

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

JEPHESSON ALEX FLORIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO
FENETIL ESTER DO ÁCIDO CAFÉICO COM POTENCIAL ANTITUMORAL**

**JOÃO PESSOA/PB
2015**

JEPHESSON ALEX FLORIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO
FENETIL ESTER DO ÁCIDO CAFÉICO COM POTENCIAL ANTITUMORAL**

**Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao curso de
Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito para
conclusão do curso de Farmácia
(generalista)**

ORIENTADORA:

PROFa. DRa. MARIANNA VIEIRA SOBRAL

JOÃO PESSOA/PB

2015

S237a Santos, Jephesson Alex Floriano dos.

Avaliação de estudos pré-clínicos de análogos sintéticos do fenetil ester do ácido caféico com potencial antitumoral / Jephesson Alex Floriano dos Santos. -- João Pessoa: [s.n.], 2015.

52f. : il.

Orientadora: Marianna Vieira Sobral.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Compostos fenólicos. 2. Citotoxicidade - Eritrócitos. 3.

JEPHESSON ALEX FLORIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO
FENETIL ESTER DO ÁCIDO CAFÉICO COM POTENCIAL ANTITUMORAL**

**Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao curso de
Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito para
conclusão do curso de Farmácia
(generalista)**

Aprovado em ___/___/___

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam

Msc. Monalisa Taveira Brito

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família por todo apoio durante essa longa jornada na
graduação.

Aos meus avós, Abel Francisco do Nascimento e Ana Floriano do Nascimento, que
me apoiaram em tempo integral nessa minha longa jornada, onde respeitaram e
tentaram entender todas as minhas decisões. Eles são o motivo para estar aqui
hoje.

Aos meus pais José Antonio Galdino dos Santos e Rosilene Floriano do Nascimento,
por toda a ajuda durante esse período.

Aos meus tios, Rosimary Floriano do Nascimento Silva e Jailson Trajano da Silva,
por toda forma de apoio, que com certeza foi crucial para que eu pudesse chegar
aqui.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal da Paraíba (UFPB)**, pelo qual me deu suporte para o desenvolvimento deste trabalho, além de todo desenvolvimento acadêmico a mim permitido.

À minha orientadora, **profª. Drª. Marianna Vieira Sobral**, que aceitou o desafio de me orientar, e que fez seu trabalho com primor e dedicação. Acreditou neste trabalho e sempre me ajudou da melhor maneira possível. Meus sinceros agradecimentos a essa pessoa que admiro muito, desde a graduação, nas disciplinas de Farmacoterapia e Atenção Farmacêutica. Sua contribuição nessa fase da minha vida foi importantíssima, só tenho a agradecer por tudo.

À **Msc. Monalisa Taveira Brito**, por ter me acompanhado durante todo o processo de desenvolvimento do trabalho, por ter dedicado seu precioso tempo a me passar todos os seus conhecimentos profissionais. Agradeço por ter se tornado minha amiga, no qual confio muito, tanto para vida profissional, quanto para a vida pessoal. Agradeço a paciência, tenho certeza que sua contribuição neste trabalho foi crucial.

Aos meus professores da graduação, que sempre me deram forças para continuar, em especial a **prof. Drª. Bagnólia Araújo da Costa**, que me deu suporte desde o primeiro dia de curso, e que sempre me aconselhava em todos os momentos.

À **profª. Drª. Márcia Regina Piuvezam**, por ser essa pessoa maravilhosa, no qual tenho orgulho por ter sido seu aluno, por todas as dúvidas tiradas, pelas várias conversas fora de aula sobre imunologia. Tenho certeza que se eu amo a imunologia como amo hoje, é grande parte pelo seu incentivo e sua determinação. Só tenho a agradecer.

À todos os membros da Liga Acadêmica de Farmacoterapia, por ter me dado a oportunidade de realizar um projeto tão fabuloso em prol da área da saúde.

À minha família, por todo apoio, dedicação e paciência.

À todas as outras pessoas que passaram pela minha vida e deixaram um pouco de si, em especial aos meus amigos e afins.

SANTOS, J. A. F. **AVALIAÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO FENETIL ÉSTER DO ÁCIDO CAFÉICO COM POTENCIAL ANTITUMORAL.** 2015. UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. O Fenetil éster do ácido caféico (CAPE), um composto fenólico, além de modular a angiogênese tumoral, também causa apoptose, diminuindo assim o crescimento do tumor. Os derivados sintético do CAPE apresentam promissora atividade antitumoral, uma vez que, não há relatos na literatura sobre sua possível toxicidade, a avaliação de seu perfil toxicológico é fundamental para a determinação de informações que permitem a escolha de doses seguras para realização de outros protocolos. Diante disto, o presente estudo foi realizado para avaliar a toxicidade *In vitro* e *In vivo* do MTB06 (Benzil-2(3,4-dihidroxifenil) acetato) e MTB07 (Benzil-2(4-hidroxifenil) acetato). O MTB06, no ensaio de toxicidade aguda, causou a morte de 2 animais nas doses de 300mg/kg, sendo um em cada experimento, e todos os animais na dose de 2000mg/kg, e o valor da DL50 (Dose Letal de 50%) foi determinado em 500mg/kg e a GHS (Globally Harmonized Classification System) ficou na categoria número 4. Com relação ao MTB07, na realização do ensaio de toxicidade aguda, não ocorreu morte nos animais tratados com 2.000 mg/kg e o valor de DL50 foi indeterminada, e se classificando na GHS 5, indicando sua baixa toxicidade. Além disso esses dois compostos apresentaram baixa taxa citotoxicidade frente eritrócitos. Na avaliação da genotoxicidade pela determinação de eritrócitos micronucleados em sangue periférico dos animais tratados com MTB06 e MTB07, não foi evidenciado um aumento dos mesmos indicando uma baixa taxa de mutação, que representa uma menor probabilidade de desenvolvimento de carcinoma.

Palavras-chave: Composto fenólicos, citotoxicidade frente eritrócitos, genotoxicidade, toxicidade aguda.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O CÂNCER: EPIDEMIOLOGIA, ETIOLOGIA E TRATAMENTO	1
1.1.1	ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE ASSOCIADA À SÍNDROME PARANEOPLÁSIA	4
1.1.2	HEMÓLISE COMO EFEITO CITOTÓXICO ASSOCIADOS A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS	5
1.2	TOXICIDADE	6
1.2.1	ENSAIOS DE TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	7
1.2.1.1	CITOTOXICIDADE FRENTE ERITRÓCITOS	7
1.2.2	ENSAIOS DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	8
1.2.2.1	TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA	8
1.2.2.2	GENOTOXICIDADE	9
1.3	A BUSCA POR COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTITUMORAL	12
1.4	ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO CAPE COMO FONTE DE FÁRMACOS COM POTENCIAL ANTITUMORAL	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	LOCAL DE PESQUISA	20
3.2	MATERIAL	20
3.3	CITOTOXICIDADE FRENTE ERITRÓCITOS	20
3.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA	21
3.5	GENOTOXICIDADE	22
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4	RESULTADOS	24
4.1	CITOTOXICIDADE FRENTE A ERITRÓCITOS	24
4.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA	24
4.3	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE	30
5	DISCUSSÃO	31

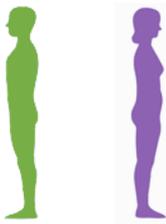
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer: epidemiologia, etiologia e tratamento

Segundo o oncologista André Sasse (2004), câncer é o nome que se refere a uma classe de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo fazer metástase. O câncer pode matar devido à invasão de órgãos normais por estas células, por extensão direta ou por disseminação à distância, que pode ser pelo sangue, linfa ou superfície serosa. O câncer é um termo utilizado para designar mais de 100 doenças de etiologia multifatorial, e é considerado como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Segundo a organização não governamental *World Cancer Research Fund International*, a incidência de câncer cresceu mais de 20% na última década, havendo uma estimativa de 14,1 milhões de casos em 2012, sendo que este número deverá aumentar para 24 milhões até 2035 (WHO, 2014). No Brasil, estima-se que em 2015 ocorram 302.350 mil casos de câncer em Homens e 274.230 mil em mulheres (Figura 1) (INCA, 2015).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de Câncer mais incidentes estimados para 2015 por sexo, exceto pelo não melanoma.

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%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2015.

Os marcadores (*hallmarks*) do câncer, compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de várias etapas de tumores humanos. Eles incluem a manutenção da sinalização para a proliferação, fuga dos supressores de crescimento resistindo assim a morte celular, com isso permitindo a imortalidade replicativa, indução da angiogênese, invasão e metástase. Subjacente a estas características são a instabilidade do genoma, o que gera a diversidade genética

que acelera a sua aquisição, e inflamação. O progresso conceitual na última década adicionou mais dois marcadores emergentes a esta lista, a reprogramação do metabolismo energético e o escape da destruição pelo sistema imunológico. Para além das células de câncer, tumores exibem uma outra dimensão de complexidade: eles contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais que contribuem para a aquisição de traços característicos, criando o reconhecimento de uma aplicabilidade generalizada destes conceitos afetam cada vez mais "microambiente do tumor" (HANAHAN, 2013).

A observação de defeitos cromossômicos recorrentes em cânceres humanos mostram que eles desempenham um papel marcante na carcinogênese. Apesar de agirem inicialmente de forma distinta, todos os agentes oncogênicos têm a mesma via final: transformação de proto-oncogenes (genes não alterados) em oncogenes (genes alterados) e/ou inibição de genes supressores de tumor (SERRANO, 2014). Os proto-oncogenes são genes relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação de células normais. Codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA (AMENDOLA, 2005). Alguns oncogenes produzem oncoproteínas, como a bcl-2, IE84 (Citomegalovírus), SV40-T (vírus SV40), E6 (HPV), EBNA-5 (EBV) e HBx (vírus da hepatite B), que se ligam fortemente e inibem as proteínas codificadas por genes supressores do crescimento celular ou indutores da apoptose, como o p53 e o Rb. Com isso, levam à ausência de repressão da divisão ou inibição da morte celular por apoptose, logo, à "imortalidade" celular (LOPES, 2002). Os genes supressores de tumor são genes inibidores da proliferação celular normal, logo, também do crescimento tumoral. O p53 é um dos gene responsáveis pela integridade do genoma (KLUMB, 2002). Sua ativação, por meio do surgimento do DNA alterado, produz uma proteína que estimula a síntese de outras proteínas, que vão atuar inibindo a replicação celular através da ligação com o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e estimulando as enzimas de reparo do DNA (LOPES, 2002).

