



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jurandy do Nascimento Silva

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE PLANTAS
DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO COM POTENCIAL PARA
DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

Teresina – Piauí

2015

Jurandy do Nascimento Silva

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE PLANTAS
DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO COM POTENCIAL PARA
DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Teresina – Piauí

2015

Jurandy do Nascimento Silva

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE PLANTAS
DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO COM POTENCIAL PARA
DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Orientador)
Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

Profa. Dra. Antônia Maria Das Graças Lopes Citó (Examinador interno)
Departamento de Química – UFPI

Profa. Dra. Mariana Helena Chaves (Examinador externo)
Departamento de Química – UFPI

Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira (Examinador externo)
Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Aos meus pais, **Maria de Jesus** e **José Luiz**, por sempre acreditarem no meu sucesso e terem me dado como herança, um dos bens mais valiosos, o estudo.

A minha esposa e amiga **Daniella**, pelo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu filho **João Victor** razão de viver, pela ausência em muitos momentos de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus **pais, esposa, irmã, filho e demais familiares**, por todos seus incentivos, apoio e compresença das ausências muitas vezes sentidas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, agradeço pelo incentivo, disponibilidade e confiança em mim depositada. Suas sugestões e conhecimentos compartilhados foram inestimáveis na elaboração desse trabalho;

As Professoras **Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Dra. Mariana Helena Chaves** e seus alunos, pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho com a cessão das amostras vegetais;

A mestranda em química **Bruna Nery** pelos constantes auxílios e trocas de informações;

Ao **Prof. Dr. Alessandro de Lima** pelo constante incentivo, e por ter proporcionado inestimável apoio na realização dos ensaios antioxidantes iniciais;

A **Profa. Msc. futura Dra. Edna Chaves**, pelas dicas e palavras de apoio para concretização de algumas ideias e esclarecimentos botânicos muitas vezes solicitados;

A **Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa (UFC)** pela disponibilidade na ajuda das análises antiproliferativas;

Ao **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**, pelo seu empenho frente ao Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), cuja estrutura foi fundamental para a realização deste estudo;

A **todos** os meus colegas de pós-graduação por todo companheirismo e horas compartilhadas “essa questão não tem resultado, só pode tá errada, alguém fez?????.....”;

Aos amigos **George Laylson** “issooooo...., exatamente...., vai dar certo....” e **Oscar Almeida** “te mando já...., pera...., se preocupe não....” pela enorme ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade verdadeira desde o início desta caminhada;

As irmãs **Kátia Machado** “que?..... ham? ainda não fiii?” e **Keylla Machado** “como tá a dissertação?..... tá com dificuldade em que?..... é assim mesmo fiii”, #adoroelas;

À aluna de iniciação científica, futura bióloga e pesquisadora **Maytê Madeira** pela amizade, dedicação e grande auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para examinarem esta dissertação de mestrado;

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI pelo apoio e incentivo;

A todos os funcionários que prestam serviços no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI, pelas descontrações e constante auxílio;

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho;

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional;

E, principalmente, a **Deus** pelo dom da Vida, que com seus desafios e mistérios nos convida sempre ao aprendizado, a superação e ao aprimoramento.

A todos, meus sinceros agradecimentos !!!!

"Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte as amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra."

Mark Twain

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	17
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
REFERÊNCIAS	26
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 Atividade antitumoral de produtos oriundos de plantas do semiárido brasileiro: uma revisão medicinal	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
3.1 INTRODUÇÃO	34
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.3 RESULTADOS	39
3.4 DISCUSSÃO	40
3.5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	52
4 Triagem antioxidante e toxicológica de plantas do semiárido brasileiro	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
4.1 INTRODUÇÃO	62
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.2.1 Obtenção das amostras vegetais	65
4.2.2 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	69
4.2.3 Avaliação da toxicidade aguda	73
4.3 RESULTADOS	74
4.3.1 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	74
4.3.2 Avaliação da toxicidade aguda	77
4.4 DISCUSSÃO	79
4.4.1 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	79
4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda	81
4.5 CONCLUSÃO	82

REFERÊNCIAS	83
5 Citotoxicidade, quimioprevenção e perfil fitoquímico de extratos vegetais do semiárido brasileiro	89
RESUMO	90
ABSTRACT	91
5.1 INTRODUÇÃO	92
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	94
5.2.1 Obtenção das amostras vegetais	94
5.2.2 Atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais.....	99
5.2.3 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos	101
5.2.4 Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade usando o teste (<i>Allium cepa</i> Linn.).....	102
5.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	104
5.2.6 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	105
5.2.6.1 Peroxidação lipídica por meio da determinação de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	105
5.2.6.2 Remoção de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$).....	106
5.2.6.3 Remoção de radicais nitrito ($\text{NO}_2\cdot$)	107
5.2.7 Análise espectrométrica – UV-Vis.....	108
5.2.8 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).....	108
5.3 RESULTADOS	109
5.3.1 Atividade citotóxica (MTT).....	109
5.3.2 Atividade hemolítica	114
5.3.3 Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade (em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>)	115
5.3.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	119
5.3.4 Análise espectrométrica UV-VIS	122
5.3.5 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).....	124
5.4 DISCUSSÃO	125
5.4.1 Citotoxicidade contra células tumorais e atividade hemolítica	125
5.4.2 Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade (<i>Allium cepa</i>).....	129
5.4.3 Perfil fitoquímico	131
5.4.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	133
5.5 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	136
6 Estudo prospectivo sobre propriedades antineoplásicas de plantas da família Fabaceae com ênfase na espécie <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. (Sabiá)	145

RESUMO.....	146
ABSTRACT	147
6.1 INTRODUÇÃO.....	148
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	149
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	150
6.4 CONCLUSÃO	157
REFERÊNCIAS	158
APÊNDICE A.....	162
ANEXO A.....	164
ANEXO B	166

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}^2$	Oxigênio singleto
AAPH	2,2'-azobis[2-metilpropionamidina]dihidroclorato
ABTS	ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDKs	<i>Ciclin Dependent Kinase</i>
CE₅₀	Concentração Eficaz 50%
CI₅₀	Concentração Inibitória 50%
CIS	Comissão Internacional de Saúde
CL₅₀	Concentração Letal 50%
DL₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M.	Erro padrão da média
EPO	<i>European Patent Office</i>
EREs	Espécies reativas derivadas de enxofre
ERNs	Espécies reativas derivadas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas derivadas de oxigênio
E.EtOH	Extrato etanólico

GPx	Glutathiona peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCT-116	Carcinoma colorretal
HL-60	Leucemia promielocítica humana
HO₂[•]	Radical hidroperoxila
IG	Índice genotóxico
IM	Índice mitótico
IMt	Índice mutagênico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NCI-US	<i>National Cancer Institute of United States</i>
NO	Óxido nítrico
NO₂[•]	Radical nitrito
NPS	Nitroprussiato de sódio
O₂⁻	Ânion superóxido
[•]OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVCAR-8	Carcinoma do ovário
R%	Porcentagem de redução dos radicais livres
RPM	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SF-295	Glioblastoma
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

TEAC	Capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta visível
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência câncer por sexo e regiões brasileira.....	36
Tabela 2	Total de artigos pesquisados nas bases de dados por palavras-chave.....	40
Tabela 3	Espécies vegetais com ocorrência na região semiárida brasileira citadas em trabalhos etnofarmacológicos com potencial ação citotóxica e/ou antitumoral.....	50

CAPÍTULO II

Tabela 1	Espécies vegetais utilizadas no estudo.....	66
Tabela 2	Valor TEAC (capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox [®]) e % de proteção pelos métodos ABTS e DPPH.....	75
Tabela 3	Concentração letal (CL ₅₀) em ensaio de toxicidade aguda utilizando como bioindicador o microcústáceo <i>Artemia salina</i> avaliada após de 24h de exposição.....	78

CAPÍTULO III

Tabela 1	Espécies vegetais utilizadas no estudo.....	96
Tabela 2	Linhagens celulares tumorais humanas testadas no ensaio do MTT.....	101
Tabela 3	Triagem da atividade citotóxica <i>in vitro</i> de 36 extratos e frações de plantas pertencentes a diferentes famílias do semiárido brasileiro e do isolado ácido betulínico contra três linhagens de células tumorais.....	110
Tabela 4	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> e seus respectivos valores de Cl ₅₀ de extratos e frações de plantas pertencentes a diferentes famílias do semiárido brasileiro e do isolado ácido betulínico contra quatro linhagens de células tumorais utilizando ensaio de MTT após 72 h de incubação.....	113
Tabela 5	Atividade hemolítica de extratos e frações de plantas pertencentes a diferentes famílias do semiárido brasileiro	114

	frente a eritrócitos de camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) após 1h de incubação.....	
Tabela 6	Índice de fases em células em divisão, índice mitótico e índice mutagênico em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à fração diclorometano da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL após 72 h de exposição..	116
Tabela 7	Índice de aberrações cromossômicas e índice genotóxico em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à fração diclorometano da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL após 72 h de exposição.....	118
Tabela 8	Concentração eficaz necessária para causar 50% do efeito máximo esperado nos ensaios antioxidantes <i>in vitro</i> , empregando os métodos de remoção de radicais hidroxila (\bullet OH), remoção de radicais nitrito ($\text{NO}_2\bullet$) e substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	121
CAPÍTULO IV		
Tabela 1	Depósitos de patentes por bases e palavras-chave pesquisadas.....	152
Tabela 2	Total de artigos científicos por base e palavras-chave pesquisadas.....	155

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	Região do semiárido brasileiro.....	26
-----------------	-------------------------------------	----

CAPÍTULO I

Figura 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil por sexo.....	37
-----------------	---	----

Figura 2	Exemplo do processo típico para a descoberta de novas moléculas naturais.....	43
-----------------	---	----

Figura 3	Alguns compostos naturais e derivados de produtos naturais utilizados no tratamento do câncer.....	45
-----------------	--	----

Figura 4	Moléculas dos análogos semi-sintéticos de camptotecina com atividade antitumoral.....	46
-----------------	---	----

CAPÍTULO II

Figura 1	Fluxograma do procedimento de obtenção dos extratos e frações utilizadas no estudo.....	68
-----------------	---	----

Figura 2	Molécula do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico (Trolox®).....	69
-----------------	--	----

Figura 3	Cátion radical ABTS ^{•+} - 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).....	70
-----------------	--	----

Figura 4	Curva de calibração-resposta da inibição da solução de Trolox® em etanol (0,05 a 0,8 mM/mL) frente ao cátion radical ABTS ^{•+} após 30 minutos de reação.....	71
-----------------	--	----

Figura 5	Molécula do radical livre DPPH [•] - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila..	72
-----------------	--	----

Figura 6	Curva de calibração-resposta da inibição da solução de Trolox® em etanol (0,002 a 0,125 mM/mL) frente ao radical DPPH [•] após 30 minutos de reação.....	73
-----------------	---	----

CAPÍTULO III

Figura 1	Fatores envolvidos na carcinogênese.....	93
-----------------	--	----

Figura 2	Fluxograma do procedimento de obtenção dos extratos e frações utilizadas no estudo.....	98
Figura 3	Conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes nas células metabolicamente ativas.....	100
Figura 4	Estrutura molecular do ácido betulínico.....	105
Figura 5	Tamanho das raízes em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à fração diclorometano da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL após 72 h de exposição.....	115
Figura 6	Fotomicrografias de aberrações cromossômicas em células de <i>Allium cepa</i> expostas em diferentes concentrações da fração diclorometano da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> após 72 h de exposição.....	117
Figura 7	Cromatograma da fração diclorometano da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> , do padrão ácido betulínico e de sua co-injeção em HPLC.....	119
Figura 8	Capacidade antioxidante da fração diclorometano da casca da espécie <i>Mimosa caesalpinifolia</i> (0,9-7,2 µg/mL) frente à inibição de radicais hidroxila (\bullet OH), diminuição de níveis de TBARS e produção de nitrito ($\text{NO}_2\bullet$).....	120
Figura 9	Capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas da espécie <i>Combretum duarteanum</i> (0,9-7,2 µg/mL) frente a inibição dos radicais hidroxila (\bullet OH), diminuição de níveis de TBARS e produção de nitrito ($\text{NO}_2\bullet$).....	121
Figura 10	Perfil no UV-Vis da fração diclorometanica da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> . λ = 200 a 500 nm, concentração de 1 g/mL.....	123
Figura 11	Perfil no UV-Vis do extrato etanólico das folhas de <i>Combretum duarteanum</i> . λ = 200 a 800 nm, concentração de 150 µg/mL.....	123
Figura 12	Cromatoplaça da fração diclorometano da casca da <i>Mimosa caesalpinifolia</i> e do extrato etanólico das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	124

CAPÍTULO IV

Figura 1	<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.....	149
Figura 2	Distribuição por Classificação Internacional de Patentes (CIP) encontradas nas bases WIPO e EPO.....	153
Figura 3	Publicações de artigos científicos para as combinações das palavras-chave: Fabaceae e (Neoplasia ou Cancer) e <i>Mimosa</i> e (Neoplasia ou Cancer) na base <i>Scopus</i>	156
Figura 4	Áreas científicas relacionadas às publicações para as combinações das palavras-chave: <i>Fabaceae</i> e (Neoplasia ou Cancer) e <i>Mimosa</i> e (Neoplasia ou Cancer), na base <i>Scopus</i>	157

Atividade Antioxidante e Citotóxica de Extratos de Plantas do Semiárido Brasileiro com Potencial para Desenvolvimento de Fitoterápicos. JURANDY DO NASCIMENTO SILVA. Orientador: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Defesa de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí, 2014.

RESUMO

O bioma Caatinga situado na região semiárida brasileira se destaca com um número considerável de espécies vegetais utilizadas empiricamente por suas propriedades terapêuticas. Partindo dessa informação esse trabalho teve como objetivo investigar a atividade antioxidante e o potencial citotóxico de amostras obtidas a partir de plantas endêmicas da região semiárida brasileira. No estudo inicial de revisão, concluiu-se que poucas são as espécies que foram e/ou estão sendo pesquisadas com vista ao seu potencial antineoplásico apesar da gama de espécies presente na região em estudo. No ensaio antioxidante utilizando o cátion radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}), os extratos etanólicos das folhas das espécies *Combretum mellifluum* e *Terminalia actinophylla* apresentaram os melhores resultados, com capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) igual a 31,4 mM de Trolox/g. No ensaio utilizando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), a fração aquosa dos galhos da espécie *Oxandra sessiliflora* apresentou maior valor TEAC com 3,5 mM de Trolox/g. No estudo da toxicidade aguda com *Artemia salina*, a fração diclorometano das folhas da espécie *Anadenanthera colubrina* revelou uma CL₅₀ de 23,75 µg/mL. A fração diclorometano da casca da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* se mostrou a mais promissora nos ensaios citotóxicos, apresentando CI₅₀ variando entre 4,7 a 7,1 µg/mL para as linhagens humanas SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (carcinoma do ovário), HL-60 (leucemia promielocítica) e HCT-116 (carcinoma colorretal) no teste de MTT, no teste utilizando células vegetais de *Allium cepa* essa fração também apresentou toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade significativa, já a análise da cromatografia líquida de alta eficiência essa fração revelou a presença significativa do ácido betulínico. Apenas três amostras exibiram atividade hemolítica, apresentando uma CE₅₀ entre 13,2 a 48,5 µg/mL, a fração hexânica da casca da espécie *Platonia insignis* e os extratos etanólicos das folhas das espécies *Combretum mellifluum* e *Terminalia actinophylla*. O extrato etanólico da folha da espécie *Combretum duarteanum*, apresentou melhor atividade antioxidante *in vitro* por meio da capacidade de remoção de radicais hidroxila, do óxido nítrico e redução do ácido tiobarbitúrico. A espectroscopia de varredura (UV-Vis) e a análise por cromatografia em camada delgada analítica se mostraram como uma ferramenta útil na identificação inicial de algumas classes de metabólitos secundários, como terpenoides e flavonoides. O levantamento prospectivo sobre espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* mostrou que as patentes foram depositadas em maior número nas bases WIPO (*World Intellectual Property Organization*) e EPO (*European Patent Office*), com classificação internacional principalmente do tipo A61K (ciência médica ou veterinária e higiene) e A23L (alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas). As produções científicas estão alocadas principalmente nas áreas da medicina, farmacologia, toxicologia e farmacêutica e bioquímica, genética e biologia molecular, com ápice de publicações a partir de 2010.

Palavras-chave: Anticâncer. Citotoxicidade. Prospecção. *Mimosa caesalpiniiifolia*

Antioxidant and Cytotoxic Activity of Plant Extract the Brazilian Semi-arid with Potential for Development of Herbal Medicines. JURANDY DO NASCIMENTO SILVA. Advisor: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Master's defense. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Federal University of Piauí, 2014.

ABSTRACT

The Caatinga biome located in the Brazilian semi-arid region stands out with a considerable number of plant species used empirically for its therapeutic properties. From this information this study aimed to investigate the antioxidant activity and the cytotoxic potential of samples obtained from endemic plants of the Brazilian semi-arid region. The beginning-review study, it was concluded that there are few species that have been and/or are being researched with a view to potential anticancer despite the range of this species in the study area. In the antioxidant test using the cation radical 2,2-azobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS^{•+}), the ethanol extracts of leaves of species *Combretum mellifluum* and *Terminalia actinophylla* showed the best results, with equivalent antioxidant capacity to Trolox (TEAC) equal to 31.4 mM Trolox/g. In the test using the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]), the aqueous fraction of the branches of *Oxandra sessiliflora* species showed higher TEAC value with 3.5 mM Trolox/g. In the study of acute toxicity to *Artemia salina*, the dichloromethane fraction of the leaves of the species *Anadenanthera colubrina* revealed a LC₅₀ 23.75 µg/mL. The dichloromethane fraction from the bark of *Mimosa caesalpiniiifolia* species proved the most promising in cytotoxic assays, with IC₅₀ ranging from 4.7 to 7.1 µg/mL for human lines SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovarian carcinoma), HL-60 (promyelocytic leukemia), and HCT-116 (colon carcinoma) in the MTT assay, using the test plant cells of *Allium cepa* this fraction also showed toxicity, genotoxicity cytotoxicidade and significant, as the analysis of the high performance liquid chromatography this fraction revealed the significant presence of betulinic acid. Only three samples exhibited hemolytic activity, with an EC₅₀ of 13.2 to 48.5 µg/mL, the hexane extract from the bark of *Platonia insignis* species and ethanol extracts of the leaves of *Combretum mellifluum* species and *Terminalia actinophylla*. The ethanol extract of *Combretum duarteianum* species leaf, showed better antioxidant activity *in vitro* by removing capability of hydroxyl radicals, nitric oxide and reduced thiobarbituric acid. The scan spectroscopy (UV-Vis), and analysis by analytical thin layer chromatography proved to be a useful tool the initial identification of certain classes of secondary metabolites such as flavonoids and terpenoids. The prospective survey of species *Mimosa caesalpiniiifolia* showed that patents were deposited in greater numbers in bases WIPO (*World Intellectual Property Organization*) and EPO (*European Patent Office*), with mainly international classification of A61K type (medical or veterinary science and hygiene) and A23L (food, food products and non-alcoholic drinks). Scientific productions are mainly allocated to the areas of medicine, pharmacology, toxicology and pharmaceutical and biochemistry, genetics and molecular biology, with publications summit from 2010.

Keywords: Anticancer. Cytotoxicity. Prospecting. *Mimosa caesalpiniiifolia*

1 INTRODUÇÃO

As populações humanas convivem com uma grande diversidade de espécies vegetais, desenvolvendo maneiras particulares de explorá-las para distintas finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência. Dentre estas, do repertório cultural, destaca-se o conhecimento sobre a utilização de plantas para fins terapêuticos (OLIVEIRA et al., 2010). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% a partir de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). Atualmente a Organização Mundial de Saúde chegou à compreensão da importância dessa biodiversidade, como sendo capaz de oferecer soluções terapêuticas acessíveis, para a maioria da população mundial (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2014).

Alguns constituintes químicos presentes nos extratos de plantas medicinais podem responder majoritariamente pela atividade biológica, embora sua forma de ação seja normalmente conjugada a determinada bioatividade. Portanto, costuma-se destacar as principais propriedades biológicas e farmacológicas de classes fitoquímicas:

- a) Saponinas, com atividade hemolítica, molusquicida, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica e antitumoral, antiviral, entre outras (SPARG et al., 2004);
- b) Compostos fenólicos, apresentando capacidade antioxidante de neutralizar a atividade de radicais livres gerados no organismo, com associações a prevenção de diversas doenças crônicas degenerativas como diabetes, câncer e processos inflamatórios inibindo também o risco das doenças cardiovasculares (ROCHA et al., 2011);
- c) Taninos, caracterizados como compostos fenólicos, apresentam atividade antioxidante e antifecciosa, ação antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária, na reparação de tecidos, regulação enzimática e protéica, estimulação das células fagocíticas e ação tumoral (ROBBERS et al., 1997); em processos de cura de feridas como pequenas ulcerações, queimaduras e inflamações (SIMÕES et al., 2001);
- d) Catequinas pertencem a um grupo de polifenóis e apresentam uma série de atividades biológicas como antioxidante, quimioprotetora, termogênica,

anti-inflamatória e anticarcinogênica (SCHMITZ et al., 2005);

e) Esteróides, envolvidos no desenvolvimento e no controle do sistema reprodutor humano, funcionando como cardiotônicos, precursores de vitamina D, anticoncepcionais orais, agentes anti-inflamatórios e agentes anabolizantes (ROBBERS et al., 1997);

f) Terpenos, reconhecidos pelos efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (FERREIRA et al., 2010, 2011);

g) Cumarinas, utilizadas no tratamento de doenças de pele, como psoríase, dermatoses, vitiligo, laxante e antitumoral (MILITÃO et al., 2012);

h) Alcalóides, bastante conhecidos devido a atividades farmacológicas marcantes da morfina e a tubocurarina, sendo princípio ativo de importante anestésico atual (CUNHA; FILHO, 2009);

i) Flavonóides, classe dos compostos fenólicos com atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009); antiulcerogênica e antimicrobiana (LOPES et al., 2000); antialérgica, hepatoprotetora, antitrombica, antiviral e anticarcinogênica (MIDDLETON JUNIOR et al., 2000).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético tem, na atualidade, valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A utilização de plantas medicinais reflete a realidade de parte da população brasileira, cujo limitado acesso aos programas de saúde pública levou ao desenvolvimento e conservação de um conhecimento etnofarmacobotânico rico de informações (SANTOS et al., 2008). Apesar desse enorme potencial, existe um grande desconhecimento sobre a biodiversidade brasileira, tornando o uso dos produtos naturais e plantas medicinais fragmentário e escasso. Menos de 1% da flora brasileira teve seus usos potenciais corretamente investigados e sua imensidade é praticamente desconhecida em termos químicos (GARCIA, 1995).

O Ministério da Saúde tem a investigação das propriedades terapêuticas das plantas medicinais como uma de suas prioridades e implantou a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS).

Para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição socioeconômica da população. Alguns trabalhos já são realizados em estados como o Ceará com o objetivo de desvendar o uso de plantas medicinais pela população, encontrando uma alta prevalência de uso (SILVA et al., 2006).

Nesse contexto, plantas medicinais com atividade anticâncer têm chamado atenção de institutos farmacêuticos à medida que cientistas percebem que elas são uma fonte quase infinita para o desenvolvimento de drogas e que na maioria das vezes apresentam baixa toxicidade, apresentando pouco ou nenhum efeito colateral (WANG et al., 2006). Enquanto drogas sintéticas contra o câncer causam uma morte não específica das células, alguns produtos de origem vegetal oferecem ações protetoras e terapêuticas, com baixa citotoxicidade e benefícios para pessoas imunocomprometidas (GÁLVEZ et al., 2003; REDDY et al., 2003). Houghton et al. (2007) afirmam que uma parte significativa das descobertas de fármacos nos últimos quarenta anos tem sido focada em agentes para prevenir ou tratar o câncer, já que na maioria dos países desenvolvidos e, cada vez mais nos países em desenvolvimento, o câncer está entre as três causas mais comuns de morte e morbidade.

O câncer é caracterizado como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais, de vários tipos presentes em um mesmo microambiente, geralmente se espalham pelos tecidos e órgãos adjacentes (metástase) para regiões distantes do organismo. Essas propriedades geralmente são ocasionadas por um acúmulo de mutações herdadas ou induzidas (radicais livres, luz ultravioleta, microrganismos) em oncogênes, genes supressores e nos genes reparadores de DNA (ácido desoxirribonucleico), o que caracteriza o câncer como doença genética (KUMAR et al., 2004; GRIVICICH et al., 2007; INCA, 2014; ROSKOSKI, 2014).

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas. A quimioterapia,

diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (SOUZA, 2004).

O século XX apresentou um avanço extraordinário na terapêutica antineoplásica e quimiopreventiva principalmente baseada em produtos naturais provenientes de plantas e microrganismos (NEWMAN; CRAGG, 2007; FARIAS et al., 2013). A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância sua origem relacionada a uma fonte natural. Porém, a grande heterogeneidade das células tumorais dificultam o tratamento e facilita a manifestação de resistência, fatores que estimulam a pesquisa por novos quimioterápicos (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Diante da grande importância que as substâncias vegetais representam na prática clínica antineoplásica, da vasta biodiversidade brasileira, as plantas do Semiárido Brasileiro e de seu principal bioma – Caatinga – surgem como excelentes fontes de substâncias com promissor potencial quimiopreventivo, antioxidante e citotóxico (RIBEIRO et al., 2014). A região do semiárido brasileiro (**Figura 1**) está praticamente incluída no Nordeste do país e apresenta a mais diversa dentre as paisagens brasileiras, tanto em relação à geomorfologia quanto aos tipos de vegetações. É uma das cinco regiões geopolíticas na qual o país está dividido, e compreende nove Estados, sendo que oito deles estão incluídos na região semiárida: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, além do Norte de Minas Gerais (Região Sudeste) (QUEIROZ et al., 2006; FARIAS et al., 2013).

Figura 1 - Região do semiárido brasileiro.



Fonte: Adaptado de Saboya (2014).

REFERÊNCIAS

- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J.M. Alcalóides derivados do núcleo isoquinolinico. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. 320 p.
- DAVID, B. A.; WOLFENDER, J. L. B.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**. v. 1, n. 1, p. 1-17, 2014.
- FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS; I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V.

M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

GÁLVEZ, M.; MARTÍN-CORDERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M.; CORTÉS, F.; AYUSO, M. J. Cytotoxic effect of *Plantago* spp . on cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3 , p. 125-130, 2003.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126 p.

KUMAR, V., ABBAS, A. K, FAUSTO, N., ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004. 1525 p.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 3, n. 17. p. 18-22, 2000.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILITÃO, G. C. G.; DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F.J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of ucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1479-1487, 2012.

- MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p.189-218.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.
- OLIVEIRA, F. C. S., BARROS, R. F. M., MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras , semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.
- QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A; GIULIETTI, A. M.;. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. p. 144.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.
- RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; SILVA, M. A. P.; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia**, 1. ed. São Paulo: Editorial premier, 1997. 372 p.
- ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.
- ROSKOSKI, R. Jr. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 87, n. 87, p.42-59, 2014.
- SABOYA, A. **Semiárido em transformação: panorama sócio-econômico e entraves para o desenvolvimento**. Disponível em: <<http://criseoportunidade.files.wordpress.com/2010/01/mapa-bnb.jpg>>. Acesso em: 16 jul. 2014.
- SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. G. R. Use of medicinal plants by the population of Ariquemes, in Rondonia State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 244-250, 2008.
- SCHMITZ, WANDERLEI.; SAITO, ALEXANDRE YUKIO.; ESTEVÃO, DIRCEU.; SARIDAKIS, HALHA OSTRENSKY. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFGRS/Ed. UFSC, 2001. p.517-543.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SPARG, S. G.; LIGHAT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.

WANG, L.; LIN, L.; YE, B. Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 5, p. 625-629, 2006.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antioxidante e o potencial citotóxico de amostras obtidas a partir de plantas do semiárido brasileiro.

2.2 Objetivos Específicos

- Revisão sobre o uso de plantas endêmicas da região semiárida brasileira estuda e/ou utilizadas como antitumorais.
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos e frações vegetais por meio de uma triagem inicial pelos métodos ABTS e DPPH.
- Determinar a toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* como bioindicador.
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* em linhagens de células tumorais e a atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos.
- Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da(s) amostra(s) com resultados citotóxicos promissores por meio do teste *Allium cepa*.
- Determinar os valores de CE₅₀ das amostras citotóxicas mais promissoras utilizando os métodos de inibição de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), diminuição de níveis de TBARS e produção de nitrito ($\text{NO}_2\cdot$).
- Realizar a caracterização fitoquímica das amostras com resultados promissores nos ensaios citotóxicos por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), análise espectrométrica UV-VIS e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Fazer um levantamento bioprospectivo sobre a espécie vegetal *Mimosa caesalpinifolia* Benth.

CAPÍTULO I**3 Atividade antitumoral de produtos oriundos de plantas do semiárido brasileiro: uma revisão medicinal**

Atividade antitumoral de plantas do semiárido brasileiro: uma revisão medicinal

Jurandy do Nascimento SILVA¹, Kátia da Conceição MACHADO¹, Paulo Michel Pinheiro FERREIRA^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, PI - Brasil.

²Departamento de Biofísica e Fisiologia, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil

RESUMO

Atualmente há uma busca crescente por novas substâncias com propriedades terapêuticas a partir de plantas com o emprego de variados estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos. O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. Pesquisou-se em teses e artigos científicos originais e gratuitos publicados nas bases eletrônicas de dados: *Scopus*, *Science Direct*, *PubMed* e *Scielo* nos idiomas inglês, português e espanhol, coletados entre os meses de fevereiro e novembro de 2014, utilizando os seguintes pares de palavras-chave: plantas medicinais, antitumoral, semiárido. As bases com maiores números de resultados para as buscas foram a *Scopus* e *Science Direct*, apresentando maior número de publicações no idioma inglês. A combinação das palavras chaves “Plantas medicinais e Antitumoral” apresentou maior número de resultado para a maioria das bases pesquisadas, com exceção da base *Scielo* com maior número de publicações envolvendo a combinação das palavras chave “Plantas medicinais e Semiárido”. Pode-se concluir com os dados levantados nesse trabalho que diante da gama de espécies endêmicas do bioma semiárido brasileiro, poucas são às espécies que foram e/ou estão sendo pesquisadas com vista ao seu potencial uso como fontes naturais antineoplásicas. Logo, há a necessidade da avaliação de novas espécies e de uma melhor avaliação do perfil farmacológico dessas espécies já em estudo, principalmente no que diz respeito ao potencial citotóxico e dos metabolitos responsáveis por essa atividade.

Palavras-chaves: Antitumoral. Plantas medicinais. Semiárido brasileiro

ABSTRACT

There are currently a crescent search for new substances with therapeutic properties from plants with the use of various chemical, pharmacological and toxicological studies. The number of cancer cases has increased considerably worldwide, configuring, today as a major global public health problems. Researched up for theses and scientific articles original and free published in electronic databases: Scopus, Science Direct, PubMed and Scielo in english, portuguese and spanish languages, collected between february and november 2014, using the following pairs of words Tags: medicinal plants, antitumor, semiarid. Bases with larger numbers of results for searches were Scopus and Science Direct, featuring the largest number of publications in the English language. The combination of the key words "Medicinal plants and Antitumor" the greatest number of results for majorities of surveyed foundations, with the exception of the base Scielo with the highest number of publications involving the combination of keywords "Medicinal plants and semiarid." Can conclude from the data obtained in this work on the range of species endemic to the Brazilian semi-arid biome are the few species that have been and/or are being researched with a view to their potential use as anticancer natural sources. Therefore there is the need for assessment of new species and a better assessment of the pharmacological profile of these species already studied, especially with regard to the cytotoxic potential and metabolites responsible for this activity.

Keywords: Antitumor. Medicinal plants. Brazilian semiarid

3.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas denominadas “estado da arte” ou “estado do conhecimento” são realizadas com o desafio de mapear e de discutir a produção acadêmica em diferentes campos do conhecimento, sendo reconhecidas por aplicarem uma metodologia de caráter inventariante e descritivo da produção acadêmica e científica sobre o tema que busca investigar. É necessário reconhecer o aspecto cumulativo do conhecimento científico, ou seja, é importante tomar como base os avanços já realizados e, por que não, as limitações dos estudos anteriormente dedicados ao tema. Por esta razão é quase impossível pensar uma monografia, uma dissertação, uma tese ou outro trabalho acadêmico ou científico sem a necessária revisão de literatura (FERREIRA, 2002; MOREIRA, 2004).

Atualmente há uma busca crescente por novas substâncias com propriedades terapêuticas a partir de plantas com o emprego de variadas indicações de uso, estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos. A fitoterapia, ciência que estuda as plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças, encontra-se muito presente na medicina popular e constitui a base dos estudos da Etnofarmacologia, ciência voltada para sistemas tradicionais de tratamento que surgem das relações entre povos e plantas e que fundamenta a busca por princípios ativos, empregados muitas vezes pelo homem sem embasamento científico. Existe ainda um interesse renovado em pesquisas com produtos naturais devido à vasta biodiversidade da flora do planeta e à ausência de descobertas de novos fármacos alternativos para tratamento de doenças crônicas, como o câncer, diabetes, hipertensão e desordens neurodegenerativas (ELISABETSKY, 2001; MACIEL et al., 2002; BUTLER, 2004; FERREIRA et al., 2014).

O câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento e disseminação descontrolada de células. É causado por fatores externos (organismos infecciosos, produtos químicos e radiação) e fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem a partir de metabolismo). Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o desenvolvimento da

doença. Geralmente, são necessários dez anos ou mais de intervalo entre a exposição a fatores externos e a detecção do câncer (ACS, 2013).

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA et al., 2005).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - *Agency for Research on Cancer*) da OMS estima que houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, no ano de 2012. A incidência do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas (INCA, 2014).

