

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE
ASPALATHUS LINEARIS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE
LINHAGENS DE CARCINOMA CERVICAL E DE OVÁRIO.**

Tatiane Cristina Hauschild

Porto Alegre, junho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE
ASPALATHUS LINEARIS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE
LINHAGENS DE CARCINOMA CERVICAL E DE OVÁRIO.**

Tatiane Cristina Hauschild

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréia Buffon

Porto Alegre, junho de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Profª Andréia Buffon, por acreditar em mim, pela dedicação e excelente orientação;

À Profª Gilsane, pela enorme contribuição neste projeto;

Ao Camilo, em especial, por toda a ajuda, paciência, dedicação e amizade;

Ao Henrique, por toda a ajuda e disponibilidade;

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo;

Ao Guilherme pela compreensão, paciência e carinho;

Ao meu irmão, pelo companheirismo e apoio;

Aos meus colegas e amigos, por estarem presentes em todos os momentos.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é apresentado sob forma de artigo a ser submetido para publicação no *International Journal of Pharmacognosy*. As normas técnicas de instruções aos autores, encontram-se disponíveis em anexo.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE
ASPALATHUS LINEARIS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE
LINHAGENS DE CARCINOMA CERVICAL E DE OVÁRIO.**

T. HAUSCHILD¹, C. D'AMORE¹, H. BRIDI², GV. POSER², A. BUFFON^{1*}.

- 1- Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.
- 2- Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, Brasil.

✉ Autor correspondente: Andréia Buffon

Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Departamento de Análises Clínicas,

Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga 2752, bairro Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: + 55 51 33085276

E-mail: andreia.buffon@ufrgs.br

RESUMO:

Aspalathus linearis, popularmente conhecida como Rooibos, é utilizada na medicina tradicional na África do Sul para tratar uma variedade de doenças, e atualmente tem despertado interesse o estudo de suas atividades biológicas para o tratamento do câncer. Embora já tenham sido descritos efeitos relacionados à atividade antitumoral em modelos animais, são poucos os estudos que descrevem esta atividade *in vitro* em células tumorais humanas. Portanto, nosso objetivo foi avaliar o efeito dos extratos de *Aspalathus linearis* na viabilidade de linhagens celulares de carcinoma cervical (SiHa) e de ovário (OVACAR). Para avaliar o efeito de cada extrato na viabilidade celular foram utilizados dois métodos: o ensaio de dimetiltiazoldifenil brometo de tetrazolina (MTT) e a contagem celular realizada em câmara de newbauer pelo método de exclusão com azul de tripan. Os resultados demonstram que a viabilidade celular da linhagem OVACAR foi significativamente reduzida, após tratamento por 24h com as frações metanol, acetato de etila, diclorometano e os extratos aquoso e bruto. Também para a linhagem SiHa observamos uma redução significativa na viabilidade celular após tratamento com as frações metanol, diclorometano e extrato aquoso. Considerando, os resultados apresentados, verificamos que extratos de *Aspalathus linearis* apresentam importante atividade biológica em linhagens tumorais de câncer cervical e de ovário, principalmente reduzindo a viabilidade celular.

Palavras-chave: *Aspalathus linearis*; câncer cervical; câncer de ovário; chá Rooibos.

ABSTRACT

Aspalathus linearis, commonly known as Rooibos, is a medicinal plant used in traditional medicine in South Africa to treat a variety of diseases, and currently its biological activity for the treatment of cancer has aroused interest in many researches. Although there has been described effects relating anti-tumor activity in animal models, few studies have described the same activity *in vitro* in human tumor cells. Therefore, our objective was to evaluate the effect of *Aspalathus linearis* extracts on the viability of cervical carcinoma (SiHa) and ovarian (OVACAR) cell lines. Two methods were used to evaluate cell viability after extracts treatment: The dimethylthiazol diphenil tetrazolium bromide assay (MTT) and cell counting performed in newbauer chamber by exclusion with trypan blue method. Results demonstrate that viability was significantly reduced in OVACAR cells after treatment for 24h with methanol, ethyl acetate, dichloromethane fractions and aqueous and crude extracts. As for SiHa cells, we observed a significant reduction in viability after treatment with methanol, dichloromethane and aqueous extract. Considering the results presented, we find that *Aspalathus linearis* extracts have important biological activity in tumor cell lines of cervical and ovarian cancer, mainly decreasing cell viability.

Keywords: *Aspalathus linearis*; cervical cancer; ovarian cancer; Rooibos tea.

INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias ginecológicas, as que envolvem o ovário e o colo do útero, são bastante prevalentes e apresentam altas taxas de mortalidade¹. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, em 2014 a previsão era que cerca de 5.680 a 15.590 novos casos de cânceres ovarianos e cervicais fossem diagnosticados no Brasil, respectivamente².

O câncer do colo do útero possui a terceira maior incidência e a quarta maior taxa de mortalidade entre a população feminina em todo o mundo³. Dentre os tumores do colo do útero, os mais prevalentes são os de origem escamosa, segundo a classificação histológica⁴. O principal fator de risco para o seu desenvolvimento é a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), sendo os tipos de HPV de alto risco 16 e 18 os mais frequentes nos casos de câncer cervical^{5, 6}. Entretanto, quando diagnosticado precocemente, através do exame de Papanicolaou, estas neoplasias são curadas na quase totalidade dos casos⁷. Com relação ao tratamento, a radioterapia e a quimioterapia, à base de platina, são utilizadas atualmente como terapia padrão⁸.

O câncer de ovário é uma neoplasia ginecológica de difícil diagnóstico e de menor chance de cura, podendo se tornar um tumor maligno altamente letal, com prevalência para os carcinomas epiteliais². O padrão de tratamento para pacientes em estágio avançado é a cirurgia, seguida por quimioterapia à base de platina. Carboplatina / paclitaxel é o padrão atual de tratamento de primeira escolha⁹. Apesar de a resposta inicial causar uma remissão em 80 a 90% dos pacientes, boa parte destes irão desenvolver recorrência¹⁰. Contudo, estas intervenções terapêuticas envolvendo os quimioterápicos, por vezes, apresentam uma eficácia terapêutica muito baixa, necessitando de novas estratégias¹¹.

A busca por novos tratamentos antitumorais está em desenvolvimento constante devido à complexidade da biologia tumoral. Entre os vários tratamentos para o câncer, a medicina complementar alternativa é muito utilizada na maioria das sociedades¹². Neste sentido, os efeitos anticancerígenos de chás, como por exemplo, o chá verde (*Camellia sinensis*), já foram documentados em um estudo epidemiológico realizado no Japão, onde estes produtos apresentam um alto índice de consumo¹³. Além disso, também há relatos sobre a atividade anticancerígena de *Salvia officinalis*¹⁴, e de extratos aquosos do chá de ervas de *Cyclopia intermedia*¹⁵. Desta forma, muitos estudos promissores, com grande potencial terapêutico, vêm despertando interesse nas propriedades de componentes de ervas medicinais como, por exemplo, o chá de ervas *Aspalathus linearis*¹⁵.

Aspalathus linearis (Família Fabaceae), popularmente conhecida como Rooibos, é um arbusto leguminoso, de distribuição muito limitada, endêmica das regiões montanhosas de Cedarberg na África do Sul e têm sido tradicionalmente utilizado como uma bebida pelo povo Khoi desde 1772¹⁷. A infusão de *Aspalathus linearis*, embora comumente chamada de chá, é, na realidade, uma infusão de ervas (tisana) que tem origem nas folhas e caules da planta¹⁸, sendo tradicionalmente prescrita para tensão nervosa, alergias e problemas digestivos¹⁷. Os principais constituintes do chá de *Aspalathus linearis* são a aspalatina e a notofagina, di-hidrochalconas C-glicosiladas, sendo a aspalatina exclusiva desta planta¹⁸. A presença de outros componentes também

foi relatada, tais como orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, luteolina, crisoeriol, quercetina, isoquercetina e rutina¹⁹. Outros compostos fenólicos como ácido caféico, ácido ferúlico, ácido vanílico e ácido *p*-cumárico estão também presentes no vegetal²⁰. Além disso, sua composição apresenta um baixo teor de tanino e ausência de cafeína²¹.

Muitos estudos têm demonstrado atividades biológicas atribuídas aos extratos de *Aspalathus linearis*, entre elas, efeito anti-inflamatório²², anti-hiperlipidêmico²³, hipoglicemiante²⁴, antioxidante²⁵ e antitumoral/antimutagênico^{15, 26}. Uma importante atividade antioxidante tem sido descrita, baseada nas propriedades de citoproteção dos flavonóides contra a ação dos radicais livres, envolvidos no estresse oxidativo²⁷. Por esta planta ser utilizada popularmente com várias finalidades terapêuticas, e baseado em estudos anteriores que demonstraram promissores efeitos citotóxicos frente a linhagens tumorais, este trabalho tem por objetivo avaliar a citotoxicidade provocada por extratos e frações obtidas de *Aspalathus linearis* em linhagens de carcinoma cervical (SiHa) e de ovário (OVACAR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

O chá de ervas *Aspalathus linearis*, constituído de folhas e caules fermentados, foi adquirido comercialmente da empresa The Big Five Rooibos Company (Pty) Ltd.

Preparação do extrato vegetal

O material vegetal seco (25 g) foi macerado sucessivamente utilizando solventes com polaridade crescente hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (relação planta: solvente 1:10) até o esgotamento. As frações foram então filtradas e o solvente evaporado até a secura em evaporador a vácuo a 45°C, após armazenados a 4 °C. Além da extração sucessiva de solventes, foram preparados extrato bruto com metanol e infusão por 20 minutos (5g; relação planta: solvente 1:10). Da mesma forma que as frações anteriores, os solventes foram evaporados até à secura em evaporador a vácuo, e armazenados a 4°C.

Cultura de células

As linhagens de carcinoma cervical (SiHa) e de carcinoma de ovário (OVACAR) foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura em meio de cultivo com DMEM para a SiHa e RPMI para a OVACAR com baixo teor de glicose suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT. As células da linhagem SiHa foram semeadas em placas de 96 poços (10.000 células/poço) cultivadas por 48h, enquanto que para a linhagem OVACAR foram semeadas 7.000 células/poço e cultivadas por 72h. Os extratos foram preparados a partir de uma solução mãe de 10 mg/mL em 100% de dimetil sulfóxido (DMSO), realizando diluições necessárias para chegar as concentrações desejadas a no máximo 1% de DMSO. As linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos seis extratos (acetato de etila a 1, 20, 40, 60 e 80 µg/mL e demais extratos a 1, 25, 50, 75 e 100 µg/mL) e incubadas por 24 h a 37°C. Após o tratamento, as células foram incubadas durante 3 h a 37°C em solução de MTT (0,5 mg/mL). Os cristais de formazana formados foram dissolvidos com DMSO e quantificados em leitor de placas (Spectramax M2 da Molecular Devices) a 570 e 630 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade em relação ao controle (100% de viabilidade celular), tratadas apenas com meio de cultivo DMEM para o extrato aquoso, e com DMSO 1% para o extrato bruto e as demais frações testada.. As médias foram obtidas em triplicatas.

Contagem celular

A contagem foi realizada em câmara de newbauer pelo método de exclusão com azul de tripan. Os tratamentos foram realizados da mesma forma como descrito para o ensaio com MTT. Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade em relação ao controle (100% de viabilidade celular), tratadas apenas com meio de cultivo DMEM para o extrato aquoso, e com DMSO 1% para o extrato bruto e as demais frações testada. As médias foram obtidas em triplicatas.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, e a significância estatística foi determinada usando análise de uma via de variância (ANOVA, $p < 0,05$), seguida pelo teste de Dunnett, para comparação de cada tratamento com o controle.

RESULTADOS

Extrato vegetal

Após a extração sequencial com diferentes solvente de polaridade crescente os rendimentos foram de 0,85% para a fração hexano, 0,37% para a fração diclorometano, 0,31% para a fração acetato de etila e apresentando os maiores rendimentos, 19,37% para a fração metanol, 19,88% para o extrato bruto e 21% para o extrato aquoso.

Viabilidade celular

Os resultados demonstraram que as frações diclorometano, acetato de etila e metanol apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular da linhagem OVACAR a partir das concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ (80,08%), 40 $\mu\text{g/mL}$ (83,45%) e 25 $\mu\text{g/mL}$ (79,95%) pela contagem, respectivamente (Fig.1). Além disso, os extratos bruto e aquoso também apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular, mas em concentrações maiores, de 100 $\mu\text{g/mL}$ (65,65%) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (89,05%), respectivamente. Entretanto, a fração hexano não demonstrou diferença significativa em nenhuma de suas concentrações estudadas. Estes resultados foram analisados pelo método exclusão com tripan blue e MTT e sugerem que a fração metanol tem capacidade mais promissora frente aos outras frações e extratos.

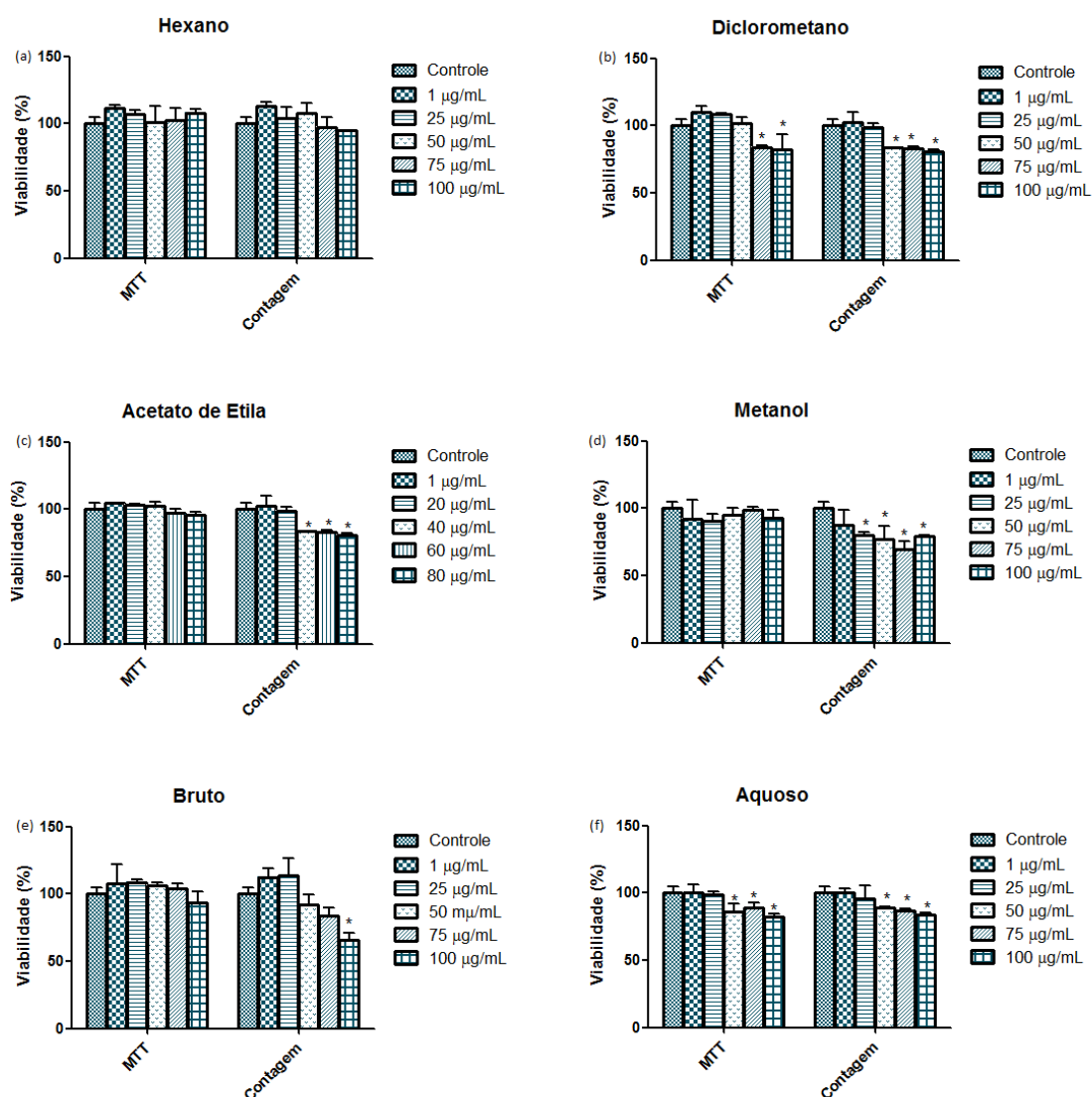


Fig.1. Viabilidade celular da linhagem OVACAR após tratamento com concentrações crescentes de *Aspalathus linearis*, em diferentes frações e extratos, durante 24h. (a) Hexano, (b) Diclorometano, (c) Acetato de Etila, (d) Metanol, (e) Bruto, (f) Aquoso. Os valores representam média e desvio padrão de seis determinações, em relação ao controle, sendo os valores $P < 0.05$, considerados estatisticamente significativos.

Foi avaliado também o efeito dos extratos de *Aspalathus linearis* na linhagem SiHa, com as mesmas frações e concentrações estudadas para a linhagem OVACAR. Os resultados indicaram uma diminuição significativa na viabilidade celular para as frações diclorometano e metanol nas concentrações de 100 µg/mL (79,4%) e a partir de 75 µg/mL (90%), respectivamente, e no extrato aquoso, a partir da concentração de 75 µg/mL (74,03%), sendo os demais extratos e frações testadas, inativos para esta linhagem nas concentrações testadas (Fig.2). A redução da viabilidade celular, assim como observado para a linhagem OVACAR, também foi mais pronunciada para a linhagem SiHa, nos experimentos de contagem celular e não pela metodologia com MTT. Além disso, observamos que em concentrações menores, as frações metanol e extrato bruto, apresentaram um efeito significativo na proliferação das células tumorais da linhagem SiHa, que deve ser melhor investigado em estudos posteriores.

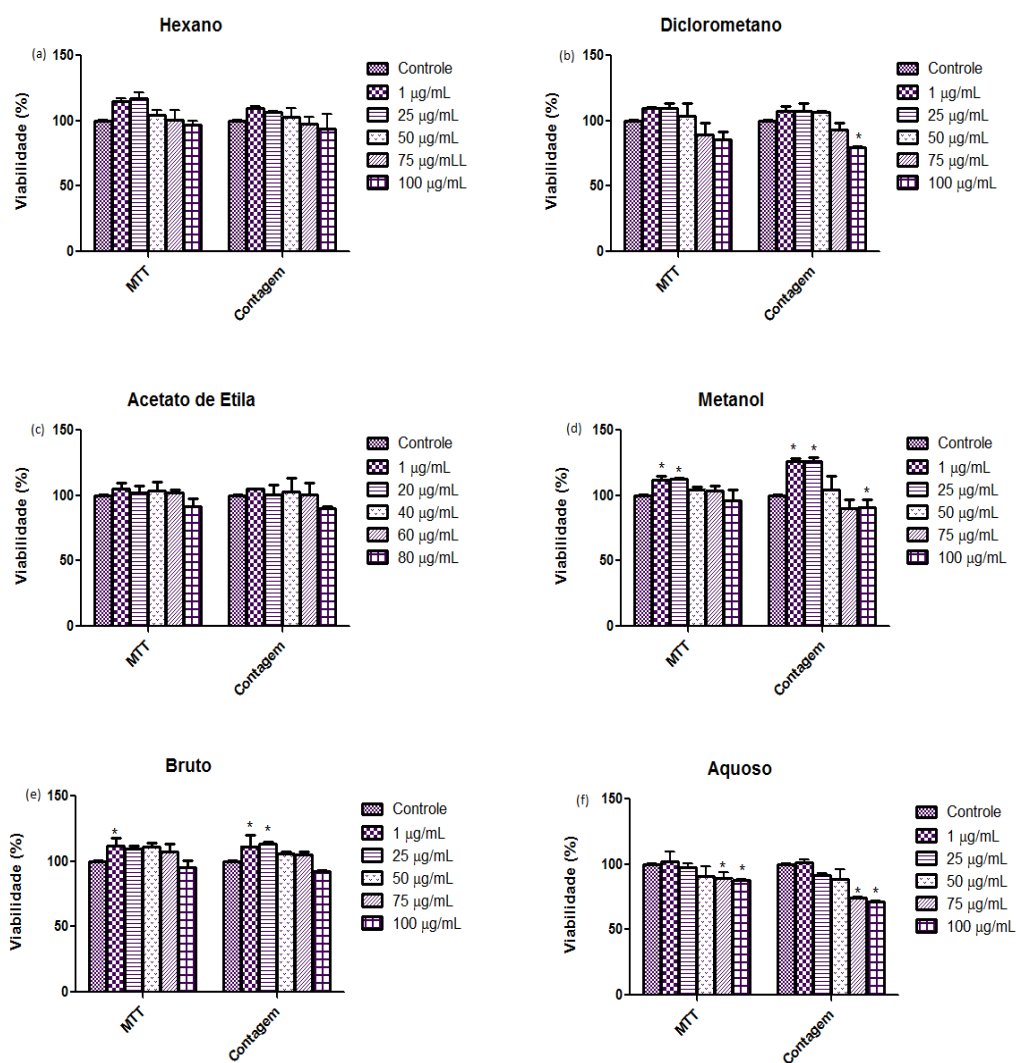


Fig.1. Viabilidade celular da linhagem SiHa tratadas com concentrações crescentes de *Aspalathus linearis*, em diferentes frações e extratos, durante 24 h. (a) Hexano, (b) Diclorometano, (c) Acetato de Etila, (d) Metanol, (e) Bruto, (f) Aquoso. Os valores representam média e desvio padrão de seis determinações, em relação ao controle, representa valores $P < 0.05$, considerados estatisticamente significativos em relação ao controle.

DISCUSSÃO

Dois tipos de chás de ervas de *Aspalathus linearis* estão disponíveis comercialmente, o tipo fermentado e o não fermentado. Tradicionalmente, o chá de ervas é produzido por um processo de fermentação, onde ocorre um processo de oxidação dos constituintes, conferindo uma coloração marrom-avermelhada ao produto. Por outro lado, o não fermentado é caracterizado por não passar por esse processo de oxidação¹⁸. Neste vegetal ocorrem predominantemente constituintes polares da classe dos compostos fenólicos. No processo de obtenção da planta fermentada, como o que foi utilizado no presente trabalho, ocorre o processo de oxidação dos componentes, e conseqüentemente um aumento dos seus análogos flavonas, proporcionando um predomínio de compostos polares^{28, 29}. Além disso, a aspalatina um dos compostos majoritários do chá de ervas não fermentado continua presente em concentrações elevadas após o processo de oxidação¹⁸. Como mostrado em estudos anteriores, este chá fermentado apresenta aspalatina, rutina e a orientina como compostos majoritários, seguido por isoorientina, isoquercitina e luteolina²⁰. Neste sentido, os resultados obtidos neste estudo, durante o processo de extração, reforçam os relatos de que compostos polares são os mais abundantes neste vegetal uma vez que o maior rendimento foi obtido na fração metanólica e nos extratos bruto e aquoso.

Uma estratégia utilizada para combater o câncer faz uso da quimioprevenção, e até então esse é foco dos trabalhos encontrados na literatura. Sabe-se que a utilização de substâncias químicas ou suas misturas de ocorrência natural podem prevenir ou até mesmo reverter a carcinogênese³⁰. Os compostos polifenólicos presentes nos chás de ervas de *Aspalathus linearis* podem apresentar componentes importantes para a quimioprevenção, e diversos estudos já demonstram ações biológicas, como atividade antioxidante em câncer de colo de útero³¹, antimutagênica em câncer de ovário³² e anti-inflamatória³³. Um exemplo disso são estudos onde se observa um aumento significativo na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase com o aumento da concentração do extrato aquoso em linhagens de câncer cervical HeLa³⁴.

Até o presente momento, são poucos os estudos que demonstram atividades antiproliferativas dos extratos de *Aspalathus linearis*. Entretanto, essa atividade já foi caracterizada em linhagens de neuroblastoma, obtendo $LC50 > 5.0$ mg/ml em extrato etanólico³⁵. Também existem estudos relatando a capacidade dos extratos em reduzir a viabilidade celular e a proliferação em linhagens de câncer esofágico³³. Entretanto, ainda não existem relatos na literatura descrevendo efeitos antitumorais de extratos de *Aspalathus linearis* em linhagens celulares de tumores femininos, como OVACAR e SiHa. Neste estudo, portanto, foi avaliado o efeito dos extratos de *Aspalathus linearis*

na viabilidade celular destas linhagens. Uma redução na viabilidade celular foi observada de forma mais sensível na linhagem OVACAR. Resultados similares, porém em concentrações mais baixas, foram observados em linhagem de câncer de mama (MCF10A), onde foi relatada uma atividade inibitória da viabilidade celular após tratamento com o extrato metanólico de *Aspalathus linearis*³⁶. Além disso, também foi observado em nosso estudo uma redução significativa na viabilidade das linhagens tumorais estudadas após tratamento com as frações diclorometano, acetato de etila e o extrato aquoso. O extrato aquoso, como demonstrado em estudos anteriores, apresenta níveis de flavonóides elevados quando comparado com as demais frações, assim como encontrado na extração metanólica¹⁹. Estes achados sugerem que estas frações podem ser importantes para caracterização de efeitos biológicos relacionados à atividade antitumoral.

Na linhagem SiHa, observamos a mesma relação com extratos polares, entretanto, com efeito não tão pronunciado quanto os encontrados após tratamento dos extratos na linhagem OVACAR. Isto sugere que as células tumorais de diferentes origens, após exposição aos constituintes polifenólicos, apresentam sensibilidade diferente aos extratos testados. Além disso, outro resultado a ser melhor investigado, que foi encontrado em nosso estudo, foi um aumento da proliferação celular com doses baixas das frações metanol e extrato bruto, após tratamento da linhagem SiHa.

Diversos compostos, ou associações deles, podem ser responsáveis pelos efeitos encontrados no nosso estudo. Dentre eles, a luteolina é descrita como sendo um flavonóide majoritário de *Aspalathus linearis*, presente tanto em extrato aquoso³⁷, quanto em extrato metanólico³⁸. Atividades de proteção contra o câncer, indução de apoptose em linhagens tumorais e inibição da angiogênese já foram descritas para esse flavonóide³⁷. Outros compostos presentes no extrato aquoso apresentam atividade antineoplásica, como a isoorientina, sendo citotóxica em células tumorais de fígado, mama e cólon³⁹ e a rutina, com uma ação significativa contra o câncer de mama⁴⁰. Também crisoeriol, que desempenha um importante papel na regulação negativa do crescimento celular, altera a proliferação e metabolismo em células de mieloma⁴¹. Além dos compostos já citados, a orientina, um dos compostos majoritários da fração metanólica, fração responsável por apresentar resultados mais promissores em relação as outras estudadas, já tem sido descrita com atividade contra câncer de próstata³⁸. Porém, não se sabe até o momento se interações sinérgicas ocorrem e em que medida ela pode afetar a atividade antimutagênica. E por isso acreditamos fortemente que esses compostos podem ser responsáveis pela atividade citotóxica observada no nosso estudo.

A contribuição relativa dos diferentes flavonóides na promoção da atividade anticancerígena, propriedade dos chás de ervas, não está totalmente esclarecida até o presente momento. Porém, os polifenóis são conhecidos por apresentar atividade antioxidante como já citado, modulam o destino metabólico de carcinógenos e alteram certos eventos associados à transdução de sinais celulares⁴². Estudos devem ser realizados para elucidar os eventos biológicos envolvidos e se concentrações maiores terão atividades mais promissoras nestas linhagens celulares.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, verificamos que extratos de *Aspalathus linearis* apresentam atividade biológica em linhagens tumorais de câncer cervical e de ovário, promovendo uma diminuição na viabilidade celular. No entanto, estes resultados devem ser aprofundados para elucidação dos mecanismos envolvidos bem como otimização das concentrações a serem utilizadas.

REFERÊNCIAS

1. Eskander RN, Tewari KS: American Society of Clinical Oncology 2013: Summary of Scientific Advancements in Gynecologic Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24(1):13-18.
2. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer 2014. Em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> acessado em 02 de abril de 2015
3. Ahmedin Jemal DVM, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2):69-90.
4. Becker EJr, Edelwein MI, Nonnenmacher B, Bozzetti MC: Prevalence and epidemiologic correlates of atypical squamous cells of undetermined in women at low risk for cervical cancer. *Diagnostic Cytopathologic* 2001; 24(4): 276-282.
5. Smith JS, Lindsay L, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM: Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International Journal of cancer* 2007; 121(3): 621-632.
6. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Sijders PJF, Clifford GM: Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International Journal of Cancer* 2011; 128(4): 927-935.
7. Adams AK, Wise-Draper TM, Wells SI: Human Papillomavirus Induced Transformation in Cervical and Head Neck Cancers. *Cancers* 2014; 6(3):1793-1820.
8. Rose PG, Sill MG, McMeekin DS, Ahmed A, Salani R, Yamada SD, et al: A phase I study of chemotherapy with whole pelvic radiation therapy in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 125(1):158-162.
9. Du Bois A, Pfisterer J: Future options for first-line therapy of advanced ovarian cancer. *Int J of Gynecol Cancer* 2005; 15(Suppl 1):42-50.
10. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ: Complete Cytoreductive Surgery Is Feasible and Maximizes Survival in Patients with Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Prospective Study. *Gynecol Oncol* 1998; 69:103-108.
11. Raja FA, Chopra N, Ledermann JA: Optimal first-line treatment in ovarian cancer. *Annals of Oncology* 2012; 23(Suppl 10):118-127.
12. Balneaves LG, Weeks L, Seely D: Patient decision-making about complementary and alternative medicine in cancer management: context and process. *Current Oncology* 2008; 15(Suppl 2):S94-S100.

13. Oguni I, Nasu K, Yamamoto S, Nomura T: On the Antitumor Activity of Fresh Green Tea Leaf. *Agric Biol Chem* 1988; 52(7):1879-1880.
14. Shahneh FZ, Valiyari S, Bardaran B, Abdolalizadeh J, Bandehagh A, Azadmehr A, et al: Inhibitory and Cytotoxic Activities of *Salvia Officinalis* L. Extract on Human Lymphoma and Leukemia Cells by Induction of Apoptosis. *Adv Pharm Bull* 2013; 3(1):51-55.
15. Marnewick JL, Gelderblom WCA, Joubert E: An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutation Research* 2000; 471(1-2):157-166.
16. Morton JF: Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage. *Econ Bot* 1983; 37(2):164-173.
17. Joubert E: HPLC quantification of the dihydrochalcone, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as effected by processing. *Food Chemistry* 1996; 55(4):403-411.
18. Bramati L, Minoggio M, Gardana C, Simonetti P, Mauri P, Pietta P: Quantitative Characterization of Flavonoid Compounds in Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *J Agric Food Chem* 2002; 50(20):5513-5519.
19. Rabe C, Steenkamp JA, Joubert E, Burger JFW, Ferreira D: Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* 1994; 35(6):1559-1565.
20. McKay DL, Blumberg JB: A review of South African herbal teas: rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopiaintermedia*). *Phytotherapy Res* 2007; 21(1):1-16.
21. Baba H, Ohtsuka Y, Haruna H, Lee T, Nagata S, Maeda M, et al: Studies of anti-inflammatory effects of Rooibos tea in rats. *Pediatrics International* 2009; 51(5):700-704.
22. Beltrán-Debón R, Rull A, Rodríguez-Sanabria F, Iswaldi I, Herranz-López M, Aragonès G, et al: Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in hyperlipidemic mice. *Phytomedicine* 2011; 18(5):414-424.
23. Muller CJF, Joubert E, De Beer D, Sanderson M, Malherbe CJ, Fey SJ: Acute assessment of an aspalathin-enriched green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract with hypoglycemic potential. *Phytomedicine* 2012; 20(1):32-39.
24. Yoo KM, Lee CH, Lee H, Moon B, Lee CY: Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry* 2008; 106(3):929-936.

25. Marnewick J, Joubert E, Joseph S, Swanevelder S, Swart P, Gelderblom W: Inhibition of tumor promotion in mouse skin by extracts of rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush(*Cyclopia intermedia*), unique South African herbal teas. *Cancer Letters* 2005; 224(2):193-202.
26. Barreira JCM, Morais AL, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP: Insights on the Formulation of Herbal Beverages with Medicinal Claims Accordin with Their Antioxidante. *Molecules* 2013; 18(3):2851-2863.
27. Krafczyk N, Glomb MA: Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. *J Agric Food Chem* 2008; 56:3368-3376.
28. Marais C, Rensburg WJ, Ferreira D, Steenkamp JA: (S)-and(R)-Eriodictyol-6-C-b-D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* 2000; 55:43-49.
30. Surh YJ: Cancer chemopreventive with dietary phitomechemicals. *Nature Reviws Cancer* 2003; 3:768-780.
31. Lillehei KO, Kong Q: Antioxidant inhibitor for câncer therapy. *Medical Hypotheses* 1998; 51:405-409.
32. Sasaki Y, Yamada H, Shimoi K, Kator K, Kinea N: The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-lei tea and Rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutation Research* 1993; 286:221-232.
33. Joubert E, Gelderblom WC, Louw A, De Beer D: South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia spp.* And *Athrixia phyllicoides* – a review. *J Ethnopharmacol* 2008; 119(3):376-412.
34. Waisundara VY, Hoon LY: Free radical scavenging ability of *Aspalathus linearis* in two *in vitro* models of diabetes and cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2004; 30:1-5.
35. Mazzio EA, Soliman KFA: *In vitro* Screening for the Tumoricidal Properties of International Medicinal Herbs. *Phytother Res* 2009; 23(3):385-398.
36. Na HK, Mossanda KS, Lee JY, Surh YJ: Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by some edible African plants. *BioFactors* 2004; 21:149-153.
37. Lopez-Lazaro M; Distribution and Biological Activities of the FlavonoidLuteolin. *Medicinal Chemistry* 2009; 9:31-59.
38. Nagaprashantha LD, Vantsyayan R, Singhal J, Fast S, Roby R, Awasthi S, et al: Anti-Cancer effects of novel flavonoid vicent-2 as a single agent in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochemical Pharmacology* 2011, 82(9):1100-1109.

39. Mohammed RS, Abou Zeid AH, EI Hawary SS, Slemm AA, Ashour WE: Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. Saudi Journal of Biological Sciences 2014; 21:547-553.
40. Perk AA, Shatynska-Mytsyk I, Gerçek YC, Boztas K, Yazyan M, Fayyaz S, et al: Rutin mediated targeting of signalin machinery in cancer cells. Cancer Cell Int 2014; 14:1-5.
41. Yang Y, Zhou X, Xiao M, Hong Z, Gong Q, Jiang L, et al: Discovery of chrysoeriol, a PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitor with potent antitumor activity against human multiple myeloma cells invitro. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2010; 30(6):734-740.
42. Roy M, Siddiqi M, Dattacharya RK: Cancer Chemoprevention: Tea Polyphenol Induced Cellular and Molecular Responses. Asian Pacific J Cancer Prev 2001; 2:109-116.

ANEXO

International Journal of Pharmacognosy (IJP)

The **International Journal of Pharmacognosy** (www.ijpjournal.com) is a monthly published online Journal, which publishes innovative research papers, reviews, mini-reviews, short communications and notes dealing with Pharmaceutical Sciences (Pharmaceutical Technology, Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Computational Chemistry and Molecular Drug Design, Pharmacognosy and Phytochemistry, Pharmacology, Pharmaceutical Analysis, Pharmacy Practice, Clinical and Hospital Pharmacy, Cell Biology, Genomics and Proteomics, Pharmacogenomics, Bioinformatics and Biotechnology of Pharmaceutical Interest). All manuscripts are subject to rapid peer review. Those of high quality (**not previously published and not under consideration for publication in another journal**) will be published without delay.

Manuscript Format

The preferred format of all manuscript is MS Word. Illustrations (figures) and images must be inserted in the manuscript at the position they should appear when published.

Preparation of Manuscript

Mode of Presenting Paper is English. Each manuscript should be typed single-spaced on A4 (8.5" × 11") paper size with 1 inch margins. It should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgement and References.

Title Page

Title page should contain title of the paper in bold face, title case (font size 14), names of the authors in normal face, upper case (font size 12) followed by the address in normal face lower case. The author to whom all correspondence be addressed should be denoted by an asterisk mark. The title should be as short as possible and precisely indicate the nature of the work in the communication. Names of the authors should appear as initials followed by surnames. At the bottom left corner of the title page, please mention “*Address For correspondence” and provide a functional e-mail address. Address of the corresponding author to whom all correspondence may be sent should be given only if it is different from the address already given under authors' names.

Abstract

Should start on a new page after the title page and should be typed in single-space to distinguish it from the Introduction. Abstracts should briefly reflect all aspects of the study, as most databases list mainly abstracts. The manuscript should have an abstract 150- 250 words.

Keywords

Provide four to six appropriate key words after abstract

Introduction

A short introduction of the research problem followed by a brief review of literature and objective of the research.

Materials and Methods

Describe the materials used in the experiment, year of experimentation, site etc. Describe the methods implied for collection of data in short.

Results and Discussion

This segment should focus on the fulfilment of stated objectives as given in the introduction. It should contain the findings presented in the form of tables, figures and photographs.

References

Should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text (not in alphabetic order). Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals in superscript. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure.

Journal Articles

Shashi A, Jain SK and Pandey M: In-vitro evaluation of antilthiatic activity of seeds of *Dolichos biflorus* and roots of *Asparagus racemosus* . International Journal of Plant Sciences 2008; 1:67- 71.

A Book

Kalia AN: A Text Book of Industrial Pharmacognosy. CBS Publishers & Distributors, First Edition 2005.

A Chapter in a Book

Nadkarni KM: Indian Materia Medica. Popular Prakashan, Mumbai, Edition 3, Vol. I, 2000: 242-246.

Illustrations

All the tables and figures should be in the text at suitable place. Only MS word table format should be used for preparing tables. Tables should show lines separating rows but not those separating columns. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals and bear a brief title in capital letters normal face. Tables should not be very large that they run more than one A4 sized page. Table format should be as follow:

Phytochemical Analysis of successive extract of.....

Chemical Constituent	Aqueous Extract	Ethanollic Extract

Abbreviations, Units Etc

The journal strictly follows the rules defined in the IUPAC Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units.

Short Communication

The journal publishes exciting findings, preliminary data or studies that did not yield enough information to make a full paper as short communications. These have the same format requirements as full papers but are only up to 10 pages in length in total. Short Communications should not have subtitles such as Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion all these have to be merged into the running text. Short Communications preferably should have only 3-4 illustrations.

Review Article

Should be about 15-30 pages long, contain up-to-date information, comprehensively cover relevant literature and preferably be written by scientists who have in-depth knowledge on the topic. All format requirements are same as those applicable to full papers.

Submission of Manuscript

All manuscripts (must be in English and in MS Word format) and should be submitted via our online system or through e-mail at editor@ijpjournal.com / ijpjournalonline@gmail.com as an attachment for quick evaluation.

Copyright and Permission

Submission is a representation that the manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. Authors would be required to sign a form (to be supplied by the Editor) transferring copyright before the manuscript can be published.

Ethical matter

Authors publishing results from in vivo experiments involving animals or humans should state whether due permission for conduction of these experiments was obtained, from the relevant ethics committees, in the Materials and Methods section. In addition, authors wishing to publish research work involving human studies should also send a notary verified letter of approval from the Ethics Committee or the Institutional Review Board.

Authors are requested to send their research articles strictly according to the given format mentioned in the guidelines to the authors