

***Valorização de recursos naturais: componentes
das ervas daninhas (da vinha) com potencial
controlo da traça da uva***

Autora: Liliana Pontes Correia

**Relatório Prodep
Maio de 2004**

66(047.3)
LEQ 2003/CORI

***Valorização de recursos naturais: componentes
das ervas daninhas (da vinha) com potencial
controlo da traça da uva***

*Estudo da composição da "planta"
Centauraea africana*

Autora: Liliana Pontes Correia

**Relatório Prodep
Maio de 2004**



***Valorização de recursos naturais: componentes
das ervas daninhas (da vinha) com potencial
controlo da traça da uva***

**Estudo da composição da “planta”
*Centaurea africana***

**Relatório Prodep
Maio de 2004**

66(047.3)/LE9 2003/COR 1

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca η	
Nº	91291
CDU	632.5 (047.3)
Data	17/08/2007

Agradecimentos

Gostaria de agradecer todo o apoio e dedicação das orientadoras deste estágio, Dr. Margarida Bastos (FEUP) e Maria Francisca Vinagre (Quinta do Tamariz). Gostaria também de agradecer a colaboração do Eng. Domingos Barbosa, e a todos aqueles que colaboraram de uma forma ou de outra para este trabalho.

Índice:

1	Introdução.....	7
2	Infestantes da vinha em Portugal.....	8
3	Quinta do Tamariz.....	12
3.1	Infestantes da Vinha da Quinta do Tamariz	13
4	Centaurea.....	14
4.1	Centaurea africana.....	15
5	Lignanós.....	16
6	Trabalho Experimental	18
6.1	Fraccionamento do extracto por Cromatografia em Coluna (CC)	18
6.2	Análise Qualitativa e Purificação das fracções por Cromatografia em Camada fina (TLC).....	21
6.2.1	TLC analítica	21
6.2.2	Purificação de fracções por TLC preparativa.....	22
6.3	Análise qualitativa de algumas fracções e grupos de fracções por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	23
7	Resultados e Discussão.....	25
8	Conclusão e Trabalho Futuro	27
9	Referências Bibliográficas.....	28
	Apêndice A: Registos de HPLC	29
	Padrões.....	30
	Matairesinol.....	30
	Arctigenina	31
	Arctina.....	33
	Grupos de fracções	35
	Ca 71-85.....	35
	Ca 108-132	36
	Ca 252-260	38
	Ca 261-276	39
	Ca 277-298	41

Fracções e Subfracções.....	43
Ca (190-216) A1.....	43
Ca (190-216) A2.....	44
Ca 211.....	46
Ca 299.....	47
Ca 305.....	49
Ca 329.....	51
Ca 335.....	52
Ca 345.....	54
APÊNDICE B: Patente.....	56

Resumo

Este trabalho consistiu no fraccionamento de um extracto clorofórmico de uma erva daninha, *Centaurea africana*, género este que se encontra distribuído por todo o Portugal Continental, encontrando-se algumas espécies nas vizinhanças das vinhas.

O fraccionamento do extracto foi efectuado por cromatografia Sólido-Líquido em coluna de vidro de grandes dimensões, tradicional em Produtos Naturais, tendo sido realizada a comparação e agrupamento de fracções, após análise destas por cromatografia em camada fina.

Foi efectuada a análise cromatográfica, por HPLC, de fracções individuais ou grupos de fracções obtidos da coluna cromatográfica (nas mesmas condições que os padrões, o Matairesinol, a Arctigenina e a Arctiína) e procurou-se detectar compostos que apresentassem tempos de retenção (Tr) semelhantes aos destes compostos.

A análise cromatográfica das amostras permitiu suspeitar a presença de matairesinol em 3 delas, nomeadamente Ca 71-85, Ca 190-216 e Ca 299, e de arctigenina em uma delas, a Ca 277-298. As suspeitas não foram confirmadas nem por variação das condições cromatográficas (variação da composição da fase móvel), nem pelo método da adição de padrão devendo-se visualizar uma intensificação do respectivo pico devido à falta de tempo e às várias contrariedades encontradas, normais em estudos do género. Sugere-se assim que à posteriori esta confirmação possa ser realizada pelos métodos sugeridos e também pela realização de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para total confirmação da estrutura dos compostos isolados.

1 Introdução

Este trabalho foca, principalmente, a utilização de recursos naturais como alternativa a compostos sintéticos para controlo de pragas (pesticidas) ou para fins medicinais. O estudo debruçou-se sobre a utilização de ervas como controlo de pragas das vinhas (traça da uva), que de uma forma geral são consideradas como infestantes das mesmas.

Uma das principais pragas da vinha é a traça da uva, também conhecida por “lagarta da uva”, que provém de duas pequenas borboletas, a *Cochylis* (*Eupoecilia ambiguella*) e a *Eudemis* (*Lobesia botrana*)^[1].



Figura 1: Traça da Uva^[1]

As duas espécies encontram-se em todas as regiões do País. As suas lagartas atacam directamente os bagos de uva, podendo provocar prejuízo a importantes na colheita e favorecer, por outro lado, o desenvolvimento da podridão cinzenta (*Botritis cinerea*) que é uma das várias doenças da vinha (figura 2).



Figura 2: Uvas com ataque da Podridão Cinzenta^[1]

No caso particular da Quinta do Tamariz podemos observar uma fase inicial da “gestação” da traça da uva (ovos) na figura 3:

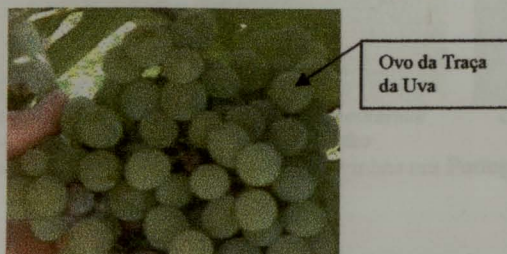


Figura 3: Uvas com ovos da Traça da Uva^[2]

2 Infestantes da vinha em Portugal

Encontram-se referidas cerca de 45 espécies de plantas infestantes da vinha em Portugal.^[1] As famílias representadas são: *Amaranthaceae*, *Araceae*, *Boraginaceae*, *Compositae*, *Convolvulaceae*, *Cruciferae*, *Cyperaceae*, *Chenopodiaceae*, *Equisetaceae*, *Euphorbiaceae*, *Gramineae*, *Geraniaceae*, *Labiatae*, *Malvaceae*, *Oxalidaceae*, *Primulaceae*, *Papaveraceae*, *Polygonaceae*, *Portulacaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae*, *Umbelliferae*.

Na figura 4 apresentam-se os nomes próprios e nomes científicos dessas 45 espécies.

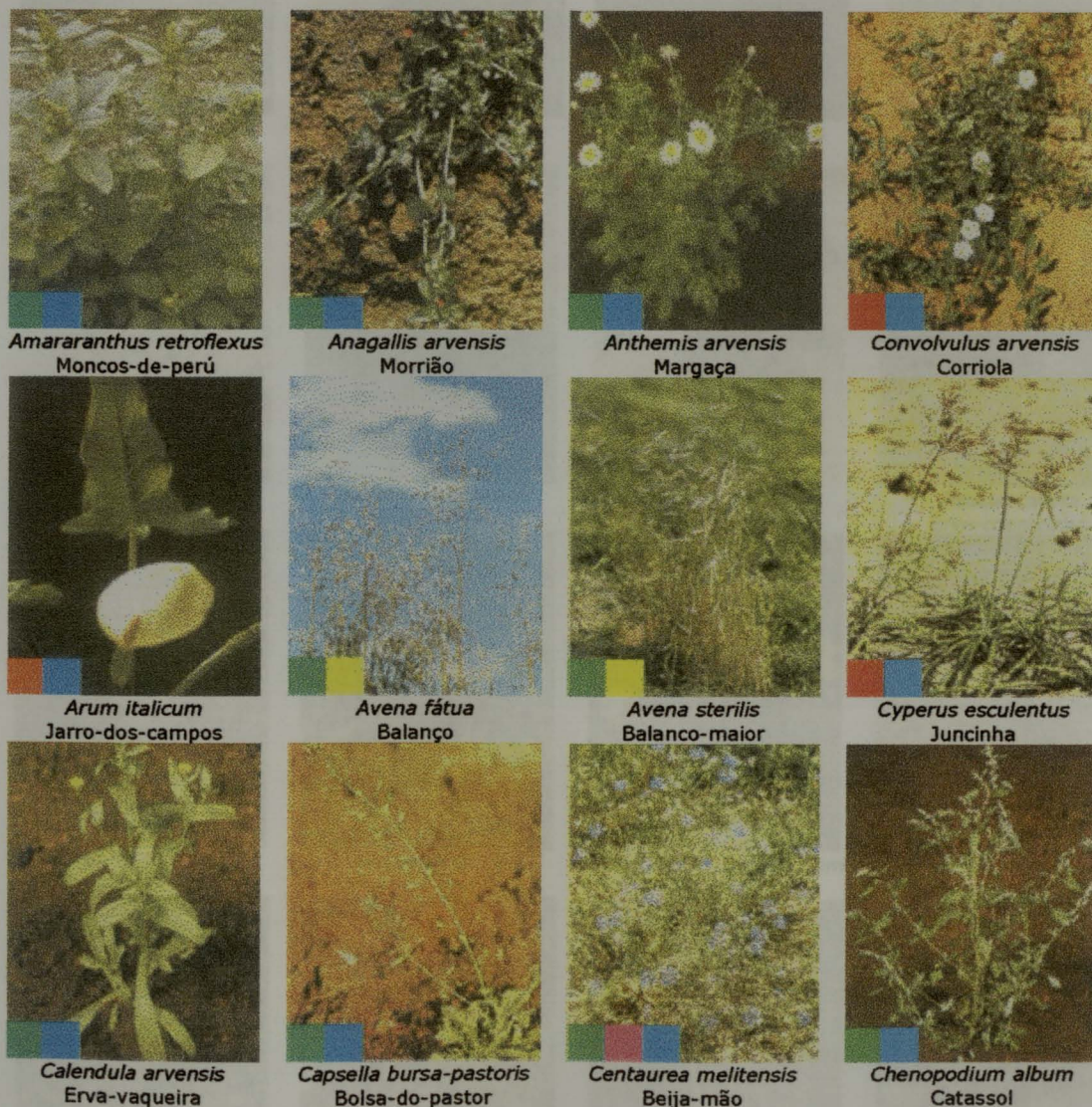


Figura 4: Algumas das infestantes encontradas nas vinhas em Portugal

Algumas dessas plantas são anuais enquanto outras desenvolvem-se duas vezes por ano. Nesta figura pode-se observar também a sua classificação relativamente ao serem plantas Vivazes, Gramíneas e Dicotiledóneas.

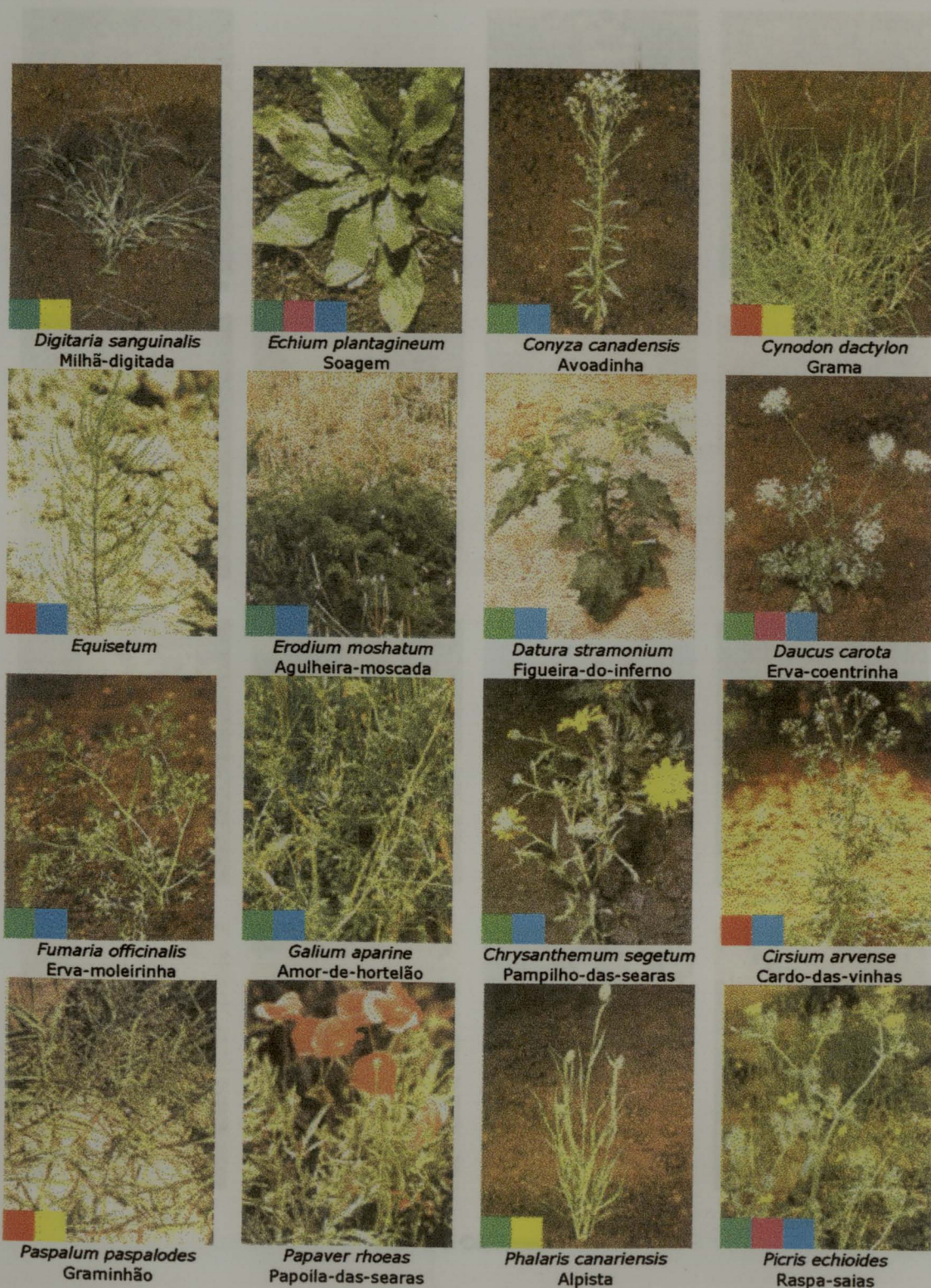


Figura 4: Continuação

Algumas destas plantas têm sido utilizadas para fins medicinais pelas populações ou encontram-se comercializadas para determinados fins medicinais.

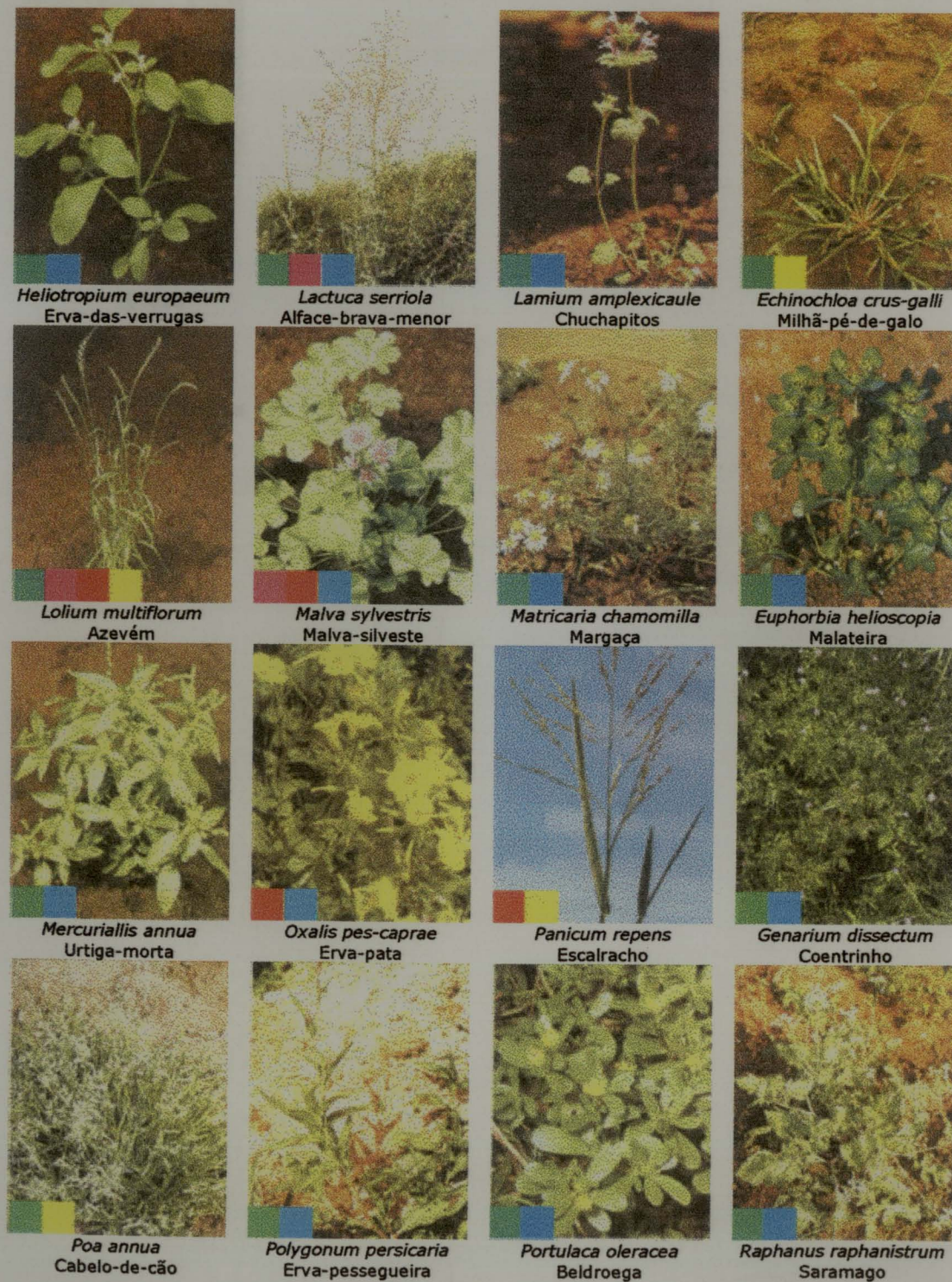


Figura 4: Continuação



Rumex crispus
Labaca-crespa

Figura 4: Continuação

Legenda:

- Anual
- Bienal
- Vivaz
- Gramínea
- Dicotiledónea



Figura 3: Vinha da Quinta do Tamariz

As vinhas da Quinta do Tamariz, encontram-se plantadas no monte encosta, com as castas brancas Touriga, trincado ou palmar, alvarinho, trincado, etc., usando o sistema de condução. Pode ainda, ver-se a montada que abraça a quinta de alto a baixo.

Esta Quinta faz parte da Sociedade Agrícola da Quinta do Santa Maria S.A. composta por mais duas quintas, a do Lameiro e a do Santa Maria, da zona do Barcelos. Esta sociedade está virada para a produção de Vinho Verde de elevada qualidade, tendo já obtido algumas medalhas nos concursos de vinho verde a nível nacional nos últimos anos.

3 Quinta do Tamariz

A Quinta do Tamariz é composta por uma exploração agrícola com área de 35 ha de vinha para produção de vinhas brancas, tintas e viveiros de plantas de jardim.



Figura 5: Vinha da Quinta do Tamariz

As vinhas da Quinta do Tamariz, encontram-se plantadas na meia encosta, com as castas brancas loureiro, arinto ou pedernã, alvarinho, trajadura, etc., usando o sistema de cordão. Pode ainda, ver-se a ramada que atravessa a quinta de alto a baixo.

Esta Quinta faz parte da Sociedade Agrícola da Quinta de Santa Maria S.A. composta por mais duas quinta, a do Landeiro e a de Santa Maria, da zona de Barcelos. Esta sociedade está virada para a produção de Vinho Verde de elevada qualidade, tendo já obtido algumas medalhas nos concursos de vinho verde a nível nacional nos últimos anos.^[3]

3.1 Infestantes da Vinha da Quinta do Tamariz

Na época da vindima (Setembro) foi possível encontrar algumas das infestantes referenciados (autor da figura 4). Encontram-se representados a família *Amaranthaceas*, *Boraginacea*, *Cyperaceae*, *Convolvulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae* e *Portulacaceae* (figura 6)^[2]



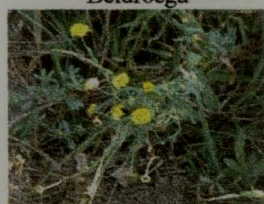
Portulaca oleracea
Beldroega



Portulaca oleracea
Beldroega



Chenopodium album
Catassol



Chrysanthemum segetum
Pampilho-das-searas



Matricaria chamomilla
Margarça



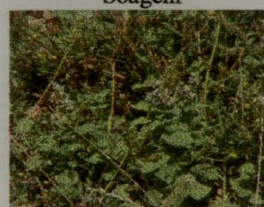
Echium plantagireum
Soagem



Cyperus esculentus
Juncinha



Trevo Violeta



Amaranthus retroflexus
Bredos



Conyza canadensis
Avoadinha



Convolvulus arvensis
Corriola

Figura 6: Plantas Infestantes da Vinha da Quinta de Tamariz

Não foi contudo encontrado nessa altura nenhuma planta da família *Compositae*, apesar deste género também ser considerado infestante como podemos constatar pela análise da figura 4 onde encontrámos a *Centaurea melitensis*. Esta família de plantas encontra-se sobretudo na vizinhança das vinhas. No presente trabalho estudou-se uma planta desta família em particular, a *Centaurea africana*.

4 Centaurea

Neste trabalho foi estudada uma planta da família *Compositae*, pertencente à classe Angiospermas. Esta família apresenta uma grande diversidade morfológica e encontra-se dividida em quinze tribos entre elas a Cynareae, na qual se encontra o género de planta estudada neste trabalho ou seja, *Centaurea*.

Segundo Franco^[4] podem ser encontradas em Portugal 25 espécies e algumas subespécies (tabela 1).

Tabela 1: Espécies e subespécies de *Centaurea* em Portugal

	Subgénero	Espécie	Subespécie
1	<i>Centaurea</i>	<i>C. vicentina</i>	---
2	<i>Centaurea</i>	<i>C. africana</i>	---
3	<i>Lopholoma</i>	<i>C. collina</i> L.	<i>Subsp. collina</i>
4	<i>Lopholoma</i>	<i>C. ornata</i> Willd	<i>Subsp. ornata</i> <i>Subsp. interrupta</i>
5	<i>Lopholoma</i>	<i>C. crocata</i>	---
6	<i>Lopholoma</i>	<i>C. prolongoi</i>	---
7	<i>Lopholoma</i>	<i>C. luisieri</i>	---
8	<i>Acrolophus</i>	<i>C. micrantha</i>	---
9	<i>Acrolophus</i>	<i>C. limbak</i>	<i>Subsp. limbak</i> <i>Subsp. geresensis</i>
10	<i>Acrolophus</i>	<i>C. rothmalerana</i>	---
11	<i>Acrolophus</i>	<i>C. aristata</i>	<i>Subsp. Aristata</i> <i>Subsp. Exilis</i> <i>Subsp. Langeana</i>
12	<i>Acrolophus</i>	<i>C. coutinhoi</i>	---
13	<i>Acrolophus</i>	<i>C. melanostick</i>	---
14	<i>Acrolophus</i>	<i>C. herminii</i>	<i>Subsp. herminii</i> <i>Subsp. lusitana</i>
15	<i>Acrolophus</i>	<i>C. exarata</i>	---
16	<i>Calcitrapa</i>	<i>C. calcitrapa</i>	---
17	<i>Seridia</i>	<i>C. sphaerocephala</i>	<i>Subsp. sphaerocephala</i> <i>Subsp. polyacantha</i> <i>Subsp. lusitanica</i>
18	<i>Seridia</i>	<i>C. aspera</i> L.	<i>Subsp. áspera</i> <i>Subsp. stenophylla</i>
19	<i>Solstitiaria</i>	<i>C. melitensis</i> L.	---
20	<i>Phalolepsis</i>	<i>C. alba</i>	<i>Subsp. strepens</i>
21	<i>Jacea</i>	<i>C. vinyalsii</i>	<i>Subsp. aproximata</i>
22	<i>Jacea</i>	<i>C. nigra</i>	<i>Subsp. rivularis</i>
23	<i>Cyanus</i>	<i>C. trumfetti</i>	<i>Subsp. lingulata</i>
24	<i>Cyanus</i>	<i>C. cyanus</i>	---
25	<i>Melanolona</i>	<i>C. pullata</i>	---

O género *Centaurea* tem sido um dos mais estudados devido às suas propriedades terapêuticas, que lhe têm sido atribuídas (por exemplo: hipoglicémico, adstringente, anti-malária, antibiótico, antifebril, etc; e à sua composição química variada.^[5-9] Este género encontra-se espalhado um pouco por todo o mundo (cerca de 700 espécies da tribo Cynareae), tendo-se registado vários estudos referentes à sua aplicação na Medicina tradicional^[10-14].

Para além destas aplicações já existem tratamentos para a cura do cancro com extractos de *Centaurea* e outros géneros de plantas, verificando-se mesmo a realização de patentes a este nível. (Ver Apêndice B). Os seus principais constituintes são os acetilenos, dos flavonóides e as lactonas sesquiterpénicas. As lactonas sesquiterpénicas isoladas nestas espécies pertencem principalmente aos guaianolidos e germacrolidos, tendo também sido isolados alguns elemanolidos e eudesmanolidos. Os grupos predominantes nos flavonóides são os flavonóis e as flavonas mono-, di- e trimetoxiladas, que podem existir também nas formas glucosiladas, em que o resíduo de açúcar pode ser a glucose, rutinose, os ácidos glucurónico ou galacturónico.^[15]

4.1 *Centaurea africana*

A *Centaurea africana* estudada neste projecto foi colhida em 15 de Julho de 1998, para o herbário do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra, onde se encontram depositado um exemplar desta espécie (figura 7).



Figura 7: *Centaurea africana*

5 Lignanos

Tal como o título deste trabalho nos sugere, existem determinados componentes das ervas daninhas (por exemplo, *Centaurea africana*) que podem ser utilizados como insecticidas naturais para o controlo da traça da uva.

Esses componentes são os Lignanos (são compostos aromáticos que fazem parte da constituição de várias espécies do Reino Vegetal, nomeadamente da classe Gimnospermae, podendo existir em todas as partes da planta, tais como sementes, folhas, flores, frutos e resinas).

O seu isolamento data de 1892, com a descoberta da Conidendrina, por Tollins e Lindsay^[1]. Desde então foram isolados vários compostos, sendo aplicado o termo "lignano", apenas a partir de 1936, para agrupar uma família de compostos naturais caracterizados por um esqueleto β - γ - dibenzilbutano (2).

Em 1974, Gottlieb introduz um novo conceito de Lignano, de forma a distingui-los dos neolignanos, recorrendo, para tal, às respectivas origens biogénéticas, pois enquanto os primeiros são formados por acoplamento oxidativo de álcool cinâmico e/ou ácido cinâmico, os últimos são dímeros de propenilo e/ou alifenois.

Existem actualmente sete grupos de lignanos representados na figura 8 e seguidamente descritos:

- ↳ **Dibenzilbutanos** – 1 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$)
- ↳ **Dibenzilbutirolactonas** – 2 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$ com formação de uma lactona nas posições $\gamma-\gamma'$)
- ↳ **Tetraidrofuranos** – 4, 5, 6 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$ com formação de uma ponte oxigenada adicional)
- ↳ **Tetraidrofurofuranos** – 3 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$ com formação de duas pontes oxigenadas adicionais)
- ↳ **Ariltetralinas** – 7 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$ e uma ligação adicional entre C-2, C- α' , gerando uma estrutura do tipo tetralina)
- ↳ **Arilnaftalenos** – 8 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$ e uma ligação adicional entre C-2, C- α' , gerando uma estrutura do tipo naftaleno)
- ↳ **Dibenzociclooctadienos** – 9 (duas unidades C_6-C_3 ligadas nas posições $\beta-\beta'$ e uma ligação adicional entre C-2, C-2', gerando uma estrutura do tipo bifenilo)

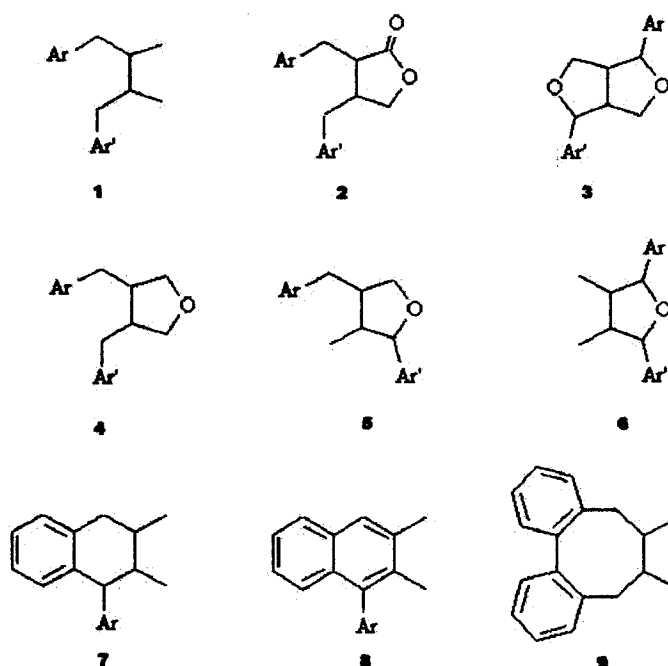


Figura 8: Grupos de Lignanos

No presente trabalho, vai-se tentar identificar três Lignanos específicos: Matairesinol, Arctina e Arctigenina cujas estruturas se apresentam na figura 9.

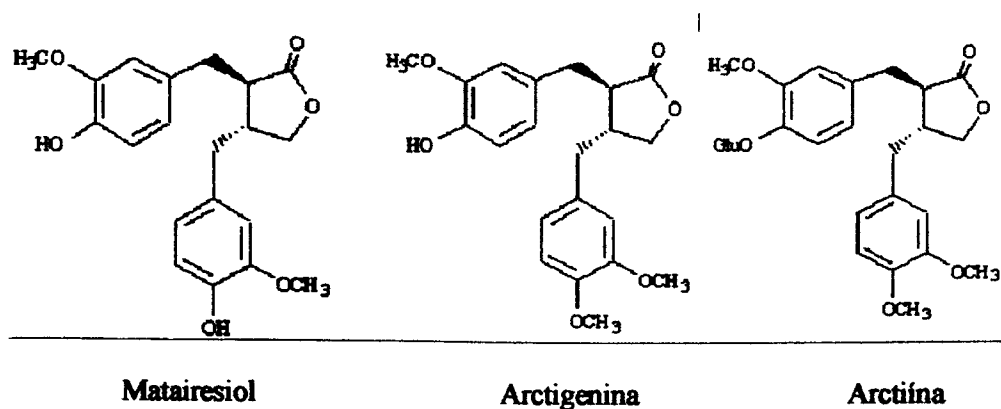


Figura 9: Lignanos do grupo Dibenzilbutirolactonas encontrados no género *Centaurea*.

6 Trabalho Experimental

A parte experimental pode-se subdividir nas seguintes secções:

1. Fraccionamento do extracto por Cromatografia em Coluna (CC)
2. Análise qualitativa e Purificação por cromatografia de camada fina (TLC) das fracções: analítica e preparativa
3. Análise qualitativa de algumas fracções e grupos de fracções por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

6.1 Fraccionamento do extracto por Cromatografia em Coluna (CC)

↳ Preparação da Coluna de Cromatografia

Utilizou-se uma coluna de cromatografia de dimensões (...), tendo o enchimento da coluna sido preparado a húmido: 200g de Sílica e cerca de 500 ml de éter de petróleo 60-80 °C (figura 10). Posteriormente cerca de 11 g de extracto clorofórmico de *Centaurea africana* (figura 11) foi impregnado em 25g de gel de Sílica (figura 12) antes de ser submetido a fraccionamento por cromatografia em coluna.



Figura 10: Preparação da Coluna



Figura 11: Extracto Clorofórmico



Figura 12: Extracto em Sílica Gel

↳ Eluição da Coluna de Cromatografia

A eluição dos diferentes componentes do extracto foi efectuada utilizando-se, como fase móvel, misturas de várias proporções de éter de petróleo 60-80 °C (EtP), clorofórmio (CHCl_3), acetona (Ac) e metanol (MeOH) (figura 13).

Foram recolhidas 392 fracções de 250 ml cada, em matrizes. O solvente de cada fracção foi eliminado a baixa temperatura e a pressão reduzida num evaporador rotativo (figura 14), tendo-se recuperado e posteriormente reutilizado.

O material obtido em cada fracção foi transferido para frascos de 5 ml de capacidade, com auxílio de um pequeno volume de um solvente adequado: diclorometano (CH_2Cl_2), acetona e/ou metanol (figura 15).



Figura 13: Coluna pronta para Extrair

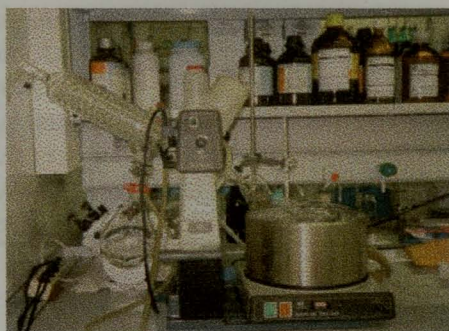


Figura 14: Evaporador Rotativo



Figura 15: Frascos de recolha das Fracções

Na tabela 2 apresentam-se os eluentes utilizados e as fracções obtidas na CC.

Tabela 2: Eluentes utilizados na recolha de fracções na CC

Fracções	Eluente
1 a 43	Éter de Petróleo/Clorofórmio (80:20)
44 a 62	Éter de Petróleo/Clorofórmio (60:40)
63 a 84	Éter de Petróleo/Clorofórmio (40:60)
85 a 130	Éter de Petróleo/Clorofórmio (20:80)
131 a 202	Clorofórmio (100)
203 a 210	Clorofórmio/Acetona (99:1)
211 a 224	Clorofórmio/Acetona (95:5)
225 a 234	Clorofórmio/Acetona (90:10)
235 a 258	Clorofórmio/Acetona (70:10)
259 a 284	Clorofórmio/Acetona (50:50)
285 a 311	Clorofórmio/Acetona (30:70)
312 a 333	Clorofórmio/Acetona (10:90)
334 a 339	Acetona (100)
340 a 353	Acetona/Metanol (90:10)
354 a 369	Acetona/Metanol (70:30)
370 a 377	Acetona/Metanol (50:50)
378 a 392	Metanol (100)

6.2 Análise Qualitativa e Purificação das fracções por Cromatografia em Camada fina (TLC)

Esta fase do trabalho experimental teve como objectivo:

- ↳ Reduzir o elevado número de fracções existentes para reunir em grupos de fracções;
- ↳ Identificar os compostos matairesinol, arctigenina e arctiína (padrões) em algumas das fracções da CC;
- ↳ Purificar alguns componentes das fracções

6.2.1 TLC analítica

Foram efectuadas várias TLC's analíticas (figura 16) de forma a seleccionar o melhor eluente para cada fracção, para tal utilizou-se placas de gel de sílica de 0,25 mm de espessura.

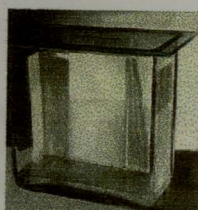


Figura 16: Câmara Cromatográfica

As fracções que apresentaram o mesmo comportamento cromatográfico foram reunidas em grupos, encontrando-se na tabela 3 os vários grupos bem como a quantidade de material existente em cada um.

Tabela 3: Grupos (fracções reunidas)

Grupo	Fracções Reunidas	Quantidade (mg)
1	1 a 5	25,90
2	6 a 29	1553,60
3	30 a 44	477,70
4	45 a 55	122,90
5	56 a 70	95,80
6	71 a 85	42,80
7	86 a 98	85,20
8	99 a 107	41,00
9	108 a 132	104,20
10	133 a 159	77,30
11	160 a 189	90,50
12	190 a 216	60,00
13	217 a 251	148,8
14	252 a 260	46,20
15	261 a 276	158,80
16	277 a 298	170,50

6.2.2 Purificação de fracções por TLC preparativa

As placas utilizadas para TLC preparativa eram de gel de sílica com espessura de 0,5 mm.

Foram seleccionados alguns grupos para TLC preparativa, de forma a isolar-se e purificar-se alguns compostos para posterior identificação por HPLC e RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Os grupos submetidos a TLC preparativa bem como as fases móveis utilizadas encontram-se descritas na tabela 4.

Tabela 4: Grupos utilizados na TLC Preparativa

Grupo	Fracções Reunidas	Fase Móvel
11	160 a 189	CHCl ₃ :Ac:CH ₃ COOH (95:5: 1)
12	190 a 216	CHCl ₃ :Ac:CH ₃ COOH (95:5: 1)
13	217 a 251	CHCl ₃ :Ac:CH ₃ COOH (95:5: 1)

As amostras obtidas da TLC preparativa do grupo 12 têm a designação de Ca 190-216. O grupo 12 apresenta-se constituído predominantemente por 2 bandas (A e B), cada uma destas bandas foi extraída da sílica sequencialmente com diclorometano e metanol (figura 17), A₁ e A₂ para a banda A respectivamente.



Figura 17: Montagem para a Extração

Legenda da Figura 17:

A: Funil de placa porosa
C: Balão cónico
E: Suporte com garras

B: Ligação
D: Suporte de cortiça
F: Bomba de sucção

↳ **Evaporação:** Remoção do Eluente → Evaporador Rotativo

6.3 Análise qualitativa de algumas frações e grupos de frações por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

↳ Equipamento

Nesta análise foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, HPLC, marca Hewlett Packard, modelo HP1050 com uma bomba quaternária, detector U.V. de três comprimentos de onda em simultâneo, loop de 20 μ l e software de aquisição e tratamento de dados (figura 18).

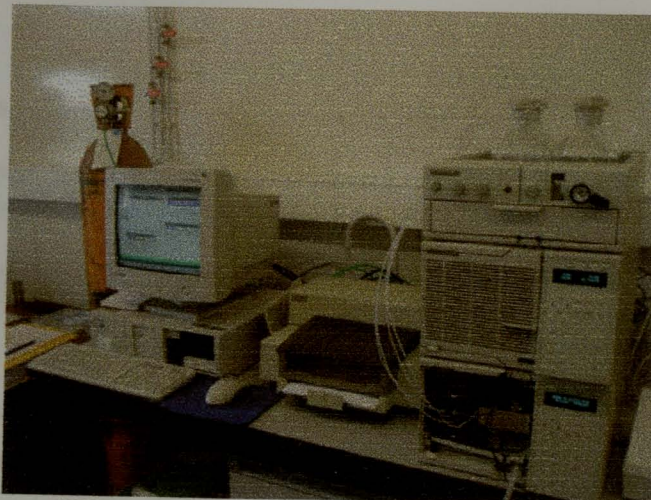


Figura 18: Imagem da Instalação de HPLC utilizada neste trabalho

↳ Condições de operação

As condições de operação relativamente às características da coluna de cromatografia bem como as do método analítico apresentam-se na tabela 5.

Tabela 5: Características da coluna de cromatografia e do método analítico

Características da coluna	Fase estacionária	RP18
	Φ_{int} (mm)	4. 6
	Comprimento (mm)	250
	Pré-coluna	Sim
Características do método analítico	Temperatura (°C)	26 a 28
	Tempo de corrida (minutos)	30
	Tipo de corrida	Gradiente
	Fluxo (ml/min)	0,84
	Deteção	U.V. a 210, 230 e 280 nm

Utilizou-se uma abordagem de gradiente da fase móvel em vez de isocrática para uma melhor resolução das amostras analisadas (tabela 6).

Tabela 6: Gradiente utilizado na análise das várias amostras

Tempo (minutos)	% MeOH	%H ₂ O
0-10	45	55
15	100	0
25	100	0
30	45	55

☞ Amostras

- Foram analisados os padrões dos três lignanos à respectiva concentração: Matairesinol (32,3 ppm), Arctigenina (35,80 ppm) e Arctiina (13,11 ppm).

- Foram analisadas amostras de cinco grupos de fracções às respectivas concentrações: Ca 71-85 (1000 ppm), Ca 108-132 (1300 ppm), Ca 252-260 (2800 ppm), Ca 261-276 (2600 ppm) e Ca 277-298 (860 ppm).

- Foram analisadas amostras de fracções e subfracções às respectivas concentrações: Ca 211 (100 ppm), Ca 299 (110 ppm), Ca 305 (2400 ppm), Ca 329 (1300 ppm), Ca 335 (1400 ppm), Ca 345 (50004 ppm), Ca 354 (13800 ppm) e as subfracções Ca 190-216 A1 (50 ppm) e A2 (40 ppm).

☞ No apêndice A estão apresentados os registos obtidos para a análise dos padrões de lignanos, grupos de fracções e fracções, aos diferentes comprimentos de onda utilizados.

7 Resultados e Discussão

Foi efectuada a análise cromatográfica de fracções individuais ou grupos de fracções obtidos da coluna cromatográfica (nas mesmas condições que os padrões) e procurou-se detectar compostos que apresentassem tempos de retenção (Tr) semelhantes aos dos padrões.

As amostras analisadas encontram-se descritas na página anterior, sendo referido o tipo de amostra: grupo de fracções reunidas, fracção individual ou subfracção obtida de um grupo de fracções após prévia preparação por cromatografia preparativa em Camada fina.

As diferentes amostras apresentam vários componentes que absorvem a 280 nm, sugerindo a presença de núcleos benzénicos. A amostra Ca 71-85 (ver página 34) apresenta pelo menos 5 componentes entre os 16 e os 28 minutos, podendo o componente a 19,15 minutos ser o matairesinol, necessitando de uma melhor separação e do teste da identidade pelo método da adição de padrão. No caso da amostra Ca 108-132 (ver página 35), adicionalmente ao mesmo padrão de componentes apresentado pela amostra Ca 71-85 no registo entre os 16 e os 27 minutos, existe a presença de um conjunto de componentes entre os 4 e os 8 minutos.

A amostra Ca 190-216 foi previamente purificada por cromatografia preparativa em camada fina e subdividida em Ca 190-216 A1 (ver página 42) e Ca 190-216 A2 (ver página 43). Estas duas subfracções apresentam o mesmo comportamento cromatográfico, com três componentes principais a 23,95; 21,27 e 19,03 minutos, podendo este último ser o matairesinol, em virtude dos tempos de retenção semelhantes aos do matairesinol padrão. A análise de uma das fracções que fazem parte deste grupo (Ca 211; ver página 45), revela o mesmo padrão cromatográfico, apresentando-se o pico a 19,12 minutos como o componente principal.

A amostra Ca 252-260 (ver página 37) apresenta um perfil cromatográfico completamente distinto das amostras anteriores, além de um pico muito intenso por volta dos 2 minutos, apresenta um pico de banda muito larga entre os 14 e os 22 minutos, sem resolução.

A amostra Ca 261-276 (ver página 32) apesar de apresentar o mesmo tipo de compostos (da amostra anterior, Ca 252-260), nesta, surgiu um pico por volta dos 6 minutos, valores próximos da arctiina, podendo inferir a presença de um componente com polaridade semelhante à arctiina e mais polar do que o matairesinol e a arctigenina.

Na amostra Ca 277-298 (ver página 40), o registo entre os 14 e os 22 minutos apresenta-se com maior definição, revelando-se constituído pelo total de 3 compostos com os tempos de retenção de 19,18; 16,14 e 15,74 minutos. Os tempos de retenção de dois destes primeiros compostos aproximam-se dos do matairesinol e da arctigenina respectivamente, levando a pressupor a sua presença nesta fracção, no entanto a identidade não foi confirmada pelo método da adição de padrão nem por variações das condições cromatográficas.

A amostra Ca 299 (ver página 46), fracção de CC imediatamente a seguir ao grupo de fracções que constituem a amostra anterior, apresenta-se predominantemente constituída pelo componente de $T_r = 19,12$ minutos. O perfil cromatográfico das amostras Ca 305 a 329 (ver páginas 48 a 50), são semelhantes entre si mas diferente dos observados nas amostras anteriores, observa-se a presença de um registo entre os 14 e os 20 minutos com pouca definição de picos. Essa má definição dos picos entre os 14 e os 18 minutos acentua-se nas amostras Ca 335 e Ca 345 (ver páginas 51 a 53).

8 Conclusão e Trabalho Futuro

Este trabalho consistiu no fraccionamento de um extracto clorofórmico de uma erva daninha, *Centaurea africana*, género este que se encontra distribuído por todo o Portugal Continental, encontrando-se algumas espécies nas vizinhanças das vinhas.

O fraccionamento do extracto foi efectuado por cromatografia Sólido-Líquido em coluna de vidro de grandes dimensões, tradicional em Produtos Naturais, tendo sido realizada a comparação e agrupamento de fracções, após análise destas por cromatografia em camada fina.

A análise cromatográfica das amostras permitiu suspeitar a presença de matairesinol em 3 delas, nomeadamente Ca 71-85, Ca 190-216 e Ca 299, e de arctigenina em uma delas, a Ca 277-298. As suspeitas não foram confirmadas nem por variação das condições cromatográficas (variação da composição da fase móvel), nem pelo método da adição de padrão devendo-se visualizar uma intensificação do respectivo pico.

Pode-se ainda referir que a fase final deste trabalho permite iniciar estudos de análise de fracções da coluna por HPLC, no caminho de um futuro isolamento e purificação dos componentes de Produtos Naturais por HPLC semi-preparativo, no sentido de possibilitar a avaliação da sua actividade biológica como potenciais pesticidas naturais.

9 Referências Bibliográficas

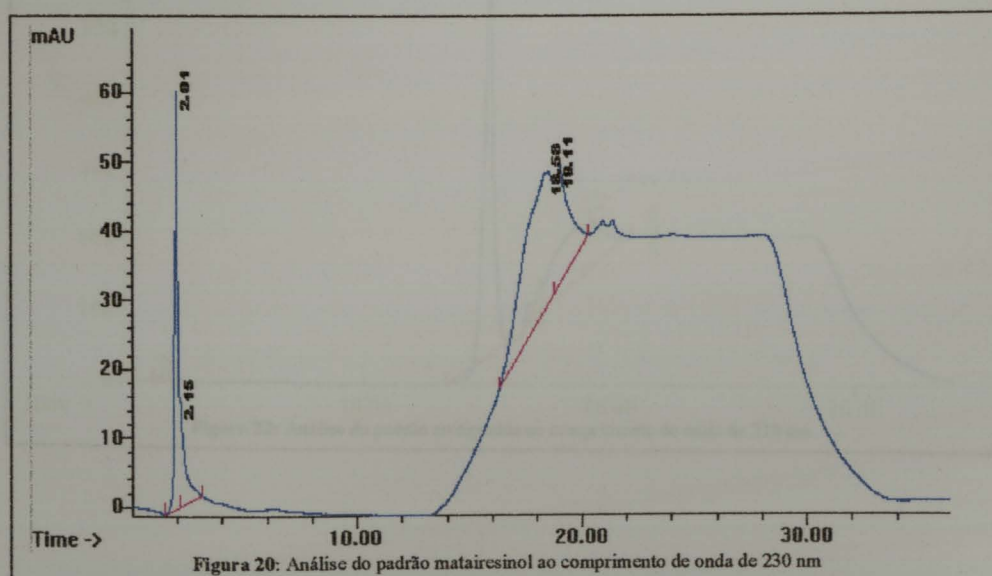
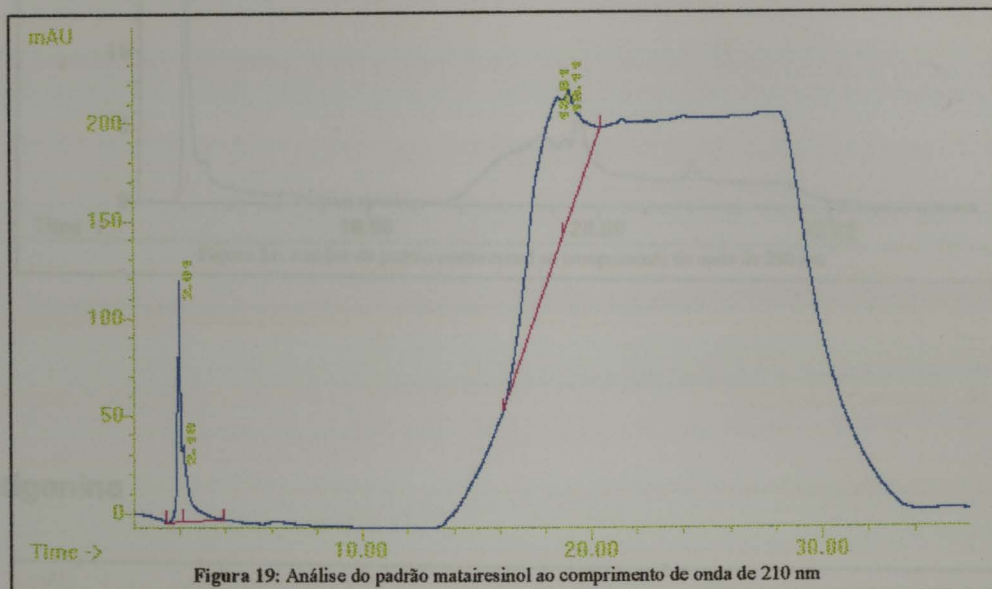
- [1] – site: www.edpinheirotorres.pt ; 27/02/2004;
- [2] – Fotos tiradas pelas orientadoras do projecto em Setembro de 2003;
- [3] – site: www.quintadotamariz.pt ; 27/02/2004;
- [4] – Franco, J.A.; “Nova Flora de Portugal”, 1984, Vol. II, Lisboa
- [5] – H.A.A. Twaij, F.M. Salih, M.T. Nadir, N.K. Aziz; “Antimicrobial and some pharmacological activity of *Centaurea Phyllocephala* and *C. Behen*”, Fitoterapia 1986, volume LVII, No. 1.
- [6] – M.T. Chuclá, M. Lamela, A. Gato, I. Cadavid: “*Centaurea corcubionensis*: A Study of its Hypoglycemic Activity in rats”, Planta Médica 1988, 107-109
- [7] – Vlata Vajs, Nina Todorović, Marina Ristić, Vele Tešević, Borislav Todorović, Pedja Janačković, Petar Marin, Slobodan Milosavjević: “Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity”, Phytochemistry (1999), 52, 383-386
- [8] – Helen Skaltsa, Lazari, Constantinos Panagouleas, Evanthia Georgiadou, Begoña Garcia, Marina Sokovic: “Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity”, Phytochemistry (2000), 55, 903-908
- [9] – A.F. Barrero, J.E. Oltra, I. Rodriguez, A. Barragan, D.G. Gravalos, P. Ruiz: “Lactones from species of *Centaurea*. Cytotoxic and antimicrobial activities”, Fitoterapia 1995, volume LXVI, No. 3.
- [10] – Gonzalez Collado, F.A. Macias, G.M. Massanet, and F. Rodriguez Luís; “Flavonoids from *Centaurea Clementei*”, Journal of Natural Products, Vol. 48, No. 5, pp 819-822, Sep-Oct 1985
- [11] – Jamal Bellakhdar, Renée Claisse, Jacques Fleurentin and Chafique Younos: “Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea”, Journal of Ethnopharmacology (1991), 35,123-143
- [12] – Erdem Yesilada, Gisho Honda, Ekrem Sesik, Mamoru Tabata, Katsumi Goto and Yasumasa Ikeshiro: “Tradicional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision”, Journal of Ethnopharmacology (1993), 39, 31-38
- [13] – Robert Novaretti, Denis Lemordant: “Plants in the traditional medicine of the Ubaye Valley”, Journal of Ethno pharmacology (1990), 30,1-34
- [14] – Jan Lietava: “Madicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV” Journal of Ethnopharmacology (1992), 35, 236-266
- [15] – Margarida Bastos” Estudo e Modificação Molecular e Metabolitos Secundários da *Compositae* e *Lauraceae* ” ; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, 1996

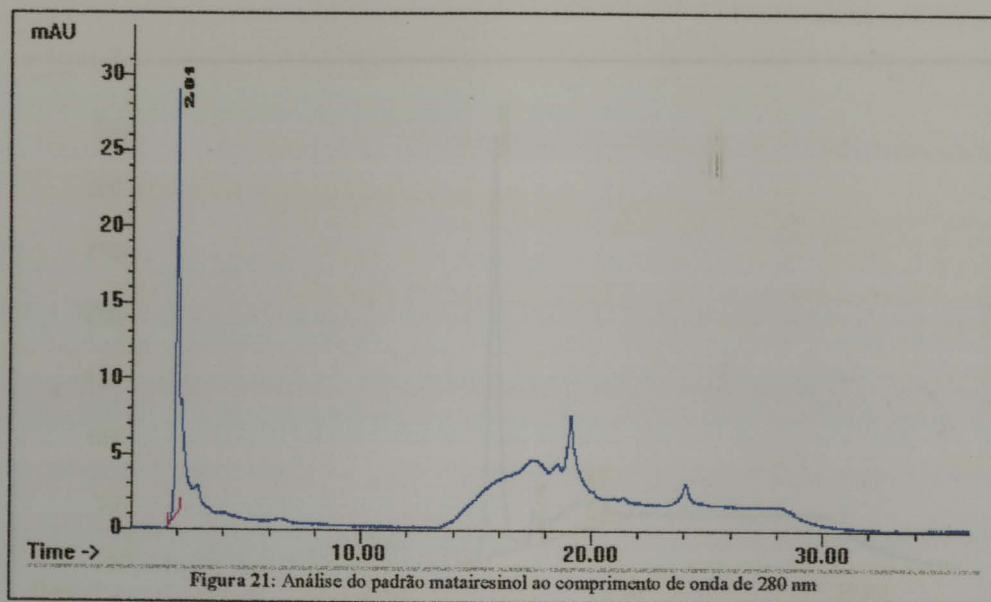
Apêndice A: Registos de HPLC

Padrões

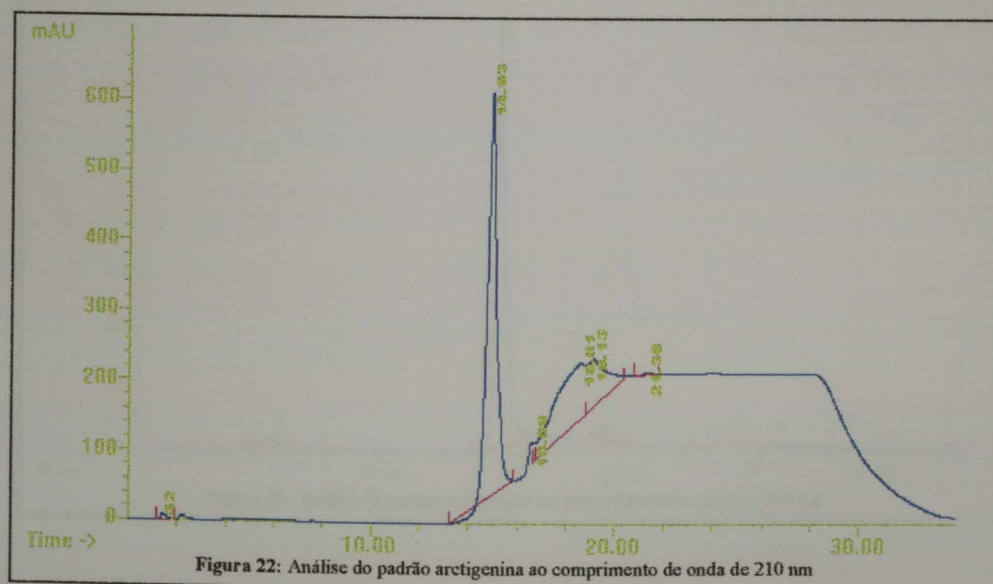
➤ Seguidamente são apresentados os registos obtidos para os três padrões de lignanos analisados a 210, 230 e 280 nm.

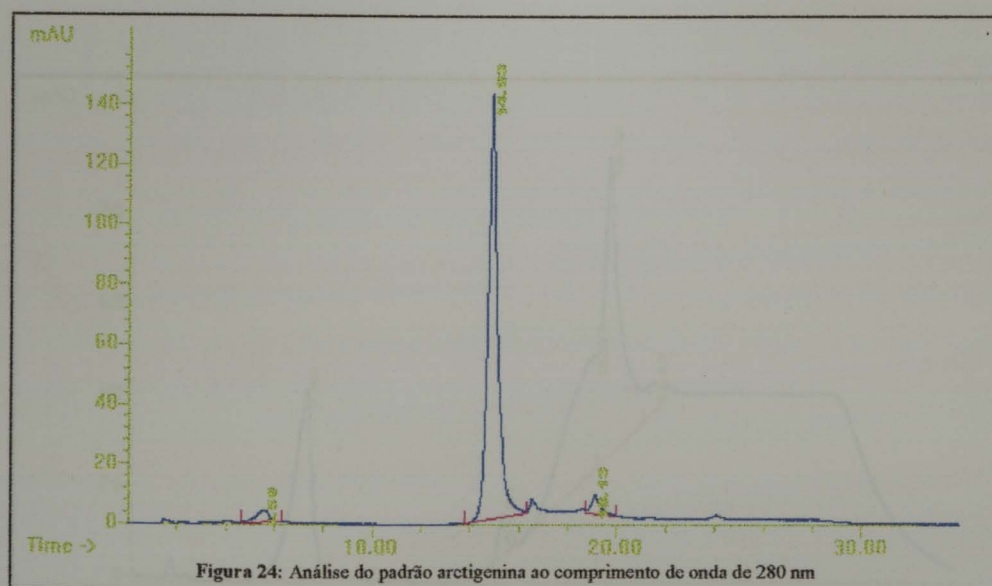
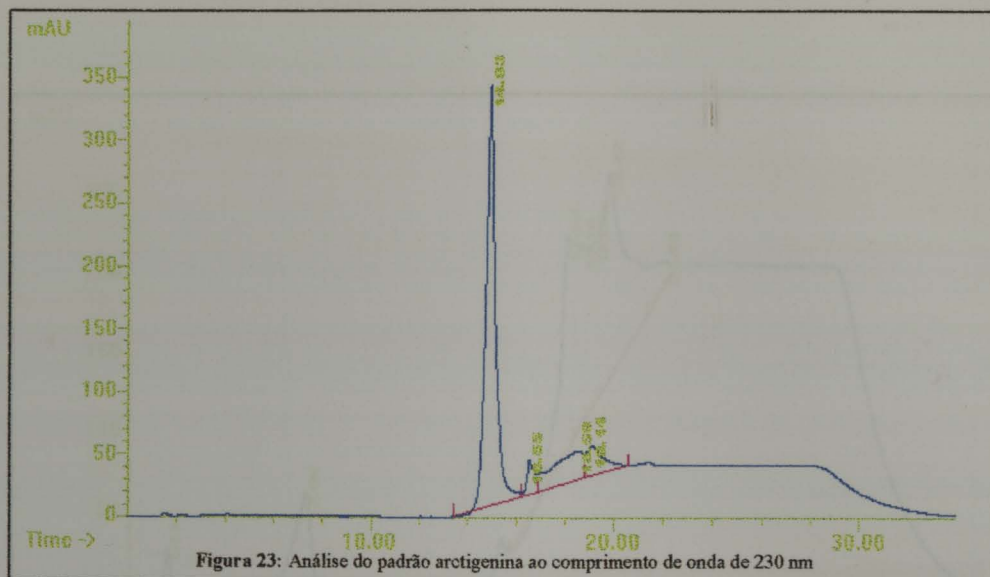
Matairesinol



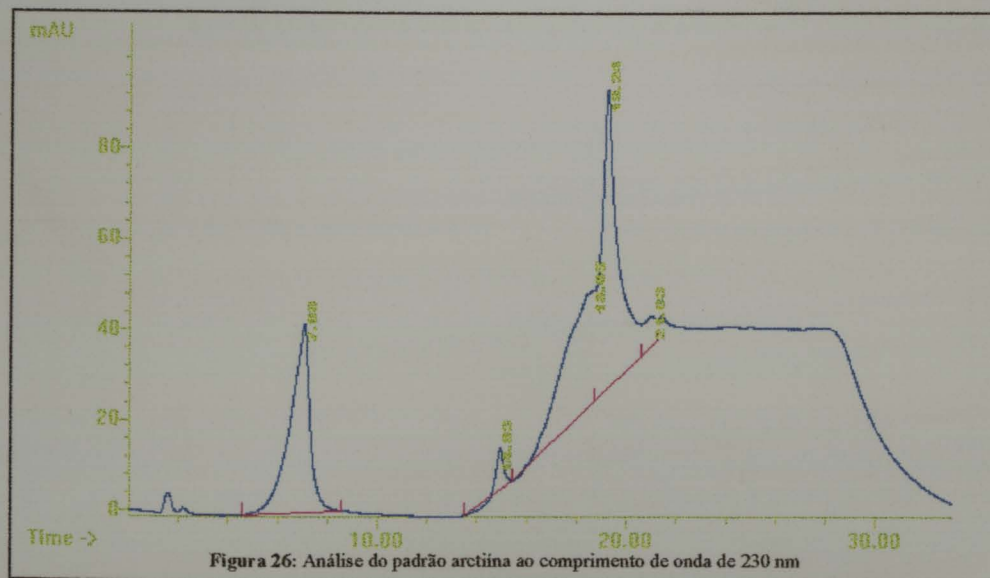
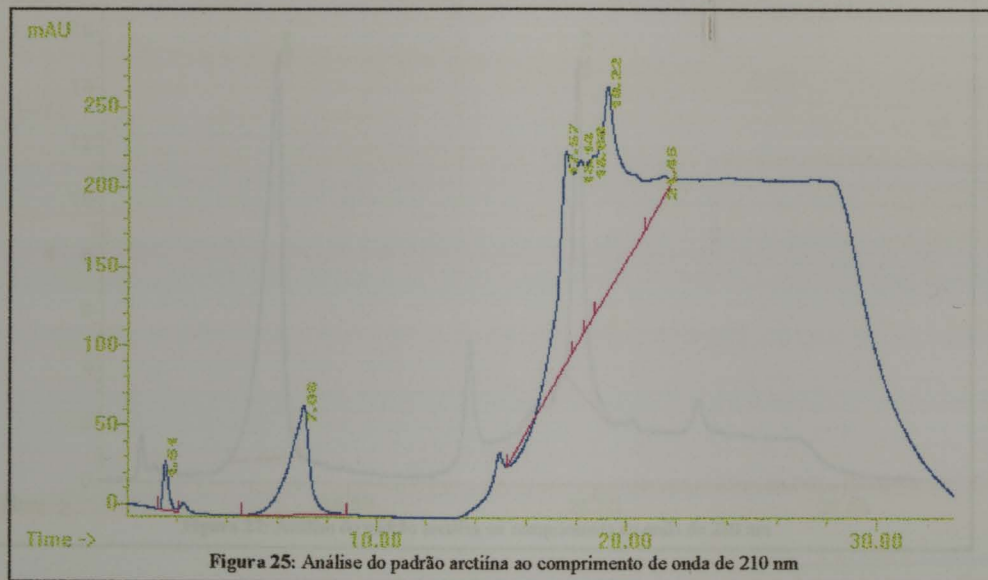


Arctigenina



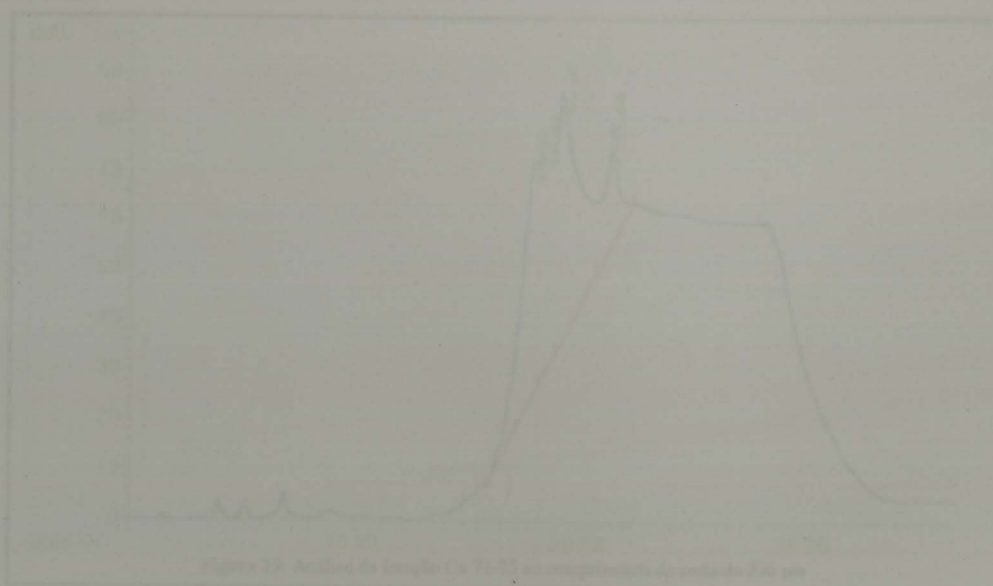
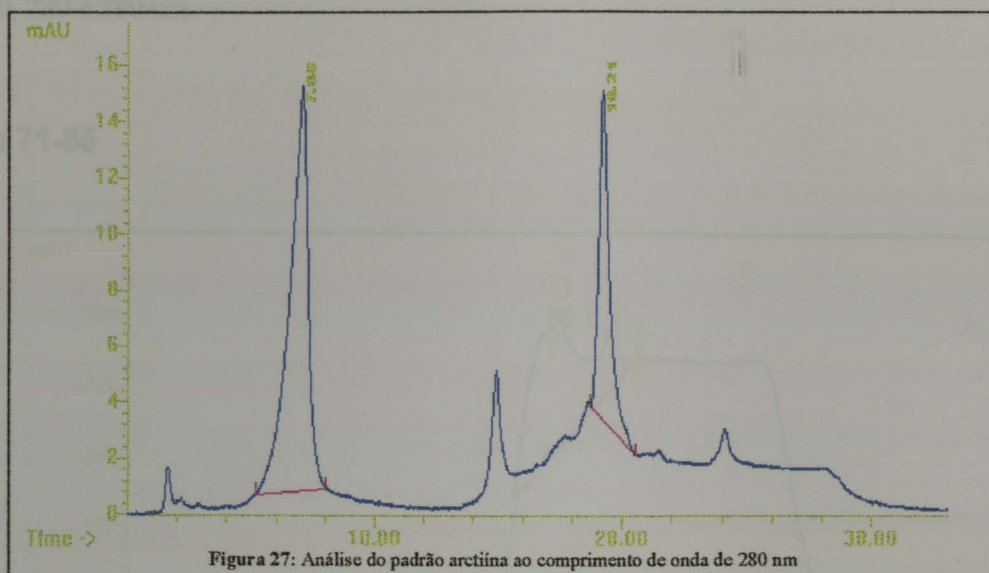


Arctina



Grupos de frações

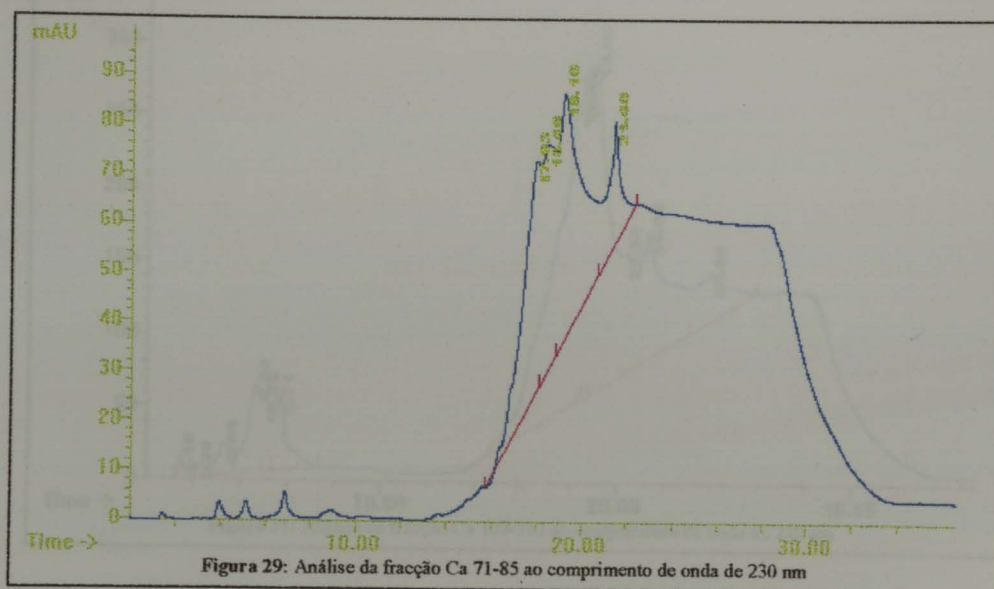
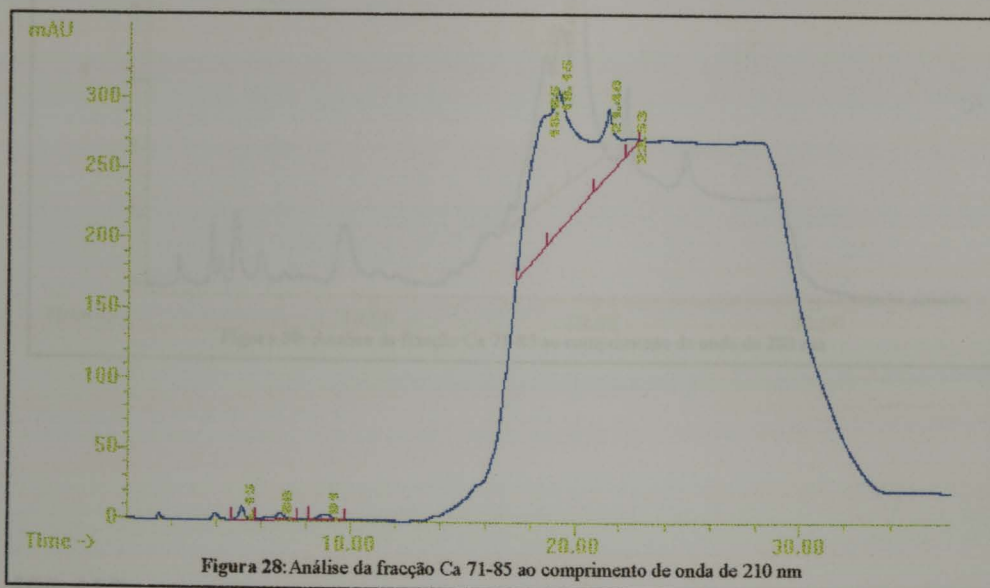
- Registos obtidos para os grupos de frações analisados nos comprimentos de onda de 210, 280 e 320 nm.

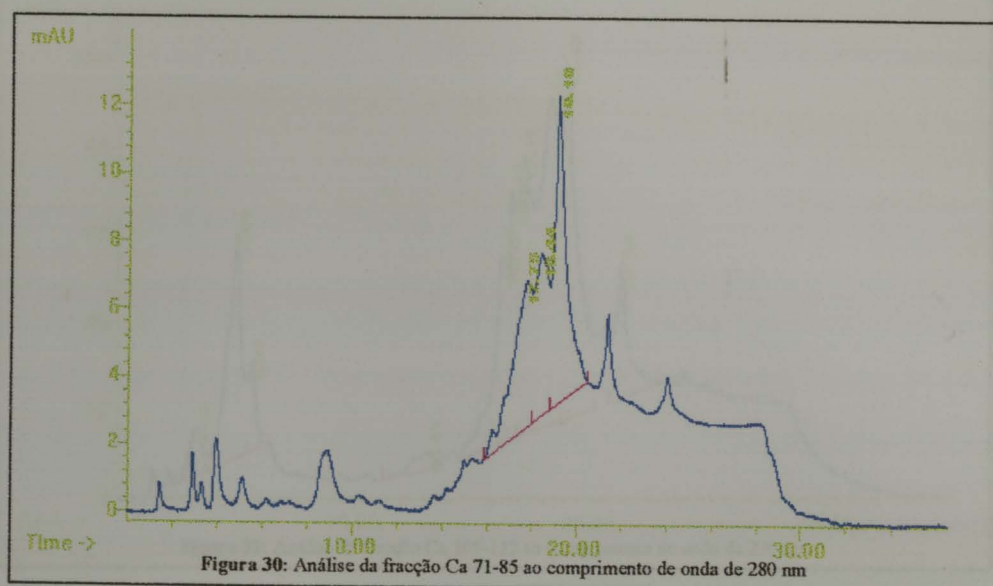


Grupos de fracções

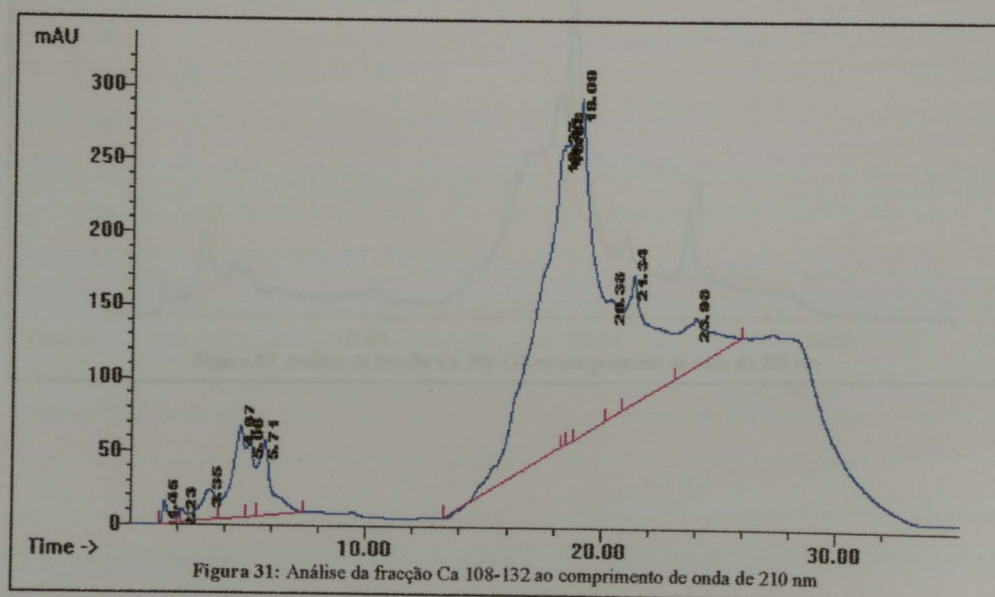
- Registos obtidos para os grupos de fracções analisados aos comprimentos de onda de 210, 230 e 280 nm.

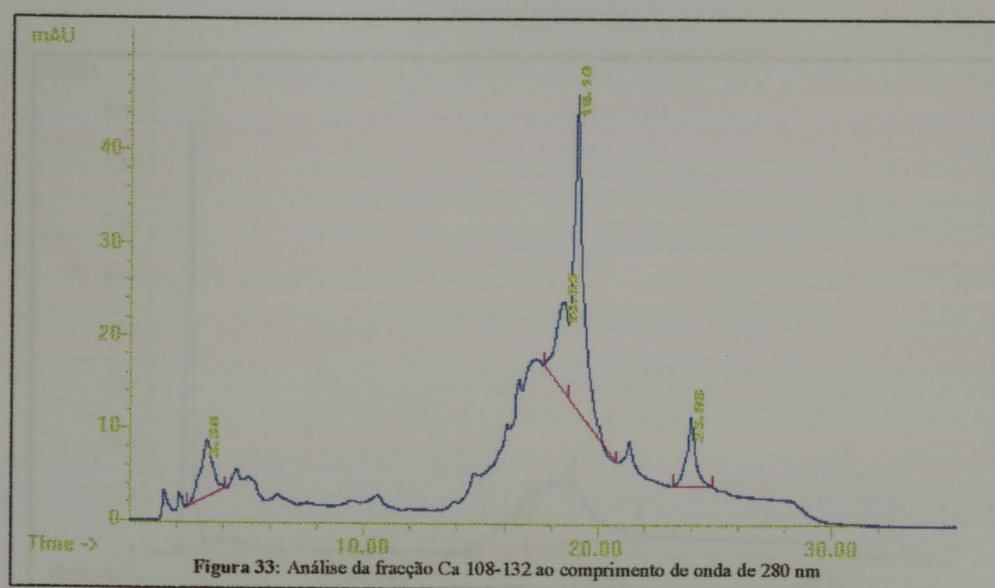
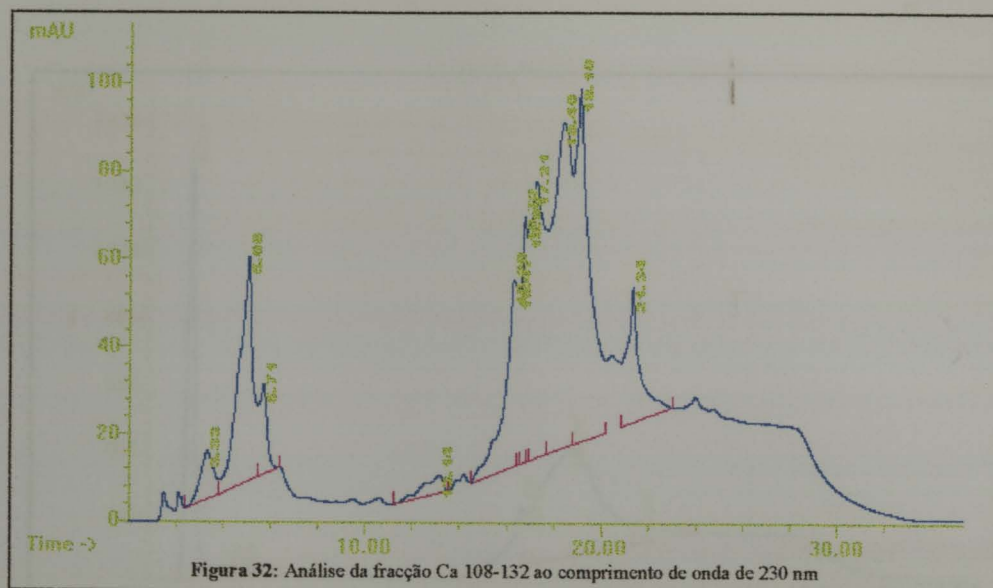
Ca 71-85



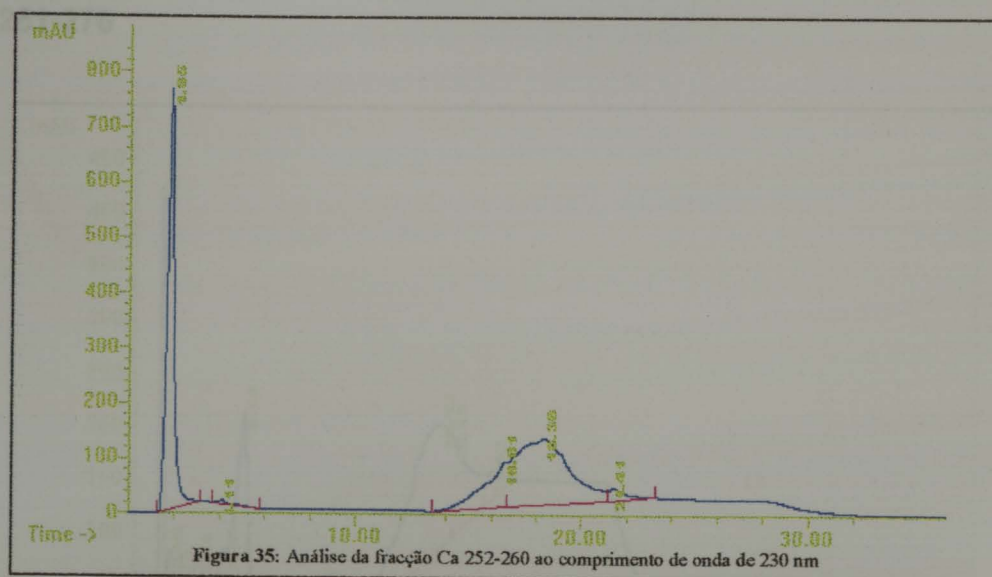
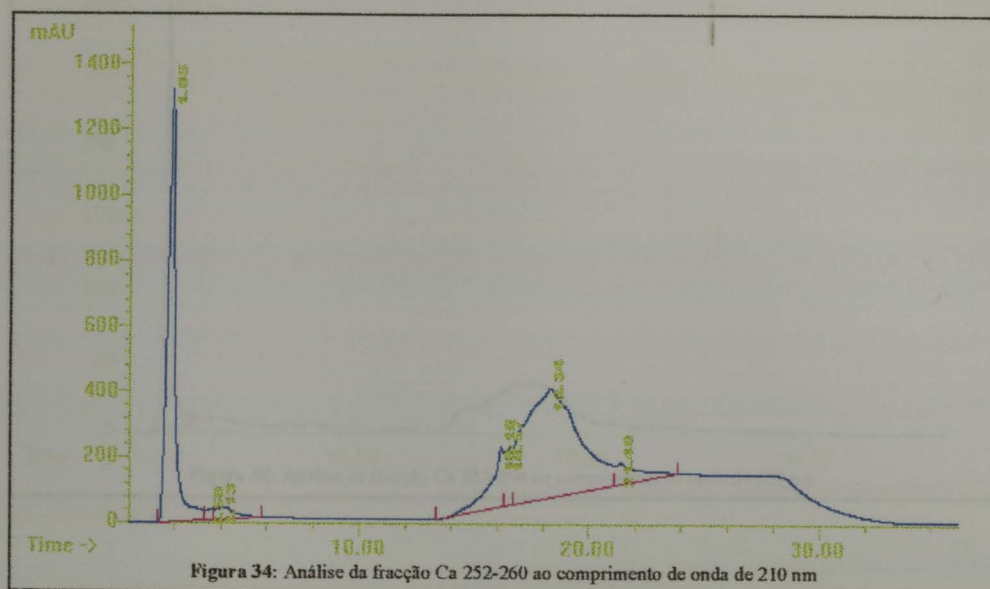


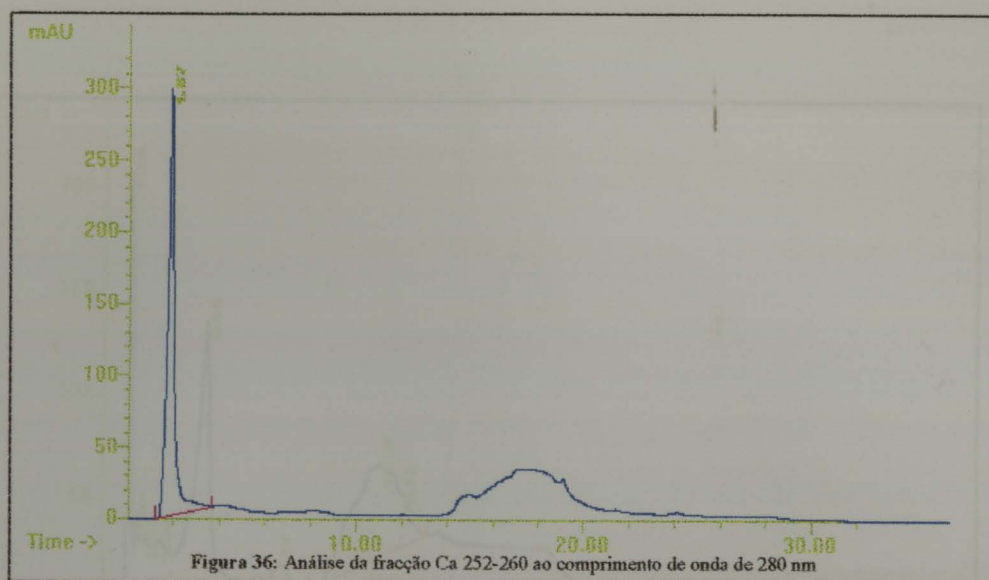
Ca 108-132



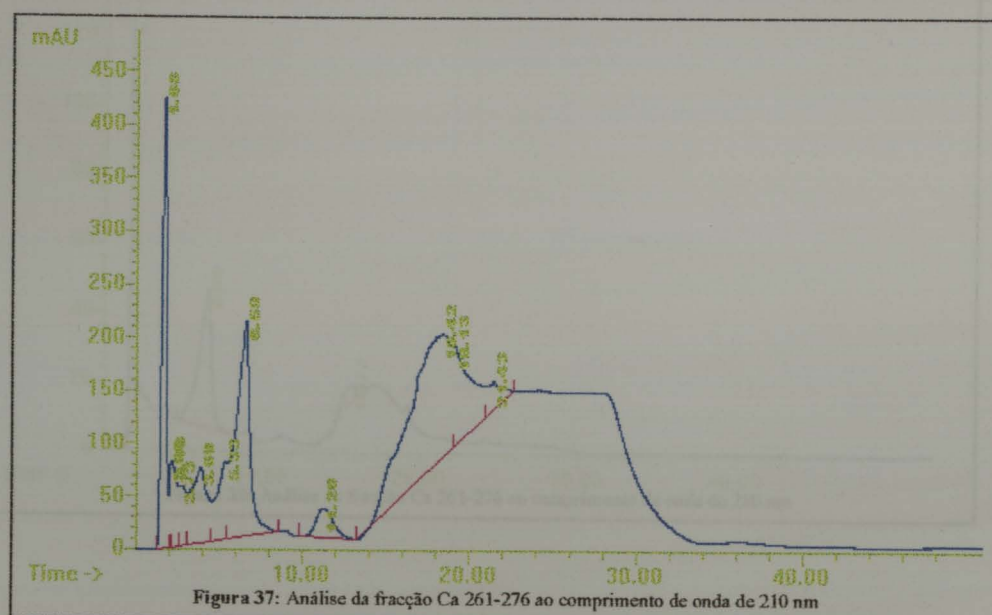


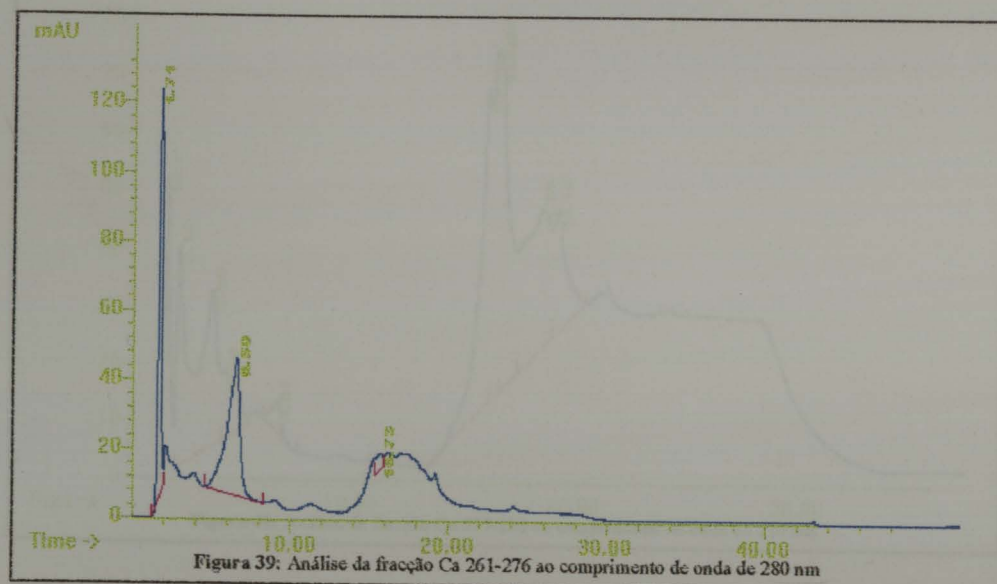
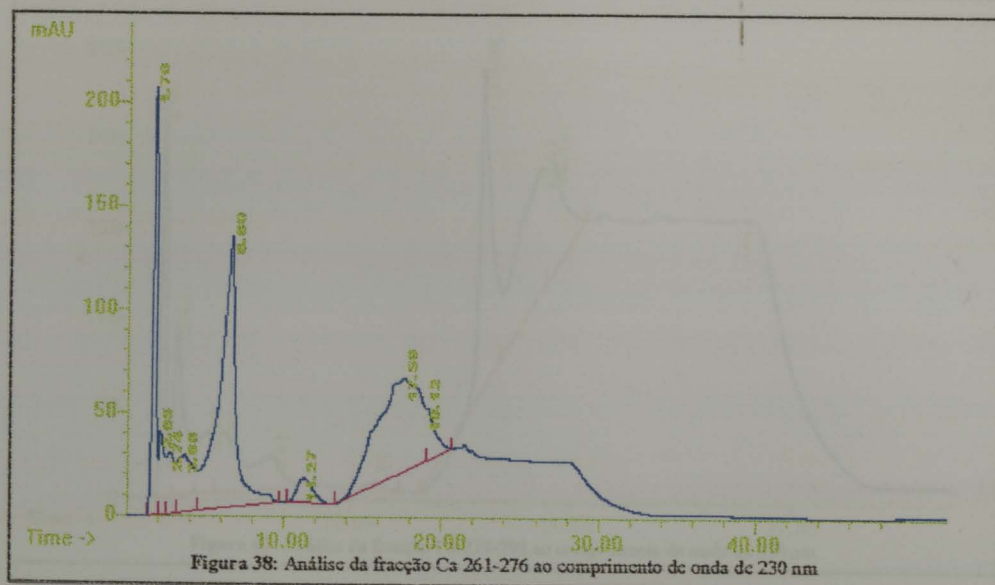
Ca 252-260



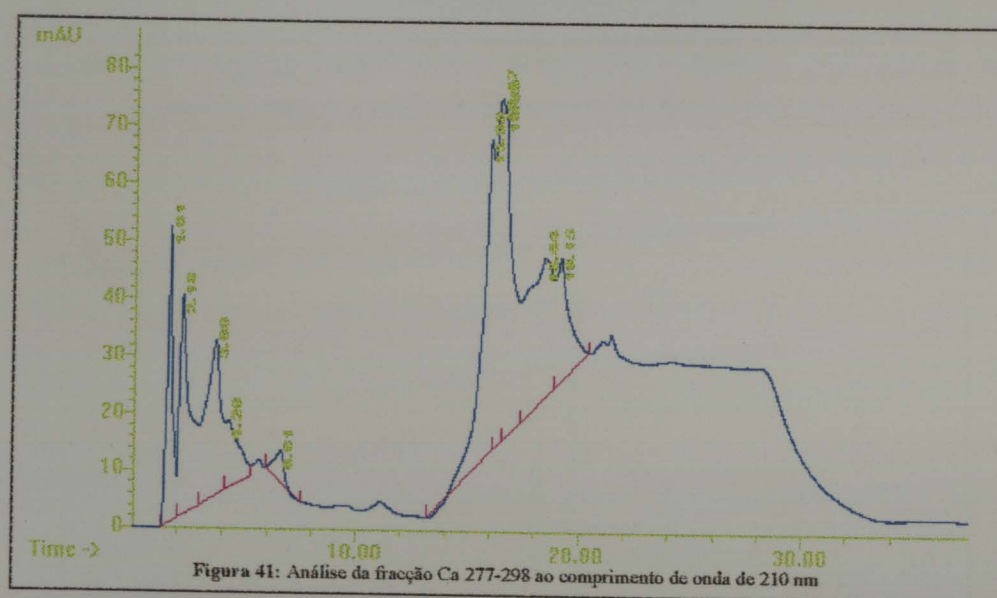
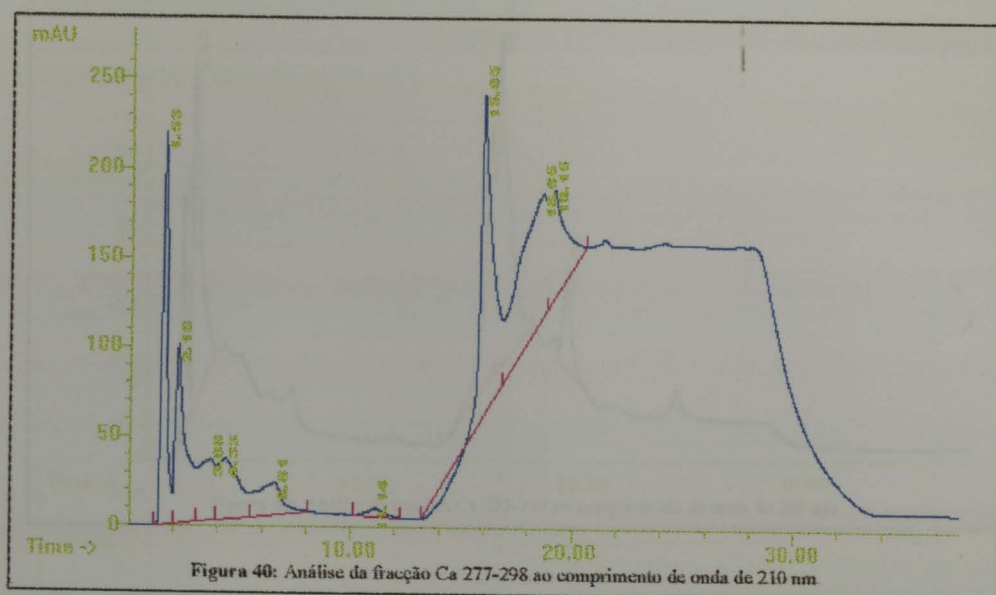


Ca 261-276





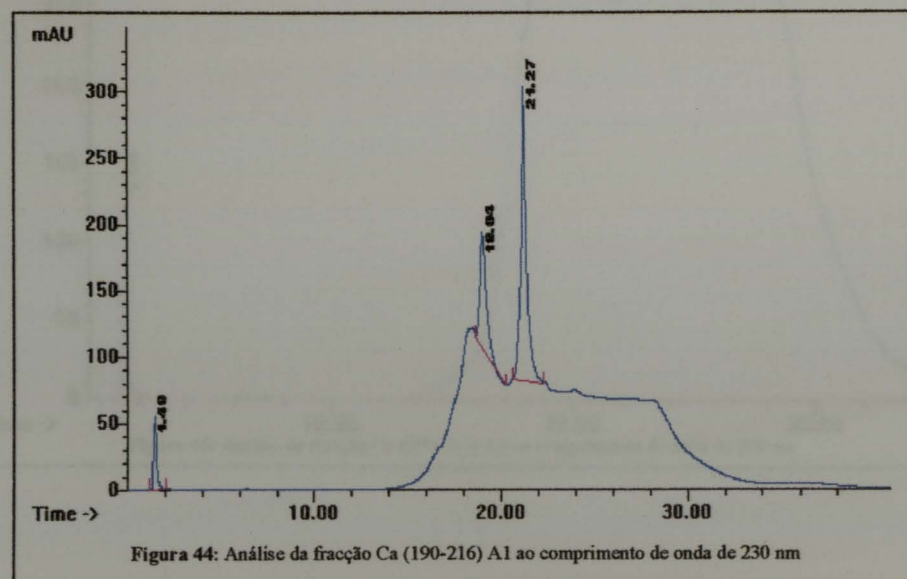
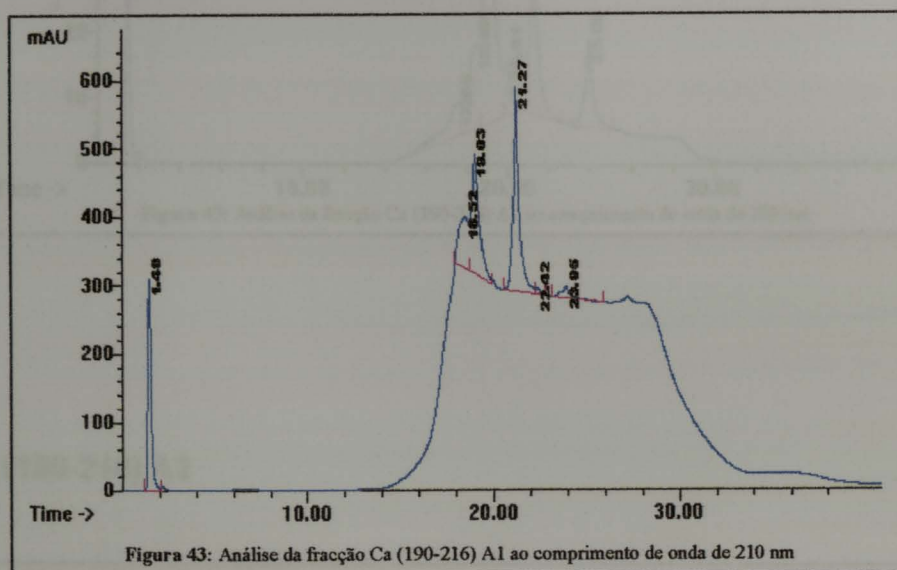
Ca 277-298



Fracções e Subfracções

- Seguidamente são apresentados os registos obtidos para a análise de cada amostra, nos três comprimentos de onda utilizados.

Ca (190-216) A1



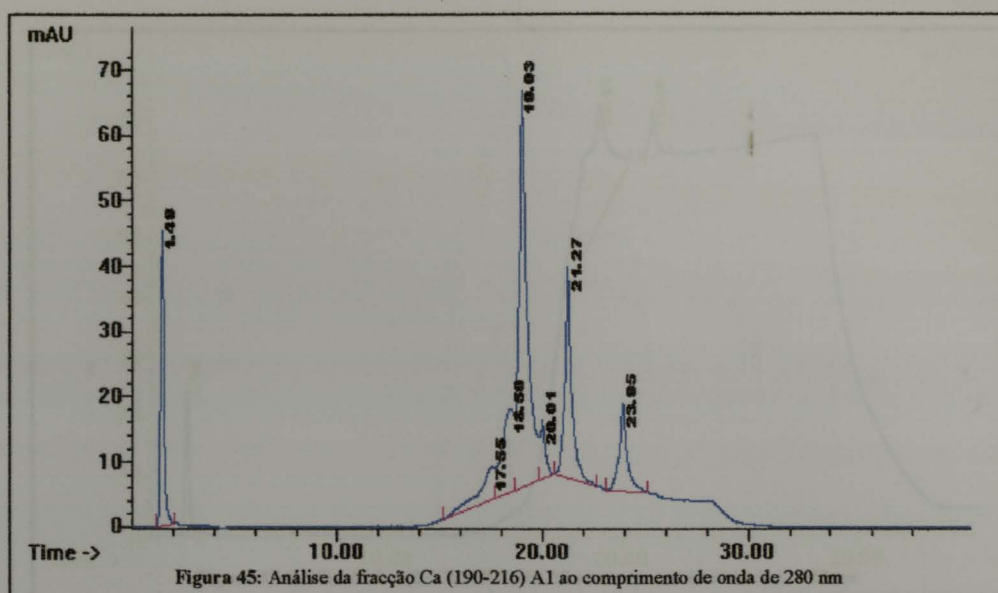


Figura 45: Análise da fracção Ca (190-216) A1 ao comprimento de onda de 280 nm

Ca (190-216) A2

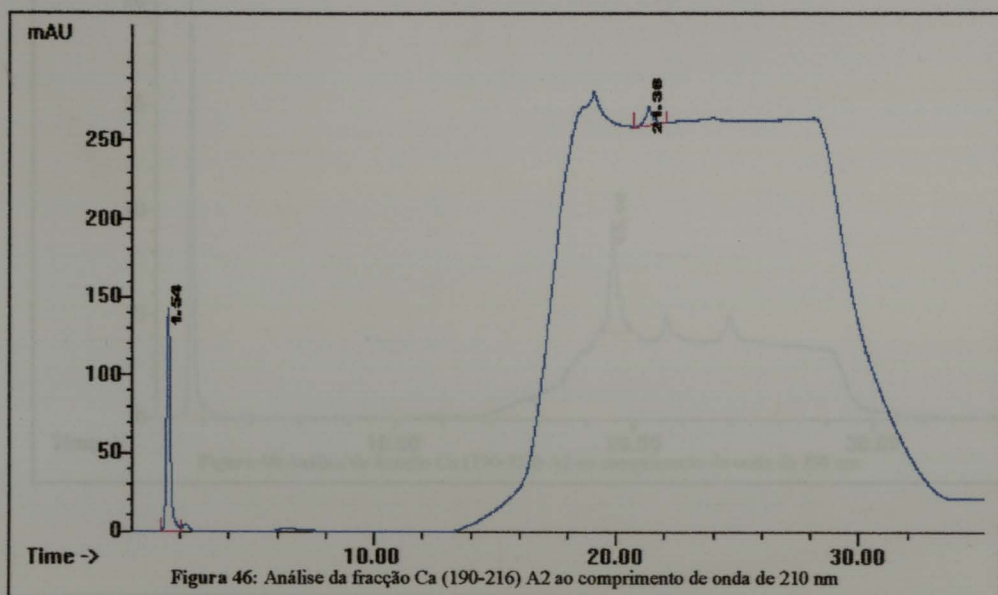
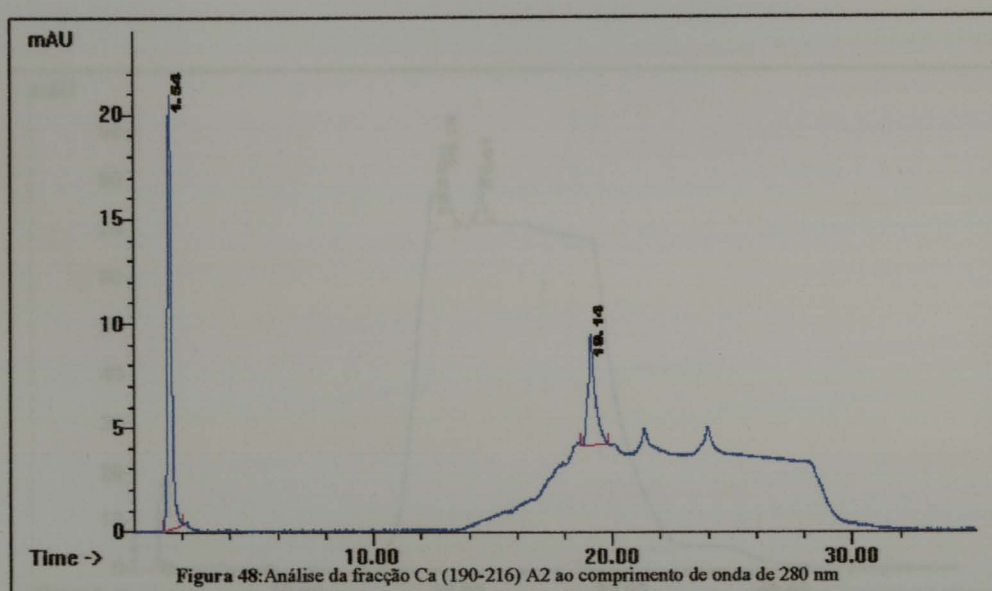
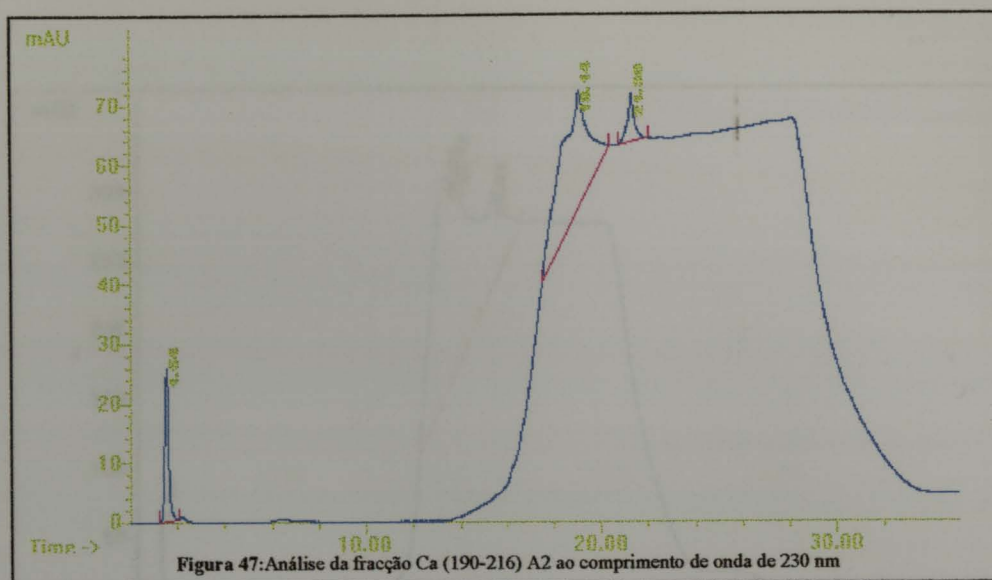
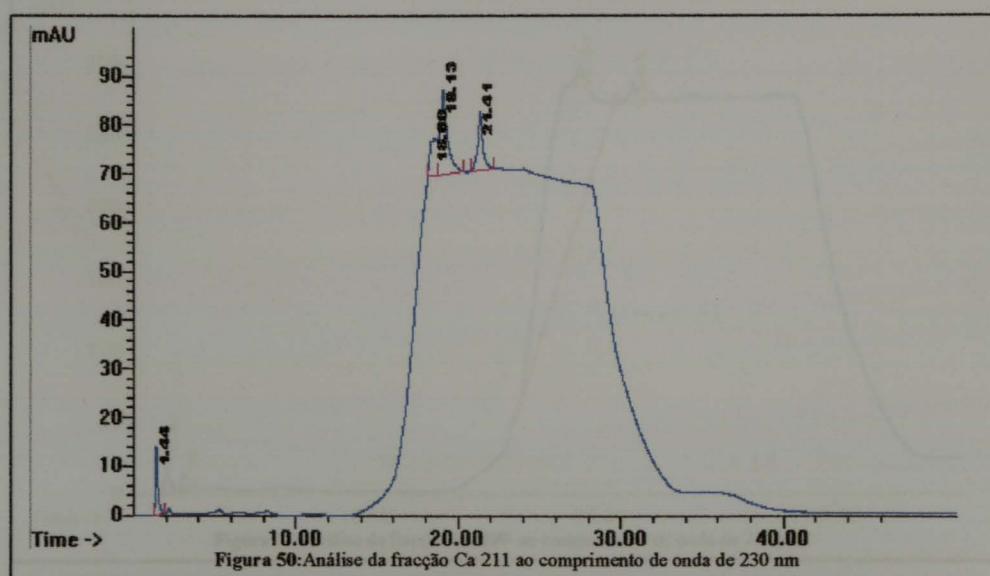
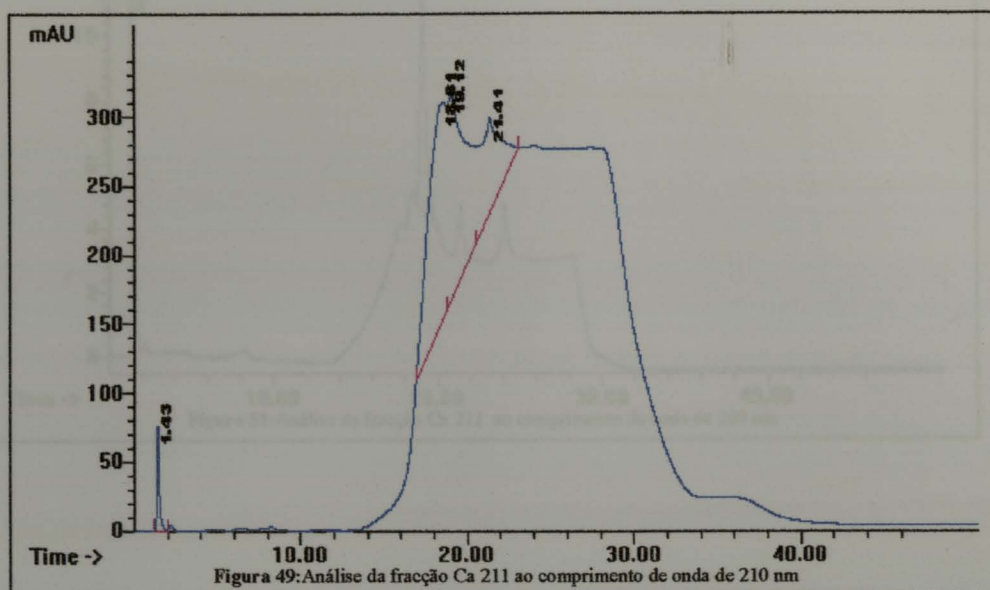


Figura 46: Análise da fracção Ca (190-216) A2 ao comprimento de onda de 210 nm



Ca 211



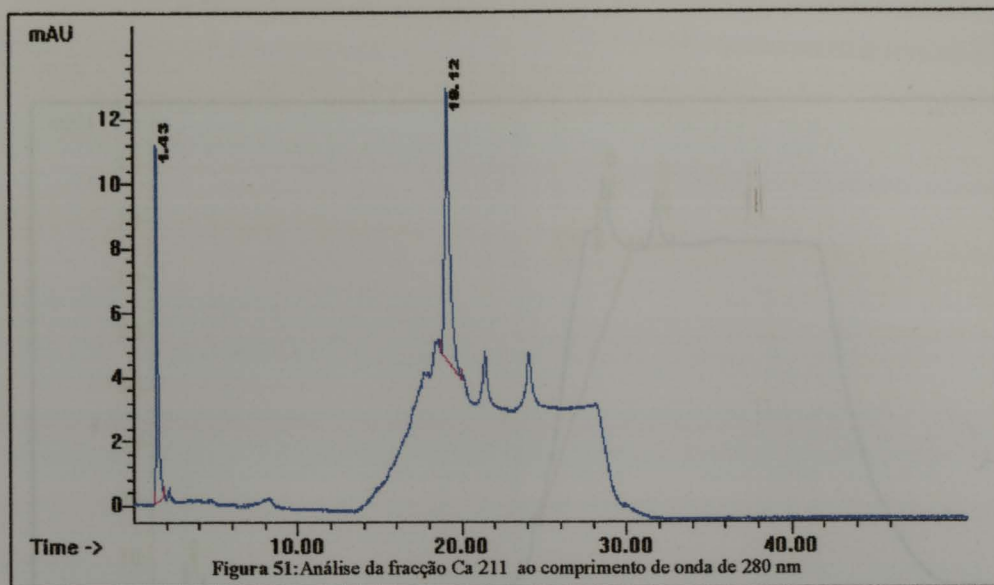


Figura 51: Análise da fracção Ca 211 ao comprimento de onda de 280 nm

Ca 299

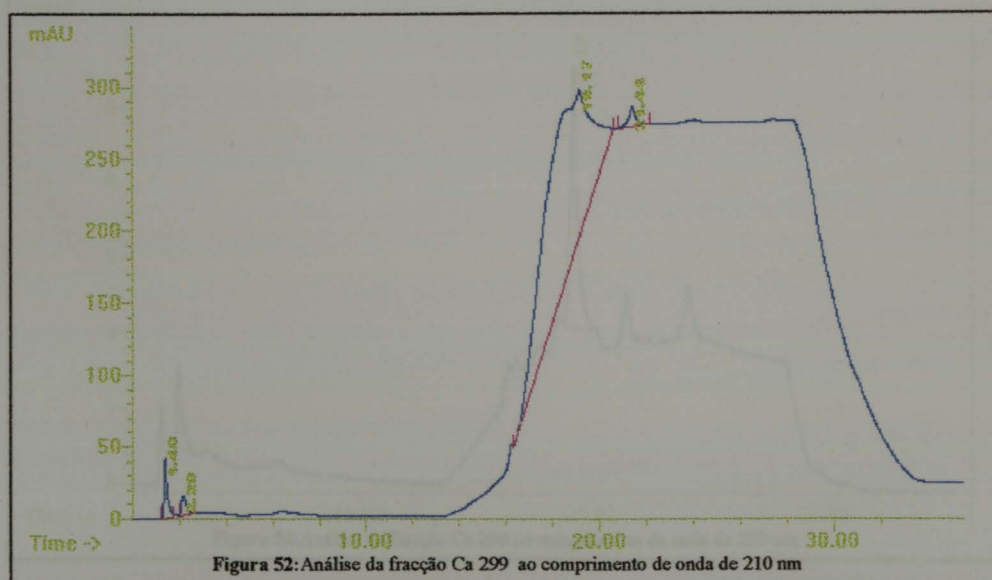
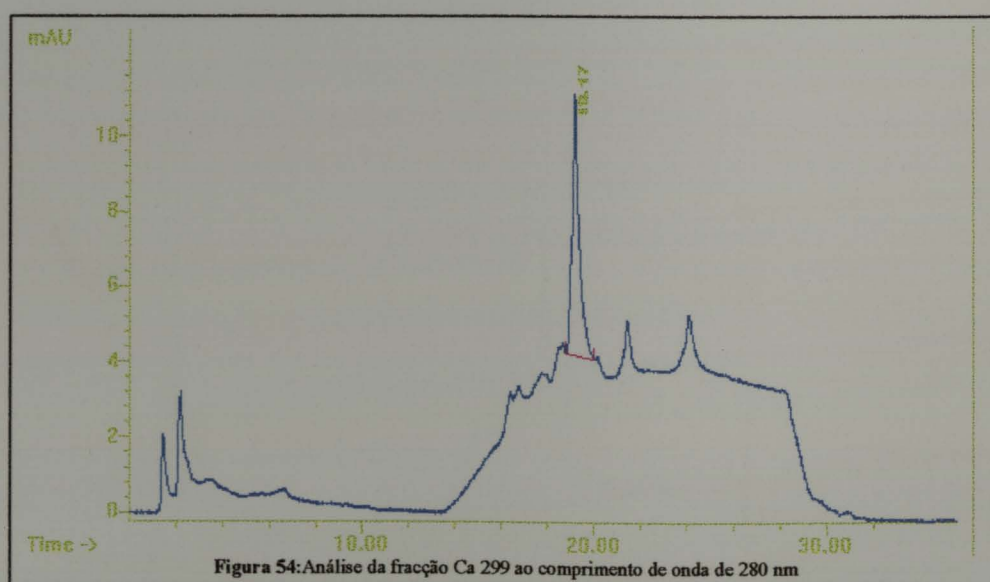
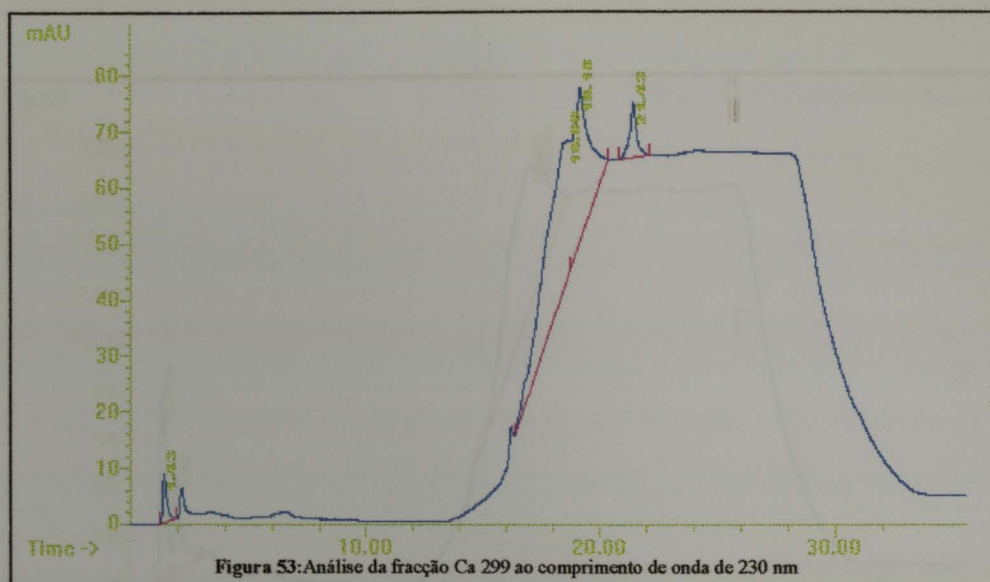
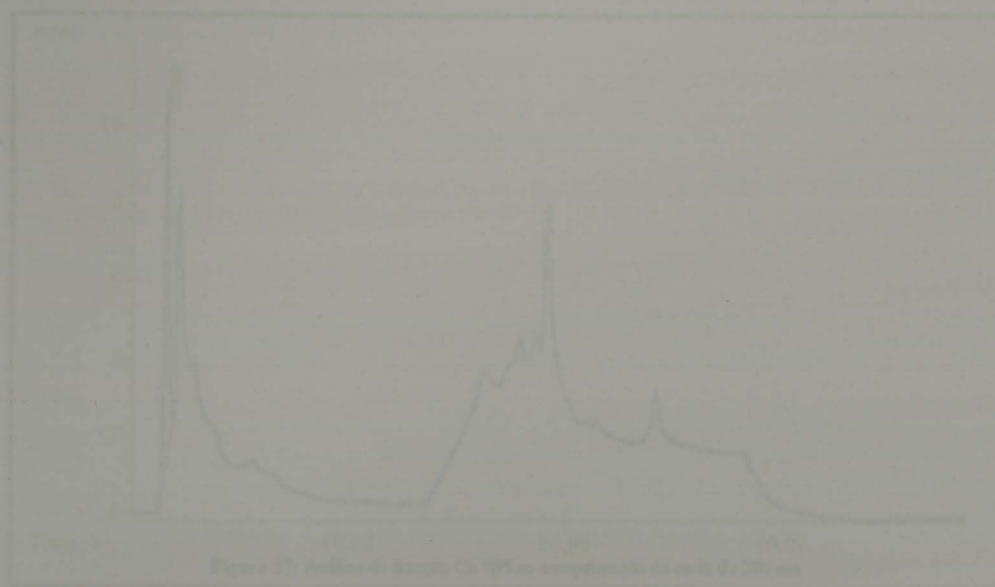
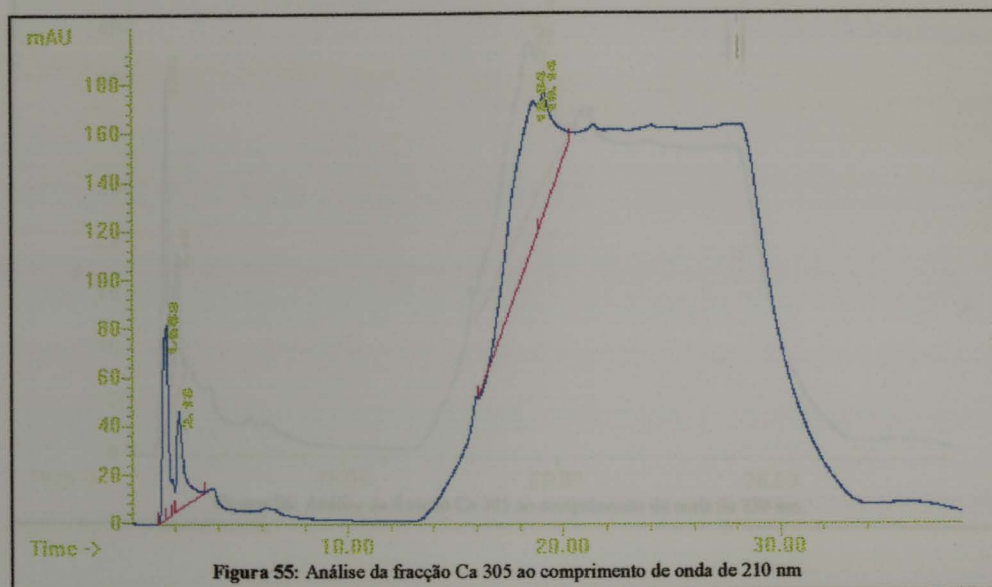


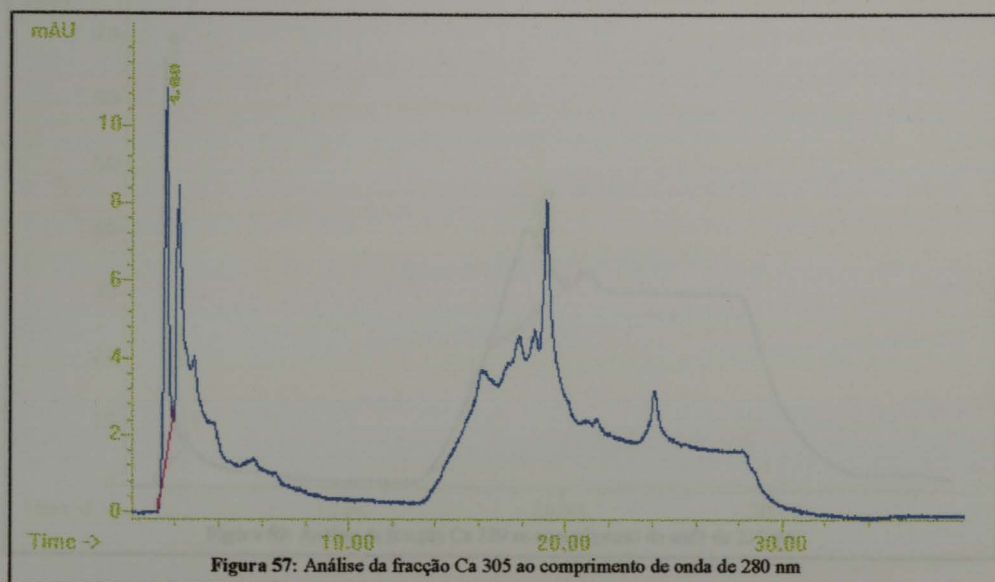
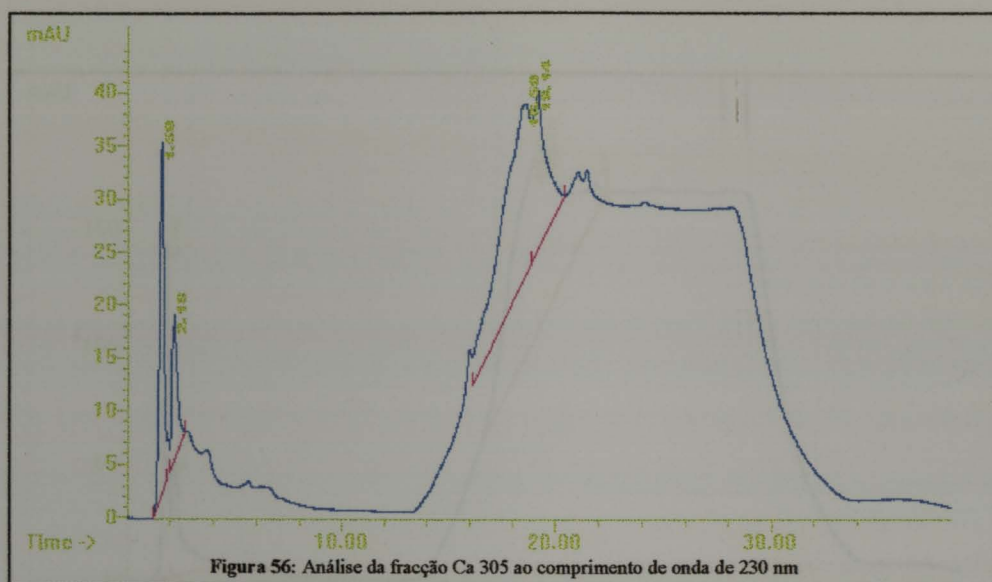
Figura 52: Análise da fracção Ca 299 ao comprimento de onda de 210 nm



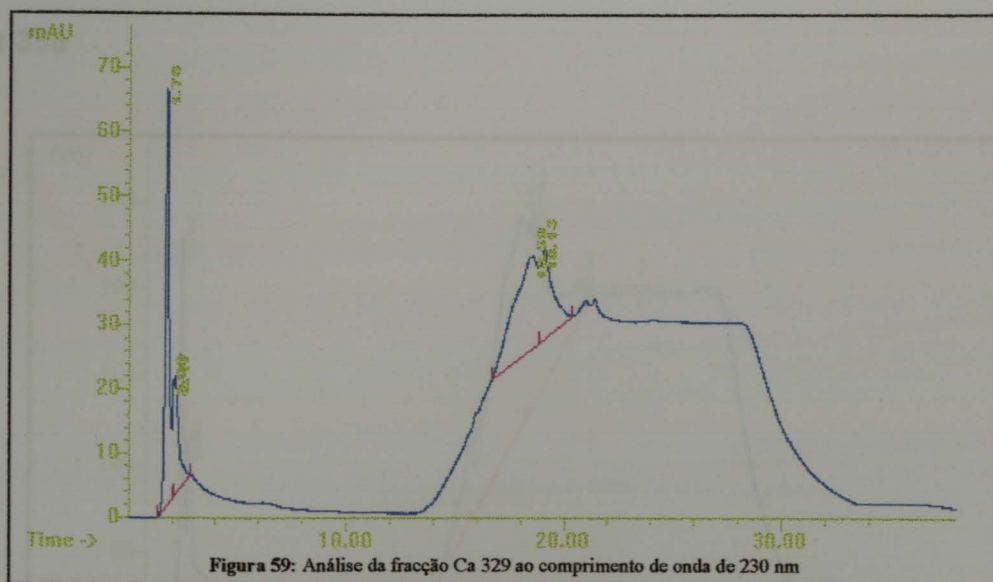
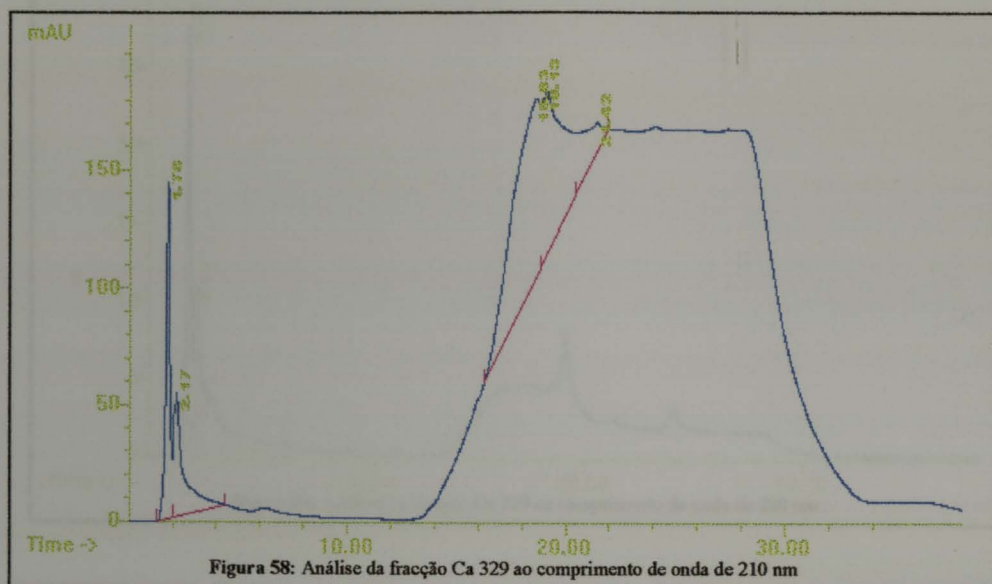
Ca 305

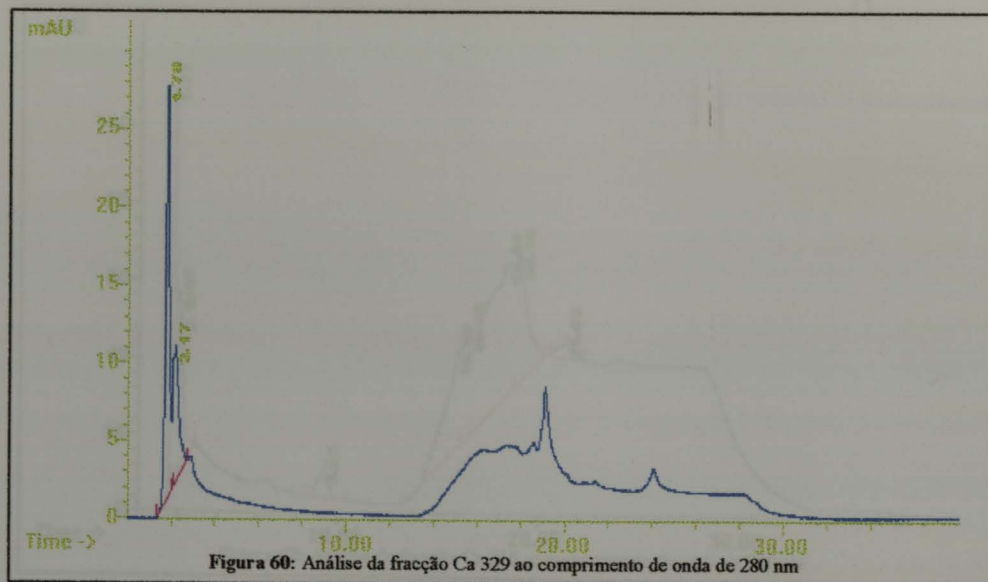


Ca 305

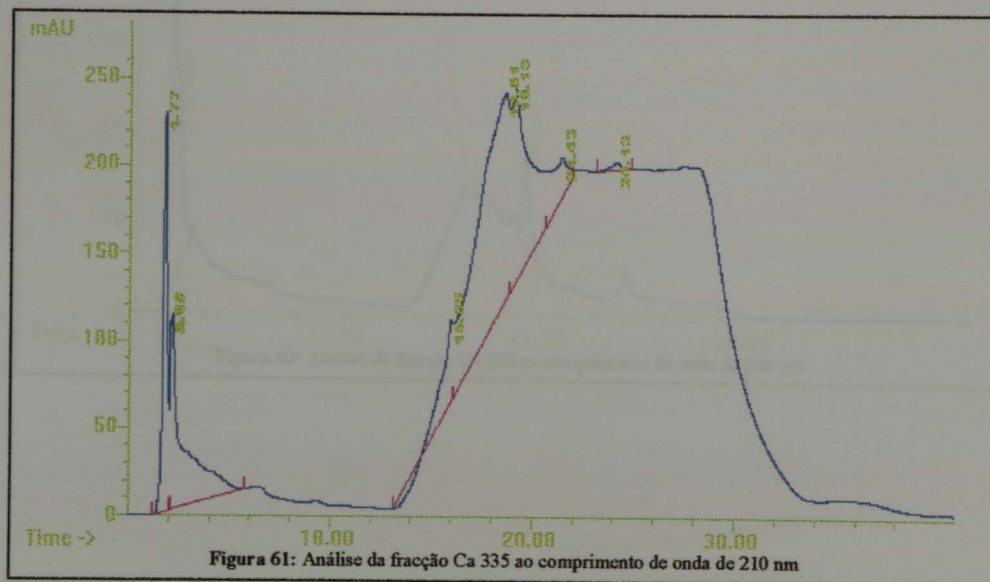


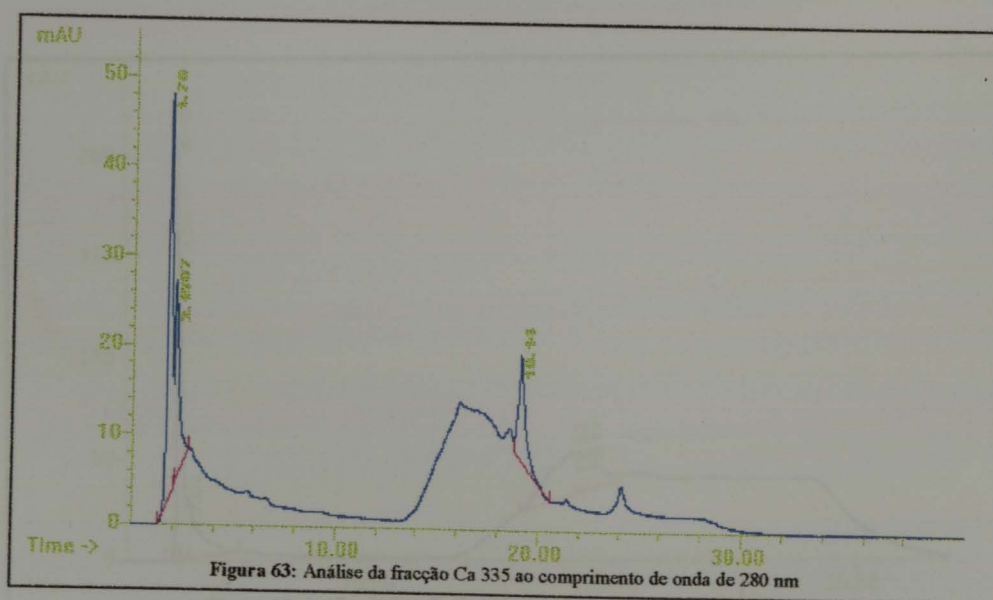
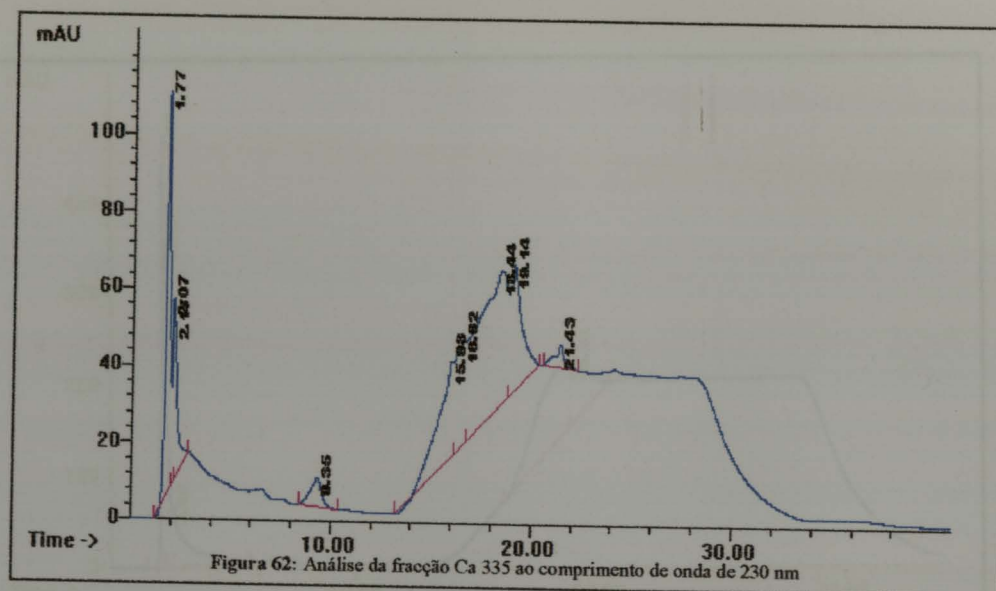
Ca 329



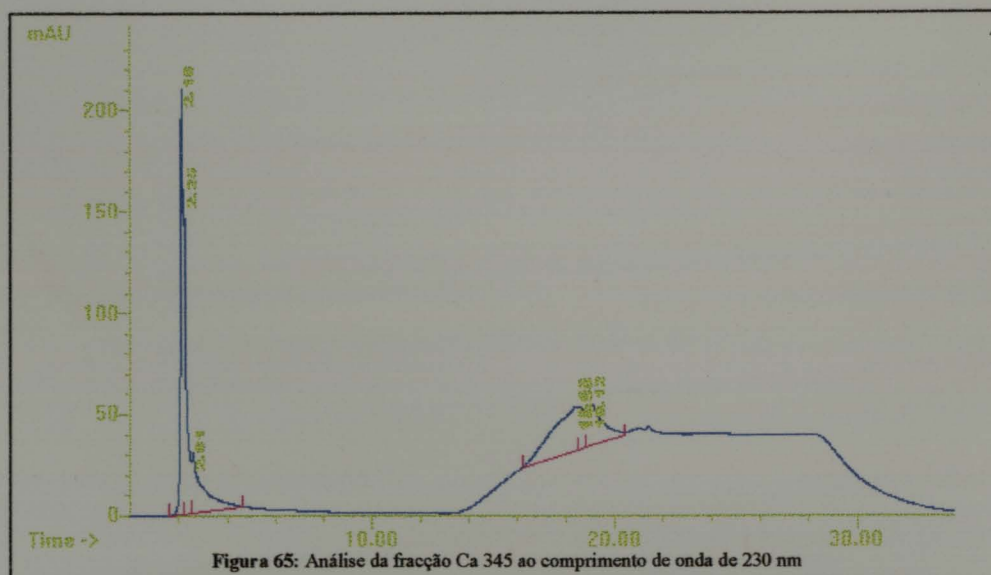
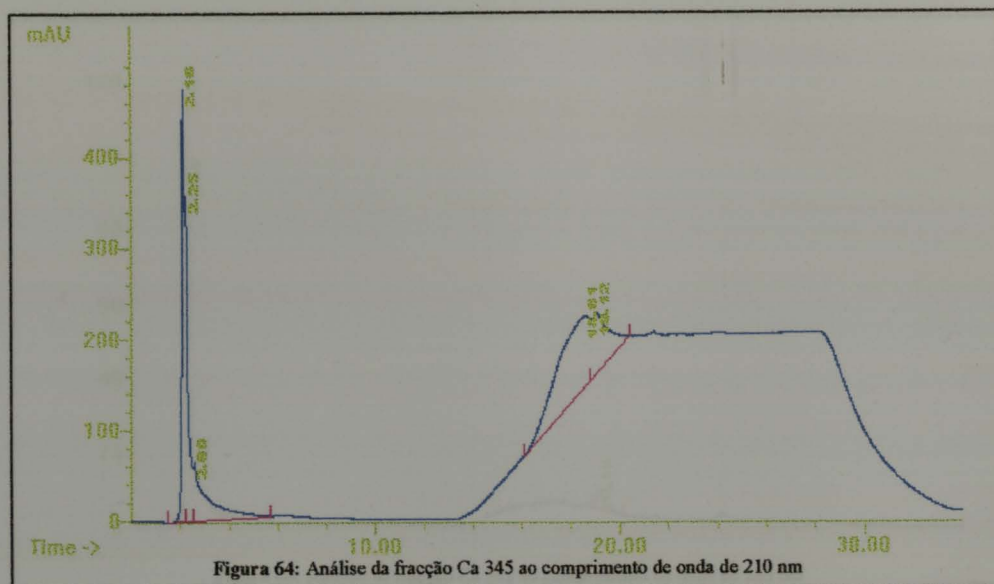


Ca 335





Ca 345



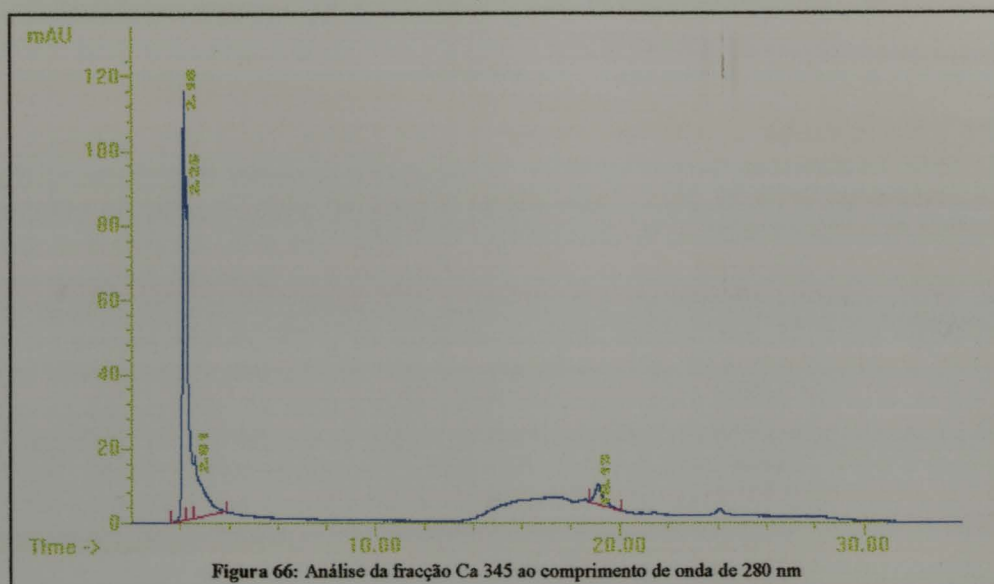


Figura 66: Análise da fracção Ca 345 ao comprimento de onda de 280 nm

APÊNDICE B: Patente

APÊNDICE B: Patente

United States Patent	5,876,728
Kass, et al.	March 2, 1999

Natural composition extracted from plants used in the treatment of cancer

Abstract

The invention is a method of treating cancer comprising administering an effective amount of either a composition of three herbal extracts consisting essentially of 30% to 70% by weight Goldenseal, 20% to 40% by weight of Myrtle, and 5% to 20% by weight of Centaurea, or a composition of seven herbal extracts consisting essentially of 3% to 5% by weight *Centaurea*, 1.5% to 4% by weight Capsicum, 1.5% to 4% by weight Lobelia, 20% to 40% by weight Myrrh, 30% to 50% by weight Echinacea, 15% to 25% by weight Goldenseal, and 3% to 5% by weight Myrtle. The compositions were prepared by separately extracting each herb by mixing the herb in water, ethyl alcohol, or a mixture of water and ethyl ether, boiling and cooling the mixture, allowing the mixture to stand for about two weeks, filtering the mixture to obtain the liquid phase, and combining each of said extracts to obtain said compositions.

Inventors:	Kass; Howard David (12646 Cumpston, Valley Village, CA); Freeman; Arnold I. (Azor Modiin, IL); Leyva; Albert (Lenexa, KS)
Assignee:	Kass; Howard David (Valley Village, CA)
Appl. No.:	594693
Filed:	January 31, 1996

Foreign Application Priority Data

Feb 15, 1995[IL]	112654
Jan 16, 1996[IL]	116766
Current U.S. Class:	424/726; 424/737; 424/748; 426/531; 426/655
Intern'l Class:	A61K 035/78
Field of Search:	424/195.1 426/531,655

References Cited [Referenced By]

U.S. Patent Documents

3932628	Jan., 1976	Hudson	424/195.
5362641	Nov., 1994	Fuks et al.	435/209.
5378465	Jan., 1995	Zeines	424/195.

Other References

The Merck Index, Tenth Edition, Merck & Co., Inc. 1983, pp. 244, 274, 506, 690, 794, 795, 908, and 1202.

The Peterson Field Guide Series, A Field Guide to Medicinal Plants, Eastern and Central North America, Houghton Mifflin Company, Boston, pp. 50, 144, 200, and 240, 1990.

Alternative Medicine, The Definitive Guide, James Strohecker, Ed., Future Medicine Publishing, Inc. Washington, pp. 515 and 516, 1994.

Primary Examiner: Naff, David M.

Assistant Examiner: Kerr, Janet M.

Attorney, Agent or Firm: Browdy and Neimark

Claims

What is claimed is:

1. A method of treating cancer comprising administering to a patient in need thereof a cancer-treatment effective amount of a composition which consists essentially of:

- (a) 30% to 70% by weight of Goldenseal extract;
- (b) 20% to 40% by weight of Myrtle extract; and
- (c) 5% to 20% by weight of Centaurea extract.

2. A method in accordance with claim 1 wherein said composition consists essentially of:

- (a) 35% to 65% by weight Goldenseal extract;
- (b) 25% to 35% by weight Myrtle extract; and
- (c) 7% to 15% by weight Centaurea extract.

3. A method according to claim 2 wherein said extracts are substantially free of berberine, hydrastine and canadine.

4. A method according to claim 1 wherein said composition is a liquid further consisting essentially of water, ethyl alcohol or a mixture of water and ethyl alcohol.

5. A method according to claim 4 wherein said composition is administered in a dosage amount of 10 to 40 drops, 4 to 6 times per day.

6. A method of treating cancer comprising administering to a patient in need thereof a cancer-treatment effective amount of a composition which consists essentially of:

- (a) 3% to 5% by weight Centaurea extract;
- (b) 1.5% to 4% by weight Capsicum extract;
- (c) 1.5% to 4% by weight Lobelia extract;
- (d) 20% to 40% by weight Myrrh extract;
- (e) 30% to 50% by weight Echinacea extract;
- (f) 15% to 25% by weight Goldenseal extract; and
- (g) 3% to 5% by weight Myrtle extract.

7. A method according to claim 6 wherein said composition consists essentially of:

- (a) 2% to 4% by weight Centaurea extract;
- (b) 2% to 3% by weight Capsicum extract;
- (c) 2% to 3% by weight Lobelia extract;
- (d) 25% to 35% by weight Myrrh extract;
- (e) 35% to 45% by weight Echinacea extract;
- (f) 18% to 22% by weight Goldenseal extract; and
- (g) 2.5% to 4.5% by weight Myrtle extract.

8. A method according to claim 6 wherein said composition is a liquid further consists essentially of water, ethyl alcohol or a mixture of water and ether alcohol.

9. A method according to claim 8 wherein said composition is administered in a dosage amount of 10 to 40 drops, 4 to 6 times per day.

10. A process for preparing a cancer treating composition consisting essentially of 30% to 70% by weight of Goldenseal extract, 20% to 40% by weight of Myrtle extract, and 5% to 20% by weight of Centaurea extract, comprising:

preparing each extract by mixing separately each of Goldenseal, Myrtle, and Centaurea with a solvent selected from the group consisting of water, ethyl alcohol and a mixture of water and ethyl alcohol to provide a liquid phase and a solid phase;
bringing the mixture of said liquid phase and said solid phase to a boil;

cooling the mixture and optionally adding an amount sufficient of ethyl alcohol to the liquid phase to provide a concentration of 10-30% ethyl alcohol by volume;

permitting the mixture to stand for at least about two weeks;

filtering to obtain the liquid phase which constitutes said composition; and

combining each of said extracts to obtain said composition.

11. A method according to claim 10 wherein said solvent is water.

12. A method according to claim 10 wherein said solvent is a mixture of water and ethyl alcohol.

13. A composition obtained by the process of claim 10.

14. A process for preparing a cancer-treating composition consisting essentially of 3% to 5% by weight Centaurea extract, 1.5% to 4% by weight Capsicum extract, 1.5% to 4% by weight Lobelia extract, 20% to 40% by weight Myrrh extract, 30% to 50% by weight Echinacea extract, 15% to 25% by weight Goldenseal extract, and 3% to 5% by weight Myrtle extract, comprising:

preparing each extract by mixing separately each of Centaurea, Capsicum, Lobelia, Myrrh, Echinacea, Goldenseal, and Myrtle with a solvent selected from the group consisting of water, ethyl alcohol and a mixture of water and ethyl alcohol to provide a liquid phase and a solid phase;

bringing the mixture of said liquid phase and said solid phase to a boil;

cooling the mixtures and optionally adding an amount sufficient of ethyl alcohol to the liquid phase to provide a concentration of 10-30% ethyl alcohol by volume;

permitting the mixture to stand for at least about two weeks;

filtering to obtain the liquid phase which constitutes said composition; and

combining each of said extracts to obtain said composition.

15. A composition obtained by the process of claim 14.

Description

INTRODUCTION

The present invention concerns novel compositions and their health and medical use. The present invention more particularly concerns a novel composition containing natural ingredients for use to treat a large variety of cancers.

BACKGROUND OF THE INVENTION

There are innumerable drugs which are used to combat a large variety of cancers. However, these drugs are made of individual or combinations of chemicals. While some are effective, many have side effects which prevent their long-term or recurrent use. In addition, there has been an increasing number of effective drugs which can no longer be used due to the resistance by the causative agent.

OBJECTIVES OF THE INVENTION

It is the objective of the present invention to provide a novel method of combatting cancers. It is a further objective of the present invention to provide novel pharmaceutical compositions containing no synthetic organic chemicals and having anti-cancer properties.

SUMMARY OF THE INVENTION

We have found a novel method of combatting cancer comprising ingesting and/or applying a composition prepared by extracting one or more plants selected from the group consisting of a Centaurea, Capsicum, Sambucus, Lobelia, Myrrh, Echinacea, Goldenseal, and myrtle. While extracts of one or more of these plants were found to be active against cancers immune to known anti-cancer agents, activity against cancer has also been found with the extension of specific binary and three-way mixtures of the above described plants as well as mixtures of all of the plants as will be detailed below.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows the cytotoxic effects of plant extracts on HCT-8 colon tumor cells.

FIG. 2 shows the cytotoxicity of plant extracts in different human tumor cells and normal fibroblast cells.

FIG. 3 shows the cytotoxicity of plant extracts in non-tumor CMH-F1 skin fibroblast cells.

FIG. 4 shows the cytotoxic effects of plants extracts in drug sensitive SW 1573 lung cancer cells.

FIG. 5 shows the cytotoxic effect of plant extracts in multi-drug resistant SW 1573-2R160 lung cancer cells.

FIG. 6 shows the in vitro effects of plant extracts on fresh tumor cells derived from individual patients.

The key to extracts is as follows;

G=Goldenseal

A=Centaurea

B=Capsicum

C=Sambucus

D=Lobelia

E=Myrrh

F=Echinacea

H=Myrtle

All of the figures have a y-axis printed on the upper left part of the figure, namely "Cell Growth (ABS)".

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Binary mixtures of Goldenseal, Myrtle, and Centaurea, when each plant is initially present in the proportion of 3:1 to 1:3 have found to be active. The plants in the referred three-way mixture are initially present in the following percentages by weight:

(a) 30% ;to 70% Goldenseal

(b) 20% to 40% Myrtle and

(c) 5% to 20% Centaurea.

Preferable initial percentages of this mixture are 35% to 65%; 25% to 35% and 7% to 15%, respectively.

The eight way mixture initially contains the following percentages by weight:

- (a) 3% to 5% Centaurea
- (b) 1.5% to 4% Capsicum
- (c) 1.5% to 3% Sambucus
- (d) 1.5% to 4% Lobelia
- (e) 20% to 40% Myrrh
- (f) 30% to 50% Echinacea
- (g) 15% to 25% Goldenseal
- (h) 3% to 5% Myrtle

Preferable initial percentages of this mixture are 2% to 3%, 2% to 2.5%, 2% to 3%; 25% to 35%; 35% to 45%; 18% to 22%; and 35% to 45% respectively.

While the plants or their mixtures may be extracted with any convenient solvent, preferred solvents are water or ethyl alcohol. The novel compositions are readily prepared by adding, for example water to the dry plant or mixture of plants in a suitable container in an amount equal to approximately four times the weight of the dry mixture, bringing to a boil, boiling for a short while and adding to the cooled water solution sufficient ethyl alcohol to result in an alcohol content of the diluted solution equal to 10% to 30% ethyl alcohol by volume. The thus obtained mixture was allowed to stand for two weeks, stirring occasionally. The resulting mixture was filtered twice and bottled.

When ethyl alcohol or a mixture of water and ethyl alcohol are used as extraction liquids, there is no need for the step of adding additional alcohol. The thus obtained tincture can be used by adding directly to liquids or other foods. Alternatively, the tincture may be evaporated to form a powder, which can be mixed with foods.

The composition of the present invention in the form of extracts of the individual plants or their mixtures have shown unusual and unexpected activity against cancer cells such as colon, leukemia, and the like. Such cells were cured in at least 3 to 7 samples, even at a dilution of 200 times.

The dosage required to obtain a satisfactory response depends on the circumstances. Generally a dose of 10 to 40 drops 4 to 6 times a day is required. A preferred dose for most cases is 15 to 30 drops, with 30 drops for adults and 15 drops for children up to age 12.

While the invention will now be described in connection with certain preferred embodiments in the following examples. It will be understood that it is not intended to limit the invention to these particular embodiments. On the contrary, it is intended to cover all alternatives, modifications and equivalents as may be included within the scope of the invention as defined by the appended claims.

EXPERIMENTAL--GENERAL

Test Substances

Plant Extracts were tested for cytotoxic effects in cultured cell lines. All examples were ethanol extracts of the plant leaves with a final alcohol concentration of 16-41% (vol/vol), mean of 24%. All plant extracts were supplied in dark glass bottles and stand at room temperature.

Cell Culture

The following human cancer cell lines were used: colon (HCT8, COLO201, SW 837); lung (SW1573, SW1573-2R160). The cells were obtained commercially from ATCC, except the SW 1573 lines were obtained from Dr. H. Joenie, Free University, Amsterdam, Holland. All cell lines were maintained in liquid nitrogen storage until use. When in use for cytotoxicity testing, cells were maintained in exponential growth in plastic flasks (Falcon) in RPM1-164 medium containing 10% fetal bovine serum. All cell culture media and reagents were obtained from JRH or GIBCO.

Other chemicals were from Sigma. Cell lines grew as adherent monolayers. The adherent cultures were passaged to new flasks and fresh medium after brief (Leyva, 1990) trypsinization. SW 1573-2R160 is a variant subline of SW 1573 that is known to over express *mdr-1* gene coding for P-glycoprotein-170, thus representing classical multi-drug resistance (MDR) Broxterman, 1989; Deuchars, 1989). This MDR cell line is over 100 times less sensitive to the anticancer drugs dextrorubicin, vincristine, and etoposide, when compared to the parent cell line SW 1573.

Two normal human skin fibroblast lines were used and maintained as with the tumor cell lines, except alpha-MEM medium was used for maintenance culture. CMH-F1 fibroblasts were originated in our laboratory and CCD 973 fibroblast line was obtained from ATCC.

Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity was determined by the MTT assay in multi-well plates (Pieters, 1988; Leyva, 1990). Cells were plated in 96-well microplates in RMPMI-1640 medium plus 10% fetal bovine serum supplement with antibiotics (penicillin, streptomycin, fungizone; not toxic to human cells). The number of cells plated varied for the different lines; in most cases 700-2000 cells per 100 μ l per well. Plated cells were then allowed to equilibrate overnight. Plant extracts were diluted in culture medium and 100 μ l added to cells. The highest concentration of plant extract tested was always 5% that resulted in an ethanol concentration of about 1%. Ethanol was tested alone and found to be 30% growth inhibitory at 1%, and not inhibitory at 0.5%. Plant extracts were usually tested at several 2-fold serial dilutes. After cells were incubated with and without added test substances for 3 days under standard culture conditions, the number of metabolically viable cells was determined by the MTT tetrazolium dye assay.

Briefly, the old medium was removed 200 μ l of fresh medium with 0.5 mg/ml MTT was added. Cells were then further incubated for 3 hr. The medium was removed and the blue black MTT formazan produced by metabolically active cells was dissolved with 150 μ l of dimethyl sulfoxide. Absorbance was determined at 550 nm using an ELISA plate reader (Cambridge instruments). Absorbance was plotted versus plant extract concentration (% vol/vol) to obtain dose-response curves. Cytotoxicity was measured as the IC_{sub}50, the concentration of plant extract or test agent that produces 50% decrease in the number viable cells (MTT absorbance) compared to untreated controls.

Fresh Tumor Specimens

Single-cell suspensions of tumor cells were obtained from surgical specimens of patients with cancer and examined for sensitivity to test substances, as reported elsewhere (Leyva, 1993). Briefly, tissue was minced and then broken apart enzymatically and mechanically. Viable tumor cells were plated at 50,000/well in 96-well plates. Otherwise, the cytotoxicity assay was the same as for cell lines. An alternative method for small numbers of tumor cells was to plate 5,000 cells in 6-well plate in 1 ml, 0.3% agar medium (semi-solid) with and without test agent. After 3 days incubation, MTT is added for overnight to stain viable cells.

The key to the labelled extracts in the following examples are as follows:

Label	Plant
A	Centaurea
B	Capsicum
C	Sambucus
D	Lobolia
E	Myrrh
F	Echinacea
G	Goldenseal
H	Myrtle

EXAMPLE 2

FIG. 2 summarizes data from 2-3 experiments for four different cell lines including CMH-F1 fibroblasts tested for sensitivity to the various plant extracts.

EXAMPLE 3

All plant extracts were tested in at least HCT 8 tumor cells and normal fibroblasts. Plant extracts E, F and G were also tested in all 4 cell lines including U138 and U87 gliomas. Plant extract G was much less toxic to CMH-F1 fibroblasts and U138 glioma. In other recent experimental chemotherapy studies, it was found that U138 glioma cells are highly resistant to the plant derived anticancer drug etoposide. Similar results were seen for plant extracts E and F. Although plant extract A was moderately cytotoxic to HCT 8, it was exceptionally inactive against fibroblasts. Further experiments were conducted with plant extracts A, F, G and H in 2 fibroblast cell lines.

FIG. 3 shows representative data for the two fibroblast lines; low sensitivities were observed for plant extracts A, F, G, and H. Plant extracts G and H were the most cytotoxic at IC_{sub}50's of 0.6 to 0.9%. Plant extracts A and F were several fold less active.

EXAMPLE 4

Plant extracts A-H were tested for cytotoxicity in SW 1573 and SW1573-2R160 to determine if the cytotoxic substances in these plant extracts are similar to those natural product drugs to which MDR tumor cells (2R160) are resistant. SW 1573 cells had a sensitivity profile for the different plant extracts similar to that of other tumor cells (FIG. 4). Plant extracts G and H were the most active at an IC₅₀ of 0.4%. The least active were plant extracts B and D at an IC₅₀ of 30%.

EXAMPLE 5

2R160 cells were less sensitive to the different plant extracts with IC₅₀ values 2-3 times higher (FIG. 5). Clearly, there was no evidence of drug resistance to the degree found for those natural product drugs including antibiotics, vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, and taxol. The plant extract substances tested do not appear to be subject to expulsion from cells by the transmembrane efflux pump (mdr-1 gene product).

EXAMPLE 6

FIG. 6 shows the cytotoxic effects of plant extracts in primary cultures of two ovarian tumors (93-64 and 94-19) and one brain tumor (94-25).

EXAMPLE 7

Cytotoxic effects were studied with regard to cell survival (absorbance) expressed as % of control. Plant extract G was cytotoxic at IC₅₀ of 0.5 to 1.2% plant extract, levels similar to those observed for tumor cell lines. Plant extracts A, F and H were not active at concentrations as high as 5% plant extract, in most cases. Plant extract H did have modest activity against the brain tumor.

While the ovarian tumors did show sensitivity to conventional anticancer drugs (doxorubicin cisplatin, cyclophosphamide), the brain tumor appeared to be multi-drug resistant.

EXAMPLE 8

In studies on A, G and H plant extracts it was found that their cytotoxic activities are not reversed by the presence of nucleosides and thus do not involve the syntheses of purine or pyrimidine precursors of RNA or DNA. Also, extract A, but not G or H, was more potent in cells with depletion of glutathione, a major detoxifying agent in all cells.

EXAMPLE 9

In a study of G and H it was demonstrated that both caused DNA damage as determined by a fluorescence procedure reported by Kanter and Schwarz (Mol. Pharmacol., 22;145-151, 1982). The effects were dose dependent after a 24-hour exposure period. Positive control used in these essays was etoposide. This can account for the cytotoxic as well cytostatic effect on tumor cells in vitro.

EXAMPLE 10

Finally, plant extract G has been fractionated by a C18 reverse phase column using a 20% to 80% methanol linear gradient (over 40 minutes). Four fractions were observed with cytotoxic activity (as determined against colon tumor cells). Three of these fractions were stable and were further tested against 3 different cell lines. Differential cytotoxicity was similar in fractions labeled X and Y, whereas fraction z was equally toxic to all 3 cell lines.

EXAMPLE 11

Fractionation of the individual extracts of A to H and further study of the individual fraction has demonstrated that these fractions were not the known cytotoxic agents such as Berberine, hydrastin, and Canadine.

EXAMPLE 12

A Limited clinical study of the extract of all eight plants in 30 patients (whose cancers did not respond to standard treatment such as chemotherapy, radiotherapy and the like) gave remissions in 8 patients (partial response). Three of those 8 had a complete remission and were not using any other form of therapy at the time of remission.



FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000091291



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

prodep III

Mais Educação