Devido à complexidade e a existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação de um tumor. No processo de progressão tumoral, algumas células tumorais perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem por meio da produção de enzimas

proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos, são as denominadas metástases (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). A capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de formar as metástases é responsável, em última análise, pela morte de dois a cada três pacientes com o diagnóstico de câncer (OTAKE; CHAMMAS; ZATZ, 2006).

Os fatores de risco de câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários (INCA, 2014). A maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde se encontra um grande número de fatores de risco. A multicausalidade é frequente na formação do câncer (carcinogênese). Pode ser exemplificada pela associação entre álcool, tabaco e residência na zona rural e o câncer de esôfago, e entre álcool, tabaco, chimarrão, churrasco e o cozimento de alimentos em fogão a lenha e o câncer da cavidade bucal. A interação entre os fatores de risco e os de proteção a que as pessoas estão submetidas pode resultar, ou não, na redução da probabilidade delas adoecerem. Nem sempre a relação entre a exposição a um ou mais fatores de risco e o desenvolvimento de uma doença é reconhecível facilmente, especialmente quando se presume que a relação se dê com comportamentos sociais comuns (o tipo de alimentação, por exemplo). Nas doenças crônicas, as primeiras manifestações podem surgir após muitos anos de exposição única (radiações ionizantes, por exemplo) ou contínua (radiação solar ou tabagismo, por exemplo) aos fatores de risco. Por isso, é importante considerar o conceito de período de latência, isto é, o tempo decorrido entre a exposição ao fator de risco e o surgimento da doença (INCA, 2015).

O tratamento do câncer pode ser feito por cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (INCA, 2015). A quimioterapia, utiliza agentes químicos na busca por destruição das células neoplásicas, que têm como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais (BRANDÃO, 2010). Contudo, podem ocorrer efeitos secundários importantes naquelas células normais de crescimento rápido, como as células do trato gastrointestinal, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (ALMEIDA et al., 2005), o que representa uma das limitações do tratamento convencional. Além disso, um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de

neoplasias é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados (LONGLEY; JOHNSTON, 2005).

Considerando a alta toxicidade dos agentes antitumorais atuais e o desenvolvimento de resistência, é constante a busca por novas alternativas terapêuticas com maior seletividade para as células tumorais, sendo neste caso, mais seletivos e menos tóxicos.

1.1.1 Anemia hemolítica autoimune associada à síndrome paraneoplásica

As neoplasias não levam apenas a alterações pela presença do tumor e sua localização, mas também pelas síndromes paraneoplásicas. Essas síndromes incluem um grupo diverso de manifestações clínicas associadas a neoplasias benignas ou malignas (BERGMAN, 2013).

As síndromes paraneoplásicas referem-se a distúrbios clínicos que não podem ser diretamente atribuídos aos efeitos físicos do tumor primário ou metastático. Podem ser causadas por: *i*) produção de substâncias pelas células tumorais responsáveis por efeitos sistêmicos; *ii*) diminuição de substâncias habitualmente presentes no organismo, que leva ao aparecimento de sintomas; e *iii*) resposta imunitária do hospedeiro ao tumor (FARIA, 2012).

Todos os tumores primários podem causar síndromes paraneoplásicas, como câncer de pulmão de células pequenas, câncer de mama, ginecológicos e linfomas (MUÑOZ-IBARRA, 2013).

A anemia é comumente relatada em pacientes com diversos tipos neoplásicos, com importante influência na qualidade de vida, na resposta à terapia e na sobrevivência (FINORA, 2003; OGILVIE, 2004; CÁPUA et al., 2011). No entanto, nem sempre representa uma síndrome paraneoplásica (MANGIERI, 2009), pois pode ocorrer secundária a invasão da medula óssea por células neoplásicas, perda de sangue, esplenomegalia com sequestro de eritrócitos ou hemólise por resposta imunomediada, além de estar associada a alterações digestivas, hiporexia e anorexia (SHAW; IHLE, 1993; CARDOSO et al., 2004; OGILVIE, 2004).

A anemia relacionada a neoplásia, por outro lado, envolve um mecanismo complexo que gera anemia normocítica, normocrômica e arregenerativa, geralmente discreta à moderada (MILLER et al., 2009). Essa alteração caracteriza síndrome

paraneoplásicas e ocorre em vários tipos de tumores, mas não é exclusiva do câncer, ocorrendo também em doenças inflamatórias e infecciosas (MANGIERI, 2009). Essa síndrome apresenta mecanismos multifatoriais como resultado do sequestro de ferro, redução da meia-vida dos eritrócitos e decréscimo da eritropoiese (MANGIERI, 2009; MILLER et al., 2009).

O sequestro de ferro é observado predominantemente no sítio inflamatório, onde ocorre a produção, pelos neutrófilos, de interleucina-1 (IL-1), que promove o aumento de lactoferrina, uma proteína semelhante a transferrina, que compete com ela por ter maior afinidade pelo ferro. A lactoferrina não transfere o ferro para as células hematopoiéticas e é fagocitada por macrófagos, bloqueando a utilização de ferro armazenado. Ainda, os macrófagos ativados produzem o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa), que induz a liberação de uma proteína de fase aguda, a apoferritina, que, assim como a lactoferrina, liga-se ao ferro sendo fagocitada pelos macrófagos, tornando o ferro indisponível para a formação da hemoglobina (CANÇADO; CHIATTONE, 2002; MANGIERI, 2009).

O decréscimo da sobrevida das hemácias ocorre devido ao aumento de IL-1, que provoca hemólise seletiva de hemácias jovens no sistema reticuloendotelial. O processo neoplásico também desencadeia uma hiperatividade do sistema fagocítico mononuclear (STOCKHAM; SCOTT, 2011) que, associado ao dano oxidativo à membrana das hemácias, resulta em diminuição do tempo de sobrevida dessas células.

Já a redução da eritropoiese está associada a uma deficiência relativa de eritropoetina (EPO). Normalmente, não há prejuízo na produção de EPO, que pode inclusive estar aumentada. No entanto, a produção de anticorpos anti-EPO e liberação de citocinas inflamatórias, impedem a atividade normal da EPO. Além disso, a maior exposição ao TNF-alfa diminui a formação de colônias eritróides e a afinidade dessas colônias à eritropoietina reduzindo ainda mais a eritropoiese (MANGIERI, 2009).

1.1.2 Hemólise como efeito citotóxico associados a drogas antineoplásicas

Efeitos deletérios causados pelo uso de quimioterápicos são descritos na literatura, entre eles, destaca-se a atividade citotóxica frente células do próprio organismo, que não são tumorais, a exemplo dos eritrócitos. A literatura descreve dois

fenômenos biológicos que resultam nessa hemólise secundária à terapêutica, são eles, a purpura trombocitopênica trombótica (TTP) e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NIU; MIMS, 2012).

A TTP é uma incomum emergência médica associada a uma significativa mortalidade. O quadro clássico consiste em febre, anemia hemolítica intravascular, trombocitopenia, insuficiência renal e manifestação neurológica. A TTP induzida por drogas tem sido reconhecida como um transtorno clínico e pode surgir no contexto do tratamento quimioterápico. Embora a quimioterapia, seja frequentemente o único tratamento eficaz para pacientes com malignidade metastática, foram relatados que agentes como a mitomicina e gemcitabina podem causar a TTP e a SHU (NIU; MIMS, 2012).

Foi reportado que os agentes quimioterápicos notavelmente associados a SHU, incluem a bleomicina, ciclosporina, cisplatina, mas o agente mais comumente reportada na literatura é a mitomicina-C (MMC). A SHU induzida pela MMC é caracterizada por anemia microangiopática hemolítica, trombocitopenia, falha renal e microangiopatia trombótica renal, entre outros sintomas pulmonares e renais. Os achados laboratoriais apresentam anemia severa, e o esfregaço periférico é caracterizado por fragmentação de eritrócitos com muito esquizócitos (WU et al, 1997).

1.2. Toxicidade

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos causados pela interação entre as substâncias químicas e os organismos vivos ou sistemas biológicos. Avalia a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos devido a exposição a determinada substância e em quais condições ela pode causar danos. Assim, sempre que for lançado um novo produto que terá contato direto com o homem tais como medicamentos, agrotóxicos, aditivos alimentares etc., devem ser realizados estudos para prever os riscos toxicológicos dessa nova substância (CAZARIN, et al., 2004; AZEVEDO, 2010).

Em relação especificamente aos antineoplásicos, a avaliação da toxicidade é um aspecto essencial. Isso por que a maioria dos fármacos antineoplásicos são agentes antiproliferativos, ou seja, não são seletivos para as células tumorais, e podem afetar

significativamente as células normais de rápido crescimento, produzindo vários efeitos indesejáveis (BODO et al., 2005, adaptado).

Sendo assim, o estudo toxicológico de potenciais fármacos antitumorais é imprescindível para definir o balanço entre efeitos farmacológicos *versus* toxicidade, o que é essencial para a avaliação da aplicabilidade farmacológica de uma droga. Os ensaios toxicológicos são então realizados para determinar as doses de ingestão das substâncias em estudo, que não causem dano ao ser humano, ou que danos podem ser causados com o seu excesso, com o objetivo de caracterizar a forma de preveni-los ou trata-los (CAZARIN, et al., 2004; AZEVEDO, 2010).