No Brasil a problemática do câncer ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, com isso, o tema conquista cada vez mais espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo (INCA, 2014).

De acordo com o INCA (2014) a estimativa de incidências de câncer para o ano de 2014, que é válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (**Tabela 1**). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, o tipo mais incidente será o câncer de próstata e nas mulheres, o de mama (**Figura 1**).


Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência câncer por sexo e regiões brasileira.

Localização primária da neoplasia maligna	Estimativa dos casos novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, brônquio e pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema nervoso central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10. Incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer segundo sexo e localização primária.

Fonte: INCA (2014).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil por sexo.

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%	
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%	
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%	
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%	
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%	
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%	
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%	
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%	
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%	

Distribuição por sexo, exceto pele não melanoma. Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2014).

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores com a quimioterapia e/ou tratamento radioterápico. Muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo único de aumentar a eficiência da quimioterapia. Alguns protocolos em andamento que fazem uso da combinação de diversos agentes antineoplásicos estão conseguindo resultados com índices surpreendentes de cura de até 90%. No entanto, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado. O carcinoma de pulmão, um dos mais frequentes em todo o mundo, apresenta respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis. Como a monoterapia apresenta apenas resposta parcial em 15% a 20% dos casos e com as associações terapêuticas não ultrapassa de 40% a 50%, é necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas. Por outro lado, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A maioria dos quimioterápicos tem origem ou são baseados em moléculas provenientes de plantas ou animais. Desde 1500 a.C., os produtos naturais têm sido reconhecidos como detentores de potencial anticâncer (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012). A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área de oncologia farmacológica, tornando-se importante a informação sobre os aspectos bioquímicos, químicos e biológicos destes quimioterápicos em potencial.

O presente trabalho apresenta, portanto, uma revisão sobre a potencialidade anticâncer de produtos naturais isolados de plantas de modo a proporcionar uma fonte de informação atualizada para os interessados em desenvolver pesquisas na área e guiar a organização do conhecimento que possibilite o desenvolvimento de fitoterápicos com ação antitumoral.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para uma revisão completa e confiável, apenas recursos primários foram usados. Os bancos de dados pesquisados para a elaboração do estudo foram:

Scopus, *Science Direct*, *PubMed* e *Scielo* nos idiomas inglês, português e espanhol, coletados entre os meses de fevereiro e novembro de 2014, utilizando como critério de seleção dos artigos com eventual informação relevante para o estado da arte, os seguintes pares de palavras-chave combinadas: plantas medicinais, antitumoral, semiárido nos idiomas português, inglês e espanhol. Além disso, não foi estabelecido intervalo de tempo limite para as publicações o que garantiu a obtenção de um número maior de referências dentro dos critérios estabelecidos. Os critérios de exclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em outros idiomas, publicações repetidas nas bases de dados ou não totalmente disponíveis ou cujo resumo não retratasse a temática da revisão.

3.3 RESULTADOS

Em relação às terminologias utilizadas - plantas medicinais, antitumoral e semiárido - foram encontrados um total de 3.132 artigos por meio da busca com as palavras-chave conforme descrito na **Tabela 2**, dos quais foram selecionados apenas artigos que atenderam aos critérios de inclusão do estudo. As bases com maiores números de resultados para as buscas foram a *Scopus* e *Science Direct*, apresentando maior número de publicações no idioma inglês. A combinação das palavras chaves “Plantas medicinais e Antitumoral” apresentou maior número de resultado para a maioria das bases pesquisadas, com exceção da base *Scielo* com maior número de publicações envolvendo a combinação das palavras chave “Plantas medicinais e Semiárido”.

Tabela 2 - Total de artigos pesquisados nas bases de dados por palavras-chave.

Palavras chaves	Bases de dados				TOTAL
	<i>Scopus</i>	<i>Science Direct</i>	<i>PubMed</i>	<i>Scielo</i>	
Plantas medicinais e Semiárido	74	29	4	10	117
Plantas medicinais e Antitumoral	2.840	92	72	9	3.013
Plantas medicinais, Semiárido e Antitumoral	0	1	0	0	1
TOTAL	2.914	122	76	19	3.132

3.4 DISCUSSÃO

O conhecimento das propriedades medicinais das plantas tem sido o foco da investigação científica ao redor do mundo graças aos grandes avanços que a ciência tem proporcionado ao desenvolvimento da fitoquímica moderna e da química medicinal associado à chamada era pós-genômica (VALLI et al., 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 65 a 80% da população mundial dependa do uso de plantas medicinais como única forma de terapia para as mais diversas doenças, principalmente devido aos custos da alopatia moderna atual. No Ocidente, o consumo de plantas medicinais vem aumentando substancialmente, onde aproximadamente 40% da população faz uso regular de preparações fitoterápicas. O uso popular ocorre principalmente nas formas de infusões, decoctos, tinturas e alcoolaturas obtidos na maioria das vezes do modo artesanal. Somado a isso, a crescente aceitação da fitoterapia por parte dos profissionais da saúde tem estimulado o uso pela população. Porém, muitas preparações à base de plantas medicinais são comercializadas sob o rótulo de serem produtos naturais, as quais muitas vezes não possuem qualidade comprovada e acabam sendo repassadas aos usuários com uma falsa conotação de que são inócuas ou seguras. Além disso, existe no mundo um apelo ao consumo de produtos naturais, embora, na

maioria das vezes, suas indicações terapêuticas possuam fundamentação apenas em hábitos e costumes e as propriedades farmacológicas a eles atribuídas ainda não tenham comprovação se quer em testes pré-clínicos (VEIGA JUNIOR et al., 2005; SEEFF, 2007; FRANÇA et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008; OLIVER, 2010).

No geral, muitos trabalhos utilizam os termos “fitoterápicos” e “plantas medicinais” como sinônimos. Entretanto, as plantas medicinais possuem nas suas estruturas substâncias com ação terapêutica que por ventura podem vir a ser precursores de fármacos semi-sintéticos ou matérias-primas de medicamentos, enquanto fitoterápicos são produtos farmacêuticos obtidos a partir do preparo da planta para uso em uma formulação. Logo, existem regulamentações sobre os ensaios toxicológicos de fitoterápicos para fins de registro do medicamento, que incluem a determinação da toxicidade pré-clínica empregando estudos de toxicidade aguda com dose única ou fracionada, obtenção da relação dose-resposta e da dose letal 50% (DL₅₀), estudo de toxicidade de longa duração com doses repetidas, verificação de alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas e exames anatomopatológicos e de genotoxicidade quando se tratar de um medicamento de uso contínuo o que motiva e norteia a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos com derivados de plantas medicinais (GOMES et al., 2001; BRASIL, 2004).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 14 de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, fitoterápico é uma classe de medicamento que emprega exclusivamente matéria-prima vegetal ativa caracterizada pela reprodutibilidade e constância da sua qualidade e que possui eficácia e segurança comprovada por parâmetros estabelecidos pela RE 90 de 2004, resolução específica que apresenta um guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica com fitoterápicos (BRASIL, 2004).

A descoberta de medicamentos à base de plantas resultou principalmente no desenvolvimento de agentes anti-infecciosos e antitumorais e continua a contribuir para a entrada de novos compostos em ensaios clínicos (OLIVEIRA et al., 2010; SHAH et al., 2013).

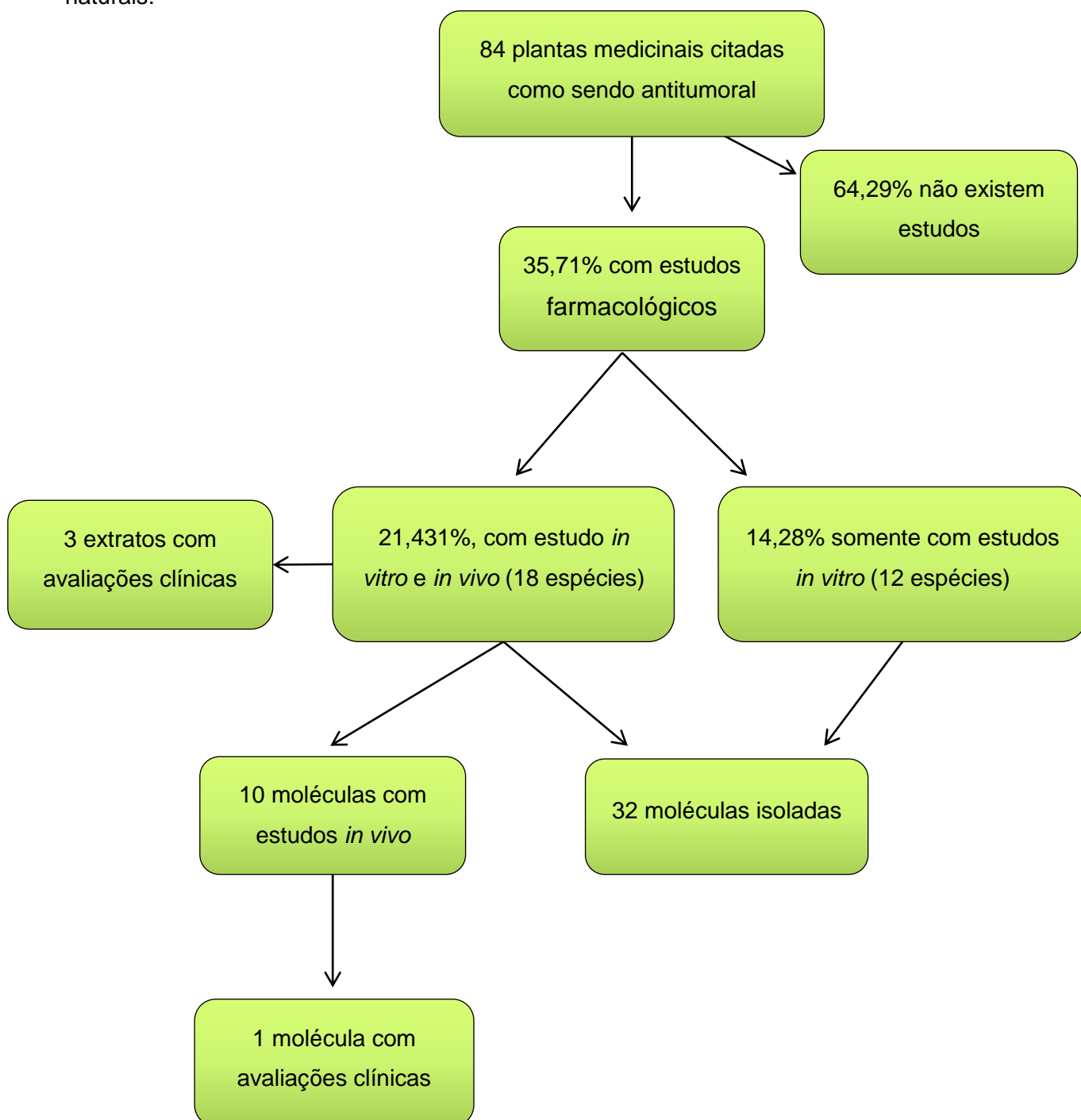
O investimento em pesquisas por novos quimioterápicos reflete as altas taxas de incidência e de mortalidade por câncer. Em países desenvolvidos, um em cada cinco óbitos é decorrente de neoplasias, proporção que equivale a

10% nos países em desenvolvimento. Estes países, entretanto, já concentram cerca de 55% dos novos casos de câncer que surgem anualmente no mundo (WHO, 2002). Diante da urgente necessidade de novas alternativas antitumorais, este estudo revisou as propriedades citotóxicas e antitumorais das plantas medicinais e espécies presentes no nordeste brasileiro.

A descoberta de produtos naturais com propriedades biológicas tem seguido um via tradicional: alvos são focados em extratos brutos de plantas e no caso de existirem evidências de atividade, os extratos são fracionados e o composto ativo é isolado e identificado. A descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais tem sido tradicionalmente demorada e metodologias mais rápidas e melhores para a coleta das plantas, triagem, bioensaios, isolamento de compostos, e desenvolvimento compostos devem ser usados (ROUHI; WASHINGTON, 2003). Logo, uso empírico e milenar de plantas medicinais por parte da população desperta o interesse de muitos pesquisadores objetivando conhecer sobre novas moléculas que possam ser usadas na terapêutica (FOGLIO et al., 2006). A seleção de plantas para pesquisa e desenvolvimento (P&D), baseada na alegação feita por seres humanos a um dado efeito terapêutico, pode ser valioso na economia de tempo e gastos para a descoberta de novos fármacos. Neste contexto, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica (isso não implica em admitir que plantas medicinais ou remédios caseiros sejam destituídos de toxicidade) (ELISABETSKY, 2001).

Como demonstrado na **Figura 2**, o processo típico para a descoberta de novas moléculas naturais costuma passar por etapas tradicionalmente conhecidas desde a produção de extratos (possuindo geralmente entre 10 - 100 componentes), concentração e fracionamento até a purificação de uma molécula. Uma alternativa eficaz para diminuir o tempo necessário para o isolamento do princípio ativo é a seleção de amostras fracionadas a partir do extrato (LAM, 2007).

Figura 2 – Exemplo do processo típico para a descoberta de novas moléculas naturais.

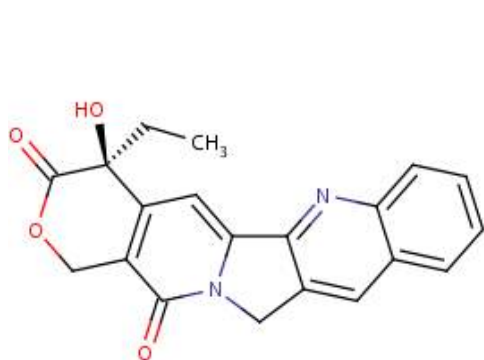


Fonte: adaptado de Melo et al. (2011).

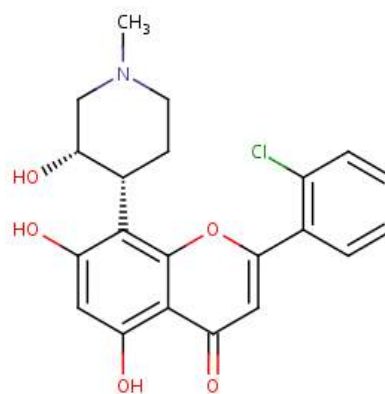
Ao longo da história, os produtos vegetais e seus análogos modificados têm sido ricas fontes de medicamentos antineoplásicos, desempenhando, assim, um papel importante na assistência farmacêutica. Através da bioprospecção de 114 mil extratos oriundos de aproximadamente 35 mil espécies de plantas, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute of United States*, NCI-US) identificou importantes compostos antitumorais tais como paclitaxel, docetaxel, flavopiridol, vimblastina, vincristina, vindesina, camptotecina, irinotecano, etoposídeo e tenoposídeo (DEWICK, 1996; WANG, 1998; SRIVASTAVA et al., 2005; SHAH et al., 2013). De fato, cerca de 64% das drogas utilizadas atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de protótipos naturais (**Figura 3**) (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os distintos mecanismos de ação dos antineoplásicos derivados de plantas, tais como interação com DNA, inibição enzimática e interação com outras proteínas visam à interrupção do ciclo celular de células cancerosas, tendo como a característica farmacológica mais desejada o máximo de distinção entre estas células malignas e normais (BRANDÃO et al., 2010).

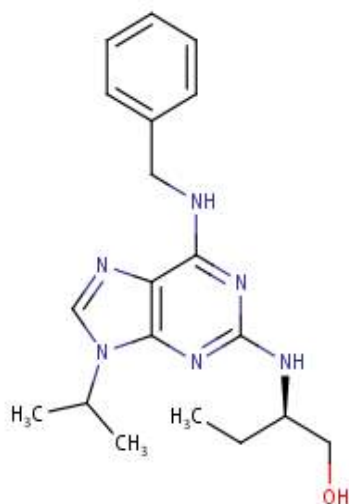
Figura 3 - Alguns compostos naturais e derivados de produtos naturais utilizados no tratamento do câncer.



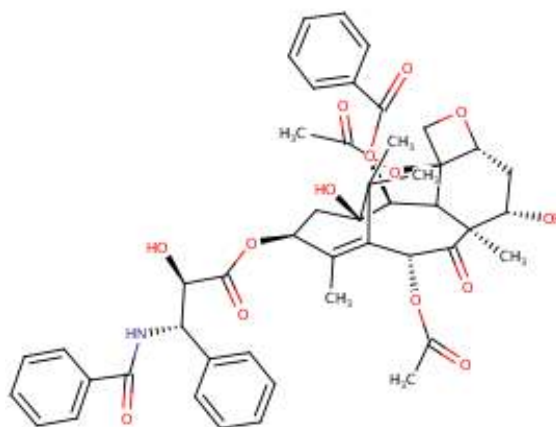
a) Camptotecina



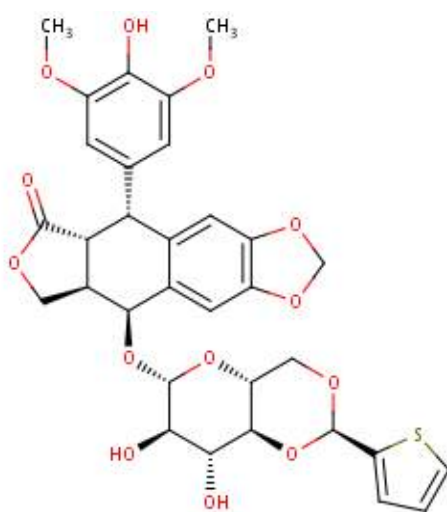
b) Flavopiridol



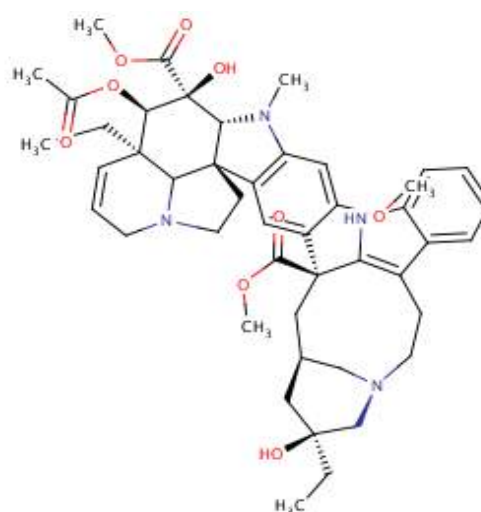
c) Roscovitine



d) Taxol



e) Teniposido

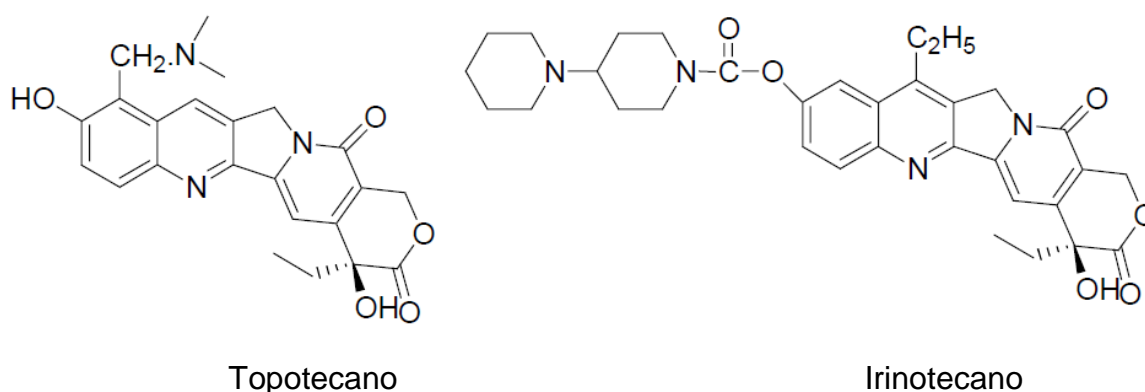


f) Vinblastina

Fonte: PDB (2014).

O composto camptotecina demonstrou promissora atividade antitumoral em ensaios clínicos preliminares, atuando como inibidor da síntese de ácidos nucleicos em células de mamíferos e um potente indutor de quebras das cadeias de DNA cromossômico, mas apresenta também baixa solubilidade e reações adversas a medicamentos. É um alcalóide isolado a partir da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*. Vários análogos semi-sintéticos de camptotecina têm demonstrado atividade antitumoral como o topotecano e irinotecano (**Figura 4**), que demonstraram ação contra carcinomas de mama, fígado e próstata (HSIANG et al., 1985; SRIVASTAVA et al., 2005; PDB, 2014).

Figura 4 - Moléculas dos análogos semi-sintéticos de camptotecina com atividade antitumoral.



Fonte: Adaptado de Srivastava et al. (2005).

Flavopiridol é um flavonóide sintético baseado originalmente em compostos purificados de *Dysoxylum binectariferum*, uma planta originária da Índia muito utilizada na medicina popular. Ele funciona inibindo quinases, e interferindo na divisão celular e causando apoptose em células cancerosas. É Investigado para tratamento de linfomas e de leucemia linfóide e cânceres de esôfago, pulmão e fígado (SEDLACEK et al., 1996; PDB, 2014).

Roscovitina é um derivado de olomucine, originalmente isolado a partir dos cotilédones do rabanete *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae), mas que agora é produzido sinteticamente. Estimulou o interesse para tratamento do câncer em virtude da sua inibição da CDKs (*Ciclin Dependent Kinases* -

Quinases dependentes de ciclina), que desempenham um papel importante na progressão do ciclo celular (CRAGG; NEWMAN, 2005).

O Paclitaxel (Taxol[®]) é um diterpenóide complexo polioxigenado isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) indicado, atualmente, como primeira linha e posterior na terapia para o tratamento de carcinoma avançado de ovário, e outros cânceres, incluindo os de mama. Inicialmente, o paclitaxel (Taxol[®]) mostrou resultados promissores nas fases I e II em cânceres de pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e foi aprovado pelo FDA para tratamento de metástase de carcinoma de ovário (EISENHAUER; VERMORKEN, 1998). Apesar de ter sido a droga mais vendida no ano de 2000, o paclitaxel apresenta baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água (SCHIFF et al., 1979) e causa fortes náuseas, formigamento nos pés e mãos, leucopenia e trombocitopenia. Alguns anos depois surgiu o Docetaxel (Taxotere[®]), um análogo estrutural com propriedades farmacológicas melhores que o taxol (atividade antitumoral e solubilidade aquosa), sendo usado no tratamento de pacientes com metástase avançada de câncer de mama e de pulmão, embora cause supressão da medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos e alopecia (RINGEL; HORWITZ, 1991). Com solubilidade 1.800 vezes maior que o paclitaxel, a pró-droga Isotaxel surgiu como uma molécula inativa, mas após 12 min em pH fisiológico ocorre a conversão do isotaxel a taxol (HAYASHI et al., 2003). Já o Nab-paclitaxel (ABI-007; Abraxane[®]) é uma nova formulação do paclitaxel que dispensou o uso do cremofor como solvente, diminuiu os efeitos colaterais (neuropatia periférica e neutropenia, principalmente) e aumentou a eficácia do tratamento quando comparada ao paclitaxel e docetaxel (ISMAEL et al., 2008).

Há alguns anos foi relatada a presença do paclitaxel em uma espécie vegetal africana (*Dacrydioides gracilior* Pilger) pertencente à família Podocarpaceae, sendo o primeiro relato da presença deste composto em plantas fora da família Taxaceae (WANI et al., 1971; STAHLHUT et al., 1999; PDB, 2014).

O Teniposideo é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, a principal substância ativa da resina de podofilina, a qual se origina de plantas das espécies *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*. A podofilotoxina revelou capacidade em causar parada do ciclo celular na metáfase devido ao

bloqueio irreversível da atividade catalítica da DNA topoisomerase II. O complexo molécula - DNA topoisomerase II induz quebras na cadeia dupla do DNA e impede a reparação por topoisomerase II. As quebras acumuladas no DNA evitam que as células entrem na fase mitótica do ciclo celular e conduzem à morte celular por apoptose. As moléculas podofilotoxina, tenoposideo e etoposideo tem mostrado atividade citotóxica e antitumoral experimental e clinicamente comprovadas para tumores de Wilms, de pulmão, linfomas, leucemia aguda, pulmão, cérebro e contra vários cânceres genitourinários (ovário, bexiga e teratomas) (DIAS et al., 2006; PDB, 2014).

A vinblastina é um alcalóide da vinca estruturalmente constituído por duas unidades semelhantes: vindolina e catarantina que teve suas propriedades antitumorais reconhecidas no final da década de 1960. Inicialmente, extratos da planta *Catharanthus roseus* foram investigados por causa de propriedades hipoglicemiantes, mas foram observadas supressão da medula em ratos e efeitos antileucêmicos *in vitro*. Moléculas estruturalmente semelhantes tais como a vindesina, vinorelbina e vincristina interferem na polimerização normal dos microtúbulos do fuso mitótico e do citoesqueleto e tem sido usado no tratamento de tumores de rins, testículos, cabeça e pescoço, coriocarcinomas, leucemia linfocítica aguda, pulmão e mama (SRIVASTAVA et al., 2005; PDB, 2014).

Por meio da aquisição de novas tecnologias, melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela progressão do câncer e da ação dos fármacos, algumas dessas moléculas citadas anteriormente foram descartadas por não apresentarem atividade satisfatória em testes clínicos, ou elevada toxicidade, estão sendo novamente investigadas e/ou modificadas quimicamente na tentativa de obtenção de protótipos mais adequados do ponto de vista da toxicidade, solubilidade em água e biodisponibilidade (BRANDÃO et al., 2010). Logo, a pesquisa por novas substâncias com potencial antitumoral é uma constante exigência de grande importância para a saúde pública. Análises criteriosas apontaram um cenário com grande heterogeneidade de formações vegetais e alta diversidade de espécies quando se compara o semiárido brasileiro com outros estudos desenvolvidos no mundo (LEAL et al., 2003). Essa abundância de nichos e associações biológicas sugere também que

exista uma grande quantidade de substâncias farmacologicamente ativas ainda pouco estudadas (FARIAS et al., 2013).

Cinco tipos de vegetações brasileiras apresentam uma abundância de plantas nativas com carência de estudos químicos e farmacológicos completos: floresta amazônica, mata atlântica, cerrado, pantanal e caatinga. Esta última é predominante na região semiárida do nordeste brasileiro (BRITO; BRITO, 1993).

Na **Tabela 3**, estão citadas algumas espécies vegetais com ocorrência na região nordeste brasileira, relatadas em levantamentos etnofarmacológicos graças as suas indicações de uso como antitumorais.

Tabela 3 - Espécies vegetais com ocorrência na região semiárida brasileira citadas em trabalhos etnofarmacológicos com potencial ação citotóxica e/ou antitumoral.

Espécie	Parte utilizada	Referência
Amaranthaceae <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	folha, planta inteira	Albuquerque et al. (2007)
Anacardiaceae <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allem.	casca, semente	Oliveira et al. (2010) Ferreira et al., (2011) Farias et al. (2013)
Apocynaceae <i>Himatanthus drasticus</i> Mart.	látex	Lucetti et al. (2010) Sousa et al. (2010)
Bignoniaceae <i>Tabebuia impetiginosa</i> Mart.	casca, entrecasca, flor	Albuquerque et al. (2007) Melo et al. (2011b)
Combretaceae <i>Combretum</i> sp.	folha, haste	Albuquerque et al. (2007)
Euphorbiaceae <i>Euphorbia tirucalli</i> L.	látex, partes aéreas e folhas	Oliveira et al. (2010) Melo et al. (2011a)
Euphorbiaceae <i>Cnidocolus obtusifolius</i> Pohl.	folha, flôr	Albuquerque et al. (2007)
Fabaceae <i>Vatairea macrocarpa</i> Ducke	planta inteira, raiz	Oliveira et al. (2010)
Fabaceae <i>Bauhinia forficata</i> Link	folha	Melo et al. (2011a) Lim et al. (2006)
Fabaceae <i>Anadenanthera colubrina</i> Brenan	caule, casca, fibra, flôr, folha, fruto	Melo et al. (2011a) Silva et al. (2011)
Fabaceae <i>Senna occidentalis</i> Link	folha, semente, raiz	Melo et al. (2011a)
Fabaceae <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.	folha	Monção et al. (2014) Silva et al. (2014)
Lamiaceae <i>Hyptis martiusii</i> Benth.	raiz	Costa-Lotufu et al. (2004) Araújo et al. (2006)
Papaveraceae <i>Chelidonium majus</i> L.	planta inteira	Melo et al. (2011b)
Passifloraceae <i>Turnera ulmifolia</i> L.	raiz, folha, planta inteira	Albuquerque et al., (2007)

Piperaceae		
<i>Piper tuberculatum</i> L.	raíz	Costa-Lotufo et al. (2010)
Rubiaceae	fruto, exsudado do caule, folha	Souza et al. (2013)
<i>Morinda citrifolia</i> L.		
Rubiaceae	raíz, rizomas	Souza et al. (2013)
<i>Psychotria ipecacuanha</i> Stokes		
Rubiaceae	raíz	Fernandes et al. (2013)
<i>Galianthe thalictroides</i> Schum.		
Rubiaceae	caule, folha, flor, raíz	Souza et al. (2013)
<i>Uncaria tomentosa</i> Willd		
Scrophulariaceae	raíz	Costa-Lotufo et al. (2010)
<i>Capraria biflora</i> L.		
Salicaceae	folhas	Ferreira et al. (2010)
<i>Casearia sylvestris</i>		
Solanaceae	folha	Melo et al. (2011a)
<i>Capsicum frutescens</i> L.		
Xanthorrhoeaceae	folha, raíz, caule e seiva	Melo et al. (2011a)
<i>Aloe vera</i> Burm.		
Xanthorrhoeaceae	folha	Melo et al. (2011a) Melo et al. (2011b)
<i>Aloe arborescens</i> Mill		
Ximeniaceae	casca	Oliveira et al. (2010)
<i>Ximenia americana</i> L.		

O entendimento da ação citotóxica é de extrema importância. Na pesquisa realizada por Farias et al. (2013) o extrato etanólico da semente da espécie *Myracrodruon urundeuva* da família Anacardiaceae (Aroeira-do-sertão), demonstrou atividade citotóxica e cerca de 20% de atividade hemolítica na concentração de 1,9 mg/mL, sugerindo que essa atividade de inibição do crescimento celular ocorra devido à danos à membrana plasmática.

O látex extraído da espécie vegetal *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) é também indicado para o tratamento de câncer, sendo citado como tóxico pela literatura, quando utilizado em quantidade superior a duas gotas (OLIVEIRA et al., 2010). Valadares et al. (2006) sugeriu que as propriedades antitumorais

desempenhada por essa espécie seja devido ao possível mecanismo de regulação dos granulócitos e produção de macrófagos com a expressão das atividades funcionais.

No trabalho realizado por Melo et al. (2011a) a moléculas silibinina, β -lapachona, plumbagina e capsaicina extraídas das espécies vegetais *Silybum marianum* Gaertn. (Asteraceae), *Tabebuia impetiginosa* Standl. (Bignoniaceae), *Plumbago scandens* L. (Plumbaginaceae) e *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) respectivamente foram relatadas como promissoras nos estudos antitumorais *in vitro* e *in vivo*, sendo sugeridos posteriores estudos clínicos para essas moléculas.

3.5 CONCLUSÃO

As plantas medicinais, apresentam-se como a principal fonte de moléculas antitumorais em uso atualmente para o tratamento clínico, embora as espécies vegetais presentes no Nordeste do Brasil ainda sejam pouco estudadas quanto ao seu potencial antiproliferativo *in vitro* e *in vivo*, uma vez que a maioria dos estudos realizados apenas relatam a atividade citotóxica e não aprofunda sobre o mecanismo de ação dessas moléculas.

REFERÊNCIAS

ACS. **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2013. 64 p.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; MONTENEGRO, R. C.; NOGUEIRA, M.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, n. 1, p. 177-183, 2006.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica nº 90 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o Guia**

para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRITO, A. R.; BRITO, A. A. Forty years of brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 53-67, 1993.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C.; LIMA, M. A.; MORAES, M. E.; PESSOA, C.; SILVIERA, E. R.; MORAES, M. O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Die Pharmazie**, v. 59, n. 1, p. 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

DEWICK, P. M. Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. Trease and Evans' pharmacognosy. **Londres: Saunders**, v.42, n. 246, p. 409-425, 1996.

DIAS, M. F. R. G.; SÁ, R. P.; SAMPAIO, F. M. S.; MACHADO, P. V.; MILLER, W. M.; KADI, N. T.; NERY, J. A. C. Evaluation of podofilotoxina 0,15% for treatment of hpv lesions. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 3, p. 194-199, 2006.

EISENHAUER, E. A., VERMORKEN, J. B. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, v. 55, n.1, p. 5-30, 1998.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade UFRGS, 2001. p. 91-103.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FERNANDES, L. M.; GARCEZ, W. S.; MANTOVANI, M. S.; FIGUEIREDO, P. O.; FERNANDES, C. A.; GARCEZ, F. R.; GUTERRES, Z. R. Assessment of the in vitro and in vivo genotoxicity of extracts and indole monoterpene alkaloid from the roots of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, n. 1, p. 405-411, 2013.

FERREIRA, N. S. A. As pesquisas denominadas “estado da arte”. **Educação & Sociedade**, v. 23, n. 79, 2002.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; ARAÚJO, E. J. F.; SILVA, J. N.; FREITAS, R. M.; COSTA, N. D. J.; OLIVEIRA, S. F. C.; PEREIRA, J. B. A.; PINHEIRO, J. A. F.; ABREU, M. C. PESSOA, C. **Safety and Efficacy of Moringa oleifera Lamarck (1785) — Therapeutic and Toxicological Properties**. In: GOWDER, S. J. T. Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science "Pharmacology and Therapeutics". Ed. InTech, Croacia. 2014. p. 179-205.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciências**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GOMES, E.; ELPO, E. R. S.; GABRIEL, M. M.; M. LOPES. Plantas medicinais com características tóxicas usadas pela população do município de Morretes, PR. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 77-80, 2001.

