



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA E
ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
BRUTO DAS FOLHAS DE *Rollinia leptopetala***

Carolina Uchôa Guerra Barbosa de Lima

João Pessoa - PB

2013

CAROLINA UCHÔA GUERRA BARBOSA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA E AÇÃO
ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS
FOLHAS DE *Rollinia leptopetala***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para o grau de DOUTOR em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia, orientada pela Prof^a Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

Orientadora: Prof^a Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

João Pessoa-PB

2013

CAROLINA UCHÔA GUERRA BARBOSA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA E AÇÃO
ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS
FOLHAS DE *Rollinia leptopetala***

Aprovada em: / /2013

Banca examinadora:

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Prof. Dr. Marcos Antônio Farias de Paiva

Profa. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes

DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos, **Maria Beatriz e André**,
razão do meu viver e da minha felicidade.*

*Ao meu esposo **Anderson** por todo amor.*

*Ao meu pai, **Homero**, fonte de inspiração.*

*À minha mãe, **Cabiará**, por toda ajuda.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar minha vida e a da minha família.

Aos meus filhos, **André** e **Maria Beatriz**, que apesar da pouca idade, compreenderam os momentos de ausência.

Ao meu esposo e amigo, **Anderson Souza de Lima**, pelo amor, companheirismo, apoio e paciência em todos os momentos, contribuindo de forma direta e indireta por essa vitória.

Ao meu pai **Homero Perazzo Barbosa**, por ser meu grande incentivador e minha fonte inspiradora, ajudando e contribuindo para a conclusão desta etapa tão importante em minha vida.

À minha mãe, **Cabiará Uchôa Guerra Barbosa**, por ter sido fundamental em todos os momentos, no incentivo e na ajuda com meus filhos, para o término dessa etapa.

Ao meu irmão, **Eduardo Uchôa Guerra Barbosa**, por seu exemplo de vida.

Aos meus avós, **Beatriz Perazzo**, **Agassis** e **Maria Guerra**, por todo amor durante todos esses anos, e ao meu eterno amor, vovô **Lauro**, que é meu anjo protetor.

Aos meus primos, tios, sogros, cunhados e todos familiares e amigos, pelo incentivo.

À profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, pelo incentivo e dedicação. Exemplo de coragem, determinação e inteligência.

À profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral**, pelos ensinamentos, paciência e prestatividade.

Aos profs. Dr. **Marcelo Sobral da Silva** e Dr. **Josean Fachine Tavares**, por colaborar com a substância estudada.

Aos amigos do LABETOX, **Waleska Viana**, **Tatianne Motta**, **Tatyanna Kélvia**, **Débora Pessoa**, **Aline Xavier**, **Madson Moreira** e **Vivianne Medeiros**. Em especial ao grande amigo **João Carlos Pita**, por toda ajuda, apoio, disponibilidade e incentivo.

À **José Crispim Duarte**, por toda ajuda e apoio nesses anos.

À **Josué Ramalho** e **Cardilândia** pela ajuda nos experimentos.

À todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em especial à **Tânia Maria Araújo** e **Caroline Manguiera**, pela amizade e serviços prestados.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George pelo fornecimento dos animais.

À Capes pela bolsa concedida no período do doutorado.