1.2.1 Ensaio de toxicidade *In vitro*

1.2.1.1 Citotoxicidade frente eritrócitos

Os eritrócitos são células sanguíneas que contêm altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, oxigênio molecular e íons ferrosos. Como consequência, são altamente vulneráveis à ação de agentes citotóxicos, oxidantes e de radicais livres e, portanto muito suscetíveis a alterações na integridade estrutural como: mudanças na fluidez da membrana e hemólise (SANTOS, 2009). Estas células são consideradas bons modelos experimentais para estudo de toxicidade, devido a sua estabilidade e facilidade de trabalho, onde uma vez ocorrendo a hemólise há a liberação de hemoglobina, facilmente quantificada por leitura espectrofotométrica de absorbância na região do visível, absorbância que é proporcional à lise dos eritrócitos (liberação de hemoglobina). A quantificação de íons, presentes nos eritrócitos, na solução afirma a lise das células (NETO, 2006).

A estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é serve como um bom indicador de danos *In vitro* em triagens de citotoxicidade, já que as drogas podem alterar esta delicada estrutura, fornecendo um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células (SHARMA; SHARMA, 2001).

1.2.2 Ensaios de toxicidade *In vivo*

1.2.2.1 Toxicidade pré-clínica aguda

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda, tais como, indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas e o estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade (COECKE, et al., 2006).

O teste da DL50 (dose que produz a morte de 50% dos animais experimentais) foi inicialmente introduzido em 1927 para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias (GUBBELS-VAN HAL, et al., 2005).

Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (KRYSIK; RYDZYNSKI, 1997; GUBBELS-VAN HAL et al., 2005; STAMMATI et al., 2005).

No Brasil, até 2010, os ensaios de toxicidade aguda em roedores eram realizados de acordo com o “GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE SEGURANÇA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS” (RE n. 90/2004 – ANVISA), que recomendava a análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Esses ensaios, em 2013, com a republicação do guia, agora então denominado “GUIA PARA A CONDUÇÃO

DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS”, passaram a ser não mais exigidos e além disso, esse guia passou a recomendar o uso de um menor número de animais, indicando, com esse propósito, o uso dos guias da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* - Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento).

Em 1981, a OECD incorporou o Teste da DL50 (Dose Letal 50%) em suas diretrizes (VALADARES, 2006). Por sua vez, o guia de n. 423 publicado pela OECD foi originalmente adotado em 1996 como uma segunda alternativa ao convencional teste de toxicidade aguda, descrito no guia n. 401 da OECD, e foi republicado em 2001 com uma versão revisada. O método de classificação de toxicidade aguda estabelecido na atual orientação é um procedimento onde se utilizam até três animais do mesmo gênero por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou do estado moribundo dos animais, é necessária a realização em média de duas a quatro etapas, para permitir avaliar a toxicidade aguda de uma substância teste. Este procedimento é reprodutível, usa poucos animais e é capaz de classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda (Guia OECD n. 420 e 425). O método de classificação de toxicidade aguda é baseado na avaliação biométrica com doses fixas, devidamente separadas para permitir a classificação de uma substância de acordo com a avaliação dos riscos. O método, adotado desde 1996, foi amplamente validado *In vivo* em relação aos dados de DL50 obtidos a partir da literatura, tanto nacional como internacionalmente (OECD, 2001).

1.2.2.2 Genotoxicidade

A genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias possuem para induzir alterações no material genético da célula em organismos expostos. Já mutagenicidade diz respeito à indução de alterações transmissíveis permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético (OLIVEIRA, 2012).

Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversos agentes químicos, podendo prever um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas (MALUF; ERDTMANN,

2003). É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida, pelo fato de que a ação mutagênica por vezes se manifesta somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas, caracterizando os chamados efeitos cumulativos, o que tem contribuído para que a exposição a agentes genotóxicos seja um dos principais problemas de saúde pública (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Alguns agentes com potencial farmacológico tem a capacidade de produzir mutações e, portanto, estes precisam ser estudados do ponto de vista da genotoxicidade. Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *In vivo*, o teste do micronúcleo, realizado em roedores, tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica, como a OECD, em seu *Guidelines for the testing of chemicals/ section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test*: nº 474 e recomendado pelo *Gene - Tox Program, Environmental Protection Agency – EPA/US* (OECD et al., 2001).

Este teste é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação mutagênica e registro de novos fármacos que entram, anualmente, no mercado mundial, sendo recomendado para estudos de biomonitoramento, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos e aneugênicos, podendo ainda ser realizado tanto em amostras de medula óssea, quanto em amostras de sangue periférico (FENECH, 2000; KRISHMA e HAYASHI, 2000; RIBEIRO et al., 2003). Embora as células alvo da medula óssea e do sangue periférico sejam as mesmas, os eritroblastos, o método desenvolvido para o sangue periférico oferece vantagens como o fato das células nesse tecido serem mais uniformes e mais facilmente analisadas quando comparadas as da medula óssea (CSGMT, 1995). Além disso, o teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais, utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio, facilitando a integração do mesmo na rotina de estudos toxicológicos e/ou farmacológicos, sem a necessidade da realização de um ensaio em separado para avaliação de efeitos genotóxicos (ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006). Além disso, estudos demonstram que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (DERTINGER et al., 2006).

Os micronúcleos, por sua vez, são pequenos corpúsculos nucleares representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Conseqüentemente, na telófase (fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre a formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos), tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010). Mas, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual (Figura 2) (FENECH et al., 1999; IARMARCOVAI et al., 2007; HOLLAND et al., 2008).

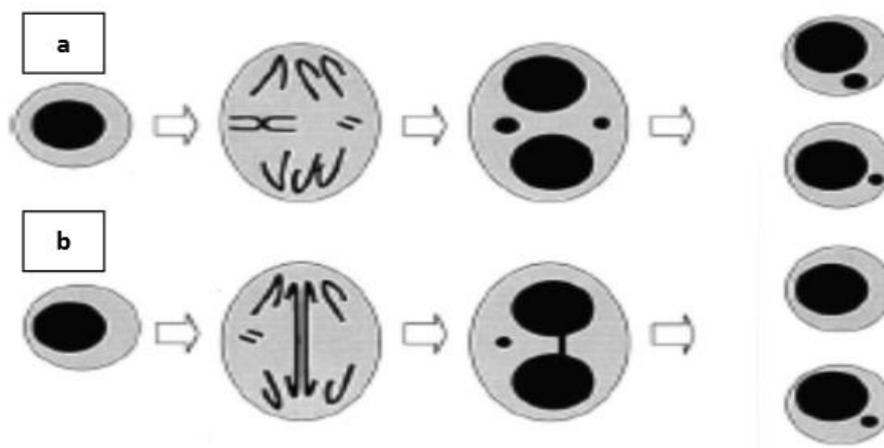


Figura 2. Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula. Adaptada de Fenech, 2000.

Os micronúcleos podem ser gerados de diferentes processos oriundos de quebras ou perdas de cromossomos (FENECH, 2007). Embora os mecanismos de reparo celular sejam extremamente eficientes, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite a atuação de agentes clastogênicos e aneugênicos durante a mitose e a meiose. A atuação de agentes clastogênicos e aneugênicos, dentre outras formas, é responsável pela origem das aberrações cromossômicas estruturais e

numéricas (CARVALHO et al., 2002). A hipótese de associação entre a ocorrência de micronúcleos e o desenvolvimento de câncer é baseada na alta frequência desse biomarcador em pacientes oncológicos não tratados e na inversa correlação entre sua frequência em células sanguíneas com os micronutrientes da dieta (BONASSI et al., 2007).

1.3 A busca por compostos com potencial antitumoral

Nos primórdios da humanidade, o tratamento para diversas enfermidades era feito, geralmente, utilizando-se produtos naturais de origem vegetal. Até a década de 1930, tem-se o destaque da extração e isolamento dos princípios ativos de plantas, responsáveis por sua atividade farmacológica. Logo em seguida, a síntese de fármacos inéditos e mais potentes, comparando-se com os naturais, apresentou um sobressalto (PALMEIRA-FILHO; PAN, 2003).

A era dos fármacos sintéticos teve início com a síntese do ácido acetilsalicílico (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Desde a antiguidade já se tinha conhecimento das propriedades analgésicas dos salicilatos, mas só em 1860 Kolbe e Lautemann obtiveram o ácido salicílico em laboratório, viabilizando sua produção em escala industrial. Daí em diante, a área da química farmacêutica recebeu grandes investimentos do setor industrial em formação (MAHDI, 2010).

O primeiro fármaco obtido pelo planejamento foi o Salvarsan, e pouco depois, o Neosalvarsan, eficazes no tratamento da sífilis, sintetizados por Paul Ehrlich em 1910. Naquela época, a sífilis era uma doença tão debilitante e fatal quanto a AIDS, mas após a introdução destes fármacos no mercado, a incidência desta doença caiu cerca de 50% em diversos países europeus. A introdução dos antibióticos fez com que esses fármacos entrassem em desuso (ANTONINI, 1997; PALMEIRA-FILHO; PAN, 2003; RUBIN, 2007).

A modificação molecular apresenta-se como uma estratégia essencial no campo da Química medicinal, pois é um dos métodos mais utilizados e compensadores no planejamento de fármacos. Assim, os análogos planejados podem apresentar perfil terapêutico superior, rota sintética viável e economicamente interessante (KOROLKOVAS, BURCKALTER, 1988).

Dentre as modificações moleculares mais efetuadas, estão a homologia linear e ramificada, que consiste na introdução de unidades metilênicas em uma cadeia hidrocarbônica presente na molécula e a introdução de grupos vinílicos, fenílicos e benzílicos. Tais modificações podem alterar propriedades moleculares interessantes como grau de flexibilidade da molécula, volume e coeficiente de partição, conseqüentemente, modificando seu comportamento biológico (BARREIRO, 2002).

Durante o Século XX, ocorreu um grande avanço nas pesquisas de produtos naturais com atividade antitumoral. Os agentes conhecidos hoje são classificados em dois grupos. O primeiro é constituído por drogas que tem por finalidade inibir o início do processo neoplásico, e o segundo grupo de drogas tem a característica de inibir a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer. Atualmente, aproximadamente 60% dos fármacos com atividade antineoplásica tem sua origem nos produtos naturais. Dentre estes se destacam a vimblastina (**1**, Velban®) e a vincristina (**2**, Oncovin®) e os análogos vindesina (**3**, Eldisine®) e vinorelbina (**4**, Navelbine®); o paclitaxel (**5**, Taxol®) e o análogo docetaxel (**6**, Taxotere®); a podofilotoxina (**7**) e os análogos, etoposídeo (**8**, Etopophos®) e teniposídeo (**9**, Vumon®); e a camptotecina (**10**) e os análogos topotecano (**11**, Hycamtin®) e irinotecano (**12**, Camptosar®). As estruturas dos fármacos estão disponíveis na Figura 3 (COSTA-LOTUFO, et al., 2010).

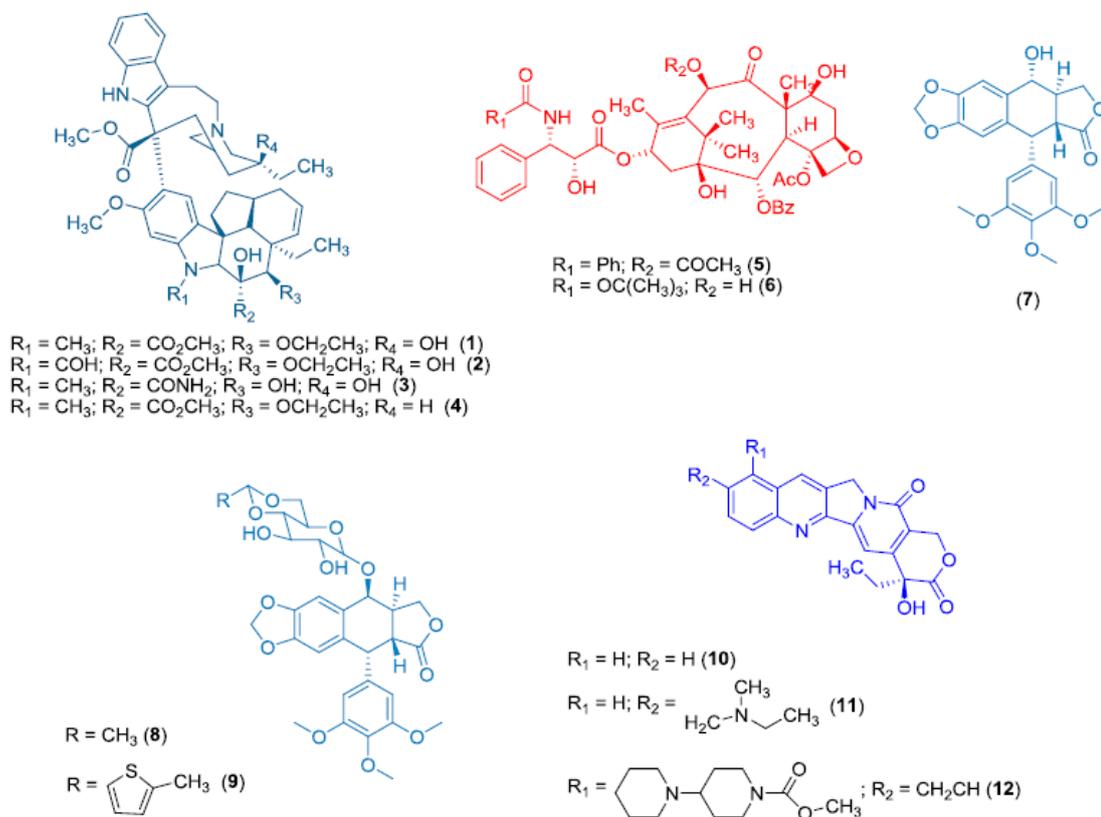


Figura 3. Fármacos usados na terapia antineoplásica. **Fonte:** Adaptado COSTA-LOTUFO, 2010.

A partir disso, diferentes alvos moleculares estão sendo pesquisados com o objetivo de se obter fármacos mais seletivos e menos tóxicos para que se possa melhorar o arsenal terapêutico atual no combate ao câncer, como por exemplo podem ser citados os inibidores do NF- κ B, do ciclo celular e das histonas desacetilases (DAMIÃO-BERNSTORFF; 2014).

Assim, considerando a morbidade relacionada aos atuais quimioterápicos, onde os mesmos causam diversos efeitos colaterais aos pacientes, como quadros de êmese, alopecia, imunossupressão, entre outros, sendo que estes sintomas causam debilidade ao paciente, que muitas vezes se faz necessária a internação do mesmo, a descoberta de diferentes fármacos para o combate ao câncer é urgente, visto que os tratamentos utilizados são muitas vezes ineficazes e que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou até mesmo desenvolvem resistência a esses agentes (VECHIA, GNOATTO, GOSMANN, 2009; FORMARIZ et al., 2004).

1.4 Análogos sintéticos do Fenetil éster do ácido caféico (CAPE) como fonte de fármacos com potencial antitumoral

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas (CARDOSO-SILVA et al., 2010). Eles apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999). Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos).

Os principais compostos fenólicos não-flavonoides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os ésteres dos ácidos caféico, cumárico e felúrico, que estão presentes em alimentos como maçã, pêra, cereja e damasco. Quanto aos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos, podem-se destacar os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico, que são encontrados em morango, uva, laranja, limão e tangerina (BELITZ; GROSCHE, 2004). Estudos realizados com esses compostos indicaram atividade antioxidante, assim como seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SANCHEZ-MORENO, 2002).

O CAPE (fenetil éster do ácido caféico, Figura 4), um composto fenólico, que além de modular a angiogênese tumoral, também causa apoptose, diminuindo assim o crescimento do tumor (WATABE et al., 2004). Ele também atenua a resistência a agentes quimioterápicos, diminuindo a expressão do gene *mdr-1* (*Multi-Drug Resistance 1*). Ainda, apresentou inibição significativa do crescimento de diversas linhagens tumorais *In vitro*, entre elas as células de glioma C6, de uma maneira concentração e tempo dependente, além de uma inibição dose dependente do crescimento de células C6 de xenógrafos em camundongos *nude*, com concentrações de 1 a 10 mg/kg (i.p.) (KUO et al., 2006). Foi também observado que o CAPE induziu efeito antimetastático (LIAO et al., 2003) e foi capaz de induzir a apoptose de carcinoma mamário MCF-7 (CARVALHO, 2013). Dados da literatura mostram ainda que o CAPE inibiu o crescimento de tumores de neurofibromatose em modelos xenográficos murinos (DEMESTRE et al., 2009).

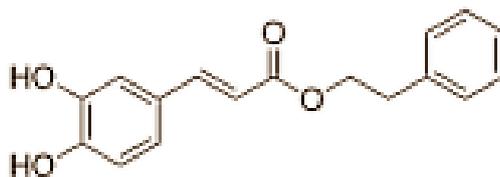


Figura 4. Estrutura química do Fenetil éster do ácido caféico

A molécula também apresentou seu mecanismo de ação antitumoral por meio da inibição do NF- κ B (fator transcricional nuclear kappa B). (LEE et al., 2010; WU et al., 2011, KAAPOR, 2013).

Este fator, importante na interface câncer e inflamação, e que opera na célula por meio de duas vias, a clássica (via canônica) e alternativa (via não-canônica), possui diferentes efeitos relacionados à inflamação e proliferação celular. A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados a inflamação, a resposta imunológica inata, a antiapoptose e a sobrevivência celular. Já a via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfoides secundários (XIAO, 2004).

Sugere-se que a ativação do NF- κ B se deve a exposição a estímulos pró-inflamatórios no microambiente do tumor ou por fator mutacional dos componentes IKK- NF- κ B na via de sinalização (KARIN et al., 2002), além do mais, foi relatado que o NF- κ B pode inibir a processo de apoptose, e promover assim um estímulo a proliferação celular (BEG and BALTIMORE 1996; LIU et al. 1996; VAN ANTWERP et al. 1996; WANG et al. 1996), assim mantendo um perfil invasivo e migratório, associado a progressão do tumor.

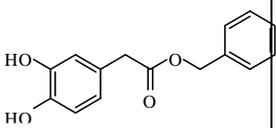
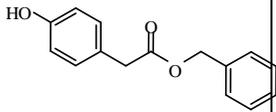
Vários compostos tem sido estudados ao longo dos anos pelo sua capacidade de alterar a via NF- κ B, inibindo por exemplo, a atividade de enzimas responsáveis pela degradação do complexo I κ B (GLEZER et al., 2000). Tanto é verdade essa afirmação, que já foi descoberto um fármaco anti-leucêmico, contra multi-mielomas, o bortezomib (Velcade®), inibidor de ubiquitinação (OLEJNICZAK, 2010).

Nesse contexto, o Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR/PPgPNSB/CCS/UFPB), em colaboração com o Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (Quetem/DCF/USP-RP) propuseram a síntese de análogos do CAPE. Os análogos sintetizados foram obtidos utilizando uma abordagem sintética

que utiliza diferentes metodologias convencionais de esterificação. O método variou de acordo com as particularidades químicas dos intermediários propostos para a modificação do fragmento referente ao ácido caféico e/ou modificação do fragmento álcool, também sendo levados em consideração os rendimentos das reações.

Foram sintetizados 12 compostos derivados do CAPE. Após *screening* da atividade antitumoral *In vitro* com células tumorais humanas (utilizando a metodologia da suforrodamina B), assim como a avaliação atividade inibitória sobre o NF-kB, por meio do ensaio de Luciferase, foi possível selecionar dois produtos, o MTB06 (Benzil-2(3,4-dihidroxifenil) acetato) e o MTB07 (Benzil-2(4-hidroxifenil) acetato), com base nos resultados apresentados na Tabelas 1.

Tabela 1. Organização das moléculas sintetizadas selecionadas para os ensaios biológicos de triagem antitumoral *in vitro* e atividade sobre o NF-kB.

MOLÉCULA	ENSAIOS BIOLÓGICOS		CONCLUSÃO PARCIAL
	ANTIPROLIFERATIVO (GI50, em µg/mL)	LUCIFERASE (concentrações em µg/mL x LPS , em %) ^b	
 <p>MTB 06</p>	<p>U251 = 93,1; MCF-7 = 178,7; K562 = 62,5 HaCat = 173,7</p>	<p>LPS vs 250: - 82,91 LPS vs 80: - 69,62 LPS vs 25: - 83,90</p>	<p>SELECIONADO para ensaios <i>In vivo</i>.</p>
 <p>MTB 07</p>	<p>U251 = 25,1; MCF-7 = 24,3; NCI/ADR/RES = 40,7; NCI-H460 = 78,9; OVCAR-3 = 23,8; HT29 = 159,9; K562 = 1; HaCat 25,8</p>	<p>LPS vs 250: - 35,08 LPS vs 80: - 42,82 LPS vs 25: - 8,593</p>	<p>SELECIONADO para ensaios <i>In vivo</i>.</p>

Antiproliferativo: **GI50** = Concentração que inibe 50% do crescimento – ou seja, a quantidade de células submetidas a esta concentração fica igual a 1,5 X do início do experimento (não confundir com IC50); [Linhagens: **U251** – glioma; **MCF-7** – mama; **NCI/ADR-RES** – ovário resistente a múltiplos fármacos; **786-0** – rim; **NCI-H460** – pulmão; **OVCAR-3** – ovário; **HT29** – cólon; **K-562** – leucemia; **HaCaT** – pele (linhagem de células não-tumoral)]. *Luciferase*: Quando negativo, o resultado representa inibição da atividade do fator transcricional (NF-kB).

As substâncias MTB06 e MTB07, foram os objetos de estudo deste trabalho, elas são análogos estruturais do CAPE, e acredita-se que as mesmas possuam atividade antineoplásica. Assim, foi avaliada a toxicidade aguda e genotoxicidade destes produtos. Assim, uma vez observados esses resultados *In vitro*, é possível planejar futuros ensaios de atividade antitumoral *In vivo*, assim como, a investigação de outras possíveis atividades farmacológicas. Para tanto, é necessário fazer o estudo de toxicidade com objetivo de definir doses seguras para o tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos toxicológicos do MTB06 (Benzil-2(3,4-dihidroxifenil) acetato) e MTB07 (Benzil-2(4-hidroxifenil) acetato), por meio de ensaios *In vitro* e *In vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do MTB06 e MTB07 em eritrócitos de camundongos;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do MTB06 e MTB07 em camundongos;
- Avaliar a genotoxicidade do MTB06 e MTB07 em sangue periférico de camundongos.

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Oncofarmacologia (ONCOFAR) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.2 Material

O MTB06 e MTB07 foram obtidos utilizando uma abordagem sintética que utiliza diferentes metodologias convencionais de esterificação.

O material sintético (MTB06 e MTB07) foi gentilmente fornecido pela Doutoranda do PPgPNSB, Msc. Monalisa Taveira Brito, em colaboração com o Prof. Flávio Emery, do QueTeM/ CCF/ USP-RP.

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária próxima de 60 dias foram utilizados, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo *pellets* de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, com bicos em vidro, colocadas nas grades metálicas das gaiolas na sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

3.3 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue de camundongos Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a

suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram então ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O MTB06 (300mg/kg e 2000mg/kg) e MTB07 (300mg/kg e 2000mg/kg) foram solubilizados em Cremophor (1%) e preparados em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. Os controles positivo e negativo foram utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma- Aldrich®) em PBS (2 mL) e Cremophor (1%), em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção, foi adicionado a cada poço 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH₅₀ (concentração do que produz 50% de hemólise) de MTB06 ou MTB07 (KANG et al. 2009).

3.4 Avaliação da toxicidade pré-clínica

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD “*Guidelines for testing of chemicals*” n. 423/2001, com adaptações.

Camundongos *Swiss*, com n=3/grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 300mg/kg (com repetição) e 2000 mg/kg (sem repetição) de MTB06 ou MTB07 por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (Tween 80, 12%). O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da

substância em categorias de acordo com o “*Globally Harmonized Classification System*” - GHS (Anexo I).

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do MTB06 ou MTB07 por via intraperitoneal (i.p.) foi realizada em 3 animais por grupo, por experimento (de acordo com a OECD 423) a observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB e descrito por Almeida e colaboradores (1999). Desde a 24^a hora e até 14 dias após a administração da dose, foram observadas a variação do peso e o consumo de água e alimentos pelos animais experimentais.

Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados. Os órgãos, fígado, rins, coração, timo e baço foram removidos e pesados. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

3.5 Genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo, n=6/grupo de camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos foram intraperitonealmente tratados com diferentes doses de MTB06 (300mg/kg) e MTB07 (300 e 2000mg/kg), com base na OECD n. 474/1997 (com alterações). Um grupo tratado com a droga padrão (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (solução salina) foram incluídos. Após 24 horas os animais serão anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg - Thiopentax[®], Cristália) e amostras de sangue periférico serão coletadas pelo plexo orbital, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas serão coradas com coloração panótica (Newprov[®]) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (HAYASHI et al., 2007).

3.6 Análise estatística

Para os ensaios *In vitro* de citotoxicidade frente eritrócitos, foram realizados pelo menos três experimentos em quatro replicatas. Os valores de CH50 foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95 %, utilizando software específico, Graphpad Prism® (versão 5.0).

Os resultados obtidos nos experimentos *In vivo* foram analisados empregando-se o teste t de Student não pareado, para análise de duas colunas. Os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade frente a eritrócitos

A citotoxicidade do MTB06 ou do MTB07 foi avaliada frente a eritrócitos de camundongos *Swiss*. O MTB06 não induziu hemólise no intervalo de concentrações avaliado (62,5 a 1500 $\mu\text{g/mL}$), sendo assim não foi possível calcular a sua CH50.

De forma semelhante, a percentagem de hemólise produzida pelo MTB07 foi insuficiente para o cálculo da CH50, uma vez que a máxima concentração testada (1500 $\mu\text{g/mL}$), induziu em média 24,5% de hemólise (Gráfico 1).

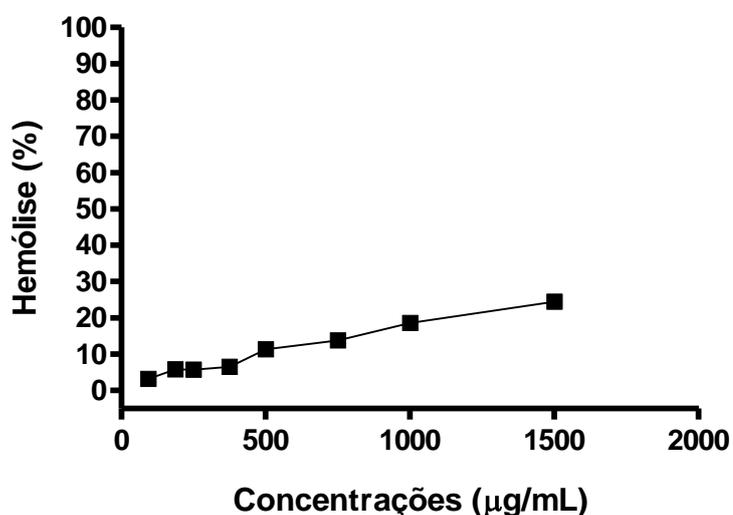


Gráfico 1 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos *Swiss* após tratamento com MTB07 ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas.

4.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

Os resultados da toxicidade aguda para MTB06 nas doses de 300mg/kg e 2000mg/kg e suas repetições, estão demonstradas na tabela 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com MTB06 na dose de 300mg/kg. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n=6 (machos)

Dose (mg/kg; i.p.)	Tempo de observação (min)	Efeitos comportamentais
MTB06 300 (3 + 3 animais)	0	(+++) hiperatividade; (+) Analgesia; (+) Resposta ao toque aumentado; (+) Perda do reflexo auricular; (+) Escalar;
	15	(++) Hiperatividade; (+) Agressividade; (+) Resposta ao toque aumentado; (+) Perda do reflexo auricular; (+) Constipação; (+) Respiração forçada; (-) Tônus muscular; (-) Força para agarrar; (-) micção
	30	(++) Hiperatividade; (+) Irritabilidade; (+) perda do reflexo auricular; (+) constipação; (-) Tônus muscular; (-) Força para agarrar; (-) micção
	60	(+) irritabilidade; (+) Contorções abdominais (+) resposta ao toque diminuído;; (+) constipação; (-) micção
	240	(+) Hipertatividade; (+) Resposta ao toque aumentado; (+) Escalar

Nos dois primeiros experimentos com dose de 300mg/kg, morreram apenas 1 animal para cada grupo de 3 animais. Ambos os animais morreram após as 4 horas de administração do MTB06 na dose em questão.

Nesta dose, foram evidenciados principalmente sinais excitatórios do sistema nervoso central (SNC), como hiperatividade, agressividade e também sinais relacionados ao sistema nervoso autônomo (SNA), foram observados constipação, respiração forçada, diminuição do tônus muscular e da força para agarrar, além da diminuição da micção.

Tabela 3 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com MTB06 na dose de 2000mg/kg. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n=3 (machos)

Dose (mg/kg; i.p.)	Tempo de observação (min)	Efeitos comportamentais
MTB06 2000 (3 + 3 animais)	0**	(++) Hiperatividade; (+) Convulsão; (+) Saltos; (+) Irritabilidade; (+) Hipnose; (+) Ataxia; (+++) Tremores; (--) Reflexo do endireitamento; (+++) Catatonía; (++) Analgesia; (+) Perda do reflexo corneal; (++) Perda do reflexo auricular; (+) Ambulação(+); Escalar; (++) Abdução das patas do trem posterior; (+) Constipação; (+) Respiração forçada; (-) Micção; (--) Tônus muscular; (-) Força para agarrar; (1) Morte nº2; (2) Morte nº1
	15**	(+) Hipnose; (+) Ptose; (+) Catatonía; (+) Resposta ao toque diminuído; (+) Perda do reflexo auricular; (--) Ambulação; (+) Constipação; (-) Tônus Muscular; (-) Força para agarrar; (+) Micção Força para agarrar; (-) micção; (3) Morte nº3

*Animal 1 – Caiu logo após a administração em T₀ e ocorreram espasmos, ponta da cauda escureceu nos três animais (Figura 01). ** O terceiro animal morreu após 15 minutos

Foram evidenciadas que as alterações/efeitos foram tanto mais frequentes e intensos quanto maior a dose. Associando-se isso ao fato de não terem sido observados esses efeitos no grupo controle, e na primeira dose experimental (300 mg/kg) os efeitos tiveram menor intensidade que a dose experimental máxima testada (2000mg/kg), aparenta-se haver uma relação entre doses e efeitos tóxicos agudos destes análogos sintéticos do CAPE.

Na maior dose experimental avaliada (2000 mg/kg), foi constatado que as alterações neurológicas observadas em alguns animais logo nos primeiros minutos após o tratamento demonstrando a predominância de sinais indicativos de ação excitatória do SNC, principalmente: hiperatividade, irritabilidade, convulsões e aumento na ambulação. Conseqüentemente apareceram sinais depressores pré-

morte na dose de 2000mg/kg como: ptose, sedação, analgesia, catatonía, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e diminuição da ambulação. Com relação aos efeitos no SNA, foi observado constipação dos animais ainda vivos, respiração forçada e diminuição no tônus muscular e força para agarrar. Após a presença de todos esses efeitos, todos os animais morreram, no qual foi administrada a dose de 2000mg/kg.

Alguns efeitos foram notados imediatamente após a administração do MTB06 na dose de 2000mg/kg e na maioria dos animais na dose de 300mg/kg, como por exemplo, o escurecimento da cauda dos animais 1, 2 e 3, mostrado na Figura 3. O escurecimento da cauda foi evidenciado em todos os animais utilizando a dose de 2000mg/kg, e em alguns animais na dose de 300mg/kg de MTB06.



Figura 5. Ponta da cauda escurecida – Na dose de 300mg/kg, um animal morreu no dia seguinte da administração com hemorragia generalizada.

No 1º e 2º experimento, utilizando doses de 300mg/kg, um animais de cada grupo de três morreram. No terceiro experimento, a dose havia sido elevada para 2000mg/kg, onde todos os animais morreram nos primeiros minutos de avaliação. Sendo assim, tomando como base o Anexo I do Guia n. 423 da OECD (OECD, 2001), foi possível estimar a DL50 em 500mg/kg e a GSH 4 > 300 – 2000.

Após 14 dias do início do experimento, foi realizada a eutanásia nos animais sobreviventes (dose de 300mg/kg) para retirada e pesagem dos órgãos, fígado, rins, baço, timo e coração. Os dados obtidos então foram tratados no software Graphpad

Prism. A tabela 6 demonstra os valores após o tratamento de dados dos animais do grupo controle e tratados na doses de 300mg/kg do MTB06 no software, não foi possível avaliar o índice dos órgãos para a dose de 2000mg/kg, pois todos os animais morreram logo após a administração.

Tabela 6: Efeitos do tratamento agudo de MTB-06 (300mg/kg) sobre o índice dos órgãos de camundongos tratados, por via intraperitoneal (i.p.).

Grupos	Gênero	Dose (mg/kg)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de Timo (mg/g)	Índice de coração (mg/g)
Controle	M	-	65,5±4,8	14,4±0,3	10,4±2,1	2,7±0,4	4,4±0,2
MTB06	M	300	70,9±0,8	15,8±1,1	4,9±0,4	3,4±0,1	4,4±0,4

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

O índice dos órgãos para MTB06 não mostrou diferenças significantes entre o grupo controle e o grupo tratado, exceto com relação ao baço, que teve uma diminuição de seu peso (mg/g) com relação ao grupo controle.

Em seguida foram avaliadas as alterações comportamentais induzidas pelo MTB07 na dose de 300mg/kg em seis animais e MTB07 na dose de 2000mg/kg, em três animais. Nas tabelas 4 e 5, são descritos todos os efeitos observados nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 240 minutos.

Tabela 4- Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com MTB07 com dose de 300mg/kg. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n= 6 (machos)

Dose (mg/kg; i.p.)	Tempo de observação (min)	Efeitos comportamentais
MTB07 300 (6 animais)	0	(+) Hiperatividade; (+) Irritabilidade; (+) Escalar; (+) Estereotipia; (-) Micção
	15	(+) Hiperatividade; (++) Limpeza; (+) Escalar; (+) Contorções abdominais; (+) Estereotipia;(-) Micção
	30	(+) Hiperatividade; (++) Limpeza; (++) Escalar; (+) Contorções abdominais; (+) Constipação; (-) Micção
	60	(+) Escalar; (+) Constipação;
	240	-

Tabela 5 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com MTB07 com dose de 2000mg/kg. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n=3 (machos)

Dose (mg/kg; i.p.)	Tempo de observação (min)	Efeitos comportamentais
MTB07 2000 (3 animais)	0	(+) Hiperatividade; (-) Resposta ao toque diminuído; (-) Micção
	15	(+) Hiperatividade; (+) Constipação; (-) Micção
	30	(+) Constipação; (-) Micção
	60	(+) Hiperatividade; (+) Constipação; (-) Micção
	240	(+) Irritabilidade; (+) Ataxia; (+) Catatonia; (-) Resposta ao toque diminuído; (+) Perda do reflexo auricular; (-) Ambulação; (+) Constipação; (-) Tônus Muscular; (-) Força para agarrar

É possível observar que tanto nas doses administradas de MTB07 (300mg/kg e 2000mg/kg), os animais apresentaram sinais predominantemente excitatórios do SNC, como hiperatividade e irritabilidade, além de efeitos do SNA como, constipação, diminuição do tônus muscular e da força para agarrar. Os efeitos foram mais predominantes com o aumento da dose.

Em relação ao MTB07, no 1º e 2º experimento, utilizando doses de 300mg/kg, não foi observada morte dos animais. No 3º, a dose foi elevada para 2000 mg/kg, no qual foram mantidos os parâmetros descritos, sem que ocorresse nenhuma morte. Assim, tomando como base o Anexo I do Guia n. 423 da OECD (OECD, 2001), foi possível estimar a DL50 em indeterminado e GSH 5 >2000 – 5000.

Seguindo o mesmo padrão anterior, após 14 dias, foi realizada a eutanásia dos animais para retirada e pesagem de seus órgãos e determinação dos índices dos órgãos. A tabela 7 demonstra os valores dos índices dos órgãos dos grupos controle e tratados com as doses de 300mg/kg e 2000mg/kg do MTB07.

Tabela 7: Efeitos do tratamento agudo de MTB-07 (300 e 2000 mg/kg) sobre o índice dos órgãos de camundongos tratados, por via intraperitoneal (i.p.).

Grupos	Gênero	Dose (mg/kg)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de Timo (mg/g)	Índice de coração (mg/g)
Controle	M	--	65,1±5,1	14,22±0,2	10,3±2,1	2,7±0,3	4,4±0,2
MTB07	M	300	72,6±1,3	16,5±1,4	6,1±0,6	3,6±0,2	4,5±0,3
MTB07	M	2000	59,6±7,7	14,5±3,8	11,7±2,4	2,7±1,1	3,8±0,3

Dados estão apresentados como média ± erro padrão.

Com relação ao MTB07, não houveram grandes diferenças entre o índices dos órgãos do grupo tratado (300mg/kg e 2000mg/kg) e do grupo controle.

4.3 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *In vivo* do MTB06 ou MTB07, foi avaliada a frequência de micronúcleos no sangue periférico após o tratamento com dose única intraperitoneal, cujo resultado é apresentado na tabela 8. O tratamento dos animais com diferentes doses do MTB06 (só 300 mg/kg, devido a morte dos animais em 2000 mg/kg) ou MTB07 (300 e 2000 mg/kg), não induziu um aumento na

frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico quando comparados ao grupo controle (12% de Tween 80).

Tabela 8. Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do MTB06, MTB07 e ciclofosfamida, via i.p., após 48 horas do tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de células/animal	Nº células micronucleadas
Controle	-	9	2000	3,8±0,45
Ciclofosfamida	50	3	2000	14,50 ± 2,60 ^a
MTB06	300	3	2000	5,5 ± 0,65
MTB07	300	3	2000	5,5 ± 0,50
MTB07	2000	3	2000	4,3 ± 0,67

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado aos pares por teste T de Student (Mann-Whitney). ^ap < 0,05 comparado ao controle (12 % Tween 80)

5 DISCUSSÃO

A estabilidade mecânica dos eritrócitos é um bom indicador de danos *In vitro* no ensaio de citotoxicidade, já que drogas podem alterar essa delicada estrutura quando exposta (SHARMA; SHARMA, 2001; PITA et al., 2012). Essas células são importantes para predizer efeitos protetores ou tóxicos de substâncias ou condições associadas com estresse oxidativo (APARICIO et al., 2005; LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; MUÑOZCASTAÑEDA et al., 2006). Os resultados obtidos mostram que o MTB06 não apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas. Com relação ao MTB07, com dose máxima testada de 1500 µg/mL, foi obtida apenas 24,5% de hemólise. Segundo dos Santos Júnior e colaboradores (2010), um produto natural em estudo, para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar CH50 maior que 1250 µg/mL. Portanto, os dados obtidos sugerem que o referido extrato apresenta baixa citotoxicidade frente eritrócitos *in vivo*. Dessa forma, não se faz necessário o uso de doses superiores para avaliar a citotoxicidade frente a eritrócitos. Estes resultados fornecem uma perspectiva para estudos farmacológicos posteriores. Sendo assim,

não foi possível calcular a CH50 para ambas as substâncias, por isso, elas são consideradas de baixa toxicidade para eritrócitos.

Para determinar o uso seguro de fármacos em humano, avaliações toxicológicas são realizadas em vários animais experimentais para prever a toxicidade e fornece diretrizes para a seleção de uma dose segura (RHIOUANI et al., 2008).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado com MTB06, em camundongos submetidos às doses de 300 e 2000mg/kg, pela via intraperitoneal. Esse estudo pré-clínico tem como objetivo buscar informações sobre as doses capazes de provocar os efeitos tóxicos em animais. A triagem farmacológica descrita por Almeida et al., (1999) apresenta uma metodologia simples para *screening* de extratos, substâncias, dentre outros produtos de vegetais com possíveis atividades estimulantes e depressoras no Sistema Nervoso Central (SNC) e autônomo (SNA), avaliando-se através de um elenco de comportamentos pré-estabelecidos, possíveis de serem observados em qualquer Laboratório de Farmacologia Experimental, que correspondem a atividades estimulantes e depressoras no SNC e atividades sobre o SNA.

Após a administração do MTB06 no ensaio de avaliação toxicológica de dose única, observou-se que parte dos animais submetidos à dose de 2000 mg/kg morreram nos primeiros minutos até as quatro horas subsequentes após o tratamento, sendo, portanto, esta dose caracterizada como de alta toxicidade. Nesta mesma dose foram apresentadas inicialmente características estimulantes do SNC, como irritabilidade e tremores, seguidos de efeitos depressores como ataxia, catatonias, analgesia, ptose, hipnose e ambulação diminuída. A diminuição ou perda do reflexo à dor, medido através da pressão no terço inferior da cauda do animal utilizando-se uma pinça, sugere uma atividade antinociceptiva ou analgésica (ALMEIDA et al., 2006). De acordo com (MARIZ et al., 2006), alguns dos parâmetros que evidenciam toxicidade são: prostração, contorção abdominal, paralisia do trem posterior, ptose palpebral, dispneia, aumento da evacuação e perda de peso. Um fato de destaque da administração aguda do MTB06, foi o de que todos os animais que morreram ao longo do período de observação tiveram abdução das patas do trem posterior associado a respiração forçada, como sinais anteriores ao óbito.

Em contrapartida, a utilização da dose de 300 mg/kg, nos dois experimentos realizados, mostrou o aparecimento de sinais como hiperatividade, ataxia, resposta

ao toque aumentado, perda do reflexo auricular, hiperatividade, agressividade e irritabilidade. Alguns desses parâmetros desapareceram ao final das quatro horas, restando apenas a resposta ao toque aumentado, hiperatividade e escalar. Com isso, pode-se inferir que a administração intraperitoneal de 300 mg/kg do MTB06 apresenta moderada em camundongos. Segundo o guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA, não é exigida a determinação de DL50 (dose que mata 50% dos animais) por ser um método que implica em grande precisão estatística. Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD pela classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS.

A resposta ao toque aumentado indica que a rapidez na reação do animal ao estímulo de estalar os dedos, podendo indicar um estágio de excitabilidade do sistema nervoso central. A respiração forçada, ou seja, o aumento da frequência respiratória indica que a droga possa estar alterando a dinâmica respiratória, como dito anteriormente, pode está relacionado a pré-morte do animal. Por fim, a diminuição da força para agarrar e do tônus muscular pode indicar que a droga está exercendo um efeito depressor no animal. (ALMEIDA et al., 2006).

Em relação ao sangramento observado nos animais onde foram administrado o MTB06 na dose de 2000mg/kg, pode-se caracterizar pela relação com o grupo catecol, por levar a vasoconstricção e aumento da pressão arterial sistêmica por ativação de receptores adrenérgicos e por potenciação dos efeitos excitatórios (GOKHALE, 1961).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado com MTB07, em camundongos submetidos às doses de 300 e 2000mg/kg, pela via intraperitoneal. Após a administração do MTB07 no ensaio de avaliação toxicológica de dose única, observou-se que os animais submetidos à dose de 2000 mg/kg apresentaram inicialmente características estimulantes do SNC, como irritabilidade e hiperatividade, seguindo do único efeito depressor que seria a resposta ao toque diminuído. Com relação aos efeitos no SNA, foi observado constipação e diminuição da micção. Há na literatura que o CAPE reduz a contração espontânea do íleo e isso se deve ao bloqueio de canais de cálcio do tipo-L, levando a constipação (AVIELLO, 2010). Além

disso pode-se sugerir que a constipação e diminuição da micção pode ser por inibição parassimpática (ALMEIDA et al., 2006)

A utilização da dose de 300 mg/kg do MTB07, no experimento realizado, induziu praticamente as mesmas respostas que a dose de 2000 mg/kg. Com isso, pode-se inferir que a administração intraperitoneal de 300 mg/kg e 2000mg/kg do MTB07 apresenta baixa toxicidade em camundongos. De acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS, foi classificado em GHS 5 e a DL50 foi indeterminada, devido que não ocorreram nenhuma morte no período.

Dentre os comportamentos observados após o tratamento com MTB07 está a estereotípi. Este indica que a droga pode apresentar também apresenta grande atividade estimulante do SNC, decorrente da ação por vias dopaminérgicas e noradrenérgicas centrais, coincidindo com os seus efeitos estimulantes para irritabilidade e hiperatividade. Paradoxalmente, os animais apresentaram a resposta ao toque diminuído, o que sugere que a droga também possa ter efeitos depressores do SNC (ALMEIDA et al., 2006).

O tratamento com MTB06 ou MTB07 não ocasionou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico dos animais tratados, portanto da ausência de capacidade genotóxica deste produto. Trata-se, portanto, de um dado relevante na análise das propriedades destas substâncias, servindo de estímulo para a realização de testes mais detalhados que avaliem outras propriedades genotóxicas e também preconizados pelas agências regulatórias nacionais e internacionais, a exemplo do teste de Ames e da citotoxicidade em linfócitos (RIBEIRO et al., 2003).

A maior parte dos quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação de outras células neoplásicas (SUBHASHINI, 2005). O teste do micronúcleo está relacionado a investigação de toxicidade genética *in vivo* (Mateuca et al., 2006), e detecta alterações genômicas e/ou dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA. Embora a toxicidade genética não seja medida de carcinogenicidade, esta é frequentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (AZEVEDO et al., 2003; REZENDE; PALHAES; CUNHA, 2006).

A ciclofosfamida é um agente alquilante, utilizado no tratamento de neoplasias em geral. Este agente inibe a replicação do DNA e a transcrição do RNA (ROESER et al., 1978; PEREIRA et al., 2004). Como sua mutagenicidade é amplamente conhecida utiliza-se esta substância para realizar ensaios de micronúcleo como droga padrão (JUNIOR, 2012). Os resultados obtidos mostram que a ciclofosfamida, como já era esperado, induziu o aparecimento de eritrócitos micronucleados no sangue periférico, caracterizando-o como um agente antineoplásico genotóxico. Por outro lado, os tratamentos com as doses de 300 e 2000 mg/kg do MTB06 e MTB07 não aumentaram a frequência de eritrócitos micronucleados. Esses resultados mostram o MTB06 e MTB07 não apresentam efeitos genotóxico *In vivo*, nas condições avaliadas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, é possível concluir que MTB06 e MTB07 mostraram diferentes perfis de toxicidade. O MTB06 apresenta moderada toxicidade aguda *In vivo*, e o MTB07, baixa toxicidade. Ambos os compostos não mostraram efeito genotóxico no ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Já em relação à citotoxicidade frente a eritrócitos de sangue periférico de camundongo, foi considerada baixa para os dois compostos testados.

Portanto, é possível afirmar que o MTB06 e MTB07 possuem moderada/baixa toxicidade, respectivamente, nos modelos experimentais avaliados, fornecendo subsídios importantes relacionados à sua segurança para realização de estudos farmacológicos posteriores.

7 REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ANTONINI, V. História da Farmácia e da Psicologia, Curitiba, 308p, 1997.

AVIELLO, G.; SCALISI, C.; FILLECIA, R.; CAPASSO, R.; ROMANO, B.; IZZO, A. A.; BORRELLI, F. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility. Elsevier, 2010.

AZEVEDO, L.; GOMES, J.C; STRINGHETA, P.C.; GONTIJO, A.M.; PADOVANI, C.R.; RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chemical and Toxicology**, v. 41, p.1671-1671, 2003.

BERGMAN, P.J. Paraneoplastics syndromes. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Small Animal Clinical Oncology. 5.ed. **Philadelphia: W.B. Saunders**, 2013. cap.5, p.83-97.

BODO, J.; CHOVANCOVA, J.; L.; SEDLAK, J. Enhanced sensitivity of human ovarian carcinoma cell lines A2780 and A2780/CP to the combination of cisplatin and synthetic isothiocyanate ethyl 4-isothiocyanatobutanoate. *Neoplasma*, **Bratislava**, v. 52, n. 6, p.510-516, 2005.

BONASSI S, A. et al. An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v. 28, p. 625-631, 2007.

CÁPUA, M.L.B; COLETA, F.E.D.; CANESIN, A.P.M.N.; GODOY, A.V.; CALAZANS, S.G.; MIOTTO, M.R.; DALECK, C.R.; SANTANA, A.E. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**, v.41, n.7, 2011.

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

CARVALHO, E. J., Atividade antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Divisão de Farmacologia e Toxicologia**, CPQBA/Unicamp.

CARVALHO, N. C. de Avaliação da atividade antineoplásica do extrato etanólico da própolis g6 baiana. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

CHO, J.M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.R.; PARK, H.M.; PARK, H.M.; KWAK, M.K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticâncer cisplatin: implication to câncer cell resistance. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 260, p.96-108, 2008.

COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLE R, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBION I, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals**. suppl 1, p.147-175, 2005.

Costa e Silva, A., Nepomuceno, J. C. 2010. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, 1, pp. 167-179.

COSTA, V. C. O. et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* RE Fries. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 245-248, 2008.

DAMIÃO-BERNSTORFF, C. F. C. M., Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da atividade antitumoral (DISSERTAÇÃO). Pós-graduação da Universidade de São Paulo (USP), 2014.

Dertinger, S.D., Bishop, M.E., McNamee, J.P., Hayashi, M., Suzuki, T., Asano, N., Nakajima, M., Saito, J., Moore, M., Torous, D.K., Macgregor, J.T. 2006. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicological Sciences**, 94, 1, pp. 83-91.

DOS SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

E. L. MUÑOZ-IBARRA*, F. GARCÍA-SALCIDO, S. AHUMADA-TAMAYO, J. A. MARTÍNEZ, A. URDIALESORTIZ, G. FERNÁNDEZ-NOYOLA, A. CAMACHO-CASTRO, G. GARZA-SAEZ, V. OSORNIO-SÁNCHEZ, E. MAYORGA-GÓMEZ, I. UBERETAGOYENA-TELLO DE MENESES, A. M. PALMEROS-RODRÍGUEZ, V. CORNEJO-DÁVILA, J. MORALES-MONTOR, M. CANTELLANO-OROZCO, C. MARTÍNEZ-ARROYO Y C. PACHECO-GAHLER. Anemia hemolítica como síndrome paraneoplásico em carcinoma de células renais. **Revista mexicana de urologia**, 2013.

ELSEENDOORN, T.J.; WEIJL, N.I.; MITHOE, S.; ZWINDERMAN, A.H.; VAM DAM., EF.; DE ZWART, F.A.; TATES, A.D; OSANTO, S. Chemotherapy induce chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of câncer patients supplemented with antioxidantes or placebo. **Mutation Research**, Amsterdam, v.498, n. 1-2, p. 145-158, 2001.

Fenech, M. 2000. The *In vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. nº 455. p. 81-95.

FINORA, K. Common paraneoplastic syndromes. **Clinical Techniques Small Animal Practice**, v.18, p.123-126, 2003.

Flores, M., Yamaguchi, M. U. 2008. Teste do Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, 1, 3, pp. 337-340.

FRANCO, G. D., Revisão: Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Instituto de Biociências**, USP, 2010.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, W. C. M.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C., O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 2000;22(1): 26-30.

GOKHALE, S. D.; GULATI, O. D. POTENTIATION OF INHIBITORY AND EXCITATORY EFFECTS OF CATECHOL AMINES BY BRETILIUM. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 1961.

GUBBELS-VAN HAL W. M., BLAAUBOER B.J., BARENTSEN H.M., HOITINK M.A., MEERTS I.A., VAN DER HOEVEN J.C. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 42, n. 3, p. 284-95, 2005.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: The next Generation. **Cell** 144, 2011.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA 2014. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>> acessado em: 21 de agosto de 2014.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemical and Physiology**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KAPOOR, S., Propolis and it's emerging anti-neoplastic effects: beyond its role in oral dysplasia. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 2013;79(4):417.

KARIN. M., NF- κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2009

KRISMA, G. e HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**. v.455, p.155-166, 2000.

Krysiak, B.; Rydzynski, K. 1997. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. **Med Pr.**, 48, 5, pp. 561-578.

LEE, Y. et al. Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and I κ B kinase inhibition are involved in NF κ B inhibitory effect: structural analysis for NF κ B inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 1, p. 21-8, 2010.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, M. A.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de biologia e ciências da terra**, 2002.

LOTUFO-COSTA, V. L. et al., A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudo no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, 2010.

Maluf, S.W., Erdtmann, B. 2003. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: Silva, J. D.A., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, pp. 183-205.

MANGIERI, J. Síndromes paraneoplásicas. IN: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009, cap.14, p.237-252.

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, 88, pp.515-531.

MENDONÇA, M.L. Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12. **Universidade São Paulo**, Ribeirão Preto 2008.

MIAGKOV, V. A.; KOVALENKO, V. D.; BROWN, E. C.; DIDSBURY; COGSWELL, P. J.; STIMPSON, A. S.; BALDWIN, S. A.; MAKAROV, S. S., NF-kB activation provides the potencial link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. **Medical Science**, 1998.

MILLER, A.G.; MORLEY, P.S.; RAO, S.; AVERY, A.C.; LANA, S.E.; OLVES, C.S. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.116-122, 2009.

NETO, M.B. Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Bioquímica). **Universidade Federal de Uberlândia**, 2006. OGILVIE, G.K. Síndromes paraneoplásicas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária. 5ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2004. cap.97, p.529-537.

OLEJNICZAK, H. S.; BLICKWEDEHL, J.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; BANGIA, N., RIAZ, W.; MAVIS, C.; CLEMENTS, L. J.; GIBBS, J.; HERNANDEZ-LLIZALITURRI, J.; CZUCZMAN, S. M., Distinct molecular mechanisms responsible for bortezomib-induced death of therapy-resistant versus – sensitive B-NHL cells. **The American Society of Hematology**, VOLUME 16, NUMBER 25, 2014.

Oliveira, E., C., S. Avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e matagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) em célula tumoral HepG2. **Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeira Preto**. Ribeirão Preto, 2012.

OLIVEIRA, M., K.; HORTA, S., R.; SILVA, O., M., C.; LAVOR, L., S., M. Principais síndromes paraneoplásicas em cães e gatos. **Enciclopédia bioesfera**, 2013.

PALMEIRA-FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 18, p. 3-22, set. 2003.

Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356pp

SANTOS, D.B. Avaliação dos efeitos de compostos orgânicos de selênio e de telúrio sobre a integridade estrutural e funcional de células sanguíneas humanas. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica). **Universidade Federal de Santa Maria**, 2009.

SERRANO, R.; THEODORO, R. T.; PINHAL, M. A. S. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **Faculdade de Medicina do ABC**, p 4-10, 2014.

Stammati, A., Combes, R. D., Sladowski, D., Van Der Valk, J., Blaauboer B. J. 2005. Thirteenth International Workshop on *In vitro* Toxicology. **Toxicology In vitro**, 19, 7, pp. 843-844.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Eritrócitos. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, cap. 3, p. 90-185.

VALADARES, C., M. Avaliação Toxicidade Aguda: Estratégia após a “Era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 3 (2), 93-98, 2006

VENDRAME, S., C. Síntese, caracterização e análise de citotoxicidade de Nanopartículas de magnetita para aplicações biomédicas. **Universidade Federal do Centro-Oeste**, Guarapuava 2011.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WATABE, M.; HISHIKAWA K.; TAKAYANAGI, A.; SHIMIZU, N.; NAKAKI, T. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NFκB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> acessado em: 21 de agosto de 2014.

WU, C. D.; LIU, M. Y.; YANG, S.; LIU, M. S.; CHEN, T. L.; PENG-WHANG, J.; Mitomycin-C Induced Hemolytic Uremic Syndrome: a Case Report and Literature Review. **Japanese Journal of Clinical Oncology** 1997; 27(2) 115-118.

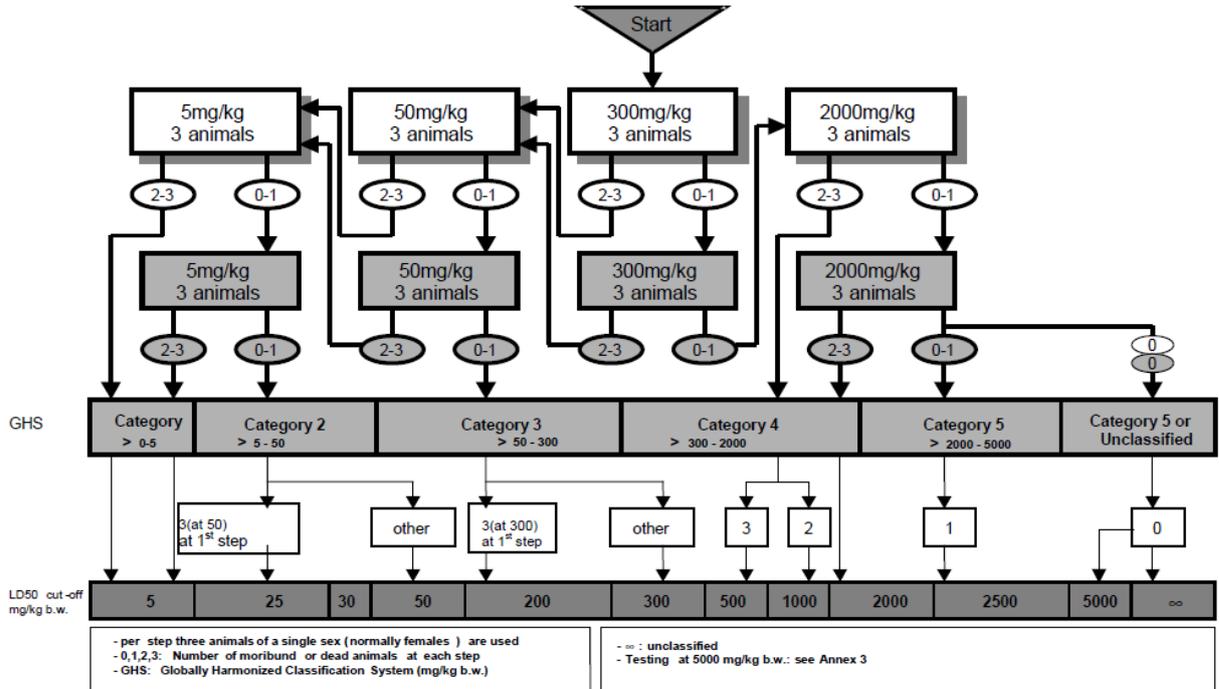
WU, J. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. **Cancer Lett**, v. 308, n. 1, p. 43-53, 2011.

YU, Y.; WAN, Y.; HUANG, C. The biological functions of NF-kappaB1 (p50) and its potential as an anti-cancer target. **Curr. Cancer Drug. Targets**, v. 9, p. 566-571, 2009.

ANEXOS

ANEXO I

ANNEX 2c: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 300 MG/KG BODY WEIGHT



Fonte: OECD 423, 2001