GUERRA, M. R.; Gallo, C. V. M.; Mendonça, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HAYASHI, Y.; SKWARCZYNSKI, M.; HAMADA, Y.; SOHMA, Y.; KIMURA, T.; KISO, Y. A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel. **Journal Medicinal Chemistry**, v.46, n. 18, p. 3782-3784, 2003.

HSIANG, Y. H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S.; LIU, L. F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 27, p. 14873-14878, 1985.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126 p.

ISMAEL, G. F. V.; ROSA, D. D.; MANO, M. S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 1, p. 81-91, 2008.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Ecologia e conservação da Caatinga: uma introdução ao desafio. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: EDUFPE, 2003. p. 13-16.

LIM, H.; KIM, M. K.; LIM Y.; CHO, Y. H.; LEE, C. H. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cell sby HY52, an ovelcyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. **Cancer letters**, v. 233, n. 1. p. 89-97, 2006.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C.; BANDEIRA, M. A.; VERAS, H. N.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 60, p. 1-11, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, JR.; VALDIR, F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Viçosa. 2003, 220 p.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-14, 2011a.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Phytochemical and pharmacological notes of plants indicated to treat tumors in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 4, p. 744-753, 2011b.

MONÇÃO, N. B. N.; COSTA, L. M.; DIAS, R. A. D.; ARAÚJO, B. Q.; CARMO, G. L. M.; FRANÇA, R. K. A.; AMORIM, C. F. A.; COSTA, A. P. R.; CITÓ, A. M. G. L. Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 39, p. S456-S462, 2014.

MOREIRA, W. Revisão de literatura e desenvolvimento científico: conceitos e estratégias para confecção. **Janus, Lorena**, v. 1, p. 20-30, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras , semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OLIVER, J. El consumo de hierbas medicinales como causa de hepatotoxicidad. **Salud i Ciência**, v. 17, n. 8, p. 775-777, 2010.

Protein Data Bank (PDB). Disponível em: <<http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **Journal National Cancer Institute**, v. 83, n. 4, p.288-291, 1991.

ROUHI, A. M.; WASHINGTON, E. Rediscovering natural products. **Chemical and Engineering News**, v. 81, n. 41, p. 77-91, 2003.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. **Natural**, v. 277, n. 22, p. 665-667, 1979.

SEDLACEK, H.; CZECH, J.; NAIK, R.; KAUR, G.; WORLAND, P.; LOSIEWICZ, M.; PARKER, B.; CARLSON, B.; SMITH, A.; SENDEROWICZ, A.; SAUSVILLE, E. Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. **International Journal of Oncology**, v. 9, n. 6, p. 1143-1168, 1996.

SEEFF, L. B. Herbal Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, v. 11, n. 3, p. 577-596, 2007.

SHAH, U.; SHAH, R.; ACHARYA, S.; ACHARYA, N. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 16-23, 2013.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: A review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2011.

SILVA, M. J. D.; CARVALHO, A. J. S.; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SILVA, M. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 64-69, 2014.

SILVEIRA, P. F. DA; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, E. L.; GRANGEIRO, A. R. S.; BASTOS, I. V. G. A.; RODRIGUES, G. C. R.; ANJOS, F. B. R.; SOUZA, I. A.; SOUSA, C. E. L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 199-203, 2010.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Ethnobotanical , phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5892-5908, 2005.

STAHLHUT, R.; PARK, G.; PETERSEN, R.; MA, W.; HYLANDS, P. The occurrence of the anti-cancer diterpene taxol in *Podocarpus gracilior* Pilger (Podocarpaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 6, p. 613-622, 1999.

VALADARES, M. C.; CARRUCHA, S. G.; ACCORSI, W.; QUEIROZ, M. L. S. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumor-bearing mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 294-299, 2006.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, Â. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WANG, H. K. Plant-derived anticancer agents currently in clinical use or in clinical trials. **IDrugs : The Investigational Drugs Journal**, v. 1, n. 1, p. 92-102, 1998.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents: vi. the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

WHO, W. H. O. **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines.** Roma: WHO, 2002. 203 p.

CAPÍTULO II**4 Triagem antioxidante e toxicológica de plantas do semiárido brasileiro**

Triagem antioxidante e toxicológica de plantas do semiárido brasileiro

Jurandy Nascimento SILVA¹, Nayana Bruna Nery MONÇÃO², Antônia Maria das Graças Lopes CITÓ^{1,2}, Ruth Raquel Soares de FARIAS², Mariana Helena CHAVES², Alessandro de LIMA³, Paulo Michel Pinheiro FERREIRA^{1,4}.

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, PI - Brasil.

²Departamento de Química/Programa de Pós-Graduação em Química, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

³Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Fedetal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *Campus* Teresina Zona Sul, 64.018-000, Teresina, PI – Brasil.

⁴Departamento de Biofísica e Fisiologia, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

RESUMO

Substâncias com propriedades antioxidantes e citotóxicas vem se destacando em virtude da relação existente entre os radicais livres e a etiologia de várias patologias e as citotóxicas pelos seus promissores uso pela indústria farmacêutica para elaboração de fitoterápicos para tratamento ou prevenção de doenças, como o câncer. As amostras foram obtidas na forma de extratos e frações, de 12 espécies vegetais endêmicas do bioma semiárido brasileiro. A capacidade antioxidante dos extratos e frações foi medida pelo monitoramento da mudança na absorbância pelos métodos ABTS e DPPH. Para realização do ensaio de toxicidade aguda utilizou-se o bioindicador *Artemia salina*. A capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) apresentou valores variando entre 0,7 e 31,4 mM de Trolox/g de amostra para ensaio com o cátion radical ABTS^{•+}, os extratos etanólicos das folhas das espécies *Combretum mellifluum* e *Terminalia actinophylla* apresentaram os melhores resultados. Para o ensaio utilizando o radical DPPH[•] foram encontrados valores entre 0,2 a 3,5 mM de Trolox/g de amostra, a fração aquosa dos galhos da espécie *Oxandra sessiliflora* apresentou melhor ação degradante para esse radical. A fração diclorometano das folhas da espécie *Anadenanthera colubrina* demonstrou resultados promissores na busca de novas substâncias citotóxicas naturais, com CL₅₀ de 23,7 µg/mL. Essa previa caracterização encoraja a continuidade dos estudos, com as amostras que apresentaram resultados promissores.

Palavras-chaves: Antioxidante. Toxicidade. Plantas. Semiárido brasileiro

ABSTRACT

The importance of substances with antioxidant and cytotoxic properties and is gaining prominence in the scientific community because of the relationship between free radicals and the etiology of many diseases and cytotoxic for its promising use by the pharmaceutical industry for the manufacture of herbal medicines for treating or preventing diseases like cancer. Samples were obtained in the form of extracts and fractions of 12 plant species endemic of the Brazilian semi-arid biome. The antioxidant activity of the extracts and fractions was measured by monitoring the change in absorbance by ABTS and DPPH methods. To perform the acute toxicity test used the bioindicator *Artemia salina*. The equivalent antioxidant capacity to Trolox (TEAC) showed values ranging between 0.7 and 31.4 mM Trolox/g of test sample with radical cation ABTS^{•+}, the ethanol extracts of the leaves of the species *Combretum mellifluum* and *Terminalia actinophylla* submitted best results. For the test using the radical DPPH[•] values were found between 0.2 and 3.5 mM Trolox/g sample, the aqueous fraction of the branches of the species showed better *Oxandra sessiliflora* degrading action for this radical. The dichloromethane fraction from the leaves of species *Anadenanthera colubrina* demonstrated promising results in finding new natural cytotoxic substances with LC₅₀ 23.7 µg/mL. This characterization foresaw encourages continuing studies, with amostas that showed promising results.

Keywords: Antioxidant, Toxicity, Plant, Brazilian semiarid

4.1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido uma fonte rica para exploração de novas moléculas com finalidade terapêutica. Cerca de 63% dos medicamentos consumidos por 20% da população são alopáticos. O restante consome produtos *in natura*, originados, na maioria das vezes de plantas, como os fitoterápicos (FOGLIO et al., 2006).

Estratégias de desenvolvimento de fármacos com base em derivados de compostos naturais podem apresentar uma considerável série de obstáculos que não são colocados por aqueles que utilizam síntese racional, desde a aquisição devido à falta de acesso aos locais de coleta, dificuldades com o isolamento e produção do ingrediente farmacologicamente ativo e disputas jurídicas graves entre os governos sobre as propriedades de direitos intelectuais. Mesmo assim, o sucesso do rastreio de produtos naturais parece mais provável do que quando comparada com a triagem de compostos racionalmente concebidos (MANS et al., 2000).

A busca por moléculas antioxidantes, principalmente derivadas de frutas e vegetais, vem aumentando consideravelmente devido ao fato do estresse oxidativo participar diretamente na gênese e evolução de várias patologias como, por exemplo, o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, enfermidades neurológicas (Alzheimer e Parkinson, por exemplo) e no processo de envelhecimento precoce (RAHMAN, 2007; ALAM et al., 2013).

A oxidação é definida quimicamente como a transferência de elétrons entre átomos que ocorre naturalmente presente nos processos metabólicos das células humanas que pode ser exacerbado por substâncias pró-oxidantes ou originar radicais livres reativos causadores de danos oxidativos. Os radicais livres são produzidos majoritariamente nas organelas citoplasmáticas e estão envolvidos em reações bioquímicas, na produção de energia, sinalização intracelular e fagocitose. Porém em excesso causam efeitos deletérios em várias moléculas como DNA, proteínas, lipídios e constituintes da membranas celulares o que leva a distúrbios degenerativos coletivamente conhecidos como estresse oxidativo (ALVES et al., 2010).

Dentre as espécies reativas, destacam-se as derivadas de oxigênio (EROs), as derivadas de nitrogênio (ERNs) resultantes da decomposição do

óxido nítrico (NO) e as derivadas de enxofre (EREs) formadas a partir de reações de tióis com EROs. Por sua vez, as EROs incluem os radicais livres ânion superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$) e radical hidroperoxila ($HO_2\cdot$). Esses radicais surgem durante o exercício físico intenso, em processos isquêmicos e inflamatórios e na metabolização de xenobióticos podendo interagir com um grande número de moléculas orgânicas (ABDALLA; FAINE, 2008; CAROCHO; FERREIRA, 2013; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Os antioxidantes são substâncias que inibem o processo de oxidação favorecendo a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção de elementos prejudiciais ao organismo e protegendo contra os danos oxidativos. Tipicamente, as defesas antioxidantes tem origem enzimática, com destaque para a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), ou não enzimática, na qual se enquadram produtos de origem exógena adquiridos por meio da dieta, como as vitaminas (tocoferóis e ascorbato), carotenóides, compostos fenólicos, quelantes e produtos sintéticos. Enquanto as enzimas impedem a produção de radicais livres, os antioxidantes não enzimáticos bloqueiam e previnem o estresse oxidativo ao sequestrar espécies reativas. O organismo conta ainda com sistemas específicos de reparo do DNA constituído por proteases e fosfolipases modulados de acordo com fatores ambientais e genéticos. Existem várias metodologias que avaliam a capacidade antioxidante *in vitro* de produtos naturais e sintéticos. Contudo, cada uma delas avalia aspectos diferentes o que torna difícil caracterizar as propriedades antioxidantes pautado em apenas um teste ou mesmo a escolha de um ensaio ideal (GUARATINI et al., 2007; RAHMAN, 2007; ABDALLA; FAINE, 2008; CHANDA; DAVE, 2009; ALVES et al., 2010; BADARINATH et al., 2010; ALAM et al., 2013).

Diversos estudos descrevem a ocorrência de metabólitos secundários de plantas dotados de propriedades antioxidantes. Essas substâncias pertencem aos mais variados grupos químicos, dentre os quais podem ser citados, os compostos nitrogenados, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos e os compostos não nitrogenados, como é o caso dos taninos, flavonóides, terpenos e antocianinas. Esses constituintes bioativos são alvos de novos estudos para a elucidação de potenciais fármacos antioxidantes (DALLAQUA;

DAMASCENO, 2011; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; RÉGO JR. et al., 2011).

Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga é, provavelmente, o mais desvalorizado e mal conhecido botanicamente, sendo o tipo de vegetação que cobre a maior parte da área com clima semiárido da região Nordeste do Brasil. Esse bioma contém uma grande variedade de tipos vegetacionais, com elevado número de espécies e também remanescentes de vegetação ainda bem preservada, que incluem um número expressivo de táxons raros e endêmicos (GIULIETTI et al., 2004)

Sua utilização inadequada está levando ao desaparecimento de algumas espécies e à consequente perda da biodiversidade (KIILL et al., 2007), uma vez que ela têm sofrido grande extrativismo dos recursos, com perdas de diversidade biológica associadas ao fornecimento de madeira e extratos vegetais (SILVA e FREIRE, 2010).

O estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga é um dos maiores desafios da ciência brasileira, pois encontrar-se entre as regiões naturais menos estudadas. Além disso, é a região menos protegida, uma vez que as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território, assim fica despercebido um extenso processo de alteração e deterioração ambiental acirrado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região. Atualmente, mais de 50% da área de Caatinga já foi alterada ou comprometida, e a perda da cobertura vegetal pode ser considerada como a principal prova da diminuição da diversidade (KIILL et al., 2007). Segundo Silva et al. (2011) muitas espécies de plantas encontradas na Caatinga têm sido amplamente utilizadas na medicina popular e para a produção comercial de produtos fitoterápicos.

Assim, diante do potencial farmacológico das plantas do semiárido brasileiro (FERREIRA et al., 2011; FARIAS et al., 2013) e como forma de agregar valores aos produtos regionais, essa parte do trabalho teve como objetivo realizar uma triagem do potencial antioxidante e toxicológico de extratos de diferentes espécies de plantas do semiárido.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das amostras vegetais

Para obtenção das 36 amostras na forma de extratos e frações foram utilizadas 12 espécies vegetais endêmicas da região semiárida brasileira. A **Tabela 1** apresenta uma lista das espécies utilizadas, o nome vulgar, a família a qual pertence, o número de registro de identificação junto ao Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, as partes utilizadas da planta no estudo, a identificação das amostras e suas respectivas siglas utilizadas ao longo do estudo. A extração das amostras foi realizada no departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Piauí sob a coordenação das professoras Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Dra. Mariana Helena Chaves.

As partes das plantas utilizadas foram secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó fino em moinho de facas. O material obtido foi submetido a maceração com EtOH (10x) na proporção 1:4 de material vegetal/solvente (m/v) com sonicação em banho de ultrassom por 30 minutos a cada dia. A fase orgânica (sobrenadante) foi submetida à filtração simples no intervalo de 3 dias e o extrato etanólico reunido foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo. Após a remoção do solvente, o extrato foi liofilizado obtendo-se o extrato etanólico bruto (E.EtOH). Parte desse extrato foi destinada ao processo de partição líquido – líquido. Onde parte do E.EtOH obtido inicialmente foi suspenso em MeOH/H₂O (2:1/v:v). Uma parte da fase hidroalcoólica foi utilizada e outra extraída exaustivamente com hexano (6x), com diclorometano (6x) e com acetato de etila (6x) e, por fim, foi coletada também a fração aquosa resultante da partição. Todos os extratos e frações utilizados foram liofilizados (**Figura 1**).

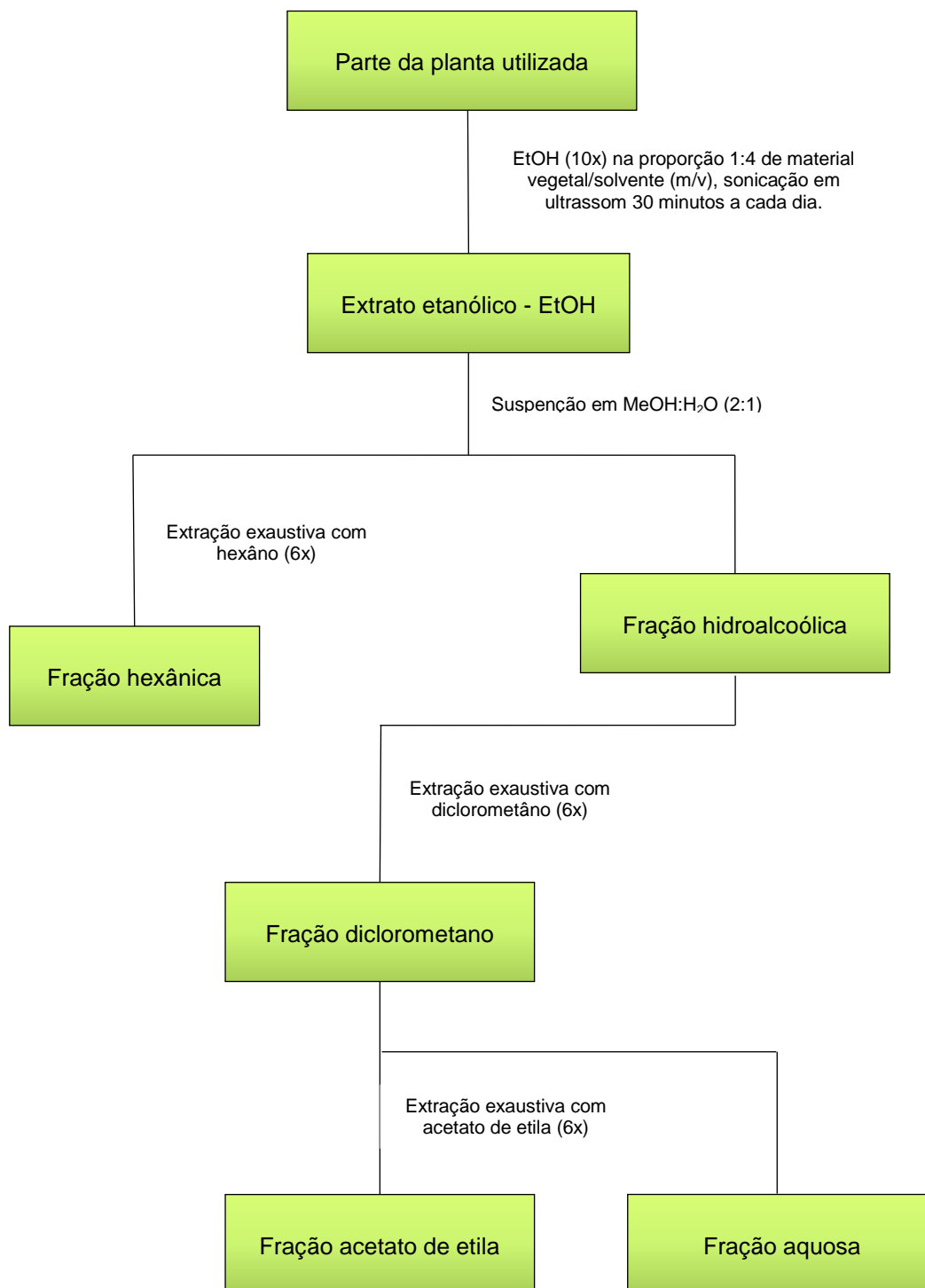
Tabela 1 - Espécies vegetais utilizadas no estudo.

	Família/Espécie	NV	Excicata	PU	Descrição da amostra	Sigla
1	Fabaceae <i>Piptadenia moniliformis</i> Benth	Jurema-preta	TEPB 27.739	fo	Fração hexânica	FHF-Pmon (1)
					Fração diclorometano	FDF-Pmon (2)
					Fração aquosa	FAF-Pmon (3)
2	Fabaceae <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth	Sabiá	TEPB 26.824	cs	Fração hexânica	FHC-Mcae (4)
					Fração diclorometano	FDC-Mcae (5)
					Fração Aquosa	FAC-Mcae (6)
3	Fabaceae <i>Anadenanthera colubrina</i> Brenan	Angico escuro	TEPB 27.881	fo	Fração hexânica	FHF-Acol (7)
					Fração diclorometano	FDF-Acol (8)
					Fração acetato de etila	FACF-Acol (9)
4	Fabaceae <i>Bauhinia pulchella</i> Benth.	Mororó de boi	TEPB 17.161	fo	Extrato hexânico	EHF-Bpul (10)
					Extrato etanólico	EEF-Bpul (11)
					Extrato Aquoso	EAF-Bpul (12)
5	Fabaceae <i>Senna acuruensis</i> Benth.	Canela de velho	TEPB 17.193	fo	Extrato hexânico	EHF-Sacu (13)
					Extrato etanólico	EEF-Sacu (14)
					Extrato Aquoso	EAF-Sacu (15)
6	Clusiaceae <i>Platonia insignis</i> Mart.	Bacuri	TEPB 20.701	cs	Fração hexânica	FHC-Pins (16)
					Extrato etanólico	EEC-Pins (17)
					Fração aquosa	FAC-Pins (18)

7	Annonaceae	Conduru-preto	TEPB 18.820	ga	Fração hexânica	FHG-Oses (19)
	<i>Oxandra sessiliflora</i> R.E.Fr.				Extrato etanólico	EEG-Oses (20)
					Fração aquosa	FAG-Oses (21)
8	Combretaceae	Vaqueta	TEPB 27.969	fo	Extrato hexânico	EHF-Cdua (22)
	<i>Combretum duarteanum</i> Cambess.				Extrato etanólico	EEF-Cdua (23)
					Extrato Aquoso	EAF-Cdua (24)
9	Combretaceae	Mofumbo	TEPB 28.192	fo	Extrato hexânico	EHF-Cmel (25)
	<i>Combretum mellifluum</i> Eichler				Extrato etanólico	EEF-Cmel (26)
					Extrato Aquoso	EAF-Cmel (27)
10	Combretaceae	Chapada	TEPB 27.990	fo	Extrato hexânico	EHF-Tact (28)
	<i>Terminalia actinophylla</i> Mart.				Extrato etanólico	EEF-Tact (29)
					Extrato Aquoso	EAF-Tact (30)
11	Bignoniaceae	Ipê do cerrado	-	fo	Extrato hexânico	EHF-Hoch (31)
	<i>Handroanthus ochraceus</i>				Extrato etanólico	EEF-Hoch (32)
					Extrato Aquoso	EAF-Hoch (33)
12	Bignoniaceae	Pau d'arco	-	fo	Extrato hexânico	EHF-Taur (34)
	<i>Tabebuia aurea</i>				Extrato etanólico	EEF-Taur (35)
					Extrato Aquoso	EAF-Taur (36)

NV: nome vulgar, TEPB: Teresina, Piauí, Brasil; PU: parte utilizada: Folhas (fo); Cascas (cs); Galhos (ga).

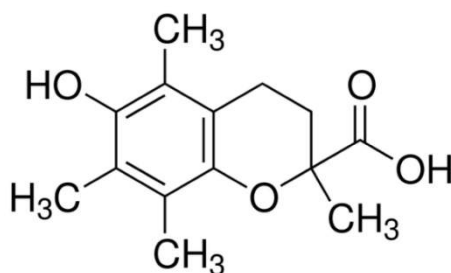
Figura 1 - Fluxograma do procedimento de obtenção dos extratos e frações utilizadas no estudo.



4.2.2 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante dos extratos e frações foi medida pelo monitoramento da mudança na absorbância do radical livre a 734 nm pelo método ABTS e a 517 nm pelo método DPPH, expressa em mM (milimolar) de Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) (**Figura 2**) por grama de amostra em base seca.

Figura 2 - Molécula do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico (Trolox[®]).

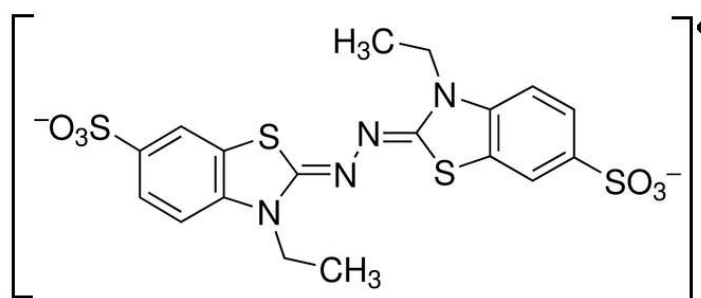


Fonte: SIGMA (2014a).

Método ABTS

O cátion radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) é um composto cromóforo quimicamente muito estável, solúvel em água e com um máximo de absorbância a 414 nm, incluindo medidas secundárias de absorbância a 645, 734 e 815 nm (MILLER et al., 1993). É solúvel tanto em solventes aquosos como orgânicos e não é afetado pela força iônica podendo então ser usado em muitos meios para determinar a capacidade antioxidante de extratos lipofílicos e hidrofílicos, o que lhe confere vantagem em relação a outros métodos (SCALFI et al., 2000; MAZZA et al., 2002; AWIKA et al., 2003). Para a determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS, usou-se a metodologia descrita por Re et al. (1999). Inicialmente, gerou-se o radical ABTS^{•+} (**Figura 3**) a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, incubação à temperatura ambiente e na ausência de luz por 12 horas.

Figura 3 – Cátion radical ABTS^{•+} - 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).

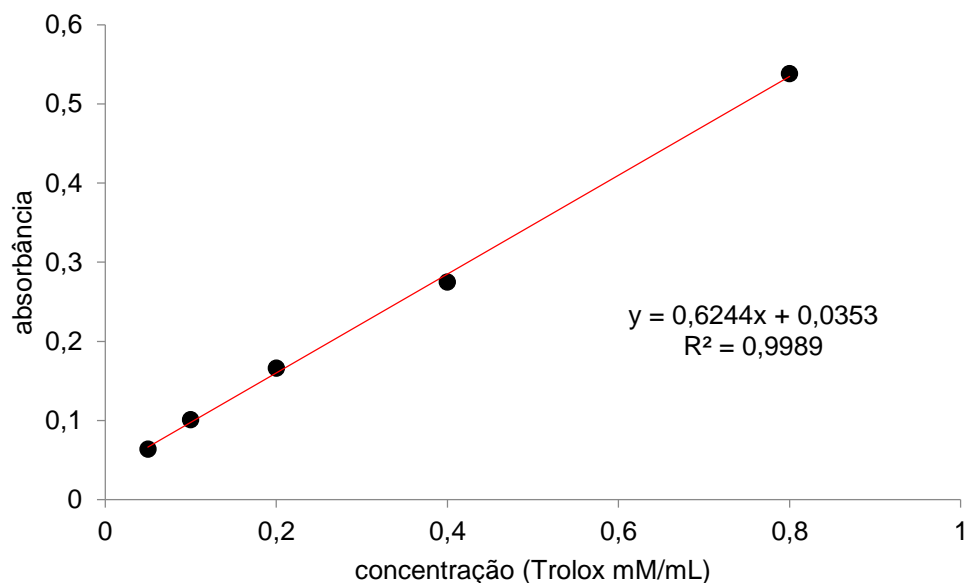


Fonte: adaptado de SIGMA (2014b).

Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até obter-se uma solução com absorvância de $0,70 \pm 0,01$ a 734 nm. As amostras foram diluídas em etanol até obter-se 20-80% de inibição do radical, e comparadas com a absorção do branco. Para realizar as medidas, foram adicionados 40 μL da amostra e 1960 μL da solução contendo o radical, determinando-se a absorvância em espectrofotômetro (PG Instruments Ltd[®], T80+ UV/VIS Spectrometer) a 734 nm, 30 min após o início da reação. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox[®] nas concentrações de 0,05 a 0,8 mM/mL diluído em etanol para construção da curva de calibração-resposta (**Figura 4**). Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mM de Trolox/g de amostra (TEAC) em base seca. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle, sendo também estabelecida a porcentagem de descoloração do radical ABTS^{•+}, conforme fórmula:

$$\% \text{ de proteção} = [(\text{abs controle} - \text{abs amostra}) / \text{abs controle}] \times 100$$

Figura 4 - Curva de calibração-resposta da inibição da solução de Trolox[®] em etanol (0,05 a 0,8 mM/mL) frente ao cátion radical ABTS^{•+} após 30 minutos de reação.

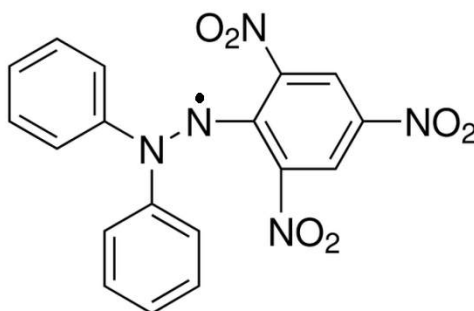


Método DPPH

O radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um dos poucos radicais nitrogenados estáveis que possui uma cor púrpura intensa. É comercialmente disponível e não necessita ser gerado antes do ensaio como acontece com o radical ABTS^{•+}, evitando sua geração por distintas formas, além de facilitar seu uso nos testes (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997; LIMA, 2008).

Essa metodologia consiste em determinar a capacidade de captura do radical livre DPPH[•] (**Figura 5**) pelos compostos antioxidantes presentes na amostra testada. Esse radical livre apresenta um máximo de absorbância na faixa de 515-520 nm. Após a adição do antioxidante, produz-se uma diminuição da absorbância, proporcional à concentração à atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS; CUEVELIER; BERSET, 1995).

Figura 5 - Molécula do radical livre DPPH[•] - 2,2difeníl-1-picril-hidrazila.

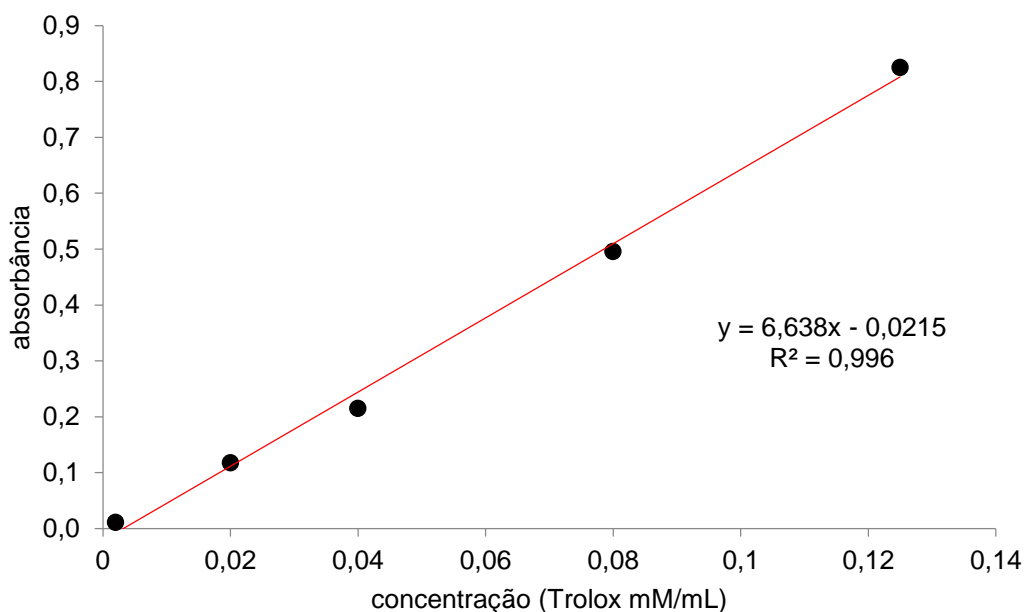


Fonte: SIGMA (2014c).

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações seguiu-se a metodologia descrita por Blois (1958) e adaptada por Brand-Williams et al. (1995). Adicionou-se a 1,5 mL de solução etanólica de DPPH[•] (6×10^{-5} M) uma alíquota de 0,5 mL da amostra testada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (PG Instruments Ltd[®], T80+ UV/VIS Spectrometer) a 517 nm, após 30 minutos do início da reação. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox[®] (0,002 a 0,125 mM/mL) diluído em etanol para construção da curva de calibração-resposta (**Figura 6**). Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mM de Trolox/g de amostra (TEAC) em base seca. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle, sendo também estabelecida a porcentagem de descoloração do radical DPPH[•], conforme fórmula:

$$\% \text{ de proteção} = \left[\frac{\text{abs controle} - \text{abs amostra}}{\text{abs controle}} \right] \times 100$$

Figura 6 - Curva de calibração-resposta da inibição da solução de Trolox[®] em etanol (0,002 a 0,125 Mm/mL) frente ao radical DPPH[•] após 30 minutos de reação.



Análises estatísticas

Os testes de atividade antioxidante foram realizados em duplicata (n=2) e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média (D.P.M.). Utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.0, foram realizadas análises de variância pelo teste ANOVA seguido Newman-Keuls. Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

4.2.3 Avaliação da toxicidade aguda

Artemia salina L. (Família Artemidae) é um microcrustáceo de água salgada (3 e 300 ppm) muito consumido por peixes e outros crustáceos no ambiente natural devido à riqueza de proteínas, vitaminas e sais minerais. Os náuplios de *A. salina* se reproduzem partogeneticamente e é uma espécie adaptada às mudanças ambientais de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido. Como seus ovos podem ser facilmente encontrados em lojas de piscicultura, bioensaios de toxicidade desse microcrustáceo apresentam praticidade e simplicidade que sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa (MEYER et al., 1982).

Para realizar o ensaio de toxicidade aguda, preparou-se uma solução salina artificial (NaCl 77,23%, MgSO₄ 9,62%, MgCl 7,13%, CaCl₂ 3,32%, KCl

2,11% e NaHCO_3 0,59%), utilizada como meio de cultura dos ovos latentes. Os ovos foram colocados no criadouro e a solução os cobriu totalmente. Este teste foi realizado de acordo com a metodologia proposta por McLaughlin (1991). Os ovos de *A. salina* foram eclodidos em água salina artificial e após 48 horas, os náuplios foram coletados para os bioensaios usando a característica de fototropismo positivo dos mesmos. As diluições das amostras e do teste em branco são realizadas em água do mar e 0,5 mL de dimetil sulfóxido concentrado.

Os extratos foram diluídos em triplicata nas concentrações de 50, 100, 500, 1000 e 1200 $\mu\text{g/mL}$, e 10 náuplios foram adicionados em cada tubo. Após 24 h de exposição, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos. Utilizou-se como controle positivo o dicromato de potássio (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) para determinação e confirmação da sensibilidade da técnica.