Carolina Uchôa Guerra Barbosa de Lima

RESUMO

O câncer é uma doença do material genético de nossas células e a cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos. Muitas drogas usadas atualmente na quimioterapia foram isoladas de espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural. Porém, plantas medicinais possuem substâncias agressivas e, assim, sua toxicidade deve ser avaliada. *Rollinia leptopetala* R.E. Fries, conhecida popularmente como “pinha brava”, é uma árvore ou arbusto, endêmica do Brasil e utilizada pela medicina popular como digestivo e contra tumores e inflamações. É pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas. Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do Extrato Hidroalcoólico Bruto (EHAB) das folhas de *R. leptopetala*, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. O valor de CI_{50} obtido através dos ensaios de exclusão do azul de tripan foi 512,3 $\mu\text{g/mL}$. Já no bioensaio com *A. salina*, o valor de CL_{50} obtido foi 78,49 $\mu\text{g/mL}$. O EHAB das folhas de *R. leptopetala* não mostrou atividade hemolítica significativa em eritrócitos de camundongos, produzindo apenas 10 % de hemólise em concentrações acima de 1250 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente sarcoma 180 as taxas de inibição do crescimento tumoral foram 8,05, 38,72 e 49,73 % após tratamento com 50, 100 e 150 mg/kg do extrato, respectivamente. As análises toxicológicas dos animais mostraram que não houve alteração no índice de baço e timo após os tratamentos, alterações estas que ocorrem com quimioterápicos utilizados na prática clínica, nem dos rins, fígado e coração. No estudo da toxicidade subcrônica, observou-se que o uso contínuo do extrato na dose de 90mg/kg, possivelmente tem uma ação diurética, pode causar anemia megaloblástica e pode afetar o Sistema Nervoso Central, além de aumentar a quantidade de plaquetas. Portanto, é possível inferir que o EHAB das folhas de *R. leptopetala* possui atividade antitumoral, mas que seu uso contínuo pode causar danos toxicológicos.

Palavras-chave: *Rollinia leptopetala*. Atividade antitumoral. Toxicidade.

ABSTRACT

The cancer is a disease of the genetic material of our cells and the experimental cancerology has a huge value for the studies of several aspects related to the neoplastic processes. Many drugs used nowadays in chemotherapy were extracted from plants or derived from a natural prototype. However, medicinal plants have aggressive substances and, so, their toxicity must be evaluated. *Rollinia leptopetala* R.E. Fries, popularly known as “angry pine”, is a tree or bush endemic in Brasil and is utilized by popular medicine as digestive and against tumors and inflammations. It’s barely addressed in the literature, both from the point of view of phytochemist studies as their biological activities. Because of this, this work has the objective of evaluate the antitumor activity and the toxicity of the Brute Hydroalcoholic Extract (BHYE) of the leaves from *R. leptopetala*, through the assays *in vitro* and *in vivo*. The value of CI_{50} obtained from the assays of the exclusion of the trypan blue was 512,3 $\mu\text{g/mL}$. Already in the bioassay with *A. salina* the value obtained from CL_{50} was 78,49 $\mu\text{g/mL}$. The BHYE of the leaves from *R. leptopetala* didn’t show significant hemolytic activity in erythrocytes in mice, producing only 10 % of hemolysis in concentrations above 1250 $\mu\text{g/mL}$. In the evaluation of antitumor activity *in vivo* in sarcoma 180 the rates of inhibition of tumor growth were 8.05, 38.72 and 49.73% after treatment with 50, 100 and 150 mg/kg of the extract, respectively. The toxicological analysis of the animals showed that there was no change in the index of spleen and thymus after the treatments, these alterations that occur with chemotherapy drugs used in clinical practice, nor the kidneys, liver and heart. In the study of the subchronic toxicity, it was observed that the continuous use of the extract at a dose of 90mg/kg, possibly has a diuretic action, which can cause megaloblastic anemia and can affect the Central Nervous System, in addition to increasing the quantity of platelets. Therefore, it is possible to infer that the BHYE from the leaves of *R. leptopetala* has antitumor activity, but that its continuous usage can cause toxicological damage.

Key Words: *Rollinia leptopetala*, Antitumor activity, toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Artemia salina</i> L.	31
Figura 2: Foto de <i>Rollinia leptopetala</i> em seu habitat	47
Figura 3: Camundongos albinos Swiss obtidos do biotério Prof. Thomas George	57
Figura 4: Cistos de <i>Artemia salina</i> L.	58
Figura 5: Células tumorais da linhagem Sarcoma 180 (Aumento 400x)	59
Figura 6 – (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System); (B) Analisador hematológico celular automático <i>Animal Blood Counter</i> (Vet)	65
Figura 7: Campo aberto / PgPNSB / UFPB	68
Figura 8: Rotarod	68
Figura 9 – Aspecto geral do experimento com <i>Artemia salina</i> . (A) Recipiente retangular com divisória contendo furos; (B) Parte coberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz.	71
Figura 10 – Aspecto geral do experimento com eritrócitos de camundongos. (A) Suspensão de eritrócitos a 1 %; (B) Agitação por 60 minutos.	73
Figura 11: Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan.	75
Foto 12: Câmara de Neubauer utilizada para quantificar o número de células vivas e mortas pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. CV: célula viva; CM: célula morta.	76
Figura 13 – Camundongo Swiss com sarcoma 180 ascítico com 8 dias de implantação.	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com o EHAB das folhas de *R. leptopetala* _____ 81

Gráfico 2: Citotoxicidade dos eritrócitos de camundongos tratados com o HEAB das folhas de *R. leptopetala*. _____ 82

Gráfico 3: Mostra o valor da DL₅₀. _____ 83

Gráfico 4 – Viabilidade celular após tratamento com o EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala*. _____ 86

Gráfico 5 – Efeito antitumoral do EHAB das folhas de *R. leptopetala*. _____ 88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Lista oficial das espécies cujos efeitos terapêuticos foram comprovados cientificamente, conforme a RDC nº17, de 24 de fevereiro de 2000._____34
- Tabela 2:** Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas do EHAB de *Rollinia leptopetala* em camundongos._____84
- Tabela 3:** Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* (50, 100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.____90
- Tabela 4:** Efeitos do EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* (50, 100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) no consumo de água e ração e evolução ponderal de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180._____91
- Tabela 5:** Temperatura de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB de *R. leptopetala*. _____92
- Tabela 6:** Glicemia (mg/dL), de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB das folhas de *R. leptopetala*._____94
- Tabela 7:** Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 10) submetidos aos diferentes tratamentos._____95
- Tabela 8:** resultados do teste do campo aberto para os submetidos aos diferentes tratamentos com EHAB das folhas de *R. leptopetala*_____97
- Tabela 9:** resultados do teste do campo aberto para os submetidos aos diferentes tratamentos com EHAB das folhas de *R. leptopetala*_____98
- Tabela 10:** Tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do aparelho Rota-rod, de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala*_____100
- Tabela 11:** Efeitos do HEAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos._____101
- Tabela 12:** Efeitos do HEAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos._____103
- Tabela 13:** Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico
_____105

Tabela 14: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico.

107

Tabela 15: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico.

108

Tabela 16: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico.

109

Tabela 17: Índice dos órgãos, de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB de *R. leptopetala*.

110

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluoruracil

ALT: alanina aminotransferase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: aspartato transaminase

ATCC: *American Type Culture Collection*

CEME: Central de Medicamentos

CI₅₀: concentração que produz 50 % de inibição do parâmetro avaliado

DL50: dose que mata 50% da população em estudo

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

EHAB: extrato hidroalcoólico bruto

HL60: linhagem de células de leucemia promielocítica humana

MTT: [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)]

PBS: solução tampão fosfato

RDC: Resolução de Diretoria Colegiada

RE: Resolução específica

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SBF: soro bovino fetal

SUS: Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	Toxicologia de produtos naturais	28
2.2	<i>Artemia salina</i> L.	31
2.3	Legislações referentes à Ensaios Toxicológicos	32
2.4	Câncer e atividade antitumoral	39
2.4.1	Atividade antitumoral <i>in vitro</i>	39
2.4.2	Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	42
2.5	A família Annonaceae e o gênero <i>Rollinia</i>	44
2.6	A espécie <i>Rollinia leptopetala</i>	47
2.7	Acetogeninas: principais substâncias isoladas de <i>Rollinia</i>	48
3	OBJETIVOS	52
3.1	Gerais	53
3.2	Específicos	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	Local da pesquisa	56
4.2	Material	56
4.2.1	Material botânico	56
4.2.2	Animais	57
4.2.3	Cistos de <i>Artemia salina</i>	58
4.2.4	Células e meio de cultura	58
4.2.5	Substâncias	59
4.2.6	Equipamentos	60
4.3	Métodos	61
4.3.1	Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Rollinia leptopetala</i>	61
4.3.2	Ensaios toxicológicos pré-clínicos	62
4.3.2.1	Ensaios toxicológicos pré-clínicos agudos	62
4.3.2.2	Ensaios toxicológicos pré-clínicos subcrônicos	65
4.4	Bioensaio com <i>artemia salina</i> Leach	69
4.5	Citotoxicidade em eritrócitos	71
4.6	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	73
4.6.1	Cultura de células leucêmicas	73
4.6.2	Ensaios de citotoxicidade	74
4.6.3	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	77
4.7	Análise estatísticas	78
5	RESULTADOS	80
5.1	Bioensaios com <i>Artemia salina</i> Leach	81
5.2	Citotoxicidade em eritrócitos	82
5.3	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	83
5.3.1	Avaliação do consumo de água e ração	84

5.3.2	Evolução ponderal	85
5.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos	85
5.3.4	Efeito imunomodulador do EHAB de <i>Rollinia leptopetala</i>	85
5.4	Avaliação da atividade antitumoral do EHAB de <i>Rollinia leptopetala</i>	86
5.4.1	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	86
5.4.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células tumorais da linhagem sarcoma 180	87
5.4.3	Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração	91
5.5	Avaliação toxicológica pré-clínica subcrônica	92
5.5.1	Temperatura	92
5.5.2	Glicemia	93
5.5.3	Consumo de água, ração e avaliação ponderal	95
5.5.4	Avaliação comportamental	97
5.5.5	Análise Bioquímica do sangue	101
5.5.6	Análise hematológica	105
5.5.7	Índice dos órgãos	110
6	DISCUSSÃO	112
7	CONCLUSÃO	128
8	REFERÊNCIAS	130

Introdução
Introdução

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005). O homem primitivo, no meio de tentativas e erros, teve de adquirir conhecimentos e através destes observar quais as plantas poderiam ser utilizadas como alimento, medicamento e ainda destacar as que fossem venenosas ou perigosas. Com o passar do tempo, o poder curativo das plantas, tornou-se muito importante para ser esquecido e o homem começou a sistematizar o seu uso (SILVA, 2002).

A utilização de plantas para tratar diversas doenças acontece no mundo todo. Médicos da antiguidade como Hipócrates e Avicenna já utilizavam as plantas medicinais. No Brasil, as plantas eram utilizadas pelos indígenas em rituais de cura e os povos africanos faziam sua associação com rituais religiosos (FERRO, 2006).

De maneira indireta, a cultura popular que envolve o uso de plantas medicinais, desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL; PINTO; VEIGA-JÚNIOR, 2002).

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25 % dos fármacos utilizados são de origem vegetal. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do

mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em contrapartida, apenas cerca de 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais e tóxicas.

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, utilizados com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitos não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.

Dentre as formas de uso das plantas como fonte terapêutica incluem-se os chás, os extratos brutos ou suas frações padronizadas em preparações farmacêuticas e os compostos isolados, usados diretamente como drogas ou precursores em processos de síntese. Independente do uso considerado, fatores como qualidade, segurança e eficácia são requisitos indispensáveis.

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química

medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (RDC 14 de 31/03/2010).

O intenso apelo comercial advindo do forte movimento cultural dos naturalistas aqueceu, em todo o mundo, o consumo de plantas medicinais. Entretanto, não há respeito aos limites de uso dos fitoterápicos, não se fornecem informações sobre efeitos colaterais, e o consumo de plantas, do modo como vem sendo feito, representa cada vez mais um risco para a saúde humana. Estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacólogos, tornam-se, portanto, cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais. No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. As espécies nativas mais citadas como de uso popular, conhecidas através de estudos etnofarmacológicos,

estão representadas nas famílias Bignoniaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Annonaceae, Apocynaceae, Lamiaceae e Euphorbiaceae.

Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública.

Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente.

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas são potencialmente perigosas. Entre elas encontram-se as espécies do gênero *Senecio*, a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) e arnica (*Arnica montana* L.), que podem causar irritação gastrointestinal; o mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a trombeteira (*Datura suaveolens* Humb. & Bopl ex Willd.), que podem lesionar o sistema nervoso central; o cambará (*Lantana câmara* L.), conhecido por sua hepatotoxicidade; a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC), que causa distúrbios gastrointestinais (como diarréia grave) e a arruda (*Ruta graveolens*), que pode provocar aborto, fortes hemorragias, irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas. Em doses elevadas, até mesmo o jatobá (*Hymenaea courbail* L.), conhecido como expectorante e fortificante, pode desencadear reações alérgicas, e a sucúba (*Himathantus sucuuba* (Spruve) