progressivamente mais elevadas na massa tumoral, e menos intensas nos tecidos normais adjacentes, e tratamento quimioterápico com drogas eficazes contra a neoplasia e com menos efeitos colaterais, permitiram indicações oncológicas mais amplas e, conseqüentemente, resultados mais encorajadores em muitos casos. Infelizmente, a maioria dos tumores sólidos ainda hoje apresenta respostas modestas aos quimioterápicos, limitando a indicação e a eficácia tanto do tratamento adjuvante de tumores localizados, quanto da terapêutica dos casos metastáticos. Tendo em vista a grande incidência de tumores disseminados na prática médica (p.e. mais que 50% dos pacientes admitidos com câncer de pulmão se apresentam com doença avançada e disseminada), torna-se imperativa a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir no armamentário médico modalidades terapêuticas mais eficientes, que possam oferecer ao número crescente de pacientes com doenças malignas disseminadas oportunidades reais de controle locorregional e a distância das células neoplásicas.

O século XX apresentou um avanço extraordinário neste sentido, com a descoberta de drogas dotadas de propriedades antineoplásicas, como a mostarda nitrogenada identificada na década de 40, e uma miríade de outras substâncias com eficácia parcial ou completa contra alguns tipos histológicos. Apesar da expansão rápida da seleção medicamentosa anticâncer, vários tumores sólidos (câncer de pulmão, cólon, mama e próstata, por exemplo) ainda não dispõem de tratamento sistêmico adequado. Carcinoma de pulmão não-pequenas células, o tumor mais prevalente em países desenvolvidos e entre os mais freqüentes em todo o mundo, apresenta respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis, com a maioria das drogas isoladas apresentando resposta parcial em 15% a 20% dos casos e as associações terapêuticas não ultrapassando 40% a 50%. Torna-se, portanto, óbvia a necessidade de procurar novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas.

A maioria dos quimioterápicos foram identificados por sua capacidade de controlar a proliferação celular. Recentemente, foram identificadas drogas com atividade específica contra alguns mecanismos metabólicos da célula tumoral, facilmente avaliados através da metodologia atual. Desta forma, substâncias eficientes contra tumores, por vezes através de alterações sutis do ciclo celular, podem ser identificadas mais rapidamente,

e seu mecanismo exato de ação demonstrado com clareza. Através do conhecimento prévio dos mecanismos de ação dos quimioterápicos, a associação de drogas tornou-se menos aleatória.

A morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. A descoberta de drogas antineoplásicas de fácil administração (a maioria das drogas atualmente necessita de administração endovenosa prolongada), e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais, é a meta atual de todos os oncologistas e pesquisadores. A necessidade de drogas novas com mecanismos de ação antineoplásica distintos é enfatizada em todos os encontros científicos.

Programas de identificação de medicamentos antitumorais envolvem várias etapas: estudos experimentais, testes de avaliações, e avaliações clínicas em fases seqüenciais I, II e III. Nos estágios pré-clínicos, fontes de substâncias com potencial antineoplásico são identificadas, os extratos que as contêm são produzidos e as substâncias ativas eventuais separadas. Os diferentes princípios ativos são testados em ensaios laboratoriais *in vitro*. Substâncias com atividade detectável pelos métodos *in vitro* são avaliadas subseqüentemente em estudos laboratoriais *in vivo*. Estes estágios pré-clínicos determinam sua atividade, especificidade e efeitos colaterais a nível celular, tecidual ou em órgãos específicos. Esta determinação é fundamental para permitir a administração de drogas em humanos.

Produtos naturais (vegetais, fungos, ou animais) provavelmente representam a fonte mais abundante e acessível de substâncias com estrutura não usual, com eficiência antitumoral, assim como novos mecanismos de ação, eventualmente específicos, talvez não descritos até a presente data. A maioria (60%) das drogas antineoplásicas identificadas e aprovadas na década de 90 tem origem de produtos naturais. Fontes naturais estão presentes em abundância, e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse oncológico. Vários quimioterápicos utilizados atualmente em diversas neoplasias são derivados de plantas naturais: alcalóides da vinca, isolados da Vinca rósea, o etoposídeo derivado do *Podophyllum peltatum*, o taxol isolado da árvore *Taxus brevifolia*. Outras substâncias foram derivadas de microrganismos: L-asparaginase da *Escherichia coli*, citarabine da *Cryptothethya crypta*. Uma substância derivada de batata-doce infectada por um fungo (*Fusarium solani*), ipomeanol, tem revelado atividade antineoplásica contra tumores de pulmão, sendo

atualmente avaliada em ensaios clínicos para tratamento de pacientes com carcinoma broncogênico. Os medicamentos obtidos a partir de produtos naturais podem ser divididos em: substâncias naturais, semi-sintéticas utilizando substâncias naturais, ou sintéticas com estrutura química baseada em modelos encontrados na natureza. A importância da pesquisa de produtos naturais foi evidenciada nas estatísticas mostrando que 48% dos medicamentos mais vendidos na década de 90, e 61% das drogas antineoplásicas aprovadas, são originados ou derivados de produtos naturais. A maioria destes medicamentos foi obtida a partir de plantas, com o restante originado em animais ou microrganismos. Calcula-se que, até hoje, somente 10% de todas as plantas do planeta (cerca de 25.000 espécies de plantas superiores) têm sido submetidas a análise sistemática para identificar substâncias ativas. A flora extremamente rica existente no Brasil representa uma fonte praticamente inexplorada de novas drogas.

Este estudo tem como objetivo a instalação de um programa de extração, identificação e teste de substâncias naturais com atividade antineoplásica.

Objetivos

1. Coleta sistematizada de plantas de várias regiões botânicas brasileiras, com identificação da planta e de seus componentes colhidos;
2. Coleta orientada de algumas plantas com tradição regional de benefícios médicos (folclore de habitantes da região);
3. Preparo das amostras para a extração de substratos potencialmente ativos contra neoplasias;
4. Extração de substratos de forma adequada;
5. Armazenamento de substratos e de amostras das plantas originais, de modo a permitir análise subsequente, testes de eficácia e reexame, se necessário.

Métodos

A execução do projeto envolve as seguintes etapas:

1. Coleta das amostras: Para a viabilização do projeto, a Universidade Paulista tem realizado coletas na bacia amazônica. As coletas são realizadas por equipes treinadas no processo, concentrando sua atuação na região do Rio Negro. A equipe é composta de botânicos, especialistas em taxonomia vegetal, habitantes da região, e médicos. Esta equipe utiliza um barco adaptado para abrigar os

membros da equipe e o equipamento necessário para a colheita das plantas e preparo preliminar das amostras - Barco Escola da Natureza de 21 metros de comprimento, 6,5 metros de largura, 7 m de altura, motor MWM 270 HP, gerador 30.000 KVA, laboratório básico com microscópios, lupas e lâmpadas. A viagem típica dura cinco dias, navegando à montante do Rio Negro. A estratégia para a coleta e seleção das plantas é variada: informações repassadas do folclore regional de uso medicinal empírico (os habitantes nativos fornecem a informação, além do nome popular dado à planta), semelhanças entre espécies de plantas previamente pesquisadas e conhecidas, assim como amostragem ao acaso da flora amazônica. As plantas são fotografadas e classificadas *in situ* pelos botânicos e taxonomistas, e as coordenadas do local onde foram colhidas registradas (GPS - Ground Position System). As amostras colhidas são separadas em recipientes individuais e identificadas com os registros correspondentes. Todas as informações são armazenadas em arquivo de dados contínuo e centralizado, para não haver ambigüidade ou duplicação de informação.

As amostras geralmente são colhidas em épocas do ano que coincidam com a floração das espécies, de forma a permitir a identificação adequada de cada planta. As amostras pesam geralmente 500 g a 1.000 g (peso seco), com potencial de fornecer quantidades superiores a 10 g de extrato (mínimo necessário para garantir extratos suficientes para futuros testes e avaliações de atividade antineoplásica). As espécies da flora amazônica classificadas como em risco de extinção pela Convention on International Trade in Endangered Species of the Wild Fauna and Flora, são evitadas. Os membros da equipe de coleta foram treinados e orientados em procedimentos para não perturbar o meio ambiente regional. A identificação definitiva das plantas se baseia na literatura botânica atualizada, além de comparação com herbários regionais oficiais. Quando a identificação clara não for possível, o material é enviado a especialistas nas plantas em questão para a identificação correta (New York Botanical Garden).

As plantas são submetidas a processos de secagem iniciados imediatamente após a chegada ao barco. Cada amostra é separada individualmente, colocada em recipientes adequados para o transporte aéreo até os laboratórios de extração, acompanhada de informações detalhadas sobre a data e local da coleta, horário, equipe responsável, descrição do ambiente regional, informações taxonômicas, partes da planta amostradas, dados

folclóricos sobre usos medicinais e forma de preparo tradicional.

A) Coleta da matéria-prima

Um grupo formado por profissionais especializados e nativos predetermina uma região onde a coleta será feita, assim como quais espécies vegetais serão colhidas.

O critério é determinado pelo cruzamento de informações científicas obtidas através da literatura especializada e de conhecimentos populares sobre os efeitos das ervas, seu preparo e utilização. As coletas realizadas contam com a infra-estrutura dos projetos “Escola da Natureza”, “Paranoá”, “Escola do Mar” e “Escola das Dunas”, todos pertencentes à Universidade Paulista. Esta infra-estrutura inclui barcos-escola com tripulação e laboratórios localizados na Floresta Amazônica, AM, Brasília, DF, Angra dos Reis, RJ e Natal, RN.

Após a coleta, o taxonomista pensará duas exsiccatas de cada espécie para que sejam identificadas. Uma exsicata será depositada (ou comparada com outra já existente) em um herbário oficial na própria região de coleta e a outra será trazida para o herbário particular do Centro de Pesquisas Oncológicas da UNIP. As exsiccatas deverão conter informações pertinentes à sua classificação e coleta: nome científico, família, parte usada, se é venenosa ou não, número de coleta e número de espécie (estes dois últimos predeterminados pelo Laboratório de Extração do Centro, em São Paulo), data, nome do coletor e local. É necessário que as exsiccatas sejam suavemente secas no próprio local de coleta em estufa com circulação de ar a temperatura igual ou inferior a 40°C.

Quando a coleta for feita em locais cujo acesso é somente possível de barco e caso seja necessária a permanência da equipe longe da sede por períodos de mais de um dia, a secagem deve ser realizada em estufas no próprio barco. Caso o material colhido não esteja totalmente seco, o procedimento deverá ser completado na sede de cada estação de coleta. Depois de secas, as espécies são acondicionadas em sacos de algodão, com etiquetas de identificação.

B) Armazenamento de dados

Da coleta à obtenção dos extratos, todos os procedimentos envolvidos são registrados em computador. Toda matéria-prima obtida recebe identificação alfanumérica. O registro de coleta, recoleta e de cada passo do processo é baseado neste número, sendo possível dizer se uma determinada espécie está sendo extraída, se já foi coletada anteriormente ou se está estocada na forma de

extrato ou fração. Este número tem correspondência a um código de barras. Para evitar que as informações se percam, em cada etapa os dados devem ser anotados também em um caderno de registros. Cada matéria-prima dará origem a um determinado número de extratos e estes extratos receberão uma nova numeração.

C) Moagem

O moinho está localizado dentro de uma capela com sucção contínua para que o pó formado durante a moagem não contamine outras plantas ou materiais do laboratório.

O procedimento de moagem deve ser diário. A matéria-prima moída fica armazenada em frascos plásticos. Estes frascos receptores são identificados. Os materiais moídos e acondicionados nos frascos receptores podem ser utilizados para extração ou armazenados sob refrigeração (de 8°C a 10°C). A moagem do material pode ser feita com moinho de martelo ou moinho de faca.

D) Extração

A sala de extração deve ter a temperatura ambiente e a umidade do ar controladas. Os frascos receptores são separados com as matérias-primas a serem extraídas. Dois tipos de extratos são preparados: 1) extrato orgânico composto de uma mistura equivalente de metanol e diclorometano (adicionando-se primeiro o metanol e depois o diclorometano, obtém-se uma mistura homogênea sem necessidade de agitação, devido ao maior peso molecular do diclorometano), e 2) extrato aquoso.

A matéria-prima é acondicionada em percoladores de tamanhos adequados, apoiados em suportes dentro da capela. No dia seguinte, abrem-se as torneiras do adaptador, e o vácuo é ligado e a mistura de solventes orgânicos é drenada. As torneiras são fechadas novamente, e metanol é adicionado até cobrir o nível da solução no percolador. Aguardam-se cinco a dez minutos e drena-se o metanol. Os seis balões são desconectados do percolador e levados para os rota- evaporadores. Cada balão deverá conter aproximadamente 1,5 L de mistura de solventes. Esta mistura é evaporada e o extrato orgânico transferido para um frasco de 120 mL. Se necessário, utiliza-se o limpador sônico (sonificador) e uma pequena quantidade de solventes, separadamente.

No final do processo, após o extrato estar devidamente seco, deve ser colocado em recipiente com gelo seco e congelado. O frasco é ligado em linha de vácuo durante uma noite, para a retirada de todo o solvente. O extrato orgânico, então, está pronto para que sejam retiradas as amostras para testes biológicos. Caso as amostras não forem utilizadas em seguida, os frascos são armazenados

entre 8°C a 10°C.

E) Amostragem

A amostragem é feita com os extratos orgânicos e aquosos obtidos da matéria-prima segundo as técnicas descritas acima.

As amostras deverão ficar armazenadas em "freezers" a uma temperatura de 20°C negativos juntamente com os frascos de extratos orgânicos e aquosos cujas amostras já foram retiradas. Cada amostra obtida é registrada através do seu número de extrato (que é o mesmo do extrato que ela se originou). Neste registro são também anotados os testes que serão realizados com as amostras, e qual a quantidade de material retirado para cada teste, por amostra.

F) Armazenagem

Os frascos com extratos são armazenados a -20°C juntamente com as amostras controle, conforme descrição anterior.

Conclusão

A extração e a identificação de substâncias potencialmente ativas contra tumores malignos é um processo importante na procura de drogas antineoplásicas. Os resultados obtidos atualmente com os quimioterápicos disponíveis no armamentário médico para o tratamento de tumores sólidos são ainda pobres. A metodologia necessária para este fim foi implantada em nosso Laboratório, fornecendo extratos para testes de "screening" de atividade contra linhagens tumorais. A coleta de amostras da flora regional da bacia amazônica, mata atlântica, cerrados, e outras regiões botânicas brasileiras, representa uma fonte inexplorada e promissora de drogas eventualmente úteis para uso clínico. Várias etapas subseqüentes são também necessárias para a determinação final da atividade antineoplásica específica de cada extrato.

Tabela 1. Exemplos de drogas antineoplásicas derivadas de fontes naturais

Derivadas de produto natural não-modificado Actinomicina D Bleomicina Doxorubicina Derivadas de produto natural modificado Paclitaxel Pentostatina Streptozotocina Vimblastina Vincristina Derivados semi-sintéticos de produto natural Citarabine Epirubicina Etoposideo Irinotecan Megestrol Prednisolona Vinorelbine Sintetizadas a partir de modelos naturais Arabinosídeo C Doxiluridina Floxuridina Mercaptopurina Metotrexate Mitoxantrone Tamoxifeno

Summary

The search for new antineoplastic drugs, presenting with significant activity against solid tumors is paramount, due to the poor results observed following the use of the available chemotherapeutic agents. Plants represent an extensive source of substances with clear therapeutic activity in several pathological processes, including cancer. This study presents the rationale behind programs of harvesting, extraction and identification of substances derived from plants, as well as describes in detail the adequate methodology for extraction and further testing of plant extracts.

Referências bibliográficas

- 1 - Costa AF. Farmacognosia. 5ª ed., Lisboa, Calouste Gulbenkian, 1994. vol. 1-3.
- 2 - Joly AB. Botânica, introdução à taxonomia vegetal. 11ª ed., São Paulo, Ed. Nacional, 1993.
- 3 - Gentry AH. A field guide to woody plants of northwest South America. Chicago, University of Chicago Press, 1996.
- 4 - Tu AT. Handbook of natural toxins. New York, Marcel Dekker, 1984.
- 5 - Duke JA. Handbook of medicinal herbs. Florida, CRC Press, 1985.

- 6 - Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis. 2ª ed. Berlin, Springer Verlag, 1996.
- 7 - Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. J Nat Prod 1997, 60:112-6.
- 8 - Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. J Clin Oncol 1995, 13:2643-55.
- 9 - Boyd MR, Paull KD. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. Drug Dev Res 1995, 34:91-109.