Análises estatísticas

Após 24 h de exposição, os náuplios vivos e mortos foram contados, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando submetidos a uma leve agitação e observados próximos a uma fonte luminosa. Os resultados foram em valores de CL_{50} e intervalos de confiança com 95% de significância para o método de Probit (IBM SPSS *Statistics* 20[®]).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Capacidade antioxidante *in vitro*

Os métodos para avaliar a atividade antioxidante utilizando os radicais ABTS^{*+} e DPPH^* consiste em verificar como os antioxidantes são capazes de degradar os radicais livres presentes nas amostras testadas. Inicialmente, obtêm-se o radical colorido; em seguida, adiciona-se o antioxidante (amostra); posteriormente, mede-se o decréscimo de absorbância produzido. Para o ensaio utilizando o radical ABTS^{*+} , evidenciamos valores TEAC variando entre 0,7 e 31,4 mM de Trolox/g de amostra em base seca. Dentre as 36 amostras

estudadas, os extratos etanólicos das folhas de *Combretum mellifluum* (26) e *Terminalia actinophylla* (29) apresentaram os melhores resultados para esse teste, com ambos os valores de TEAC de $31,4 \pm 0,2$ mM de Trolox/g de amostra e percentuais de proteção de $98,4 \pm 0,4$ e $97,8 \pm 0,7\%$, respectivamente.

Para o ensaio utilizando o radical DPPH^{*} encontramos valores entre 0,2 a 3,5 mM de Trolox/g de amostra em base seca (**Tabela 2**). Nesse teste, o extrato aquoso obtido dos galhos de *Oxandra sessiliflora* (21) apresentou a melhor ação sequestradora para esse radical, com valores de TEAC de $3,5 \pm 0,0$ mM de Trolox/g de amostra e percentual de proteção de $82,6 \pm 0,3\%$, respectivamente.

Tabela 2 - Valor TEAC (capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox[®]) e % de proteção pelos métodos ABTS e DPPH.

Amostras	TEAC (mM de Trolox/g de amostra)		% de Proteção	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
FHF-Pmon (1)	$6,0 \pm 1,6$	$0,2 \pm 0,1$	$47,4 \pm 5,3$	$2,8 \pm 1,6$
FDF-Pmon (2)	$1,4 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,1$	$9,2 \pm 4,1$	$15,0 \pm 2,3$
FAF-Pmon (3)	$30,1 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,2$	$94,1 \pm 0,1$	$19,1 \pm 4,4$
FHC-Mcae (4)	$11,7 \pm 1,1$	$1,6 \pm 0,5$	$39,9 \pm 0,7$	$33,6 \pm 1,0$
FDC-Mcae (5)	$2,7 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,1$	$13,5 \pm 0,9$	$61,1 \pm 1,7$
FAC-Mcae (6)	$29,7 \pm 0,0$	$1,8 \pm 0,1$	$93,01 \pm 0,1$	$42,0 \pm 3,2$
FHF-Acol (7)	$1,6 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,1$	$10,2 \pm 1,1$	$2,2 \pm 1,9$
FDF-Acol (8)	$20,4 \pm 1,7$	$2,4 \pm 0,0$	$65,5 \pm 4,9$	$55,0 \pm 0,8$
FAcF-Acol (9)	$15,5 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,3$	$52,3 \pm 1,4$	$33,5 \pm 0,7$
EHF-Bpul (10)	$0,7 \pm 0,7$	$0,2 \pm 0,1$	$3,4 \pm 2,1$	$1,8 \pm 2,5$
EEF-Bpul (11)	$9,5 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,1$	$33,4 \pm 1,4$	$23,1 \pm 1,4$
EAF-Bpul (12)	$10,7 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,2$	$36,5 \pm 1,1$	$29,7 \pm 0,4$
EHF-Sacu (13)	$5,7 \pm 1,9$	$0,6 \pm 0,0$	$22,3 \pm 5,6$	$11,0 \pm 1,2$
EEF-Sacu (14)	$17,9 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,1$	$58,2 \pm 0,9$	$45,8 \pm 2,3$

EAF-Sacu (15)	13,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1	44,1 ± 0,7	35,0 ± 2,4
FHC-Pins (16)	19,9 ± 0,6	0,8 ± 0,7	64,0 ± 1,9	10,9 ± 6,4
EEC-Pins (17)	14,8 ± 0,3	2,1 ± 0,1	49,1 ± 1,0	49,5 ± 1,7
FAC-Pins (18)	5,8 ± 1,3	1,5 ± 0,2	22,7 ± 3,9	34,3 ± 3,7
FHG-Oses (19)	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,1	3,3 ± 1,1	3,9 ± 3,5
EEG-Oses (20)	29,5 ± 0,2	3,3 ± 0,2	92,3 ± 0,4	77,5 ± 4,0
FAG-Oses (21)	16,4 ± 0,9	3,5 ± 0,0	53,8 ± 2,8	82,6 ± 0,3
EHF-Cdua (22)	11,6 ± 0,9	1,0 ± 0,2	39,6 ± 2,8	21,3 ± 4,7
EEF-Cdua (23)	24,0 ± 1,6	3,2 ± 0,0	76,1 ± 4,7	75,2 ± 1,0
EAF-Cdua (24)	30,8 ± 0,2	2,9 ± 0,1	96,0 ± 0,6	67,4 ± 1,3
EHF-Cmel (25)	6,1 ± 0,9	0,7 ± 0,2	23,6 ± 2,8	15,5 ± 4,1
EEF-Cmel (26)	31,4 ± 0,2	2,2 ± 0,0	98,0 ± 0,4	51,4 ± 0,3
EAF-Cmel (27)	22,4 ± 0,8	1,7 ± 0,1	67,9 ± 0,9	36,08 ± 0,3
EHF-Tact (28)	27,9 ± 0,6	2,5 ± 0,6	90,1 ± 1,3	53,1 ± 0,7
EEF-Tact (29)	31,4 ± 0,2	3,1 ± 0,0	97,8 ± 0,7	73,8 ± 1,0
EAF-Tact (30)	29,5 ± 0,2	2,6 ± 0,0	93,0 ± 0,6	61,5 ± 1,2
EHF-Hoch (31)	10,2 ± 1,0	1,7 ± 0,1	35,6 ± 3,0	39,6 ± 3,3
EEF-Hoch (32)	19,6 ± 0,4	1,7 ± 0,0	63,1 ± 1,1	38,6 ± 0,0
EAF-Hoch (33)	9,3 ± 0,6	1,8 ± 0,1	32,9 ± 1,9	40,9 ± 1,3
EHF-Taur (34)	15,7 ± 0,4	1,5 ± 0,2	49,3 ± 0,9	31,8 ± 1,6
EEF-Taur (35)	26,8 ± 1,0	2,0 ± 0,2	84,3 ± 2,9	47,1 ± 5,8
EAF-Taur (36)	20,1 ± 1,4	1,6 ± 0,0	63,2 ± 2,3	33,5 ± 0,1

FHF-fração hexânica das folhas, FDF-fração diclorometano das folhas, EHF-extrato hidroalcolico das folhas, FHC-fração hexânica da casca, FDC-fração diclorometano da casca, FAC-fração aquosa da casca, FAF-fração acetato de etila das folhas, EHF-extrato hexânico das folhas, EEF- extrato etanólico das folhas, EAF-extrato aquoso das folhas, FHG-fração hexânica dos galhos, EEG-extrato etanólico dos galhos, FAG-fração aquosa dos galhos. TEAC – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox[®], mM – milimolar. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (D.P.M.), com n=3.

4.3.2 Avaliação da toxicidade aguda

Utilizando a dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina* como ponto de corte (*cut-off*), destacaram-se vinte amostras com valores de CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (considerada como tóxica) e dezesseis amostras com valores de CL_{50} maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (considerada atóxica). Dentre as amostras testadas, a fração diclorometano das folhas de *Anadenanthera colubrina* (8) se destacou com um valor de CL_{50} de 23,7 $\mu\text{g/mL}$, considerada, portanto, como a mais tóxica. A utilização do controle positivo ($K_2Cr_2O_7$), é importante para mostrar a sensibilidade do microcrustáceo utilizado frente a uma solução com efeito tóxico conhecido (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Concentração letal (CL₅₀) em ensaio de toxicidade aguda utilizando como bioindicador o microcústáceo *Artemia salina* avaliada após de 24h de exposição.

Amostras	Toxicidade aguda (µg/mL)		Classificação
	CL ₅₀	intervalo de confiança (95%)	
FHF-Pmon (1)	918,3	667,2 – 1136,3	TO
FDF-Pmon (2)	95,9	42,0 – 186,4	TO
FAF-Pmon (3)	895,1	400,9 – 1035,3	TO
FHC-Mcae (4)	885,1	646,1 – 1158,2	TO
FDC-Mcae (5)	278,8	0,13 – 474,0	TO
FAC-Mcae (6)	> 1200	-	NT
FHF-Acol (7)	221,4	163,9 – 292,7	TO
FDF-Acol (8)	23,7	11,5 – 31,2	TO
FACF-Acol (9)	164,9	136,1 – 200,1	TO
EHF-Bpul (10)	> 1200	-	NT
EEF-Bpul (11)	> 1200	-	NT
EAF-Bpul (12)	209,7	79,3 – 466,5	TO
EHF-Sacu (13)	> 1200	-	NT
EEF-Sacu (14)	> 1200	-	NT
EAF-Sacu (15)	> 1200	-	NT
FHC-Pins (16)	315,4	138,5 – 443,1	TO
EEC-Pins (17)	410,2	171,4 – 979,3	TO
FAC-Pins (18)	> 1200	-	NT
FHG-Oses (19)	95,8	36,0 – 211,9	TO
EEG-Oses (20)	123,1	49,1 – 321,1	TO
FAG-Oses (21)	143,8	41,4 – 316,0	TO
EHF-Cdua (22)	87,4	59,1 – 119,8	TO
EEF-Cdua (23)	52,0	23,5 – 148,7	TO

EAF-Cdua (24)	61,1	39,7 – 81,3	TO
EHF-Cmel (25)	> 1200	-	NT
EEF-Cmel (26)	> 1200	-	NT
EAF-Cmel (27)	> 1200	-	NT
EHF-Tact (28)	> 1200	-	NT
EEF-Tact (29)	424,1	284,3 – 593,2	TO
EAF-Tact (30)	> 1200	-	NT
EHF-Hoch (31)	> 1200	-	NT
EEF-Hoch (32)	70,4	36,2 – 108,4	TO
EAF-Hoch (33)	> 1200	-	NT
EHF-Taur (34)	> 1200	-	NT
EEF-Taur (35)	651,0	483,8 – 897,0	TO
EAF-Taur (36)	> 1200	-	NT
K ₂ Cr ₂ O ₇	15,4	12,3 – 23,7	TO

FHF-fração hexânica das folhas, FDF-fração diclorometano das folhas, EHF-extrato hidroalcolico das folhas, FHC-fração hexânica da casca, FDC-fração diclorometano da casca, FAC-fração aquosa da casca, FAF-fração acetato de etila das folhas, EHF-extrato hexânico das folhas, EEF- extrato etanólico das folhas, EAF-extrato aquoso das folhas, FHG-fração hexânica dos galhos, EEG-extrato etanólico dos galhos, FAG-fração aquosa dos galhos. Valores de CL₅₀ acima > 1000 µg/mL indicam amostras atóxicas para o teste. CL₅₀ – concentração necessária para causar metade do efeito máximo de letalidade esperada. K₂Cr₂O₇ (dicromato de potássio) foi usado como controle positivo (10-100 µg/mL). TO – tóxico, NT – não tóxico. Com n=3.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Capacidade antioxidante *in vitro*

Os antioxidantes são substâncias químicas que reduzem ou impedem a oxidação. Costumeiramente, os métodos DPPH e ABTS são usados para avaliar a atividade antioxidante em extratos (LI et al., 2014). A maior parte dos métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é baseada na capacidade destes em remover os radicais livres do meio e rápida doação de um átomo de hidrogênio para estes radicais. Quanto maior a atividade antioxidante dos compostos testados, maior será o decréscimo na absorbância

e, conseqüentemente, as doações de hidrogênios como ocorre com os métodos utilizados nesse trabalho (PRIOR; CAO, 2000).

O teste ABTS se baseia na formação do radical cátion $ABTS^{*+}$ [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato)], de coloração verde-azulada, e sua remoção, medida por espectrofotometria. Termodinamicamente, um composto é capaz de reduzir o $ABTS^{*+}$ se tiver um potencial redox inferior ao desse radical. Muitos polifenóis têm potenciais redox mais baixos e, portanto, são capazes de reagir com esse radical (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O efeito antioxidante no sequestro do $DPPH^{\bullet}$ é devido à capacidade doadora de hidrogênio destas substâncias as quais são geralmente compostos fenólicos (CHAVES et al., 2010). No geral, as plantas, devido à necessidade de proteção contra o estresse oxidativo gerado pela exposição aos raios solares e ao oxigênio, concentram uma grande diversidade de antioxidantes. A maioria dos antioxidantes das plantas superiores são os polifenóis, que mostram atividades biológicas diversificadas, que incluem citotoxicidade contra células tumorais, antimicrobiana e hipolipemiante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; ZANON, 2010; FERREIRA et al., 2011, 2014).

A ação citotóxica *in vitro* de vários extratos de plantas tem sido estudada e correlacionada com os seus constituintes, como antioxidantes polifenólicos naturais (GRINBERG et al., 1997). Assim, embora os métodos DPPH e ABTS possam não reproduzir resultados biológicos significantes *in vivo*, eles servem para categorizar o potencial antioxidante de plantas medicinais e também para guiar o isolamento de compostos bioativos com elevada capacidade quimiopreventiva (ARTS et al., 2004; AHMED et al., 2014).

No presente trabalho, as amostras EEF-Cmel (26) e EEF-Tact (29) demonstraram resultados antioxidantes promissores, com valor TEAC de 31,4 mM Trolox/g de amostra para ambos os extratos. De fato, plantas do gênero *Terminalia* possuem como componente bastante presente o ácido gálico, uma molécula com reconhecido potencial antioxidante (SURVESWARAN et al., 2007). He et al. (2012) analisando os resíduos de sementes da romã (*Punica granatum* L.) por diferentes técnicas de extração encontraram um valor TEAC 26,9 mM Trolox/g de amostra inferior aos encontrados com os extratos etanólicos das folhas de *C. mellifluum* (26) e *T. actinophylla* (29).

Mirzaei et al. (2013), ao avaliar o potencial antioxidante pelo método DPPH de extratos de *Dorema aucheri*, uma planta iraniana hipoglicemiante da família Apiaceae, encontraram valores TEAC de 220 e 350 mM de Trolox/g de amostra, para os extratos aquoso e hidroalcolico respectivamente. No presente estudo, o melhor valor TEAC encontrado foi de 3,5 mM de Trolox/g de amostra, também presente em solvente polar [FAG-Oses (21)], demonstrando a eficiência desse solvente na solubilização de metabólitos capazes de degradar o radical DPPH[•]. Surveswaran et al. (2007), estudando 133 espécies vegetais indianas com uso medicinal, revelaram valores TEAC semelhantes a este estudo de 3,94 e 4,21 de Trolox/g de amostra para as espécies *Punica granatum* L. (Punicaceae) e *Acacia catechu* Willd. (Fabaceae), respectivamente.

4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda

O ensaio de letalidade utilizando como bioindicador o microcrustáceo *A. salina* é uma técnica de baixo custo e rapidez, dispensando o uso de técnicas assépticas. Portanto esse método é uma ferramenta útil na avaliação e fracionamento monitorado para bioatividades, guiando o fracionamento e isolamento de compostos naturais de classes distintas, tais como flavonóides, triterpenos, esteróis e compostos aromáticos simples, poupando a necessidade de ensaios posteriores *in vitro* e *in vivo* mais caros e demorados (CEPLEANU, 1993). Assim, identificar compostos que apresentem ação antioxidante e baixa toxicidade é um dos critérios essenciais para identificar uma molécula bioativa promissora do ponto de vista farmacológico e mercadológico (ZANON, 2010).

De acordo com David et al. (2001), a classificação da atividade citotóxica de substâncias vegetais em *A. salina* pode ser assim atribuída: substâncias que apresentam $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas inativas (ou atóxicas) e aquelas com $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ são muito ativas (muito tóxicas), comparáveis à camptotecina e ao sulfato de vincristina, substâncias usadas no tratamento de leucemias (SCHRIPSEMA; DAGNINO; GOSMANN, 2007). Diante disso, verifica-se que três frações (diclorometano das folhas da *Piptadenia moniliforme* (2), diclorometano das folhas da *Anadenanthera colubrina* (8) e hexânica dos galhos da *Oxandra sessiliflora* (19)) e quatro

extratos (hexânico, etanólico e aquoso das folhas da *Combretum duarceanum* (23,24) e etanólico das folhas da *Handroanthus ochraceus* (32)) apresentaram $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, sendo que a fração diclorometano das folhas de *Anadenanthera colubrina* [(FDF-Acol (8))] revelou maior toxicidade com CL_{50} de $23,7 \mu\text{g/mL}$. Sharif et al. (2014) encontraram um valor de CL_{50} de $1,58 \mu\text{g/mL}$ para o extrato hexânico de *Polygonum hydropiper* (Polygonaceae), valor próximo ao demonstrado pelo pela viscristina (CL_{50} de $0,92 \mu\text{g/mL}$), um alcalóide antitumoral e citotóxico natural originalmente encontrado em *Catharanthus roseus* L. e atualmente utilizado no tratamento de leucemias, neuroblastoma, tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, linfoma de Hodgkin, osteossarcoma e carcinomas de mama, pulmão, ovário cervical, câncer colorretal e contra melanoma (BRANDÃO et al., 2010). Os vegetais possuem tipos primários e secundários de metabólitos, e enquanto os primários respondem pela sobrevivência do vegetal, os secundários defendem o organismo vegetal contra predadores. Por isso não é surpreendente que muitas plantas acumulem substâncias de elevada toxicidade (NASS, 2007).

Na literatura, são encontrados vários exemplos de estudos que envolvem *A. salina* como um pré-ensaio de substâncias vegetais para determinar sua citotoxicidade e sugerir futuras investigações para o desenvolvimento de protótipos de novos fármacos (CAVALCANTE et al., 2000; TIEW et al., 2002). Assim, existe uma correlação entre a toxicidade sobre o crustáceo (*A. salina*) e a citotoxicidade em células leucêmicas da linhagem P388 (MEYER et al., 1982), servindo, indiretamente, como indicativo de substâncias com potencial antitumoral (SIQUEIRA et al., 1998). É importante enfatizar que o uso de invertebrados como bioindicadores deve ser implementado em testes antes do uso de vertebrados, já que sua aplicação ainda é marginal, o que exige, dentre os resultados primários, a avaliação da toxicidade e genotoxicidade das substâncias em estudo (KANWAR, 2007).

4.5 CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos das folhas de *Combretum mellifluum* e *Terminalia actinophylla* apresentaram as mais promissoras capacidades de proteção antioxidante dentre as amostras testadas. Por outro lado, a fração

diclorometânico das folhas de *Anadenanthera colubrina* demonstrou maior toxicidade aguda contra *A. salina*, destacando-se dentre as 36 amostras pesquisadas.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Eds.). **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 474 p.

AHMED, A. S.; MCGAW, L. J.; ELGORASHI, E. E.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Polarity of extracts and fractions of four *Combretum* (Combretaceae) species used to treat infections and gastrointestinal disorders in southern African traditional medicine has a major effect on different relevant in vitro activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 339-350, 2014.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARTS, M. J. T.; HAENEN, G. R.; VOSS, H. P.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 45-49, 2004.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003.

BADARINATH, A. V.; K. RAO, M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T.V.S.; GNANAPRAKASH, K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods : Comparisons , Correlations and Considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 199-200, 1958.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CEPLEANU, F. **Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation**. Lausanne: Repro EPFL, 1993. 272 p.

CHANDA, S.; DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties : An overview. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996, 2009.

CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; BRITO JÚNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 106-112, 2010.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 367-373, 2011.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 2013, p. 1-9, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. U. Study of the antiproliferative potential of

seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; ARAÚJO, E. J. F.; SILVA, J. N.; FREITAS, R. M.; COSTA, N. D. J.; OLIVEIRA, S. F. C.; PEREIRA, J. B. A.; PINHEIRO, J. A. F.; ABREU, M. C.; PESSOA, C. **Safety and Efficacy of Moringa oleifera Lamarck (1785) — Therapeutic and Toxicological Properties**. In: GOWDER, S. J. T. *Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science* » "Pharmacology and Therapeutics". Ed. InTech, Croacia. 2014. p. 179-205.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciências**, v. 7, p. 1-8, 2006.

GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. B.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: SILVA, J. M. C., TABARELLI, M; FONSECA, M. T; LINS, L. V. (orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. MMA, UFPE, Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, Embrapa Semi-Árido, Brasília, 2004, p.48-90.

GRINBERG, L. N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIM, E.; CHEVION, M.; RACHMILEWITZ, E. A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 973-978, 1997.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HE, L.; ZHANG, X.; XU, H.; XU, C.; YUAN, F.; KNEZ, Z.; NOVAK, Z.; GAO, Y. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS+ assay. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 215-223, 2012.

KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 236-240, 2007.

KIILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A.; LIMA, P. C. F.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. **Preservação e uso da Caatinga**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007, 42 p.

- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.
- LI, X. F.; TANG, L.; ZHENG, N. N.; AN, S.; WANG, Y. X.; ZHANG, W. X.; HU, Y. N. Determination of antioxidant activity in vitro from *hyptis rhomboidea* Mart. et Gal. ethanol extracts. **Applied Mechanics and Materials**, v. 472, p. 824-828, 2014.
- LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 182p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.
- MANS, D. R.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The oncologist**, v. 5, n. 3, p. 185-198, 2000.
- MAZZA, G.; KAY, C. D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7731-7737, 2002.
- MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: DEY, P.; HARBORNE, J.; HOSTETTMANN, K. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. 6. ed. London: Academic Press, 1991. p. 1-32.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.
- MIRZAEI, A.; MIRZAEI, N.; GHAVAMIZADEH, M. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Dorema aucheri* by *Artemia urmiana*: a Brine Shrimp Lethality Test. **Life Science Journal**, v. 10, n. 12, p. 8-12, 2013.
- NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. 1. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia, 2007. 858 p.
- PRIOR, R. L.; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p. 950-956, 2000.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REGO JUNIOR, N. O.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; SILVA, L. C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, M. V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

SCALFI, L.; FOGLIANO, V.; PENTANGELO, A.; GRAZIANI, G.; GIORDANO, I.; RITIENI, A. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1363-1366, 2000.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007. p. 819-846.

SHARIF, S.; AHMED, T.; HAQUE, A.; BHUIYAN, M. A.; SHABRIAR, M. Phytochemical Screenings, Thrombolytic Activity, Membrane Stabilizing Activity and Cytotoxic Properties of Polygonum hydropiper. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 8, n. 2, p. 92-98, 2014.

SIGMA. **(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid**.

Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 13 jun. 2014a.

SIGMA. **2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1888?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 13 jun. 2014b.

SIGMA. **2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 13 jun. 2014c.

SILVA, T. S.; FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n. 4, p.427-435, 2010.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: A review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2011.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. D. Estudo fitoquímico de *Unonapsi lindomani*-Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TIEW, P.; PUNTUMCHAI, A.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W. Coumarins from the heartwoods of *Mansonia gagei* Drumm. **Phytochemistry**, v. 60, n. 8, p. 773-776, 2002.

ZANON, G. **Análise Fitoquímica e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase das Espécies *Zanthoxylum Rhoifolium* e *Zanthoxylum Hyemale***. 2010. 174 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

CAPÍTULO III**5 Citotoxicidade, quimioprevenção e perfil fitoquímico de extratos vegetais do semiárido brasileiro**

Citotoxicidade, quimioprevenção e perfil fitoquímico de extratos vegetais do semiárido brasileiro

Jurandy do Nascimento SILVA¹, Nayana Bruna Nery MONÇÃO², Antônia Maria das Graças Lopes CITÓ^{1,2}, Ruth Raquel Soares de FARIAS², Mariana Helena CHAVES², Daisy Jereissati Barbosa LIMA³, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹, Rivelilson Mendes de FREITAS¹, Cláudia do Ó PESSOA³, Paulo Michel Pinheiro FERREIRA^{1,4}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

²Departamento de Química/Programa de Pós-Graduação em Química, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 60.430-270, Fortaleza, CE – Brasil.

⁴Departamento de Biofísica e Fisiologia, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

RESUMO

Na triagem citotóxica inicial, as amostras apresentaram atividade variando de sem atividade (SA) a muita atividade (MA). A fração diclorometano da casca da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* apresentou CI_{50} variando entre 4,7 e 7,1 $\mu\text{g/mL}$, para as linhagens de células tumorais SF-29, OVCAR-8, HL-60 e HCT-116, já em células vegetais (*Allium cepa*) apresentou atividade tóxica e citotóxica e ausência de mutagenicidade em concentrações entre 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, a atividade genotóxica foi evidenciada em concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Nessa mesma amostra foi revelada a presença do ácido betulínico um composto com atividade citotóxica conhecida. Três amostras foram capaz de lisar células vermelhas, sugerindo que a ação citotóxica seja por dano a membrana plasmática da célula. As amostras das espécies *M. caesalpiniiifolia* e *C. duarteanum* apresentam potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção de radicais hidroxilas e do óxido nítrico, bem como na prevenção da formação de TBARS. A espectroscopia de varredura - UV-Vis e a análise por cromatografia em camada delgada analítica se mostraram como uma ferramenta útil na identificação inicial das classes de metabólitos secundários. A fração diclorometano da casca da *M. caesalpiniiifolia* se mostrou promissora na busca de substâncias naturais anticâncer.

Palavras-chaves: Anticâncer, Genotoxicidade, *Mimosa caesalpiniiifolia*

ABSTRACT

In the initial cytotoxic screening samples showed activity ranging from no activity (SA) to a lot of activity (MA). The dichloromethane fraction from the bark of *Mimosa caesalpinifolia* species showed IC₅₀ ranging between 4.7 and 7.1 µg/mL to tumor cell lines SF-29, OVCAR-8, HL-60 and HCT-116 already vegetables cells (*Allium cepa*) showed toxic and cytotoxic activity and the lack of mutagenicity concentrations between 10 and 50 µg/mL, the genotoxic activity was observed at concentrations of 25 and 50 µg/mL. In the same sample was revealed the presence of betulinic acid a compound known cytotoxic activity. Three samples were capable of lysing red blood cells, suggesting that the cytotoxic action either by damage to the cell plasma membrane. Samples of *M. caesalpinifolia* and *C. duarteana* have antioxidant activity *in vitro*, by removing capacity of hydroxyl radicals and nitric oxide, as well as in preventing the formation of TBARS. Spectroscopy scan - UV-Vis and analysis by analytical thin layer chromatography is shown as a useful tool the initial identification of classes of secondary metabolites. The dichloromethane fraction from the bark of *M. caesalpinifolia* has shown considerable promise in the search for natural substances anticancer.

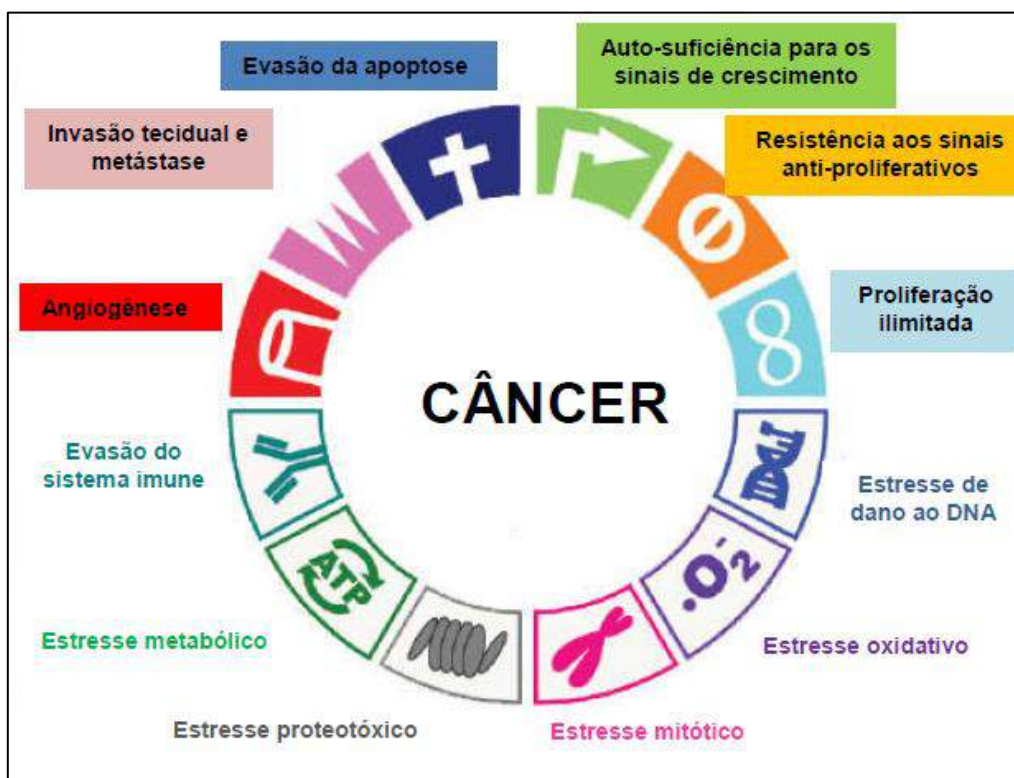
Keywords: Anticancer, Genotoxicity, *Mimosa caesalpinifolia*

5.1 INTRODUÇÃO

Há cerca de 25 anos a “guerra contra o câncer” foi lançada nos Estados Unidos e a partir daí vários investimentos foram direcionados para o estudo do câncer. Durante as últimas cinco décadas o tratamento do câncer tem sido realizado primariamente com uso de várias formas de quimioterapia citotóxica e terapia de radiação precedidas ou não por cirurgias. Porém, em todos os casos, a efetividade dos tratamentos citotóxicos são limitados pela geração de efeitos adversos que estão quase sempre relacionados a uma estreita janela terapêutica, à múltipla resistência farmacológica e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas, o que torna muito difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento, principalmente, para pacientes no estágio avançado da doença, quando os efeitos adversos da quimioterapia podem superar os benefícios, e o aumento da sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (ANAZETTI et al, 2003; KAMB, 2005; SOUZA et al., 2007; FERREIRA et al., 2013b).

O câncer é uma doença genética e epigenética e têm como denominador comum um crescimento desordenado de células com potencial invasivo que podem surgir em diversos tecidos e nos mais diferentes órgãos, com a propriedade de se disseminar para outras regiões do corpo. Condições multifatoriais estão envolvidas como fatores causais e podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (carcinogênese) como dieta inadequada, predisposição genética e fatores ambientais, que quando associados a fatores genéticos, favorece o aparecimento de maior número de casos de cânceres (PY; JACQUES, 2003; REDDY et al., 2003; INCA, 2014). Dentre os fatores que favorecem a transformação das neoplasias para maligna incluem: a) evasão da apoptose; b) auto-suficiência para os sinais de crescimento; c) resistência antiproliferativa; d) proliferação ilimitada; e) dano ao DNA, f) estresse oxidativo; g) estresse metabólico; h) evasão do sistema imune; i) angiogênese e j) invasão tecidual e metástase conforme esquematizado na **Figura 1**.

Figura 1 – Fatores envolvidos na carcinogênese.



Fonte: Luo et al. (2009).

Assim como no resto do mundo, as neoplasias apresentam altas taxas de mortalidade no Brasil e elevados custos clínicos assistenciais. A magnitude dos agravos varia de acordo com a localização primária do tumor, o gênero do paciente e a região do país (BOING et al., 2007). Estimativas indicam que mais de 2/3 dos cânceres humanos possam ser prevenidos por uma mudança adequada no estilo de vida, especialmente na dieta (WU; LIPPMAN, 2011).

Desde 1950, agentes antitumorais tem sido desenvolvidos a partir de plantas (MARTINO et al., 2014) e até hoje os produtos naturais ainda representam uma importante fonte de novas moléculas bioativas e promissoras contra varias doenças (BALUNAS; KINGNORN, 2005; FERREIRA et al., 2008, 2011).

Uma vez que 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde e quase 85% dessa tradição envolve o uso de plantas medicinais e seus princípios ativos (WHO, 2003), extratos vegetais surgem como uma fonte extraordinária de novas moléculas anticâncer (FERREIRA et al., 2011, 2013b). Associando o fato de

que menos de 10% das espécies vegetais conhecidas da terra tiveram algum tipo de estudo fitoquímico ou de atividades biológicas, acredita-se, então, que muitos medicamentos derivados de plantas ainda estejam por ser descobertos, incluindo compostos antitumorais e anticarcinogênicos. Porém, não se trata de uma tarefa simples, visto que de cada 5 mil estruturas químicas testadas, somente uma se torna medicamento (CORRÊA et al., 1998; BRANDÃO et al., 2010), assim, esse trabalho avaliou o potencial citotóxico de 36 extratos de 12 espécies vegetais oriundas do semiárido brasileiro em células tumorais, o potencial hemolítico e antioxidante das amostras mais citotóxicas e analisou a atividade antiproliferativa, tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da fração diclorometano da casca do caule de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção das amostras vegetais

Para obtenção das amostras na forma de extratos e frações foram utilizadas 12 espécies vegetais encontradas no semiárido nordestino. A **tabela 1** apresenta uma lista das espécies utilizadas, o nome vulgar, a família a qual pertence, o número de registro de identificação junto ao Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, as partes utilizadas da planta no estudo, a identificação das amostras e suas respectivas siglas utilizadas ao longo do estudo. A extração das amostras foi realizada no departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Piauí sob a coordenação das professoras Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Dra. Mariana Helena Chaves.

As partes das plantas utilizadas foram secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó fino em moinho de facas. O material obtido foi submetido à maceração com Etanol (EtOH) (10x) na proporção 1:4 de material vegetal/solvente (m/v) com sonicação em banho de ultrassom 30 minutos a cada dia. A fase orgânica (sobrenadante) foi submetida à filtração simples no intervalo de 3 dias e o extrato etanólico reunido foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo. Após a remoção do solvente, o extrato foi liofilizado obtendo-se o extrato etanólico (E.EtOH).

Parte do E.EtOH foi destinada ao processo de partição líquido – líquido. Parte deste extrato foi suspenso em MeOH/H₂O (2:1/v:v). Uma parte da fase hidroalcoólica foi utilizada e outra extraída exaustivamente com hexano (6x), com diclorometano (6x) e com acetato de etila (6x), respectivamente, e por fim, foi coletada também a fração aquosa resultante da partição. O fluxograma disposto na **Figura 2**, apresenta o procedimento geral para o preparo do E.EtOH e a obtenção das frações utilizadas no experimento. Todos os extratos e frações foram liofilizados.

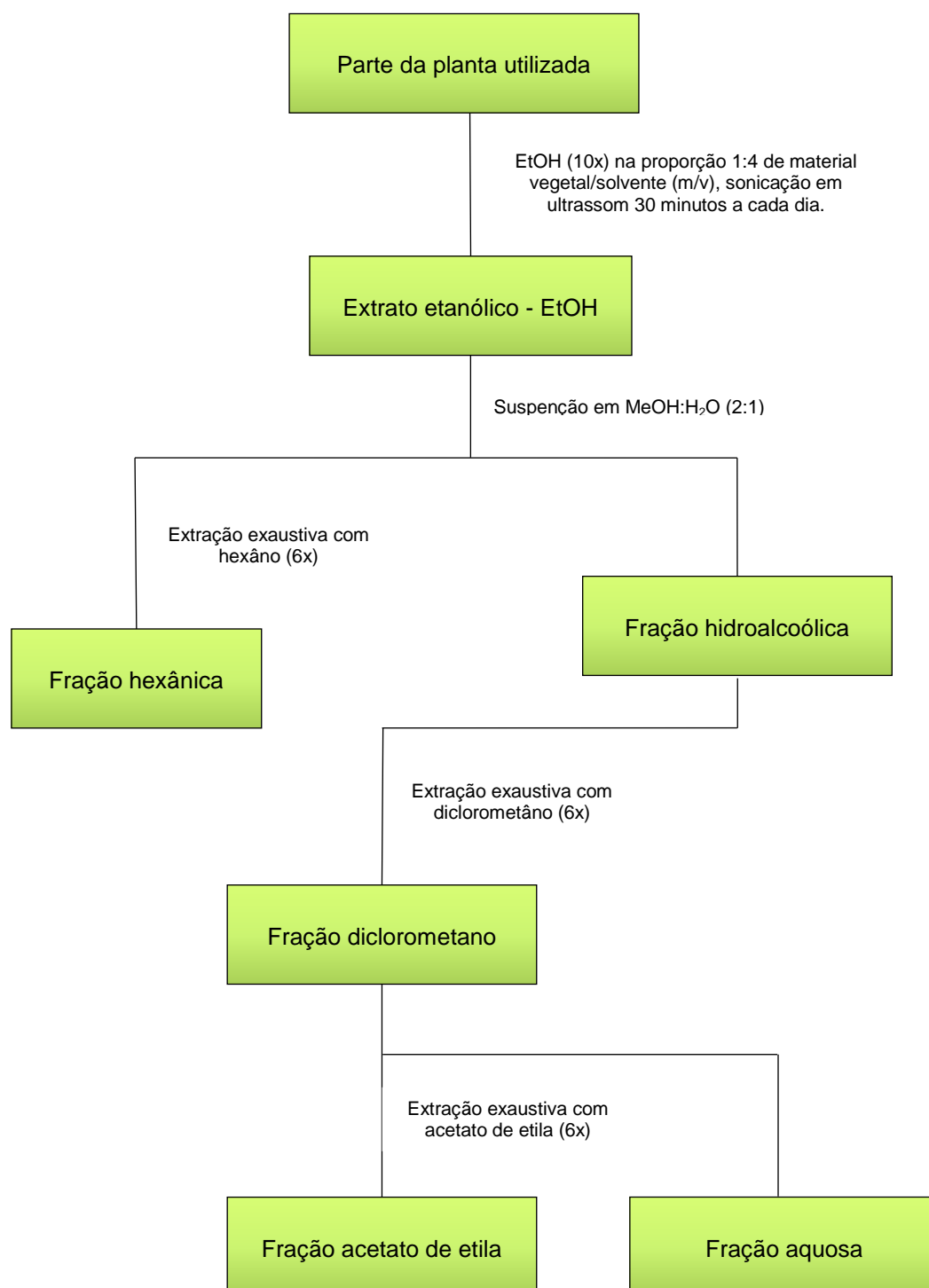
Tabela 1 - Espécies vegetais utilizadas no estudo.

	Família/Espécie	NV	Excicata	PU	Descrição da amostra	Sigla
1	Fabaceae <i>Piptadenia moniliformis</i> Benth	Jurema-preta	TEPB 27.739	fo	Fração hexânica	FHF-Pmon (1)
					Fração diclorometano	FDF-Pmon (2)
					Fração aquosa	FAF-Pmon (3)
2	Fabaceae <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth	Sabiá	TEPB 26.824	cs	Fração hexânica	FHC-Mcae (4)
					Fração diclorometano	FDC-Mcae (5)
					Fração Aquosa	FAC-Mcae (6)
3	Fabaceae <i>Anadenanthera colubrina</i> Brenan	Angico escuro	TEPB 27.881	fo	Fração hexânica	FHF-Acol (7)
					Fração diclorometano	FDF-Acol (8)
					Fração acetato de etila	FACF-Acol (9)
4	Fabaceae <i>Bauhinia pulchella</i> Benth.	Mororó de boi	TEPB 17.161	fo	Extrato hexânico	EHF-Bpul (10)
					Extrato etanólico	EEF-Bpul (11)
					Extrato Aquoso	EAF-Bpul (12)
5	Fabaceae <i>Senna acuruensis</i> Benth.	Canela de velho	TEPB 17.193	fo	Extrato hexânico	EHF-Sacu (13)
					Extrato etanólico	EEF-Sacu (14)
					Extrato Aquoso	EAF-Sacu (15)
6	Clusiaceae <i>Platonia insignis</i> Mart.	Bacuri	TEPB 20.701	cs	Fração hexânica	FHC-Pins (16)
					Extrato etanólico	EEC-Pins (17)
					Fração aquosa	FAC-Pins (18)

7	Annonaceae	Conduru-preto	TEPB 18.820	ga	Fração hexânica	FHG-Oses (19)
	<i>Oxandra sessiliflora</i> R.E.Fr.				Extrato etanólico	EEG-Oses (20)
					Fração aquosa	FAG-Oses (21)
8	Combretaceae	Vaqueta	TEPB 27.969	fo	Extrato hexânico	EHF-Cdua (22)
	<i>Combretum duarteanum</i> Cambess.				Extrato etanólico	EEF-Cdua (23)
					Extrato Aquoso	EAF-Cdua (24)
9	Combretaceae	Mofumbo	TEPB 28.192	fo	Extrato hexânico	EHF-Cmel (25)
	<i>Combretum mellifluum</i> Eichler				Extrato etanólico	EEF-Cmel (26)
					Extrato Aquoso	EAF-Cmel (27)
10	Combretaceae	Chapada	TEPB 27.990	fo	Extrato hexânico	EHF-Tact (28)
	<i>Terminalia actinophylla</i> Mart.				Extrato etanólico	EEF-Tact (29)
					Extrato Aquoso	EAF-Tact (30)
11	Bignoniaceae	Ipê do cerrado	-	fo	Extrato hexânico	EHF-Hoch (31)
	<i>Handroanthus ochraceus</i>				Extrato etanólico	EEF-Hoch (32)
					Extrato Aquoso	EAF-Hoch (33)
12	Bignoniaceae	Pau d'arco	-	fo	Extrato hexânico	EHF-Taur (34)
	<i>Tabebuia aurea</i>				Extrato etanólico	EEF-Taur (35)
					Extrato Aquoso	EAF-Taur (36)

NV: nome vulgar, TEPB: Teresina, Piauí, Brasil; PU: parte utilizada: Folhas (fo); Cascas (cs); Galhos (ga).

Figura 1 - Fluxograma do procedimento de obtenção dos extratos e frações utilizadas no estudo.



5.2.2 Atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais

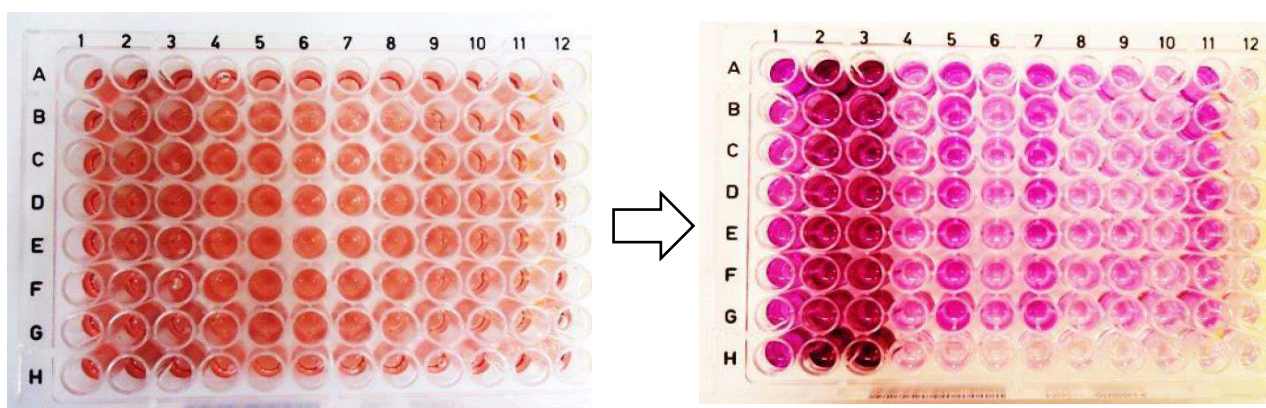
A citotoxicidade foi avaliada usando o método de MTT (MOSMANN, 1983). É um método rápido, sensível e barato que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. A solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo (SKEHAN et al., 1990) (**Figura 3**). As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade, observadas a cada 24h em relação ao crescimento celular e controle de contaminação em microscópio de inversão (Nikon®) e, quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo.

As substâncias foram dissolvidas previamente em dimetilsulfóxido (DMSO) puro estéril para a concentração estoque de 5 mg/mL. Primeiramente, realizou-se uma triagem inicial em relação à capacidade citotóxica dos extratos avaliando-se o percentual de inibição da proliferação celular na concentração única de 50 µg/mL. O quimioterápico doxorubicina (Dox: 0,005 – 5,0 µg/mL) foi usado como controle positivo e aos poços do controle negativo adicionou-se DMSO na concentração final v/v de 1,6%. Assim, as linhagens humanas de tumores sólidos SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (carcinoma do ovário) e HCT-116 (carcinoma colorretal) foram plaqueadas nas concentrações desejadas (**Tabela 2**). Após 24h de incubação, as amostras foram acrescentadas às placa de 96 poços (100 µL/poço). Após um período de incubação de 69 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 µL de solução de MTT 10% em RPMI 1640, sendo a placa colocada em estufa a 5% de CO₂ por 3 h adicionais. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspendido em 150 µL de DMSO puro e agitado por cerca de

10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

Após a seleção de amostras com potencial mínimo inibitório de 75%, tais amostras foram seriadamente diluídas em meio RPMI completo para obtenção das concentrações finais (0,039-50 $\mu\text{g/mL}$) e adicionadas em placa de 96 poços (100 μL /poço) contendo células tumorais humanas de SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60 plaqueadas nas concentrações desejadas (**Tabela 2**). Após um período de incubação de 69 h, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 μL de solução de MTT 10%. Após 3h de incubação, as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

Figura 3 - Conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes nas células metabolicamente ativas.



Fonte: Matos (2013).

Tabela 2 – Linhagens celulares tumorais humanas testadas no ensaio do MTT.

Linhagem Celular	Tipo histológico do câncer	Concentração de plaqueamento (células/mL)
SF-295	Glioblastoma	$0,1 \times 10^6$
OVCAR-8	Carcinoma do ovário	$0,7 \times 10^5$
HL-60	Leucemia promielocítica	$0,3 \times 10^6$
HCT-116	Carcinoma colorretal	$0,7 \times 10^5$

Análises estatísticas

As amostras foram testadas em triplicata. Os percentuais de inibição da proliferação celular e os valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software®).

Como sugerido por Almeida et al. (2014), uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras: amostras sem atividade (SA), pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

5.2.3 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos

Esta metodologia permite avaliar o potencial de substâncias em causar lesões diretas à membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total (DRESCH et al., 2005). Para a efetivação da análise, o sangue de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) foi coletado por via orbital e diluído em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços

receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da amostra teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL da amostra teste. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,56 a 250 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm. Todos os procedimentos foram apreciados e aprovados (carta de aceite nº 034/14) pelo Comitê em Pesquisa Animal da UFPI estando de acordo com leis nacionais [Lei Nº 11.794/2008 do Ministério da Ciência e Tecnologia/ Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal (CONCEA)] e internacionais (EEC Directive of 1986, 86/609/EEC) para a pesquisa com animais de laboratório.

Análises estatísticas

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram determinados a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software®).

5.2.4 Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade usando o teste (*Allium cepa* Linn.)

Para a realização do teste de *A. cepa* seguiu-se o protocolo sugerido primeiramente por Fiskesjö (1985), com modificações Carvalho et al. (2011).

Condições do ensaio e tratamentos

Cada tratamento experimental constou de diluições da FDC-Mcae (5) nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL. Como controle negativo utilizou-se água desclorificada e como controle positivo sulfato de cobre 0,6 µg/mL.

Foram utilizadas cebolas da espécie (*Allium cepa*) (com diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catáfilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis, adquiridas comercialmente no Mercado Público Central de Teresina, Piauí, Brasil, sendo mantidas em local livre de umidade e ao abrigo da luz.

Antes do teste, os catáfilos externos secos foram removidos com bisturi, certificando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, os bulbos foram postos em água de torneira por duas horas para reduzir os efeitos de possíveis inibidores do brotamento.

Cada tratamento constituiu-se de 05 (cinco) bulbos. A solução teste foi distribuída em recipientes de vidro, previamente esterilizados, de capacidade de 5 mL e um bulbo foi colocado em cada recipiente com a área radicular em contato com a solução, para permitir a germinação em temperatura ambiente entre 18 e 22 °C (KOVALCHUK et al., 1998).

O volume de solução absorvido era repostado diariamente, objetivando a manutenção das raízes mergulhadas. Após 72 h de exposição, as raízes foram extraídas com o auxílio de uma régua, sendo desprezadas aquelas muito curtas ou muito longas, sendo o tamanho das raízes utilizado como avaliação de toxicidade. Após a mensuração, foram colocadas em solução fixadora de Carnoy (etanol 99%/ ácido acético glacial – 3: 1 v/v) durante 24h e, após, em etanol 70%, conservando-se sob refrigeração até o momento da preparação histológica das lâminas (FISKEJÖ, 1985).

Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas, duas a três raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min) e hidrolizadas em HCl 1M a 60 °C por 8 min. Em seguida, transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de Schiff (fuccina básica/metabissulfito de sódio – 3:1 p/p), por aproximadamente 2 horas. Com auxílio de uma pinça e de uma lâmina de bisturi, a coifa (porção apical da raiz) de aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento foi retirada, desprezando o restante da raiz. Adicionou-se duas gotas de carmim acético 2% e deixou-se corar durante 10 minutos. Logo, em seguida, os ápices de raízes foram transferidos para uma lâmina. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina e feito o squash (esmagamento) com o dedo

polegar, com razoável pressão. O material preparado foi então levado ao microscópio óptico para observação no aumento de 1000X, seguindo-se a recomendação de se usar lente de imersão.

Análises tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica

A toxicidade das substâncias testadas foram analisadas através do crescimento das raízes e os resultados comparados com o controle negativo.

Para os ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade, foram avaliadas 5000 células por tratamento (1000 células/lâmina). Os seguintes parâmetros foram observados: (a) índice mitótico (IM); (b) aberrações cromossômicas (AC's) no ciclo mitótico; e (c) presença de micronúcleos (MN). O IM corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem, sendo analisada a presença de prófase, metáfase, anáfase e telófase separadamente e expressos como índice de fases de células em divisão (IF) (ROA; YEBER; VENEGAS, 2012).

Para a análise de AC, foram contabilizados cromossomos soltos e fragmentos cromossômicos em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), pontes e atrasos anafásicos, sendo todos os registros reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único *endpoint* e expressos em porcentagem do índice genotóxico (IG%). A presença de micronúcleos nos tratamentos foi comparada com o controle negativo e expressa em porcentagem do índice mutagênico (IMt%).

Análises Estatísticas

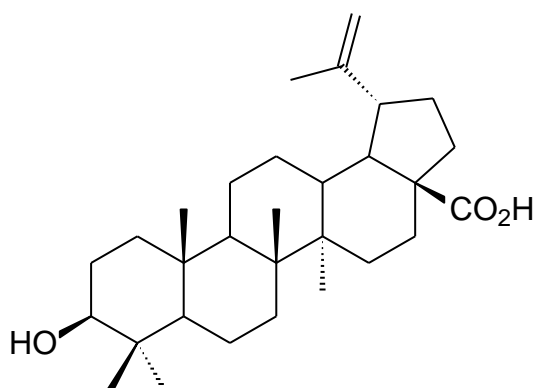
Os resultados apresentados como a média \pm desvio padrão da média (D.P.M.) foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido por Tukey utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) considerando $P < 0,05$.

5.2.5 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

Para o preparo da amostra utilizou-se 10 mg da FDC-Mcae (5) dissolvida em 2 mL de MeOH grau HPLC (Sigma-Aldrich[®]) e submetida a extração em fase sólida em cartucho C-18 (Agilent[®]) e filtrada em filtro de 0,45 μm . A amostra foi

analisada em HPLC (do Laboratório de Geoquímica Orgânica - LAGO). Utilizou-se água (0,1% de AcOH) como eluente A e MeOH como eluente B com o seguinte gradiente de 0,01 - 1 min com 5% de B, 1,1 - 30 min com 5-95% de B, 30,1 - 35% com 100 % de B, no comprimento de onda de $\lambda = 206$ nm e volume de injeção de 5 μ L. O padrão de ácido betulínico (**Figura 4**) na concentração de 1 mg/mL foi avaliado nas mesmas condições cromatográficas. Para a análise de co-injeção 0,7 μ L da solução de ácido betulínico foi adicionado em 0,7 μ L da FDC-Mcae (5).

Figura 4 – Estrutura molecular do ácido betulínico



5.2.6 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

As análises antioxidantes foram realizadas apenas com as amostras *Mimosa caesalpinifolia* [FDC-Mcae (5)] e *Combretum duarteanum* [EEF-Cdua (23)], as quais apresentaram resultados promissores na triagem citotóxica inicial.

5.2.6.1 Peroxidação lipídica por meio da determinação de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este teste foi utilizado para quantificar nível de peroxidação lipídica e adaptado para medir a capacidade antioxidante dos extratos usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídios (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; GUIMARÃES et al., 2010). A gema de ovo foi brevemente homogeneizada (1% p/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Em seguida 1 mL de homogenato foi sonificado e ao homogeneizado foi adicionado 0,1 mL de cada amostra testada nas

concentrações 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL da solução de 2,2'-azobis[2-metilpropionamidina]dihidroclorato (AAPH) 0,12 M. Ao grupo controle foi adicionado apenas o veículo (DMSO 1,6% dissolvido em água destilada). As reações foram realizadas durante 30 min a 37 °C e após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante foi misturado com 0,5 mL ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas pelo AAPH isolado.

A porcentagem de redução dos radicais livres (R%) foi determinada em função das medidas das absorbâncias por meio da seguinte equação (REANMONGKOL et al., 1994):

$$R\% = 100 \times (A_c - A_T) / A_c$$

Onde: A_c é a absorbância do controle, obtida do meio reacional sem a amostra e A_T é o valor de cada substância testada.

Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e analisados por ANOVA seguido Newman-Keuls com significância de 5% ($P < 0,05$). Os valores de CE_{50} (concentração efetiva capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram determinados a partir de regressão não-linear. Todas as análises foram feitas no programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software®).

5.2.6.2 Remoção de radicais hidroxila (\cdot OH)

A formação do radical hidroxila (\cdot OH), mediante a reação de Fenton, foi quantificada usando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose a malonaldeído (MDA), que por sua vez reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (LOPES et al., 1999). As reações foram iniciadas pela adição de sulfato ferroso ($FeSO_4$) em uma

concentração final de 6 mM em soluções contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H₂O₂ e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2). Para medir a atividade antioxidante de remoção do radical hidroxila, diferentes concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL) das amostras testadas foram adicionadas ao sistema antes da adição de FeSO₄. Após 15 min à temperatura ambiente, a reação foi bloqueada pela adição de ácido fosfórico 4% (v/v) seguido de TBA 1% (p/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas durante 15 min a 95 °C, e depois resfriadas à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos em função da degradação da 2-desoxirribose.

Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) e analisados por ANOVA seguido Newman-Keuls com significância de 5% (P < 0,05). Os valores de CE₅₀ (concentração efetiva capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram determinados a partir de regressão não-linear. Todas as análises foram feitas no programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software®).

5.2.6.3 Remoção de radicais nitrito (NO₂·)

O radical nitrito (NO₂·) surge a partir da interação do óxido nítrico com o oxigênio e sua formação é quantificada pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006). O óxido nítrico foi inicialmente gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). O meio reacional (1 mL) contendo NPS em tampão fosfato e as amostras testadas em diferentes concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL) foram incubados a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e misturada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida em 540 nm. A porcentagem de inibição do nitrito produzido foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles (nitroprussiato de sódio 10 mM e veículo) e os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado pelo NPS isolado.

Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e analisados por ANOVA seguido Newman-Keuls com significância de 5% ($P < 0,05$). Os valores de CE_{50} (concentração efetiva capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram determinados a partir de regressão não-linear. Todas as análises foram feitas no programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software[®]).

5.2.7 Análise espectrométrica – UV-Vis

O espectro na região UV-Vis foi realizado apenas para as amostras com resultados promissores na triagem inicial de citotoxicidade. A varredura foi realizada na faixa de 200-800 nm no espectrofotômetro UV-Vis (Varian modelo Cary 300 n). Os resultados foram expressos na forma de gráficos com resultados de absorvância *versus* comprimento de onda. As substâncias testadas foram preparadas com concentrações de 1 mg/mL para a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* [FDC-Mcae (5)] e de 150 μ g/mL para o extrato etanólico das folhas de *Combretum duarteanum* [EEF-Cdua (23)].

5.2.8 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

A análise em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi realizada apenas para as amostras com resultados promissores na triagem inicial de citotoxicidade. As substâncias testadas foram preparadas com concentrações de 1 mg/mL para a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* [FDC-Mcae (5)] e de 150 μ g/mL para o extrato etanólico das folhas de *Combretum duarteanum* [EEF-Cdua (23)].

As placas para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram preparadas com 0,25 mm de espessura, usando como fase estacionária, gel de sílica 60 GF254 da Merck e 60 G Vetec. Foram utilizados como eluentes hexano/AcOEt (8:2), $CHCl_3$ /MeOH (9:1) $CHCl_3$ /MeOH/ H_2O (65:30:5). As revelações das cromatoplasmas foram feitas por borrifamento com solução de sulfato cérico [$Ce(SO_4)_2$].

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Atividade citotóxica (MTT)

Dentre os resultados obtidos na triagem citotóxica após 72h de incubação (**Tabela 3**), observou-se que cinco das 36 amostras testadas e o ácido betulínico apresentaram muita atividade (MA, inibição de crescimento entre 75 e 100%) contra as três linhagens tumorais utilizadas: as frações hexânica e diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* (4) e (5), a fração hexânica da casca de *Platonia insignis* (16) e os extratos etanólicos das folhas de *Combretum duarteanum* (23) e *Combretum mellifluum* (26) respectivamente. Adicionalmente, 2 amostras apresentaram mais de 90% de inibição da proliferação celular: os extratos etanólicos das folhas de *Combretum duarteanum* (23) e *Handroanthus ochraceus* (32). Por outro lado, as outras amostras apresentaram pouca ou nenhuma atividade antiproliferativa frente às linhagens neoplásicas testadas (percentual de inibição do crescimento celular menor que 50%). O controle doxorrubicina foi muito ativo contra todas as linhagens.

Tabela 3 - Triagem da atividade citotóxica *in vitro* de 36 extratos e frações de plantas pertencentes a diferentes famílias do semiárido brasileiro e do isolado ácido betulínico contra três linhagens de células tumorais.

Amostras	Inibição da Proliferação Celular (%)		
	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
FHF-Pmon (1)	-30,7 ± 17,0 (SA)	3,4 ± 2,8 (PA)	22,0 ± 1,2 (PA)
FDF-Pmon (2)	-51,4 ± 3,0 (SA)	5,2 ± 2,5 (PA)	3,2 ± 2,8 (PA)
FAF-Pmon (3)	-58,4 ± 3,2 (SA)	-5,3 ± 3,1 (SA)	6,1 ± 5,1 (PA)
FHC-Mcae (4)	86,4 ± 4,5 (MA)	74,5 ± 7,6 (MO)	65,5 ± 10,3 (MO)
FDC-Mcae (5)	90,9 ± 0,5 (MA)	88,2 ± 0,8 (MA)	86,9 ± 0,9 (MA)
EAC-Mcae (6)	28,7 ± 3,7 (PA)	26,2 ± 2,1 (PA)	44,7 ± 4,1 (PA)
FHF-Acol (7)	-52,7 ± 1,2 (SA)	13,7 ± 3,6 (PA)	4,4 ± 0,6 (PA)
FDF-Acol (8)	-43,1 ± 19,5 (SA)	34,2 ± 1,7 (PA)	25,5 ± 4,0 (PA)
FACF-Acol (9)	-72,0 ± 8,8 (SA)	-30,1 ± 0,6 (SA)	-27,8 ± 5,1 (SA)
EHF-Bpul (10)	-6,5 ± 9,9 (SA)	-7,6 ± 3,4 (SA)	39,3 ± 5,2 (PA)
EEF-Bpul (11)	-10,8 ± 9,9 (SA)	20,1 ± 4,2 (PA)	32,4 ± 5,7 (PA)
EAF-Bpul (12)	-18,3 ± 7,8 (SA)	-10,1 ± 0,6 (SA)	19,1 ± 4,7 (PA)
EHF-Sacu (13)	-0,3 ± 3,5 (SA)	-6,6 ± 2,6 (SA)	42,3 ± 16,0 (PA)
EEF-Sacu (14)	-19,0 ± 0,5 (SA)	2,2 ± 3,2 (PA)	20,0 ± 6,6 (PA)
EAF-Sacu (15)	-7,0 ± 3,3 (SA)	-12,3 ± 5,4 (SA)	-12,3 ± 24,6 (SA)
FHC-Pins (16)	93,8 ± 3,5 (MA)	91,7 ± 0,2 (MA)	88,3 ± 7,4 (MA)
EEC-Pins (17)	-11,5 ± 4,6 (SA)	37,2 ± 17,4 (PA)	22,7 ± 6,4 (PA)
FAC-Pins (18)	11,0 ± 14,0 (PA)	-16,9 ± 2,6 (SA)	51,2 ± 13,7 (MO)
FHG-Oses (19)	48,3 ± 3,3 (PA)	42,2 ± 19,5 (PA)	58,0 ± 9,7 (MO)
EEG-Oses (20)	10,3 ± 3,9 (PA)	4,7 ± 0,1 (PA)	48,3 ± 0,2 (PA)
FAG-Oses (21)	-5,5 ± 6,0 (SA)	-8,6 ± 0,7 (SA)	17,0 ± 4,2 (PA)

EHF-Cdua (22)	49,6 ± 3,5 (PA)	38,6 ± 16,4 (PA)	42,7 ± 1,9 (PA)
EEF-Cdua (23)	100,6 ± 0,5 (MA)	94,4 ± 2,9 (MA)	97,1 ± 0,3 (MA)
EAF-Cdua (24)	26,1 ± 9,9 (PA)	52,2 ± 6,9 (MO)	52,3 ± 3,4 (MO)
EHF-Cmel (25)	45,3 ± 6,0 (PA)	36,9 ± 34,5 (PA)	37,0 ± 2,8 (PA)
EEF-Cmel (26)	95,9 ± 0,3 (MA)	83,9 ± 1,4 (MA)	89,0 ± 1,2 (MA)
EAF-Cmel (27)	68,4 ± 3,9 (MO)	57,9 ± 1,1 (MO)	41,7 ± 3,9 (PA)
EHF-Tact (28)	53,8 ± 6,0 (MO)	59,5 ± 13,4 (MO)	28,3 ± 1,5 (PA)
EEF-Tact (29)	80,4 ± 1,9 (MA)	83,7 ± 5,6 (MA)	62,7 ± 1,7 (MO)
EAF-Tact (30)	79,4 ± 1,4 (MA)	79,0 ± 0,0 (MA)	59,7 ± 2,6 (MO)
EHF-Hoch (31)	47,5 ± 1,4 (PA)	18,3 ± 5,8 (PA)	36,6 ± 1,7 (PA)
EEF-Hoch (32)	91,2 ± 6,4 (MA)	98,3 ± 1,3 (MA)	92,2 ± 6,9 (MA)
EAF-Hoch (33)	32,5 ± 1,7 (PA)	21,9 ± 0,1 (PA)	17,5 ± 1,8 (PA)
EHF-Taur (34)	58,4 ± 0,8 (MO)	45,0 ± 1,4 (PA)	47,2 ± 3,8 (PA)
EEF-Taur (35)	43,1 ± 16,6 (PA)	59,6 ± 29,7 (MO)	80,0 ± 17,0 (MA)
EAF-Taur (36)	17,2 ± 6,4 (PA)	3,2 ± 1,7 (PA)	18,9 ± 0,9 (PA)
Ácido Betulínico	99,8 ± 2,8 (MA)	96,0 ± 1,6 (MA)	100,0 ± 3,2 (MA)
Doxorubicina	96,8 ± 4,6 (MA)	100,0 ± 0,7 (MA)	83,6 ± 3,0 (MA)

A triagem foi determinada pelo ensaio MTT após 72h de incubação na concentração de 50 µg/mL. FHF-fração hexânica das folhas, FDF-fração diclorometano das folhas, EHF-extrato hidroalcoólico das folhas, FHC-fração hexânica da casca, FDC-fração diclorometano da casca, FAC-fração aquosa da casca, FAF-fração aquosa das folhas, FAcF-fração acetato de etila das folhas, EHF-extrato hexânico das folhas, EEF- extrato etanólico das folhas, EAF-extrato aquoso das folhas, FHG-fração hexânica dos galhos, EEG-extrato etanólico dos galhos, FAG-fração aquosa dos galhos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) do percentual de inibição do crescimento celular a partir de 2 experimentos independentes para as linhagens tumorais humanas de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e colorretal (HCT-116). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo. Amostra sem atividade (SA), pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Levando em consideração o percentual antiproliferativo analisado pelo método do MTT (**Tabela 3**), as amostras que se revelaram muito ativas contra pelo menos 2 linhagens de células tumorais foram selecionadas para a determinação dos valores de CI_{50} . Assim, tais amostras foram seriadamente diluídas em meio RPMI completo (0,039-50 $\mu\text{g/mL}$) e adicionadas em placa de 96 poços (100 $\mu\text{L/poço}$) contendo células tumorais humanas de SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60. A citotoxicidade foi avaliada após 72h de exposição. Como descrito na **Tabela 4**, a amostra FDC-Mcae (5) apresentou o maior potencial citotóxico dentre todos os extratos e frações testados, com valores de CI_{50} variando entre 4,7 e 7,1 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 – Atividade citotóxica *in vitro* e seus respectivos valores de CI_{50} de extratos e frações de plantas pertencentes a diferentes famílias do semiárido brasileiro e do isolado ácido betulínico contra quatro linhagens de células tumorais utilizando ensaio de MTT após 72 h de incubação.

AMOSTRAS	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	SF-295	OVCAR-8	HL-60	HCT-116
FHC-Mcae (4)	24,6 20,2 - 30,0	22,9 17,1 - 30,7	13,8 12,3 - 15,5	22,5 20,5 - 24,8
FDC-Mcae (5)	5,4 4,7 - 6,2	7,1 6,2 - 8,1	4,7 4,3 - 5,0	5,2 4,6 - 5,8
FHC-Pins (16)	22,3 17,6 - 28,8	25,1 20,5 - 30,7	21,5 15,0 - 30,7	18,9 16,8 - 21,3
EEF-Cdua (23)	6,4 3,3 - 12,4	28,6 21,5 - 38,1	13,5 9,4 - 19,2	22,1 20,4 - 23,9
EEF-Cmel (26)	23,5 21,4 - 25,7	27,5 23,4 - 32,3	13,7 10,5 - 17,8	32,4 27,3 - 38,4
EEF-Tact (29)	14,8 12,5 - 17,6	17,5 11,7 - 26,2	17,2 12,6 - 23,6	35,6 31,5 - 40,3
EAF-Tact (30)	8,1 6,6 - 10,0	20,1 15,6 - 25,8	10,5 8,7 - 12,6	24,1 21,3 - 27,2
EEF-Hoch (32)	18,2 16,7 - 19,9	32,0 23,9 - 42,7	15,6 11,1 - 22,1	> 50,0
Ácido Betulínico	24,4 17,01 - 35,15	8,4 6,10 - 11,58	14,6 9,18 - 23,50	3,5 2,61 - 4,79
Doxorrubicina	0,2 0,13 - 0,23	0,3 0,17 - 0,31	0,02 0,01 - 0,02	0,1 0,09 - 0,17

FHC-fração hexânica da casca, FDC-fração diclorometano da casca, EEF- extrato etanólico das folhas, EAF-extrato aquoso das folhas. Os resultados foram expressos como CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95 % a partir de 2 experimentos independentes para as linhagens tumorais humanas de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e colorretal (HCT-116). Doxorrubicina ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi usada como controle positivo.

5.3.2 Atividade hemolítica

As oito amostras que revelaram potencial antiproliferativo nos ensaios biológicos pelo método do MTT foram submetidas à determinação da atividade hemolítica usando a suspensão de eritrócitos de camundongos a 2%. Após 60 min de incubação sob agitação constante, apenas a fração hexânica da casca de *Platonia insignis* (16) e os extratos etanólicos das folhas de *Combretum duarteanum* (23) e de *Terminalia actinophylla* (29), revelaram atividade hemolítica e valores de CE_{50} de 48,5 (35,4-66,6), 27,5 (21,2-35,7) e 13,2 (10,1-17,4) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 5 – Atividade hemolítica de extratos e frações de plantas pertencentes a diferentes famílias do semiárido brasileiro frente a eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) após 1h de incubação.

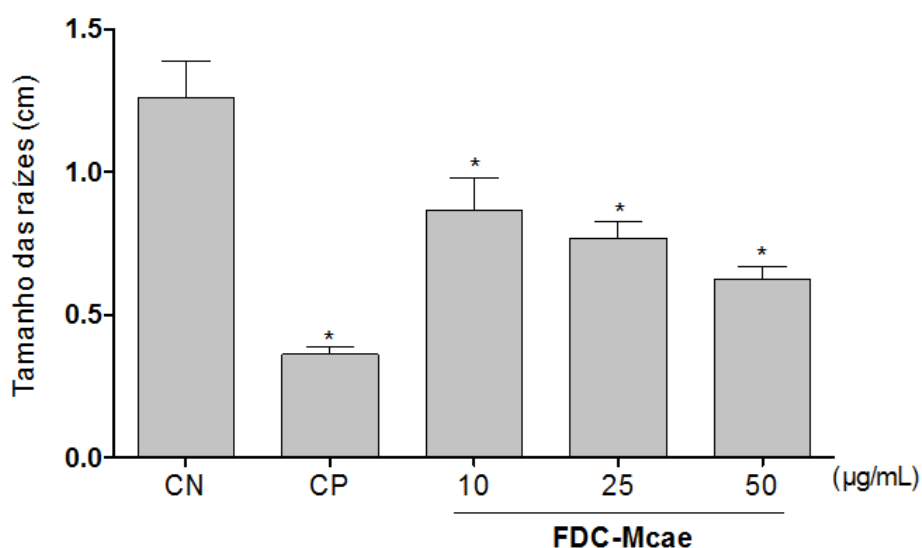
AMOSTRAS	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
FHC-Mcae (4)	> 250
FDC-Mcae (5)	> 250
FHC-Pins (16)	48,5 35,4 - 66,6
EEF-Cdua (23)	27,5 21,2 - 35,7
EEF-Cmel (26)	> 250
EEF-Tact (29)	13,2 10,1 - 17,4
EAF-Tact (30)	> 250
EEF-Hoch (32)	> 250

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram obtidos por regressão não-linear a partir de 2 experimentos independentes.

5.3.3 Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade (em células meristemáticas de *Allium cepa*)

O tratamento das raízes de *A. cepa* com a FDC-Mcae (5) revelou toxicidade e redução do crescimento das raízes em todas as concentrações testadas ($0,86 \pm 0,11$; $0,76 \pm 0,10$ e $0,64 \pm 0,04$ cm nas concentrações de 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) quando comparado ao controle negativo ($1,26 \pm 0,13$ cm) com $p < 0,05$ (Figura 5). O grupo controle positivo, tratado com sulfato de cobre ($0,6 \mu\text{g/mL}$), apresentou raízes com tamanho de $0,36 \pm 0,02$ cm

Figura 5 - Tamanho das raízes em espécimes de *Allium cepa* expostas à fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* nas concentrações de 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ após 72 h de exposição.



Valores correspondem à média \pm D.P.M. ($n=5$). CN: controle negativo - água da de abastecimento desclorificada, CP: controle positivo - sulfato de cobre ($0,6 \mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do Teste de Tukey.

De maneira similar ao demonstrado nos resultados de toxicidade, todos os tratamentos (10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) causaram redução do IM ($39,2 \pm 4,6$; $37,7 \pm 4,0$ e $33,8 \pm 4,0\%$) em relação ao controle negativo ($74,6 \pm 8,6\%$), sugerindo uma ação antiproliferativa da FDC-Mcae (5) ($p < 0,05$). O oposto pode ser verificado quando se analisou o índice mutagênico, uma vez que nenhum dos tratamentos apresentou indicação de mutagenicidade. Já o controle positivo apresentou ação

tóxica e mutagênica. Quanto ao o índice de fase, a maior parte das células se apresentou em divisão e está na fase de prófase (**Tabela 6**).

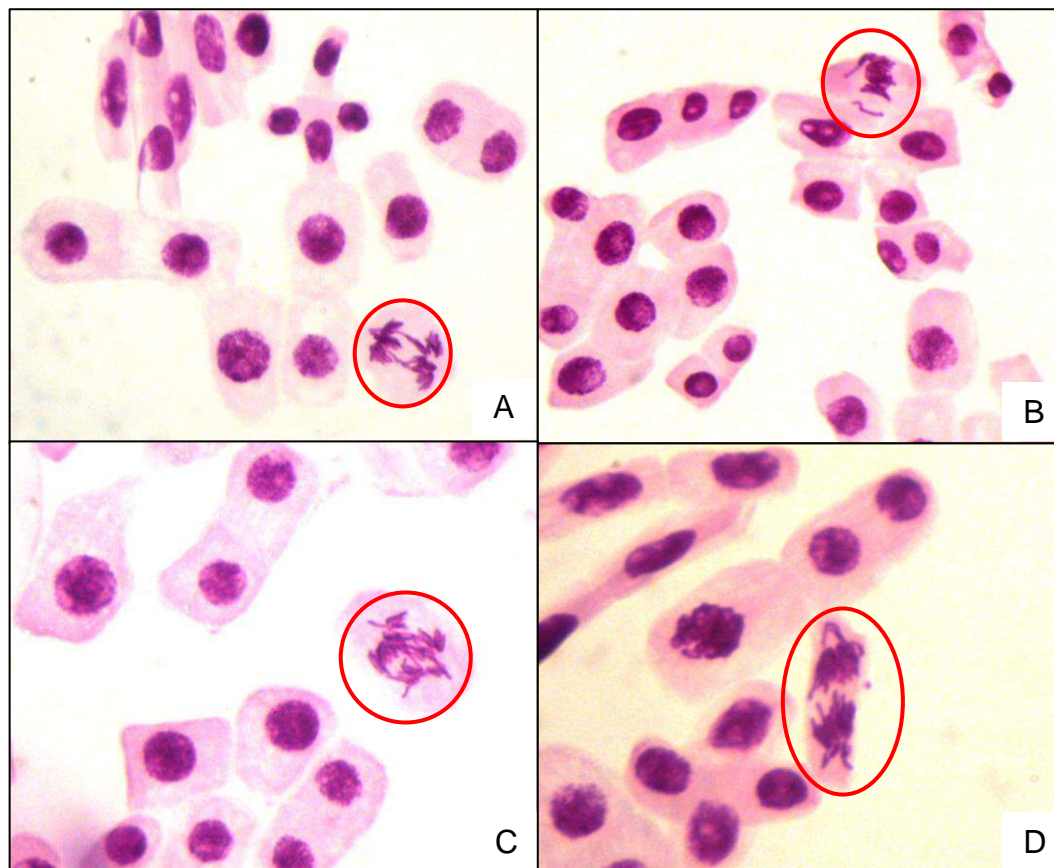
Tabela 6 – Índice de fases em células em divisão, índice mitótico e índice mutagênico em espécimes de *Allium cepa* expostas à fração diclorometano da casca da *Mimosa caesalpinifolia* nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL após 72 h de exposição.

Tratamentos µg/mL	Índice de fase de células em divisão (IF%)				IM (%)	IMt (%)
	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
CN	77,9 ± 0,9	9,5 ± 0,3	6,7 ± 1,0	5,9 ± 0,3	74,6 ± 8,6	0,04 ± 0,1
CP	68,4 ± 1,2	11,6 ± 0,9	10,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	32,6 ± 4,4 *	1,0 ± 0,2*
10	95,7 ± 0,8	2,9 ± 0,5	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,3	39,2 ± 4,6 *	0,06 ± 0,1
25	93,8 ± 0,8	3,9 ± 0,2	1,7 ± 0,9	0,6 ± 0,8	37,7 ± 4,0 *	0,08 ± 0,1
50	93,1 ± 1,1	3,7 ± 0,8	2,7 ± 0,9	0,9 ± 0,8	33,8 ± 4,0 *	0,02 ± 0,04

Valores correspondem à média ± D.P.M. (n=5 bulbos/concentração) e total de 5000 células. CN: controle negativo - água da de abastecimento desclorificada, CP: controle positivo - sulfato de cobre (0,6 µg/mL). * p < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do Teste de Tukey.

Para avaliação do índice genotóxico (IG), as seguintes alterações foram consideradas aberrações cromossômicas: pontes, perdas, fragmentos e atrasos (**Figura 6**).

Figura 6 - Fotomicrografias de aberrações cromossômicas em células de *Allium cepa* expostas em diferentes concentrações da fração diclorometano da casca da *Mimosa caesalpinifolia* após 72 de exposição.



A – Ponte anáfase, B – Perda cromossômica, C – Atraso cromossômico, D – Fragmento cromossômico.

Os resultados expressos na **Tabela 7** indicam aumento significativo ($p < 0,05$) de aberrações cromossômicas na forma de pontes apenas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($17,0 \pm 1,1$). Por outro lado, houve aumento do IG ($0,60 \pm 0,1$ e $0,76 \pm 0,1\%$) nas duas maiores concentrações testadas (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), quando comparada ao controle negativo ($0,34 \pm 0,1\%$), sugerido possíveis efeitos genotóxicos da FDC-Mcae (5) nessas concentrações. O controle positivo sulfato de cobre (0,6 $\mu\text{g/mL}$) favoreceu o surgimento de todas as formas de aberrações cromossômicas analisadas [pontes ($38,0 \pm 1,1$), perdas ($12,0 \pm 0,9$), fragmentos ($22,0 \pm 1,7$) e atrasos ($1,86 \pm 0,2$) e aumentou o IG para $1,86 \pm 0,2\%$ quando comparados ao controle negativo ($6,0 \pm 1,1$; $2,0 \pm 0,5$; $6,0 \pm 0,8$ e $3,0 \pm 0,4$ e $0,34 \pm 0,1\%$, respectivamente) ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Índice de aberrações cromossômicas e índice genotóxico em espécimes de *Allium cepa* expostas à fração diclorometano da casca da *Mimosa caesalpinifolia* nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL após 72 h de exposição.

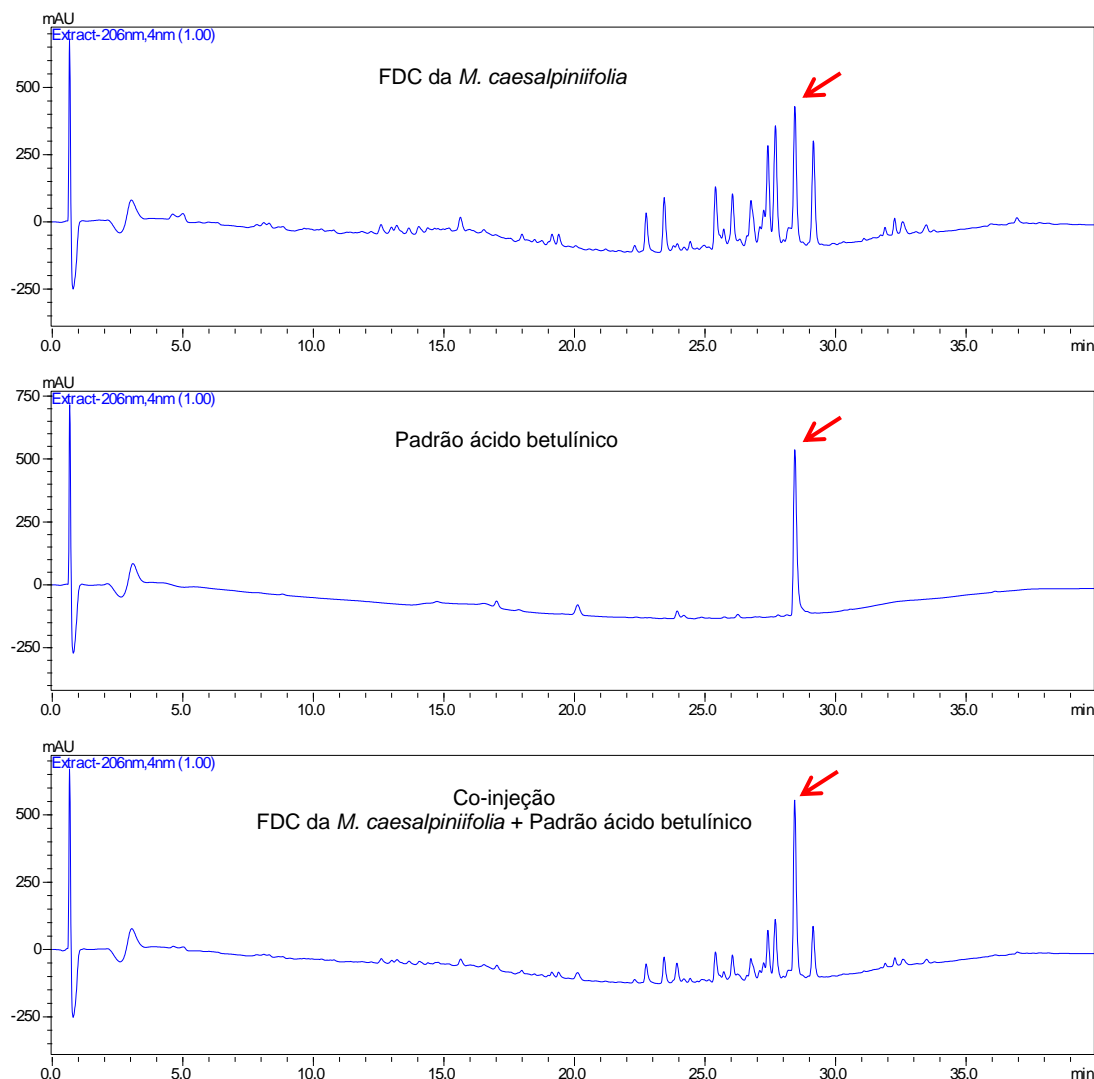
Tratamentos µg/mL	Aberrações cromossômicas				IG (%)
	Pontes anafásicas	Perdas cromossômicas	Fragmentos cromossômicos	Atrasos anafásicos	
CN	6,0 ± 1,1	2,0 ± 0,5	6,0 ± 0,8	3,0 ± 0,4	0,34 ± 0,1
CP	38,0 ± 1,1*	12,0 ± 0,9*	22,0 ± 1,7*	21,0 ± 2,2*	1,86 ± 0,2*
10	4,0 ± 0,4	1,0 ± 0,4	2,0 ± 0,9	5,0 ± 1,2	0,22 ± 0,2
25	12,0 ± 1,1	2,0 ± 0,5	7,0 ± 0,9	8,0 ± 0,9	0,60 ± 0,1*
50	17,0 ± 1,1*	4,0 ± 0,8	10,0 ± 1,0	7,0 ± 1,5	0,76 ± 0,1*

Valores correspondem à média ± D.P.M. bulbos/concentração). CN: controle negativo - água da de abastecimento desclorificada, CP: controle positivo - sulfato de cobre (0,6 µg/mL). * p < 0,05 quando comparado ao controle negativo (ANOVA seguido pelo teste de Tukey)

5.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A **Figura 7** apresenta o cromatograma obtido para a FDC-Mcae (5) no comprimento de onda de 206 nm, com um pico característico da presença de ácido betulínico. A presença desse composto foi evidenciada a partir da análise do padrão de ácido betulínico, que apresentou tempo de retenção de 28,44 min. A análise de co-injeção confirmou a presença do ácido betulínico, uma vez que houve um aumento na intensidade do pico característico do composto, com tempo de retenção de 28,46 min.

Figura 7 - Cromatograma da fração diclorometano da casca da *Mimosa caesalpinifolia*, do padrão ácido betulínico e de sua co-injeção em HPLC.

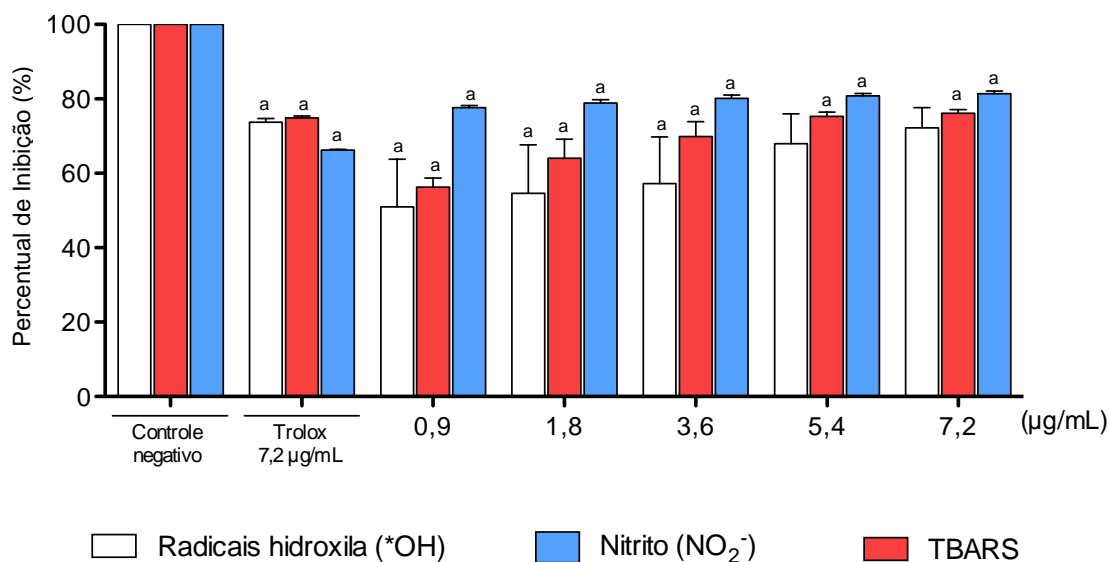


5.3.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Os ensaios antioxidantes *in vitro* pelos métodos de inibição de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), diminuição de níveis de TBARS e produção de nitrito ($\text{NO}_2\cdot$) foram realizados apenas para as amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23) que apresentaram resultados promissores nos ensaios antiproliferativos. As **figuras 8** e **9** apresentam os resultados dos percentuais de inibição de cada amostra testada e do padrão Trolox[®] em relação ao meio reacional (controle negativo que contém apenas o radical).

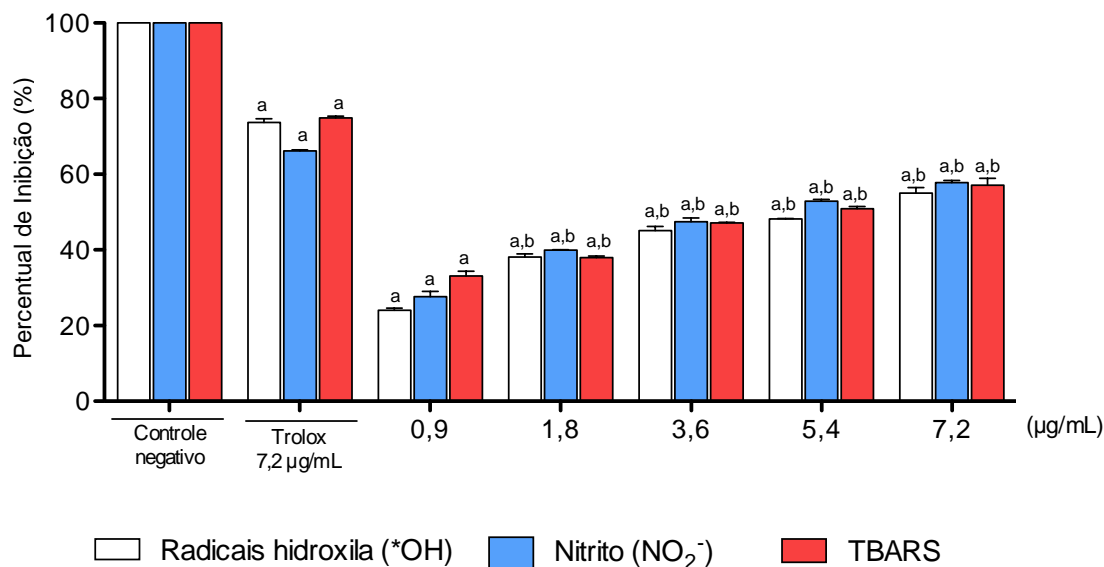
Ambas as amostras apresentaram potencial antioxidante, uma vez que foram observados resultados estatisticamente significantes de inibição na produção de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), diminuição de níveis de TBARS e da produção de nitrito (NO_2^-) com a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* e com o extrato etanólico das folhas de *Combretum duarteanum* ($p < 0,05$) (**Figuras 8 e 9**). Porém, as duas maiores concentrações (5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$) da FDC-Mcae (5) não foram capazes de reduzir os níveis de radicais $\cdot\text{OH}$ ($p < 0,05$) em relação ao Trolox[®]. A relação concentração-efeito ficou mais evidenciada nos estudos com a EEF-Cdua (23), com a qual foi possível perceber que o aumento da concentração foi capaz de aumentar a atividade antioxidante em relação à concentração imediatamente anterior. No entanto, a FDC-Mcae (5) apresentou os menores valores de CE_{50} (0,29; 0,10 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$) em todos os parâmetros analisados (produção de $\cdot\text{OH}$, níveis de TBARS e produção de NO_2^-) quando comparados aos valores de CE_{50} obtidos com o EEF-Cdua (23) (5,24; 5,04 e 4,52 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente (**Tabela 8**).

Figura 8 - Capacidade antioxidante da fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* (0,9-7,2 $\mu\text{g/mL}$) frente à inibição de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), diminuição de níveis de TBARS e da produção de nitrito (NO_2^-).



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (erro do padrão da média) de experimentos independentes ($n=3$). O controle negativo equivale apenas ao meio reacional. Trolox (7,2 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,05$ em relação ao meio reacional (100% de radical) analisado por ANOVA seguido por Newman-Keuls.

Figura 9 - Capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas da espécie *Combretum duarteanum* (0,9-7,2 µg/mL) frente à inibição de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), diminuição de níveis de TBARS e da produção de nitrito (NO_2^-).



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (erro padrão da média). de experimentos independentes (n=3). O controle negativo equivale apenas ao meio reacional. Trolox (7,2 µg/mL) foi usado como padrão antioxidante. ^ap < 0,05 em relação ao meio reacional (100% de radical) analisado por ANOVA seguido Newman-Keuls; ^bp < 0,05 em relação a concentração anterior analisado por ANOVA seguido por Newman-Keuls.

Tabela 8 - Concentração eficaz necessária para causar 50% do efeito máximo (CE_{50}) obtida em ensaios antioxidantes *in vitro* com a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* e o extrato etanólico das folhas da espécie *Combretum duarteanum* empregando os métodos de remoção de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), remoção de radicais nitrito (NO_2^-) e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Parâmetro analisado	CE_{50} (µg/mL)	
	FDC-Mcae (5)	EEF-Cdua (23)
Radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)	0,29	5,24
Remoção nitrito (NO_2^-)	0,10	5,04
TBARS	0,78	4,52

5.3.4 Análise espectrométrica UV-VIS

A amostra FDC-Mcae (5) apresentou um pico absorção na região de 290 nm, e a amostra EEF-Cdua (23), apresentou picos de absorção entre os comprimentos de onda 250 e 350 nm, característicos de compostos fenólicos (**Figuras 10 e 11**).

Figura 10 - Perfil no UV-Vis da fração diclorometano da casca da *Mimosa caesalpiniiifolia*. λ = 200 a 500 nm, concentração de 1 mg/mL.

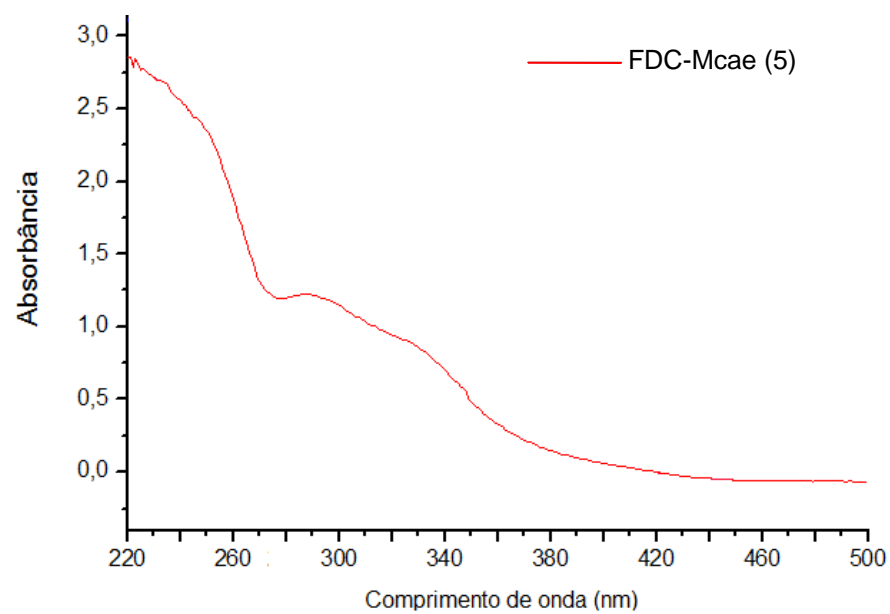
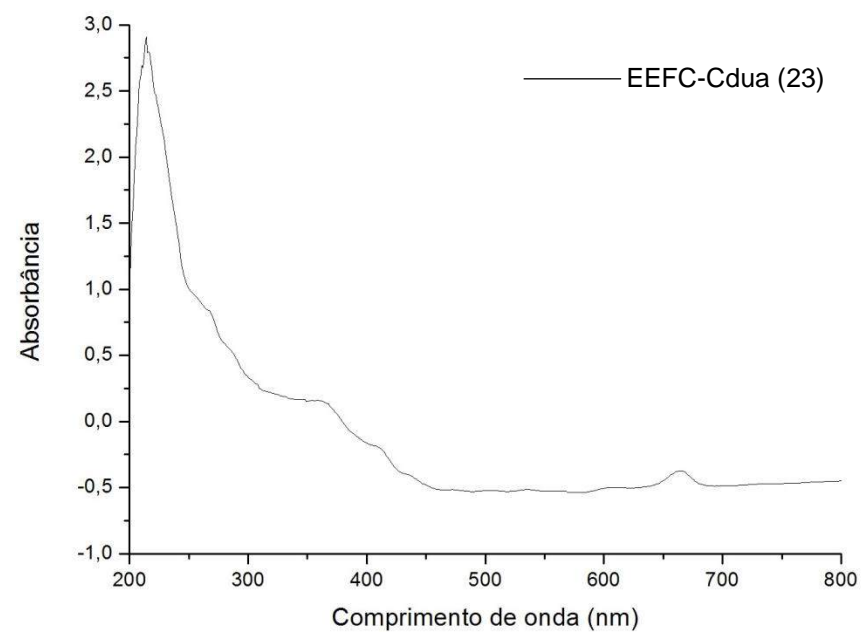


Figura 11 - Perfil no UV-Vis do extrato etanólico das folhas de *Combretum duarceanum*. λ = 200 a 800 nm, concentração de 150 μ g/mL.

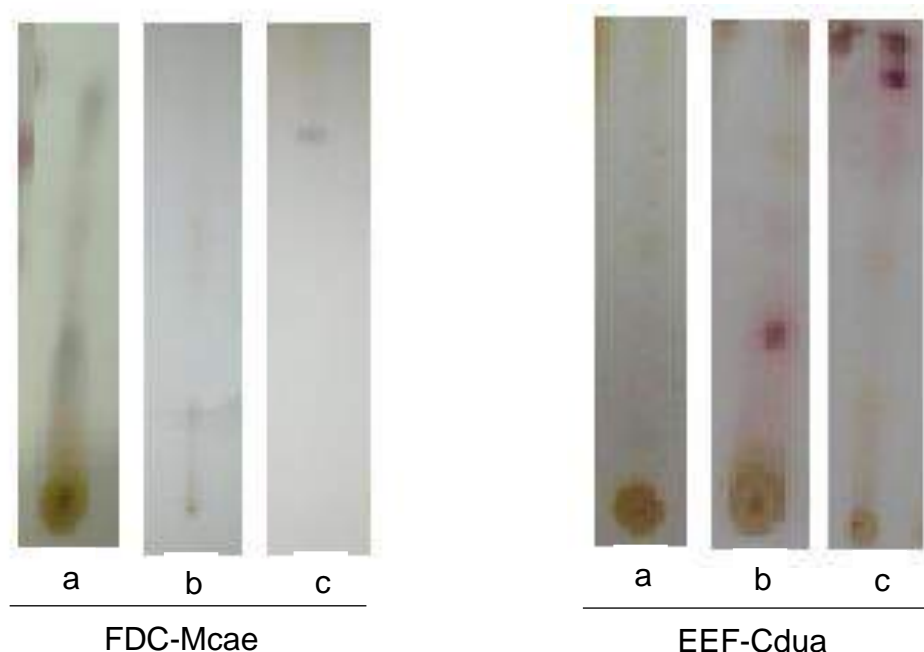


5.3.5 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

A análise da amostra FDC-Mcae (5) em CCDA eluídas em Hex:AcOEt (8:2) e reveladas em solução de sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) demonstrou presença de terpenóides e esteróides indicadas pela coloração roxa na cromatoplaça. Quando utilizou-se o solvente CHCl_3 :MeOH:H₂O/65:30:5 não foi observada eluição do ponto de aplicação das amostras na placa, mas com uma leve coloração roxa na parte superior da placa eluída (**Figura 12**).

Para a amostra EEF-Cdua (23) no sistema de solvente hexano/AcOEt (8:2) verificou-se que praticamente não houve eluição das substâncias presentes no extrato etanólico, indicando uma predominância de substâncias de natureza polar. No sistema de solvente CHCl_3 /MeOH (9:1), a cromatoplaça apresentou manchas roxas característica de terpenóides. Ao utilizar a fase móvel CHCl_3 /MeOH/H₂O (65:30:5) as substâncias eluíram mais, podendo ser observado com maior nitidez as manchas roxas relativas a terpenóides. Verificou-se também na cromatoplaça a presença de manchas amarelas características de compostos fenólicos (**Figura 12**).

Figura 12 - Cromatoplaça da fração diclorometano da casca da *Mimosa caesalpinifolia* e do extrato etanólico das folhas de *Combretum duarteanum*.



Revelador: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Eluentes: (a)-hexano/AcOEt (8:2), (b)- CHCl_3 /MeOH (9:1) e (c)- CHCl_3 /MeOH/H₂O (65:30:5).

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Citotoxicidade contra células tumorais e atividade hemolítica

Durante a segunda metade do século XX, o desenvolvimento de agentes citotóxicos revolucionou a terapia anticâncer, pois o tratamento adjuvante com esses agentes tem demonstrado uma vantagem incontestável quando comparado ao tratamento tradicionalmente baseado na cirurgia e monoquimioterapia, tornando possível a cura de neoplasias como leucemia aguda infantil, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e tumores de células germinativas (SOUZA et al., 2007; ISMAEL et al., 2008). Porém, apesar destes avanços e do desenvolvimento da química combinatória, da modelagem molecular e de outras técnicas químicas de síntese usadas pelas indústrias farmacêuticas e instituições de pesquisa, a quimioterapia do câncer ainda permanece desalentadora e a mortalidade proveniente das várias formas de câncer continua inaceitavelmente alta, uma vez que do total de 7,9 milhões de mortes em 2007, 13% foram ocasionadas por doenças neoplásicas (BUTLER, 2004). Neste cenário, as plantas têm oferecido a oportunidade da descoberta de compostos com propriedades citotóxicas e antitumorais contra diferentes tipos histológicos de câncer, estando, inclusive, vários destes compostos, além de outros já aprovados para o tratamento, em estudos de fase clínica para a avaliação e compreensão de sua eficácia terapêutica, do seu mecanismo de ação e dos efeitos adversos (ISMAEL et al., 2008; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Sabendo da importância farmacológica e popular das plantas para a produção e desenvolvimento de medicamentos e de que células de mamíferos em cultura são ferramentas muito utilizadas para avaliar a citotoxicidade de novos compostos com atividade anticâncer (MILITÃO et al 2012; BARROS et al., 2013; FERREIRA et al., 2013a; AMARAL et al., 2014), o presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade citotóxica por MTT de 36 extratos pertencentes a 12 espécies de plantas e o isolado ácido betulínico frente a um painel de 4 linhagens tumorais.

De todas as amostras testadas, a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpiniiifolia* [FDC-Mcae (5)] revelou o maior potencial citotóxico, com valores de CI_{50} variando entre 4,7 e 7,1 $\mu\text{g/mL}$ contra células tumorais de carcinoma de ovário, cólon, de sistema nervoso central e leucêmicas.

O ácido betulínico isolado da FDC-Mcae (5) também demonstrou resultados promissores, apresentando melhor resultado de inibição da proliferação celular para a linhagem HCT-116 com CI_{50} de 3,5 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado difere do apresentado pela FDC-Mcae (5) que apresentou menor valor de CI_{50} para a linhagem HL-60, isso pode ser devido ao sinergismo e a presença de outros metabólitos presentes na fração.

No recente trabalho realizado por Ragasa, Espineli e Shen (2014), o ácido betulínico também foi isolado do extrato diclorometano das cascas da espécie *Barringtonia asiatica*, sendo empregado em avaliação citotóxica juntamente com o também isolado triterpeno 22-O-tigloylcamelliagenina apresentando resultados significativos de inibição da proliferação celular para a linhagem de câncer humano HCT-116 com CI_{50} 8,0 $\mu\text{g/mL}$, para a linhagem A-549 (adenocarcinoma do pulmão) também apresentou resultados promissores com CI_{50} 6,0 $\mu\text{g/mL}$, em conclusão os autores atribuem os significativos achados citotóxicos ao ácido betulínico.

O glioblastoma é o tumor maligno intracraniano mais comum, originário de células gliais, com crescimento rápido, invadindo o tecido normal do cérebro, morfologicamente diverso e prognóstico sombrio, apesar da multimodalidade terapêutica (MILLER; PERRY, 2007; ONCOGUIA, 2014). Leucemias são a quinta maior causa de morte para homens e a sexta para mulheres, sendo o tipo de neoplasma mais mortal em pessoas com até 20 anos de idade. Embora muitas das atuais formas de tratamento tenham se revelado relativamente eficazes em alcançar a cura, a grande maioria dos fármacos usados no tratamento das leucemias apresentam graves efeitos colaterais. O câncer ovariano é um dos mais letais e costumeiramente mais mortal que os câncer cervical e endometrial juntos, não sendo uma doença de mulheres jovens ou meninas (REA, 2004). É a neoplasia ginecológica mais letal com sobrevida global inferior a 40% em cinco anos (REIS, 2005). As neoplasias do trato gastrointestinal (TGI) constituem importante causa de mortalidade por câncer, com incidência comparável ao câncer pulmonar, e

devido ao fato dos sintomas aparecerem tardiamente, geralmente são diagnosticadas em estágio avançado. Juntos, os cânceres do TGI correspondem a cerca de 17,9% do casos esperados para o ano de 2014 no Brasil para o sexo masculino e a cerca de 9,1% para o sexo feminino. O câncer de cólon e reto, por exemplo, é o terceiro tipo mais incidente na população brasileira e embora esteja, em sua maioria, relacionado a causas genéticas, estudos mostram que até 50% dos casos podem ser prevenidos com mudanças na dieta e no estilo de vida (INCA, 2014).

De acordo com o *American National Cancer Institute* (NCI), extratos que apresentam valores de CI_{50} menores que 30 $\mu\text{g/mL}$ são considerados promissores para estudos posteriores de purificação de moléculas (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Neste estudo, com exceção das amostras EEF-Hoch (32) para a linhagem OVCAR-8, EEF-Cmel (26) e EEF-Tact (29) para a linhagem HCT-116, todas as amostras tiveram CI_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$.

Recentemente, Santos et al. (2014) mostraram que extratos metanólicos dos galhos e folhas de *Bauhinia purpurea* (Fabaceae) causaram inibição do crescimento celular das linhagens humanas SF-295, HCT-8 (carcinoma de cólon) e melanoma (MDA/MB-435) entre 26,2 e 29,8%. Almeida et al. (2014), trabalhando com as mesmas linhagens utilizadas no protocolo de triagem citotóxica deste trabalho, relataram a capacidade antiproliferativa do extrato etanólico, clorofórmico e hexânico das folhas de *Annona vepretorum* (Annonaceae), diminuindo a proliferação celular entre 59,9 e 71,2%. Singh et al. (2013), ao avaliar o ação citotóxica do extrato clorofórmico das folhas de *Anthocephalus cadamba* (Rubiaceae), revelaram valores de CI_{50} maiores (entre 7 e 8 $\mu\text{g/mL}$) que os encontrados aqui para a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpiniiifolia* quando testados contra linhagens de carcinomas de pulmão (A-549), ovário (IGR-OV-1), próstata (PC-3) e glioblastoma (SF-295).

Um estudo feito com a planta *Myracrodruon urundeuva* (Anarcadiaceae), popularmente conhecida como aroeira do sertão, uma árvore nativa da Caatinga e do Cerrado, com larga distribuição no Nordeste do Brasil, revelou percentuais de inibição da proliferação celular superiores a 90% contra diferentes linhagens tumorais (SF-295, HCT-8 e MDA/MB-435) após 72h de incubação e achados bioquímicos e morfológicos de morte celular sugestivos

de apoptose em células HL-60 após 24h de exposição. Além disso, o extrato etanólico das sementes de *M. urundeuva* foi capaz de inibir o crescimento celular do tumor Sarcoma 180, um dos protocolos experimentais *in vivo* mais utilizados na procura de novas substâncias antitumorais (FERREIRA et al., 2011; MILITÃO et al., 2012).

O extrato etanólico do pseudofruto da espécie *Hovenia dulcis* pertencente à família Rhamnaceae, demonstrou altas porcentagens na inibição do crescimento em algumas linhagens de células tumorais, apresentando seletividade com elevado percentual de inibição do crescimento celular nas linhagens SP2/0 (mieloma de camundongo) e BW (timoma de camundongo) (CASTRO et al., 2002).

De acordo com Craag e Newman (2005), boa parte dos agentes utilizados na terapia anticâncer são derivados de fontes naturais e foram descobertos a partir de testes de citotoxicidade, por inibirem a proliferação de células cancerosas em modelos *in vitro* ou *in vivo*.

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* pelo método do MTT serem eficazes na procura de novas substâncias antitumorais, este método não permite definir o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996). Assim, posteriormente à análise citotóxica, avaliou-se o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana. A investigação da atividade hemolítica com eritrócitos de camundongos permite caracterizar o mecanismo citotóxico direto sobre a membrana plasmática das células, já que os mesmos possuem grande semelhança com os eritrócitos humanos, principalmente quanto à sensibilidade (DRESCH et al., 2005). Este método é um ótimo indicador para averiguar agressão *in vitro*, por causa da estabilidade mecânica característica da membrana eritrocitária (SHARMA; SHARMA, 2001).

A presença da atividade hemolítica foi observada em apenas três dentre as oito amostras analisadas, onde a EC_{50} mostrou valores de 48,5; 27,5 e 13,2 $\mu\text{g/mL}$ para as amostras FHC-Pins (16), EEFCdua (23) e EEFTact (29) respectivamente, sugerindo possivelmente que o mecanismo de atividade citotóxica desempenhado por esta amostra esteja relacionado à indução de dano em nível de membrana plasmática, e não por uma possível interferência com os mecanismos intracelulares. Mais recentemente, Farias et al. (2013)

demonstrou que o extrato etanólico das sementes de *M. urundeuva*, dito anteriormente com atividade antiproliferativa, apresentou cerca de 20% de atividade hemolítica na menor concentração testada (1,9 mg/mL), sugerindo que a atividade de inibição do crescimento celular de alguns produtos citotóxicos naturais seja por meio de danos causados à membrana celular.

Embora o mecanismo exato da ruptura das membranas das hemácias por compostos do metabolismo secundário ainda não seja claramente elucidado, sabe-se que esta atividade está correlacionada com propriedades anfífilas destes compostos. Estudos indicam que alguns compostos vegetais, como terpenoides, podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e, subseqüentemente, produzir hemólise (ZHANG et al., 1997). Em relação às saponinas, a principal hipótese considera que essas moléculas interagem com as membranas lipídicas e formam complexos insolúveis com o colesterol levando à formação de poros, permeabilização das células e perda de hemoglobina para o meio extracelular (GAUTHIER et al., 2009).

5.4.2 Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade (*Allium cepa*)

Várias espécies vegetais são utilizadas como sistemas de teste citogenéticos, pois apresentam boa sensibilidade e confiabilidade, exigem ensaios a curto prazo e são de fácil armazenamento e cultura no laboratório (FISKESJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; SETH et al., 2008). A grande vantagem do uso destes vegetais sobre os outros sistemas se dá, sobretudo, pelo fato de seus cromossomos serem grandes e responderem aos mutágenos de maneira similar aos mamíferos e outros eucariotos (SETH et al., 2008).

Entre as várias plantas superiores usadas como organismos teste, a espécie *Allium cepa* tem sido usada como um padrão eficiente para monitoramento citogenético (LEME; MARIN-MORALES, 2008, GONZÁLEZ et al., 2012; KHANNA, SHARMA, 2013). Embora haja diferença metabólica entre vegetais e animais, existem outras numerosas semelhanças indicando que o teste que utiliza a espécie vegetal *A. cepa* pode ser utilizado para estudos de alterações celulares que também ocorrem em mamíferos (FISKESJO, 1985; FELICIDADE et al., 2014).

As avaliações pré-clínicas devem permitir e demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso (GOLDIM, 2007). Dentre estas avaliações se destaca os ensaios que determinam a toxicidade de agentes terapêuticos em estudo fornecendo as primeiras informações sobre a segurança destes compostos.

Aqui, observou-se, macroscopicamente uma inibição significativa do crescimento das raízes de *A. cepa* nas concentrações de (10, 25 e 50 µg/mL), sugerindo que, a FDC-Mcae (5) apresenta efeito tóxico. Assim como em nossos achados, Rathnasamy et al, (2013) evidenciou a inibição de crescimento radicular pelos extratos de *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae), *Adhatoda vasica* (Acanthaceae) e *Carica papaya* (Caricaceae). De forma similar, a indicação de toxicidade verificada pela inibição do crescimento das raízes foi considerada nos estudos de Arraes e Longhin (2012) como sendo uma análise satisfatória e eficaz.

Em nosso trabalho, também percebeu-se redução do Índice Mitótico (IM)), explicando, em nível celular, a redução macroscópica do crescimento das raízes. Essas avaliações são utilizadas em diferentes estudos e a maioria deles mostrou resultados satisfatórios, constituindo-se como parâmetros importantes para a avaliação da toxicidade celular de diversas substâncias naturais e sintéticas, onde a citotoxicidade de determinado agente químico pode ser determinada pelo aumento ou pela diminuição do IM e pela presença de micronúcleos que expressa ação mutagênica (LEME e MARIN-MORALES, 2008; KHANNA; SHARMA, 2013).

A redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações, derivadas da ação química do agente sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (LEME e MARIN-MORALES, 2008). Conforme Turkoglu (2008), a redução desse índice pode também ser devido a uma inibição da síntese do DNA ou bloqueio da Fase G2 do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose. Porém, em nossos resultados não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes fases do ciclo celular, uma vez que a grande parte das células analisadas estava na prófase e indícios de ação mutagênica de FDC-Mcae (5) na forma de micronúcleos também não foram encontrados.

Para verificar o índice genotóxico (IG), foram analisadas as anomalias do ciclo mitótico (ponte anáfase, perda cromossômica, atraso cromossômico, fragmento cromossômico), sendo observado um aumento significativo apenas nas duas maiores concentrações testadas, indicando um possível efeito genotóxico da FDC-Mcae (5), nestas concentrações. Segundo Puli e Patil (2007) uma característica interessante é que as substâncias citotóxicas são geralmente genotóxicas. Em nossos resultados isso não foi observado para amostra na concentração de 10 µg/mL, onde apresentou indícios de citotoxicidade e ausência de genotoxicidade. O aumento da citotoxicidade pela presença de agentes genotóxicos ainda não é bem conhecida, pois as respostas aos danos genotóxicos é complexa, podendo provocar desde reparos, mutações até a morte celular (KAINA, 2003; FRITZ e KAINA, 2006).

Extratos de diferentes partes de plantas encontradas em ambientes áridos da África como *Morinda lucida* (extrato das raízes), *Azadirachta indica* (folhas), *Terapluera tetraptera* (frutos), *Plumbago zeylanica* (raízes), *Xylopi aethiopica* (frutos), *Newbouldia laevis* (folhas), *Alstonia boonei* (casca), *Enantia chlorantha* (casca) e *Rauvolfia vomitoria* (raízes) avaliadas quanto ao seu potencial mutagênico pelo teste de AMES em cepa de *Escherichia coli* também causaram redução do crescimento das raízes de *A. cepa* e do IM e aumentaram o número de aberrações cromossômicas de forma dependente da concentração (ALADE et al., 2009).

5.4.3 Perfil fitoquímico

O conhecimento da constituição química das plantas usadas na medicina popular envolve um sistema complexo e combinatório de diferentes ferramentas capazes de elucidar estruturalmente as inúmeras classes e/ou moléculas que podem vir a constituir uma única planta (CARVALHO et al., 2008). Espectrofotometria é uma das técnicas de análise mais difundidas devido à sua simplicidade, confiabilidade e instrumentação de baixo custo para ambas às medições diretas e acoplada a outras técnicas ou processos, tais como a cromatografia (ROCHA, 2004). É fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (PERKAMPUS, 1992) e permite

análises qualitativas e quantitativas de misturas moleculares, possibilitando a visualização dos perfis espectrais e indicando a presença dos constituintes de uma mistura (CARVALHO et al., 2008).

Os compostos fenólicos exibem picos de absorção entre 230 e 290 nm, coincidindo com os intervalos encontrados com as amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23), as quais apresentaram bandas características, sugerindo a presença de tais compostos como observado nas análises espectrométricas UV-VIS.

A banda espectral apresentada pela amostra EEF-Cdua (23) é característica para flavonóides, um composto fitoquímico pertencentes à classe de compostos fenólicos. Os flavonóides constituem um grupo de moléculas com grande diversificação no reino vegetal e possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002). A amostra EEF-Cdua (23) também apresentou uma banda acentuada próxima de 650 nm. Nesse espectro de leitura predominam as clorofilas (GERBER, 2013).

A análise preliminar da presença de metabólitos nas amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23) feita por CCDA demonstra a presença de manchas com coloração roxa, indicativas da presença de terpenoides em ambas as amostras. Verificou-se também na cromatoplaça da amostra EEF-Cdua (23) a presença de manchas amarelas confirmando a presença dos compostos pertencentes à classe dos flavonoides (CHAVES, 1997). A ingestão desses compostos está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer, e que estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante nos vegetais (SILVA et al., 2010). A capacidade antioxidante demonstrada pelos flavonoides é uma das diversas atividades biológicas demonstrada por estes compostos que mais tem sido associada à prevenção de enfermidades em países desenvolvidos (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000).

O composto ácido betulínico foi evidenciado na amostra FDC-Mcae (5) após caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), apresentando um pico característico desse composto, sendo

posteriormente isolado e empregado nos ensaios citotóxicos (MTT) onde revelou resultados promissores. Similarmente, Ragasa et. al (2014) isolou o ácido betulínico no extrato diclorometano das cascas da espécie *Barringtonia asiatica*, indicando sua solubilidade e extração em solventes com características apolares.

O ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico que ocorre naturalmente e que demonstrou citotoxicidade seletiva contra um número de tipos específicos de tumores com ausência de efeitos colaterais sistêmicos. Os diversos mecanismos de ação desempenhados pelo ácido betulínico sugerem a sua ação contra células resistentes a outros agentes quimioterapêuticos. A indução da morte celular está ligada diretamente a via mitocondrial, resultando na ativação de caspases e morte celular por apoptose (EIZNHAMER; XU, 2004; FULDA; DEBATIN, 2005).

Estudos que visam avaliar a combinação do ácido betulínico e fármacos anticancer já conhecidas (doxorrubicina, cisplatina, Taxol, VP16 ou actinomicina D), visam uma nova estratégia para aumentar a eficácia da terapia anticâncer e apresentaram diferentes modos de ação (FULDA; DEBATIN, 2005). No recente trabalho realizado por Ragasa et al. (2014), o ácido betulínico foi empregado juntamente com o triterpeno 22-O-tigloylcamelliagenin, demonstrando inibição da proliferação celular de células de carcinoma de cólon da linhagem HCT-116.

Em outras pesquisas busca-se esse melhoramento da ação citotóxica do ácido betulínico pela modificação da sua estrutura química, como feito por Shi et al. (2014), onde o composto modificado (30-[4-(4-fluorofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-yl] ácido betulínico) demonstrou um efeito oito a nove vezes melhor do que a molécula normal do ácido betulínico contra a linhagem leucêmica HL-60.

5.4.4 Atividade antioxidante *in vitro*

No presente estudo, as amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23) apresentaram atividade antioxidante nos três métodos empregados. No ensaio de peroxidação lipídica, a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) demonstrou valores de CE_{50} de 0,78 e 4,52 $\mu\text{g/mL}$ para as amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23), respectivamente. Esses valores foram mais eficazes quando comparados com os resultados encontrados por

Olivero-Verbel et al. (2010), com valores de CE_{50} de 31,1 e 94,9 $\mu\text{g/mL}$ para óleos essenciais presentes das plantas da flora brasileira *Ocotea odorifera* (Lauraceae) e *Lippia alba* (Verbenaceae). Resultados semelhantes foram obtidos por Neto et al. (2013), contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), com valor de CE_{50} de 0,45 $\mu\text{g/mL}$, porem para uma substancia isolada (nerolidol).

Para o ensaio determinado pela remoção de radicais nitrito (NO_2^{\cdot}), os resultados também se mostraram satisfatório apresentando valores de CE_{50} de 0,10 e 5,04 $\mu\text{g/mL}$ para as amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23). Neto et al., (2013) encontraram valores intermediários para a remoção de radicais nitrito (NO_2^{\cdot}) com valor de CE_{50} de 1,1 $\mu\text{g/mL}$ para o nerolidol, um sesquiterpeno observado em diversos óleos essenciais de plantas medicinais como laranja-amarga (*Citrus aurantium*, Família Rutaceae), gengibre (*Zingiber officinale*, Família Zingiberaceae), lavanda (*Lavandula angustifolia*, Família Lamiaceae) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*, Família Poaceae).

Em relação à capacidade de remoção contra radicais hidroxilas, foi detectada uma diminuição significativa na produção deste, espécie reativa de oxigênio por ambas as amostras FDC-Mcae (5) e EEF-Cdua (23), demonstrando uma propriedade antioxidante *in vitro* e valores de CE_{50} de 0,29 e 5,24 $\mu\text{g/mL}$. Mais uma vez, os achados são comparáveis a compostos isolados como descrito por Costa et al., (2012), que relatam CE_{50} de 0,20 $\mu\text{g/mL}$ para a ciano-carvona, um monoterpene de ocorrência natural componente ativo em plantas medicinais, como hortelã (*Mentha spicata*, Família Lamiaceae), aneto (*Anethum graveolens*, Família Apiaceae), cominho (*Carum carvi*, Família Apiaceae) e capim-cidreira (*Lippia alba*, Família Verbenaceae) (GONÇALVES et al., 2010).

Os resultados encontrados no trabalho de Fu et al. (2014) demonstram uma correlação da presença de compostos fenólicos com a elevada atividade antioxidante dos extratos aquoso, etanólico e acetato de etila da planta *Jatropha curcas* (Euforbiaceae), conhecida como pinhão-manso. Por outro lado, Adedayo et al. (2010), estudando a influencia do estado de maturação fisiológica de frutos da espécie nativa do deserto nigeriano *Dennettia tripetala* (Annonaceae), afirmou que os frutos maduros dessa árvore apresentaram maior quantidade de polifenóis embora tenham sido os frutos imaturos que

mostraram melhor atividade antioxidante, enfatizando que essa propriedade não está ligada unicamente a presença desse metabólito nos vegetais.

Os antioxidantes são definidos como substâncias heterogêneas que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação deste substrato. As defesas não-enzimáticas são compostas principalmente pela glutathiona (GSH), vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinco e selênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998), sendo os carotenóides, os fenóis e as vitaminas C e E os mais investigados quanto as suas propriedades quimiopreventivas. As fases de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese têm sido frequentemente relacionadas ao estresse oxidativo, caracterizado em circunstâncias nas quais o excesso de radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos, sugerindo-se que o processo carcinogênico seja caracterizado por um estado oxidativo crônico, especialmente na etapa de promoção (GRIGOLO et al., 1998). Deste modo, os nutrientes antioxidantes poderiam reduzir o risco de câncer inibindo os danos oxidativos no DNA (LIU; RUSSEL, 2008).

A intervenção na gênese tumoral através da modulação das vias de sinalização intracelulares é a fundamentação da quimioprevenção, muito baseada na ampla variedade de fitoquímicos alimentares naturais. As células cancerígenas adquirem resistência a apoptose por meio da expressão aumentada de proteínas anti-apoptóticas, e/ou por uma repressão ou mutação de proteínas apoptóticas. Então, um meio para evitar a promoção e a progressão da carcinogênese e remover células pré-malignas e malignas do organismo seria pela indução da apoptose ou da parada do ciclo celular por meio de compostos quimiopreventivos (MEHTA et al., 2010; FERREIRA et al., 2011). Assim, a quimioprevenção, ao evitar que deficiências de substâncias antioxidantes que possam causar danos genômicos, baseia-se na tentativa de reverter ou suprimir a passagem de lesões pré-malignas para carcinomas invasores (AMES; WAKIMOTO, 2002).

5.5 CONCLUSÃO

Dentre as 36 amostras estudadas, a fração diclorometano da casca de *Mimosa caesalpinifolia* revelou maior potencial citotóxico *in vitro* contra diferentes tipos histológicos de câncer e antiproliferativa e genotóxica em células meristemáticas de *A. cepa*. Também apresentou atividade antioxidante detectada por meio da remoção de radicais hidroxilas, do óxido nítrico e pela prevenção da formação de TBARS, achados sugestivos da presença de moléculas com ação antitumoral e quimiopreventiva.

REFERÊNCIAS

ADEDAYO, B. C.; OBOH, G.; AKINDAHUNSI, A. A. Changes in the total phenol content and antioxidant properties of pepperfruit (*Dennettia tripetala*) with ripening. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 6, p. 403-409, 2010.

ALADE, A.; OLUFUNSHO, A.; GBENGA, A.; HERBERT, A. B. C. Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 3, p. 461-470, 2009.

ALMEIDA, J. R. G. D. S.; ARAUJO, C. S.; PESSOA, C. O.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade Antioxidante, Citotóxica e Antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 258-264, 2014.

AMARAL, D. N.; CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CASTRO, R. P.; SABINO, J. R.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C.; SANT'ANNA, C. M. R.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Docking, Synthesis and Antiproliferative Activity of N-Acylhydrazone Derivatives Designed as Combretastatin A4 Analogues. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-16, 2014.

AMES, B. N.; WAKIMOTO, P. Are Vitamin and Mineral Deficiencies a Major Cancer Risk? **Nature Reviews Cancer**, v. 2, v. 9, p. 694-704, 2002.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, n. 2-3, p. 261-274, 2003.

ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1958-1972, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARROS, F. W. A.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTI, B. C.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I.

R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P. ; PESSOA, C. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 1, p. 37-46, 2013.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

BERRIDGE, M. V.; TAN , A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BOING, A. F.; VARGAS, S. A. L.; BOING, A. C. A Carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 4, p. 317-322, 2007.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CARVALHO, C. A.; SILVA, M. B.; OLIVEIRA, T. G.; LIMA, J. M.; ROSA, M. B. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da Brassica oleracea var. capitata. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 249-257, 2008.

CARVALHO, I. M. C. M. M.; CAVALCANTE, A. A. M.; DANTAS, A. F.; PEREIRA, D. L. A.; ROCHA, F. C. C.; OLIVEIRA, F. M.; SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. **Chemosphere**, v. 82, n. 7, p. 1056-1061, 2011.

CASTRO, T. C.; PELLICCIONE, V. L. B.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, R. O. A.; BOZZA, M. T.; VIANA, V. R. C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L. Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 96-99, 2002.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAIS, L. E. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 8. ed. Petrópolis: Editora Vozes, 1998. 272 p.

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 567-575, 2012.
CRAAG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n. 1-2, p.72-79, 2005.

DRESCH, R. R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHE, B.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 16-19, 2005.

EEC Directive of 1986. **Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC)**, 1986. 7 p.

EIZNHAMER, D. A.; XU, Z. Q. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. **Investigational Drugs Journal**, v. 7, n. 4, p. 359-373, 2004.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 2013, p. 1-9, 2013.

FELICIDADE, I.; LIMA, J. D.; PESARINI, J. R.; MONREAL, A. C. D.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, R. J. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9986-9996, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. Moringa oleifera: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.

FERREIRA, J. R. O.; CAVALCANTI, B. C.; COSTA, P. M.; ARANTES, F. F.; ALVARENGA, E. S.; MALTHA, C. R.; ALMEIDA, B. L. C.; MILITÃO, G. C.; PESSOA, C.; FERREIRA, P. M. Induction of G2/M arrest, caspase activation and apoptosis by α -santonin derivatives in HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1458-1466, 2013a.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J.; DEBIASI, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. C.; NORONHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SINHORIN, A. P.; PESSOA, C.; VIEIRA, G. M. JR. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo gutatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v. 72, p. 43-51, 2013b.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FRITZ, G.; KAINA, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. **Current Cancer Drug Targets**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2006.

FU, R.; ZHANG Y.; GUO, Y.; LIU, F.; CHEN, F. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant. **Industrial Crops and Products**, v. 58, n. 1, p. 265-270, 2014.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Sensitization for Anticancer Drug-Induced Apoptosis by Betulinic Acid. **Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 162-170, 2005.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 2009.

GERBER, T. Perfil metabólico de calos de *Cedreia fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Interfaces Acadêmica**, v. 8, n. 1, p. 169-180, 2013.

GOLDIM, J. R. A Avaliação ética da investigação científica de novas drogas: A importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Clinical & Biomedical Research**, v. 27, n. 1, p. 66-73, 2007.

GONÇALVES, J. C. R.; ALVES ADE, M.; ARAÚJO, A. E.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, n. 1-3, p. 108-112, 2010.

GONZÁLEZ, P. S.; MAGLIONE, G. A.; GIORDANA, M.; PAISIO, C. E.; TALANO, M. A.; AGOSTINI, E. Evaluation of phenol detoxification by *Brassica napus* hairy roots, using *Allium cepa* test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 2, p. 482-491, 2012.

GRIGOLO, B.; LISIGNOLI, G.; TONEGUZZI, S.; MAZZETTI, I.; FACCHINI, A. Copper/zinc superoxide dismutase expression by different human osteosarcoma cell lines. **Anticancer Research**, v. 18, n. 2A, p. 1175-1180, 1998.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C.; ARAÚJO, A. A.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-

JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

ISMAEL, G. F. V., ROSA, D. D., MANO, M. S., AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 1, p. 81-91, 2008.

KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. **Biochemical Pharmacology**. v. 66, n. 8, p. 1547-1554, 2003.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005.

KHANNA, N.; SHARMA, S. *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 105-119, 2013.

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**. v.415, n, 1-2, p.47-57, 1998.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LIU, C.; RUSSELL, R. M. Nutrition and gastric cancer risk: an update. **Nutrition Reviews**. v. 66, n. 5, p. 237-249, 2008.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MARTINO, T.; PEREIRA, M. F.; GAYER, C. R.; DALMAU, S. R.; COELHO, M. G.; SABINO, K. C. Antitumor screening of *Pterodon pubescens* terpenic fraction indicates high sensitivity for lymphocytic leukemia cells. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 11, p. 1547-1551, 2014.

MATOS, A. A. **Efeito do extrato de aroeira no processo de proliferação e mineralização de osteoblastos in vitro**. 2013. 131 f. Dissertação (Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 27, p. 950-61, 2010.

MILITÃO, G. C. G.; DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; ODORICO, M. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1479-1487, 2012.

MILLER, C.; PERRY, A. Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 1, p. 397-406, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NETO, J. D. N.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p.311-335, 2012.

OLIVERO-VERBEL, J.; GONZÁLEZ-CERVERA, T.; GÜETTE-FERNANDEZ, J.; JARAMILLO-COLORADO, B.; STASHENKO, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 10, n. 4, p. 568-574, 2010.

ONCOGUIA, I. **Tipos de Câncer: Tumores Cerebrais / Sistema Nervoso Central**. Disponível em:

<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/glioblastoma/895/293/>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS Spectroscopy and Its Applications**. Berlin: Springer- Verlag, 1992. 244 p.

PULI, L. K.; PATIL, P. A. Genotoxic evaluation of morphine, buprenorphine, pentazocine, and noscapine by micronucleus and comet assay in albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 265-268, 2007.

PY, L. A.; JACQUES, H. **A linguagem da saúde**. 2. ed. São Paulo: Editora Campus, 2003. 296 p.

RAGASA, C. Y.; ESPINELI, D. L.; SHEN, C. C. Cytotoxic Triterpene from *Barringtonia asiatica*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 8, p. 531-535, 2014.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p. 49-53, 1993.

RATHNASAMY, S.; MOHAMED, K. B.; SULAIMAN, S. F.; AKINBORO, A. Evaluation of cytotoxic, mutagenic and antimutagenic potential of leaf extracts of three medicinal plants using *Allium cepa* chromosome assay. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 8, p. 131-140, 2013.

REA, M. F. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 142-146, 2004.

REANMONGKOL, W.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SUBHADHIRASAKUL, S.; SAKAI, S. Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 10, p. 1345-1350, 1994.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1-13, 2003.

REIS, F. J. C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário - papel dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 4, p. 222-227, 2005.

ROA, O.; YEBER, M. C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 471-477, 2012.

ROCHA, F. R. P. Estratégias para Aumento de Sensibilidade em Espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SANTOS, P. M.; ALMEIDA, P. D. O.; LIMA, E. S.; MORAES, M. O.; COSTA, P. M.; MEIRA, A. S.; PESSOA, C. O.; VALENTE, L. M. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Flavonoid profiles and evaluation of antioxidant potential and cytotoxicity of Amazonian. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 89-94, 2014.

SETH, C. S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L. K.; SINGH, R. R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3. p. 711-716, 2008.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes - By plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SHI, W.; TANG, N.; YAN, W. D. Synthesis and cytotoxicity of triterpenoids derived from betulin and betulinic acid via click chemistry. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2014.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINGH, S.; ISHAR, M. P. S.; SAXENA, A. K.; KAUR, A. Cytotoxic effect of *Anthocephalus cadamba* Miq. leaves on human cancer cell lines. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 3, p. 127-129, 2013.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONCALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 25-42, 2007.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry: assays for bioactivity**. 6. ed. London: Academic Press, 1991. 376 p.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 6, p. 2035-2041, 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Traditional Medicine**. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

WU, X.; LIPPMAN, S. M. An intermittent approach for cancer chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 879-885, 2011.

ZHANG, A.; ZHU, Q. Y.; LUK, Y. S.; HO, K.Y.; FUNG, K. P.; CHEN, Z. Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on the radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 383-394, 1997.

CAPÍTULO IV

6 Estudo prospectivo sobre propriedades antineoplásicas de plantas da família Fabaceae com ênfase na espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Sabiá)

Estudo prospectivo sobre propriedades antineoplásicas de plantas da família Fabaceae com ênfase na espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Sabiá)

Jurandy do Nascimento SILVA¹; Nayana Bruna Nery MONÇÃO²; Antônia Maria das Graças Lopes CITÓ^{1,2}; Paulo Michel Pinheiro FERREIRA^{1,3}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, PI - Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

³Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, PI – Brasil.

RESUMO

Nos últimos anos a demanda por utilização de métodos alternativos para o tratamento do câncer está aumentando e estudos sugerem um papel de proteção de um grande número de moléculas medicinais de origem vegetal contra diferentes tipos de cânceres. A *Mimosa caesalpinifolia* Benth. é uma planta nativa da caatinga, na Região Nordeste que vem sendo progressivamente inserida do Maranhão ao Rio de Janeiro e apresenta-se como promissora na buscas de moléculas com atividades antineoplásicas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre a utilização da espécie vegetal *M. caesalpinifolia* Benth. no desenvolvimento de tratamentos de neoplasias e/ou cânceres. Esse levantamento prospectivo mostrou que de um modo geral que as patentes foram depositadas em maior número nas bases WIPO e EPO, com classificação internacional principalmente nas áreas de ciência médica ou veterinária e higiene (A61K) e alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas (A23L). As produções científicas estão alocadas principalmente nas áreas de medicina; farmacologia, toxicologia e farmacêutica e bioquímica, genética e biologia molecular, com um ápice de publicações em nossa década atual, demonstrando o interesse da comunidade científica pelo tema na atualidade.

Palavras-chave: Antitumoral. Fabaceae. *Mimosa caesalpinifolia*

ABSTRACT

In recent years the demand for use of alternative cancer treatment methods is increasing and studies suggest a protective role of a large number of medicinal plant molecules against different types of cancers. The *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. is a plant native savanna in the Northeast that has been increasingly inserted from Maranhão to Rio de Janeiro and is presented as promising in the search for molecules with anticancer activities. In this context, this work aimed to make a scientific and technological foresight on the use of plant species *M. caesalpiniiifolia* Benth. in the development of cancer and / or cancer treatment. This prospective survey showed that in general that patents were deposited in greater numbers in bases WIPO and EPO, with international classification especially in the areas of medical science or veterinary and hygiene (A61K) and food, food products and non-alcoholic beverages (A23L). The scientific productions are allocated mainly in the areas of medicine; pharmacology, toxicology and pharmaceuticals and biochemistry, genetics and molecular biology, with a peak of publications in our current decade, demonstrating the interest of the scientific community by theme today.

Keywords: Antitumor. Fabaceae. *Mimosa caesalpiniiifolia*.

6.1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de produtos naturais permite a descoberta de novos princípios ativos, ou ainda, a descoberta de novas atividades para extratos de plantas, oferecendo melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (BUTLER, 2008; PASQUINI-NETTO et al., 2012). Aproximadamente 1/3 de todos os fármacos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) tem sua origem de plantas e mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas (SARDESAI, 2002; GORDALIZA, 2007; BUTLER, 2008).

O câncer, sinônimo de neoplasia maligna, é uma doença de natureza crônica multifatorial que mata pela invasão destrutiva de órgãos normais por extensão direta e/ou disseminação para pontos distantes (metástases). As neoplasias malignas mais prevalentes no Brasil, com pequena variação de região para região, são os cânceres de mama, próstata, pulmão, estômago, pele não-melanoma, colo do útero e colorretal (KUMAR et al., 2004; INCA, 2014).

A demanda por métodos alternativos para o tratamento do câncer é muito alta e estudos em diferentes linhagens celulares, em modelos animais e ensaios epidemiológicos humanos, sugerem um papel de proteção de um grande número de moléculas vegetais contra diferentes tipos de cânceres (LIU et al., 2013; ULLAH et al., 2014).

No Brasil, o estudo das plantas medicinais em resposta a tendência mundial de preservação da biodiversidade esta crescendo de forma vertiginosa. Esse fato se deve a grande diversidade química e potencialidade farmacológica das plantas. Mesmo que moléculas isoladas não venham a se tornar fármacos, podem ser utilizadas como protótipos e originar compostos com utilidade clínica. Muitas das espécies vegetais com tais substâncias bioativas são encontradas na Caatinga, bioma exclusivamente e tipicamente brasileiro (MONTANARI; BOLZANI, 2001; SILVA et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Dentre essas espécies, há a *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (**Figura 1**), nativa da Caatinga, mas que vem sendo inserida em outros estados da federação, desde o Maranhão até o Rio de Janeiro. A planta apresenta grande

potencial para arborização, cerca viva e produção de madeira (ALVES et al., 2005; FREITAS et al., 2011).

Figura 1 - *Mimosa caesalpinifolia* Benth.



Fonte: Maia (2014).

No contexto da bioprospecção, os estudos não têm como objetivo prever o futuro, mas estudar as diversas possibilidades de futuros plausíveis existentes, ou até mesmo criar condições para que modifiquem suas probabilidades de ocorrência ou minimizar seus efeitos (MORITZ; PEREIRA, 2005). Assim, este trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre a utilização de plantas da família Fabaceae e uma de suas espécies - *Mimosa caesalpinifolia* Benth - na procura por substâncias antineoplásicas, analisando produções científicas desenvolvidas em bases de dados e a participação de países nos depósitos de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia nacionais e internacionais até os dias atuais.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A prospecção foi realizada em março de 2014, com base nos pedidos de patentes depositados no *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office*

(USPTO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil, sendo também pesquisados artigos nas bases de periódicos científicos *Pub Med*, *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science*. Como palavras-chave foram usados os termos *Cancer or Neoplasia*, *Fabaceae*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Fabaceae* e (*Neoplasia* ou *Cancer*), *Mimosa* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) e *Mimosa caesalpiniiifolia* e (*Neoplasia* ou *Cancer*). Os termos foram pesquisados nos idiomas inglês e português em todas as bases de depósitos de patentes e artigos científicos analisadas até os dias atuais, sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos no título e/ou resumo e/ou palavras-chave.

As patentes encontradas com as combinações dos termos buscados foram computadas individualmente, a fim de caracterizar o avanço tecnológico, considerando pedidos de depósito por base, países, ano de depósito e classificação internacional de patentes (CIP). Os resultados foram expressos em tabelas e figuras (IBM SPSS *Statistics* 20[®]).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos referentes à prospecção de tecnologias têm aumentado a fim de constatar as tendências de crescimento numa determinada área de conhecimento ou produto de interesse (LIMA, 2007; JUROSZEK, 2011; SIMÕES et al., 2012). O exercício de prospecção consiste em tentar adiantar os avanços e colocar-se de modo a influenciar na orientação das trajetórias tecnológicas, ou seja, lançar-se à frente e garantir a competitividade e sobrevivência das instituições de pesquisa e extensão, dos usuários de seus resultados (ZACKIEWICZ; SALLES-FILHO, 2001). Dentro do contexto das plantas medicinais, este instrumento permite direcionar a pesquisa de acordo com que já foi produzido e formar parcerias ou cooperações que possam alavancar a inovação, determinadas pelas necessidades das instituições públicas, privadas e órgãos governamentais (SIMÕES et al., 2012). Diante disto, essa parte do trabalho avaliou o perfil quantitativo das publicações e patentes sobre a família *Fabaceae* e da espécie *M. caesalpiniiifolia* Benth a fim de determinar o seu potencial tecnológico para a produção de medicamentos anticâncer.

Primeiramente, avaliou-se o número de patentes cadastradas nas bases de dados usando o termo *Neoplasia* ou *Cancer*. Ambos os termos foram encontrados em todas as bases pesquisadas e em números expressivos nas bases WIPO e EPO, apresentando mais de 100.000 patentes cada base, fato que evidencia o interesse de pesquisadores e inventores por esse tema (**Tabela 1**). É importante lembrar que mais de 99% dos pedidos de patente depositados são, costumeiramente, modificações de patentes já existente (ARAÚJO, 1984).

Patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado aos inventores ou autores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação. Em contrapartida, o inventor se obriga a revelar detalhadamente todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente (AMADEI; TORKOMIAN, 2009). Os fitoterápicos movimentam anualmente bilhões de dólares, sem incluir a economia informal da utilização popular de plantas medicinais nos países em desenvolvimento. O crescimento deste setor vem estimulando pesquisadores e indústrias farmacêuticas internacionais a investir nas pesquisas e patenteamento de novos produtos (SANT'ANA, 2002).

Quando se buscou a combinação dos termos *Mimosa* e (*Neoplasia* ou *Cancer*), apenas duas patentes para cada uma foram encontradas nas bases WIPO e EPO. Uma delas, intitulada "*Preparation method of compound bamboo leave flavone dripping pill*", descreve um método de preparação de um composto a base de bambu, paltado na medicina tradicional chinesa, que pode ser utilizado como adjuvante no tratamento do câncer. A outra, intitulada "*Natural plant antioxidant and its preparation method*" refere-se a um método de preparação de um antioxidante natural à base de plantas, que auxilia no prolongamento da vida de prateleira de alimentos e melhora a imunidade do corpo humano contra o câncer (KE et al., 2009; RUIPING, 2009).

Após a combinação dos termos Fabaceae e (*Neoplasia* ou *Cancer*), o INPI foi a única base que a apresentar resultados, com a patente intitulada "Probióticos Nutricêuticos Compostos", referindo-se ao desenvolvimento de novos suplementos alimentares nutricêuticos a base de extratos de grãos de soja (*Glicine max*) da família Fabaceae (*Leguminosae*) associado aos produtos derivados do inhame (*Dioscorea vilosa*) e extratos de estevia (*Stevia*

rebeudiana, família Compositae), atuando como adjuvantes na prevenção do câncer, artrite e diabetes além de se prestarem para uso como suplemento alimentar aplicados em dietas para emagrecimento contra perda de massa muscular e no restabelecimento do equilíbrio orgânico (SOUZA, 2014).

Nenhum resultado foi encontrado com a combinação dos termos “*Mimosa caesalpiniiifolia* e *Neoplasia* ou *Cancer*”, evidenciando a inexistência de inovação envolvendo essa espécie vegetal no desenvolvimento ou tratamento de neoplasias e/ou câncer.

Tabela 1 - Depósitos de patentes por bases e palavras-chave pesquisadas.

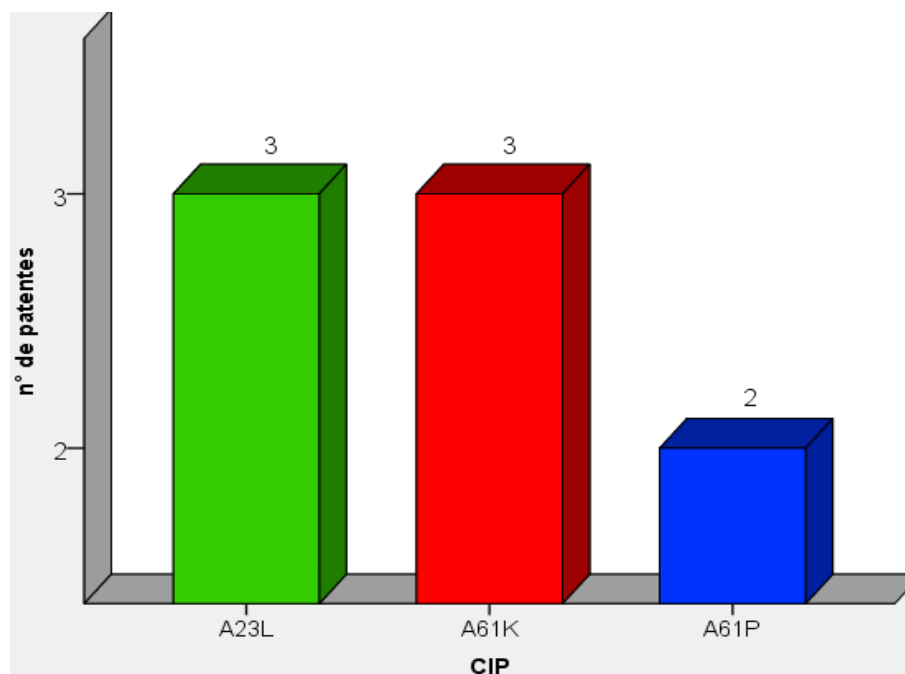
Palavras-Chave	Bases de Patentes			
	WIPO	EPO	USPTO	INPI
<i>Cancer</i> ou <i>Neoplasia</i>	>100.000	>100.000	36.310	2111
Fabaceae	64	62	05	03
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	0	0	0	0
Fabaceae e <i>Neoplasia</i> ou <i>Cancer</i>	0	0	0	01
<i>Mimosa</i> e (<i>Neoplasia</i> ou <i>Cancer</i>)	02	02	0	0
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> e (<i>Neoplasia</i> ou <i>Cancer</i>)	0	0	0	0

EPO: *European Patent Office*; WIPO: *World Intellectual Property Organization*; USPTO: *United States Patent and Trademark Office*; INPI: Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil.

Nas prospecções, um formato importante para agilizar buscas nas bases patentárias é a Classificação Internacional de Patentes (CIP), na qual as patentes são classificadas de acordo com a aplicação. São divididas em 8 seções, 21 subseções, 120 classes, 628 subclasses e 69000 grupos (SERAFINI et al., 2012).

Observou-se que todas as patentes encontradas estão alocadas na seção “A” (necessidades humanas). As 5 patentes relacionadas ao termo *Fabaceae* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) e *Mimosa* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) pertencem à classe “61” (ciência médica ou veterinária e higiene) e 3 a classe “23” (alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas), como visto na **figura 2**. Vale salientar que uma patente pode ser alocada em mais de uma classificação. Observou-se a prevalência da China com 4 patentes depositadas no ano de 2009 e o Brasil com apenas um depósito de patente no ano de 2007. O câncer é um dos maiores gargalos na saúde pública na China. Sua prevenção e controle tornou-se uma das questões mais importantes para o Estado, sendo o câncer de pulmão o mais comum, seguido do câncer de estômago, fígado, esôfago e colorretal (ZHAO et al., 2010). Então, é provável que o peso epidemiológico do câncer tenha incentivado o governo chinês a investir na procura de alternativas terapêuticas.

Figura 2 - Distribuição por Classificação Internacional de Patentes (CIP) encontradas nas bases WIPO e EPO.



A23K: Produtos alimentícios especialmente adaptados para animais; A61K: Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas; A61P: Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais.

Nas duas últimas décadas, o Brasil contribuiu com aproximadamente 40% das patentes concedidas na América Latina, sendo que, desse total, a maior parte pertence à área biológica. No entanto, a grande maioria dos direitos de patente concedidos no Brasil pertencem a grupos empresariais estrangeiros, especialmente dos Estados Unidos (EUA) (MARQUES, 2000). Os países em desenvolvimento têm se caracterizado pela inexistência de políticas de inovação ou por ações parceladas e desencontradas sobre esse processo, embora todos os países tenham um Escritório Governamental de Propriedade Industrial (MACEDO, 2000).

As instituições universitárias ao redor do mundo têm gerado um potencial de novas tecnologias passíveis de patenteamento. Por outro lado, o Brasil possui baixa concorrência e apresenta pouco esforço em inovar na área de invenções tecnológicas, provavelmente devido a alguma falha do sistema de inovação (articulação competente entre governo, empresas e instituições, capaz de promover um sistema de Produção & Desenvolvimento de Medicamentos - P & D), o Brasil não possui proteção de produtos e processos biotecnológicos relacionados a espécies do gênero *Mimosa* refletindo ainda mais à falta de incentivo em proteger as tecnologias desenvolvidas por meio das propriedades industriais.

As condições institucionais para a competitividade na sociedade do conhecimento são dinâmicas e estão em contínua reconstrução, sendo a capacidade de inovação tecnológica um de seus fatores determinantes. O elevado grau de incerteza e o alto custo associados à inovação tecnológica são desafios para a sustentação dos padrões tradicionais de investimento em Ciência e Tecnologia (ZACKIEWICZ et al., 2005). No Brasil, finalmente, em 2004, foi promulgada a Lei de Inovação Tecnológica N° 10.973, e regulamentada em 2005 pelo Decreto N° 5.563.11 Essa lei regula, entre outros assuntos, os estímulos para a participação de Instituições Científicas e Tecnológicas (ICT's) no processo de inovação, para a inovação nas empresas, para o inventor independente e para a criação de fundos de investimentos para a inovação. É a primeira lei brasileira que trata do relacionamento entre Universidades e/ou Instituições de Pesquisa com empresas e da criação dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NIT's), trazendo como consequência o

amadurecimento institucional dos mesmos com o intuito de fazer gestão estratégica da propriedade intelectual das ICT's brasileiras (BRASIL, 2014).

A importância crescente da Ciência e Tecnologia, como fator de desenvolvimento social e político, aumenta a demanda por estudos para refletir e compreender os elementos envolvidos no canal mais importante de informação e comunicação da ciência: o periódico científico (RODRIGUES, BORGES, 2012; STUMPF, 1996). Assim, em relação às publicações científicas, assim como nas buscas de patentes, o termo com maior número de resultados foi “*Cancer* ou *Neoplasia*”, apresentando mais de um milhão de publicações nas bases *Pubmed*, *Scopus* e *Web of Science*. Não foram obtidos resultados de busca em nenhuma das bases quando pesquisado a combinação dos termos *Mimosa caesalpiniiifolia* e (*Neoplasia* ou *Cancer*)”, evidenciando a inexistência de pesquisas científicas envolvendo essa espécie vegetal no desenvolvimento ou tratamento de neoplasias e/ou câncer (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Total de artigos científicos por base e palavras-chave pesquisadas.

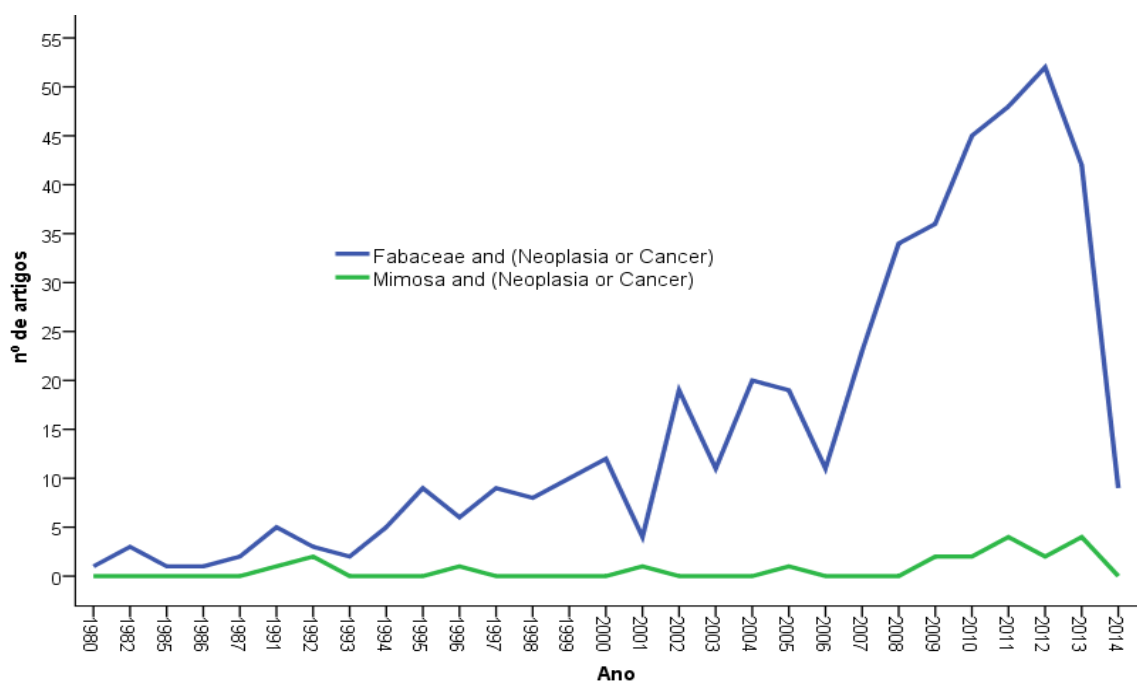
Palavras-Chave	Bases de Artigos Científicos			
	<i>Pubmed</i>	<i>Science Direct</i>	<i>Scopus</i>	<i>Web of Science</i>
<i>Cancer or Neoplasia</i>	1.053.349	326.005	2.041.648	1.576.813
Fabaceae	1.255	975	20.310	6.523
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	01	02	49	54
Fabaceae e <i>Neoplasia</i> ou <i>Cancer</i>	45	33	449	105
<i>Mimosa</i> e <i>Neoplasia</i> ou <i>Cancer</i>	06	01	20	14
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> e <i>Neoplasia</i> ou <i>Cancer</i>	0	0	0	0

A *Scopus* é uma base de dados multidisciplinar, produzida pela editora *Elsevier* desde 2004, com cobertura desde 1960, que contém resumos de 27

milhões de artigos, referências e índices da literatura científica, técnica e médica (ELSEVIER, 2004). A base de dados *Scopus* encontra-se, juntamente com o *Google Scholar* e a *Web of Science*, entre as maiores bases de dados multidisciplinares (JACSO, 2005). Isso explica os resultados mais significativos para buscas realizadas na *Web of Science* e *Scopus*.

Na **figura 3** é observado o interesse por estudos envolvendo os termos mais específicos da busca (*Fabaceae* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) e *Mimosa* e (*Neoplasia* ou *Cancer*)), a partir do ano de 2000, com ápice de publicações no ano de 2012 (52 publicações) na base *Scopus*. Acredita-se que o aumento do número de patentes depositadas bem como do número de artigos publicados no período se deve aos atuais investimentos no setor tecnológico na área pelas instituições governamentais. Como exemplo nacional de tais investimentos, tem-se o reconhecimento das plantas para o desenvolvimento de fármacos modernos e terapeuticamente mais eficazes oficializado pelo lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (BRASIL, 2006).

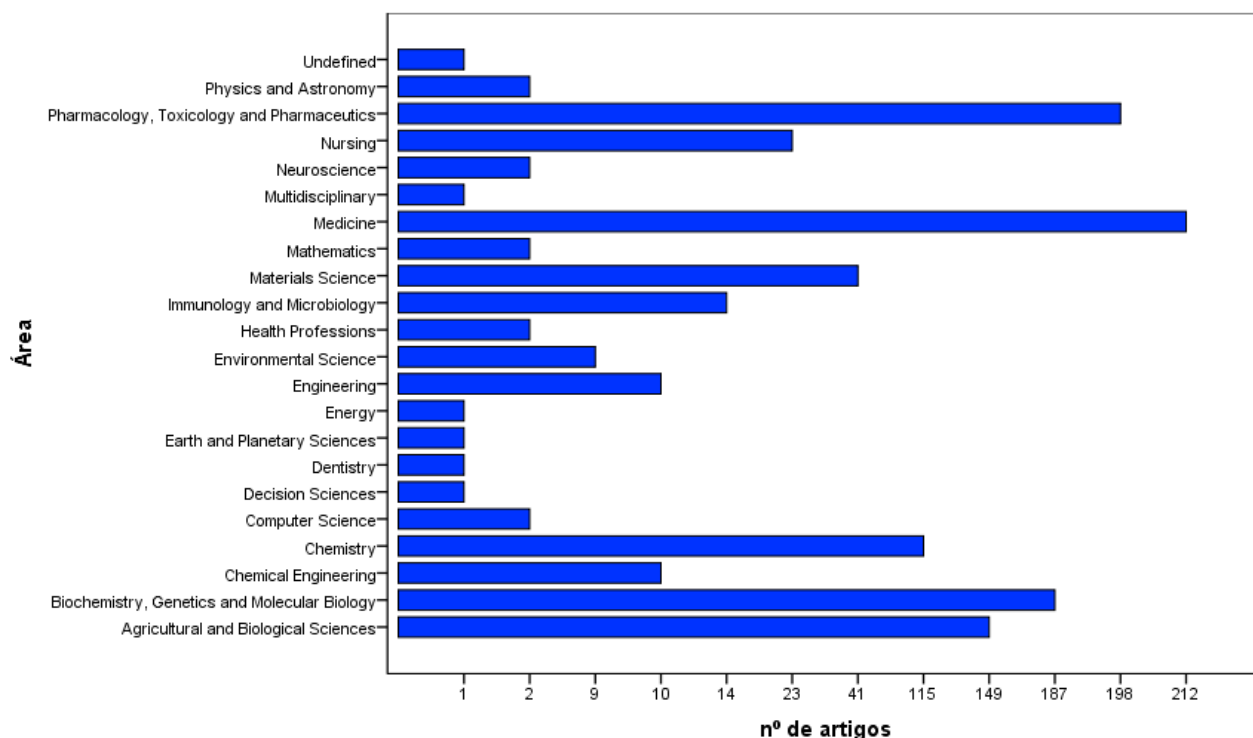
Figura 3 - Publicações de artigos científicos para as combinações das palavras-chave: *Fabaceae* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) e *Mimosa* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) na base *Scopus*.



As áreas científicas que mais publicaram envolvendo as combinações *Fabaceae* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) e *Mimosa* e (*Neoplasia* ou *Cancer*) na base

Scopus foram a Medicina, Farmacologia, Toxicologia, Farmacêutica e Bioquímica e Genética e Biologia Molecular, com 212, 198 e 187 publicações respectivamente (**Figura 4**).

Figura 4 - Áreas científicas relacionadas às publicações para as combinações das palavras-chave: Fabaceae e (Neoplasia ou Cancer) e *Mimosa* e (Neoplasia ou Cancer) na base Scopus.



Os resultados demonstram que os avanços nas pesquisas científicas em câncer são objetivos principais das áreas da saúde, porém pode-se observar que esse tema é multidisciplinar e se correlaciona com várias outras áreas do conhecimento, como as engenharias, matemática, ciências da computação, dentre outras (**Figura 4**)

6.4 CONCLUSÃO

Esse levantamento prospectivo revelou que um total de 144 patentes com o termo Fabaceae foram encontradas nas bases de dados WIPO, USPTO, EPO e INPI, embora apenas uma patente englobando a associação dos termos Fabaceae e *Neoplasia* ou *Cancer* e quatro patentes englobando a associação dos termos *Mimosa* e *Neoplasia or Cancer* tenham sido encontrados apesar do

vertiginoso aumento do número de publicações científicas e dos depósitos de patentes nos últimos 10 anos.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; OLIVEIRA, A. P.; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; PAULA, R. C. Influência do tamanho e da procedência de sementes *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. Sobre a germinação e vigor. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 877-885, 2005.

AMADEI, J. R. P.; TORKOMIAN, A. L. V. As patentes nas universidades : análise dos depósitos das universidades públicas paulistas. **Ciência da Informação**, v. 38, n. 2, p. 9-18, 2009.

ARAÚJO, V. M. R. H. Uso da Informação Contida em Patentes nos Países em Desenvolvimento. **Ciência da Informação**, v. 13, n. 1, p. 53-56, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Série B - Textos Básicos de Saúde, 2006. 60 p.

BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei Nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/l10.973.htm>. Acesso em: 21 fev. 2014.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural product reports**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.

ELSEVIER. Material Publicitário, Amsterdam: **Elsevier**, 2004.

FREITAS, R. M. O; PINTO, J. R. S; PRAXEDES, S. C; NOGUEIRA, N. W; RIBEIRO, M. C. C. Gibberellic acid stimulus on seed and seedling performance is dependent on pod position in *Mimosa caesalpiniiifolia*. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 660-665, 2011.

GOMES, C. H. R.; NOBRE, A. L.; AGUIAR, G. N.; FERNANDES, I. M.; SOUTO, I. V.; BESSA, L. T.; GONTIJO, M. B. Avaliação do Conhecimento sobre Detecção Precoce do Câncer dos Estudantes de Medicina de uma Universidade Pública. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 25-30, 2008.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767-776, 2007.

INCA. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n.1, p. 63-64, 2014.

JACSO, P. As we may search - Comparison of major features of the Web of Science, Scopus, and Google Scholar citation-based and citation-enhanced databases. **Current Science**, v. 89, n. 9, p. 1537-1547, 2005.

JUROSZEK, P.; TEIDERMANN, A. V. Potential strategies and future requirements for plant disease management under a changing climate. **Plant Pathology**, v.60, n. 1, p.100-112, 2011.

KE, Y., YUEQIN, X., WEIWU, Y. **Preparation method of compound bamboo leave flavone dripping pill**. China, 2009. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004. 1525 p.

LIMA, R. A.; VELHO, L. M. L. S.; FARIA, L. I. L. Delimitação de uma área multidisciplinar para análise bibliométrica de produção científica: o caso da Bioprospecção. **TransInformação**, v.192, p.153-168, 2007.

LIU, J.; OUYANG, L.; CHEN, Y.; LIU, B. Plant natural compounds targeted cancer cell autophagy: Research advances. **Journal of International Pharmaceutical Research**, v. 40, n. 6, p. 688-694, 2013.

MACEDO, M. F. G. **Patentes , pesquisa e desenvolvimento um manual de propriedade intelectual**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 164

MAIA, G. N. **Banco de Dados de Plantas do Nordeste**. Disponível em: <<http://www.cnip.org.br/bdpm/fotosdb/1499887688.JPG>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

MARQUES, M. B. Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 7, n. 1, p. 07-21, 2000.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORITZ, G. O.; PEREIRA, M. F. R. N. A. Planejamento de Cenários: A Evolução do Pensamento Prospectivo. **Revista de Ciências da Administração**, v. 7, n. 13, p. 1-20, 2005.

PASQUINI-NETTO, H.; MANENTE, F. A.; MOURA, E. L.; REGASINI, L. O.; PINTO, M. E. F.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; VELLOSA, J. C. R. Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 666-672, 2012.

RODRIGUES, R. S. O.; BORGES, A. Scientific Periodicals in Latin America: open access titles indexed by Thompson Reuters ISI and Sciverse Scopus. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, n. 4, p. 76-99, 2012.

RUIPING, D. **Natural plant antioxidant and its preparation method**. China, 2009. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

SANT'ANA, P. J. P. O contexto brasileiro para a bioprospecção. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 29, 2002.

SARDESAI, V. M. Herbal medicines: Poisons or potions? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 6, p. 343-348, 2002.

SERAFINI, M. R.; QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Mapeamento de Tecnologias Patenteáveis com o uso da Hecogenina. **Revista Geintec**, v. 2, n. 5, p. 427-435, 2012.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SIMÕES, E. R. B; MARQUES, L. G. A; PINHEIRO, B. M; SANTOS, M. R. C; PESSOA, C. Technological Forecasting on Phytotherapics Development in Brazil. **World Academy of Science, Engineering and Technology** , v. 6, n. 7, p. 132-136, 2012.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Ethnobotanical , phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

SOUZA, H. P. **Compostos, Probióticos Nutricêuticos**. Brasil, 2007. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pPI/servlet/PatenteServletController>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

STUMPF, I. R. C. Passado e futuro das revistas científicas. **Ciência da Informação**, v. 25, n. 3, p. 1-6, 1996.

ULLAH, M. F.; BHAT, S. H.; HUSAIN, E.; ABU-DUHIER, F.; HADI, S. M.; SARKAR, F. H.; AHMAD, A. Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 1-23, 2014.

WU X.; LIPPMAN, S. M. An intermittent approach for cancer chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 879-85, 2011.

ZACKIEWICZ, M.; SALLES-FILHO, S. Technological foresight: um instrumento para política científica e tecnológica. **Parcerias Estratégicas**, n. 10, p. 144-161, 2001.

ZACKIEWICZ, M.; BONACELLI, M. B.; SALLES FILHO, S. Estudos prospectivos e a organização de sistemas de inovação no Brasil. **São Paulo em Perspectiva**, v. 19, n. 1, p. 115-121, 2005.

ZHAO, P.; DAI, M.; CHEN, W.; LI, N. Cancer trends in China. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n.4, p. 281-285, 2010.

APÊNDICE A

APÊNDICE A: Artigo publicado no Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.



© 2014

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 13 (5): 466 - 476

ISSN 0717 7917

www.blacpma.usach.cl

Artículo Original | Original Article

Teor de fenóis e flavonoides, atividades antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae – Mimosoideae)

[Phenols, flavonoids and antioxidant and cytotoxic activity of leaves, fruits, peel of fruits and seeds of *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae - Mimosoideae)]

Márcia de Jesus ALVES¹; Arkellau Kenned Silva MOURA¹; Luciana Muratori COSTA²; Éverton José Ferreira de ARAÚJO²; Gardene Maria de SOUSA³; Nagilla Daniela de Jesus COSTA⁴; Paulo Michel Pinheiro FERREIRA⁴; Jurandy do Nascimento SILVA²; Cláudia PESSOA⁵; Sidney Gonçalo de LIMA¹ & Antônia Maria das Graças Lopes CITO¹

¹Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela,

²Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas,

³Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Biologia, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela,

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, Brasil

⁵Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, Brasil
Contactos | Contacts: Antônia Maria das Graças Lopes CITO - E-mail address: gracacito@gmail.com

Abstract: The total phenol and flavonoid content, in addition to the antioxidant and cytotoxic activities, of extracts and fractions of *Piptadenia moniliformis* was determined. This honey plant species is commonly known as "catanduba" or "angico de bezerro". The aqueous fraction derived from the peels of the fruits exhibited the highest antioxidant activity, remaining comparable to the standard value, and there was a general correlation between this activity and the phenol and flavonoid content. The antioxidant potential of this species provides a basis for future developments in herbal medicines and cosmetics. Only the hydro alcoholic extract, the dichloromethane fractions and the ethyl acetate fractions showed moderate cytotoxicity.

Keywords: free radical-scavenging activity; honey plant; polyphenols

Resumo: Foram determinados o teor de fenóis e flavonoides, as atividades antioxidante e citotóxica dos extratos e frações de *Piptadenia moniliformis*. Essa é uma espécie melitófila comumente conhecida como "catanduba" ou "angico de bezerro". Das frações testadas, a fração aquosa das cascas dos frutos apresentou a maior atividade antioxidante, com valor comparável ao padrão, e no geral houve correlação do teor de fenóis e flavonoides com essa atividade. Os resultados do potencial antioxidante para essa espécie fornecem subsídios para futuros trabalhos que visem o desenvolvimento de fitoterápicos e cosméticos. Quanto à atividade citotóxica apenas o extrato hidroalcoólico e as frações diclorometano e acetato de etila demonstraram moderada citotoxicidade.

Palavras-chave: atividade sequestradora de radical livre; planta melitófila; polifenóis

Recibido | Received: 24 de Mayo de 2013

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 2 de Septiembre de 2014

Publicado en línea | Published online: 30 de Septiembre de 2014

Declaración de intereses | Declaration of interests: Ao CNPq, CAPES, LPN e UFPI

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: MJ Alves; AKS Moura; LM Costa; ÉJF Araujo; GM Sousa; NDJ Costa; PMP Ferreira; JN Silva; C Pessoa; SG Lima, AMGL CITO. 2014. Teor de fenóis e flavonoides, atividades antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae – Mimosoideae) *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 13 (5): 466 – 476.

ANEXO A

ANEXO A: Autorização para realização de pesquisa nas dependências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí / *Campus* Teresina Zona Sul.

SOLICITAÇÃO DE AUTIRIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

Teresina, 07 de outubro de 2013.

Ilma. Sra. Francisca Assunção Almeida Félix
Diretora do IFPI - Campus Teresina Zona Sul
Av. Pedro Freitas, 1020, Bairro São Pedro, CEP: 64018-000,
nesta capital.

Senhora diretora,

Eu, **Jurandy do Nascimento Silva**, servidor desta instituição com matrícula SIAPE nº1614544 e regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado), da Universidade Federal do Piauí - UFPI, matrícula nº2013101031, estou trabalhando com uma pesquisa intitulada: "**Atividade citotóxica de extratos de plantas do Semiárido Nordestino**", sob orientação do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, com a finalidade de elaborar minha dissertação. Para tanto, necessito obter maiores informações e levantar dados sobre este assunto por meio de realização de testes laboratoriais. Desta forma, venho através desta, solicitar sua autorização para realização dos testes nas dependências do **Laboratório de Análise de Alimento** do referido Campus, a fim de viabilizar a execução da pesquisa.

Terminada a pesquisa, os resultados, que são de minha inteira responsabilidade, serão apresentados visando o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Também estarei à sua disposição para esclarecer dúvidas sobre o trabalho.

Certo de sua colaboração, agradeço antecipadamente.

Jurandy do Nascimento Silva

Fone: (86) 9411-0875
jurandy@ifpi.edu.br

Permissão


Assinatura / Carimbo
Francisca Assunção Almeida Félix
Diretora Geral
IFPI - Campus Teresina Zona Sul
SIAPE: 0275910

ANEXO B

ANEXO B: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFPI.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 18 de Julho de 2014.

Ilmo.

Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA
Departamento: Biofísica e Fisiologia- CCS/UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (18 de Julho de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **034/14**, o projeto de pesquisa intitulado **"Atividade citotóxica, antitumoral, tóxica e neurofarmacológica de plantas do Nordeste Brasileiro"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Agosto/2014 à Julho/2016, e serão usados 210 Camundongos isogênicos *swiss* (105 machos e 105 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora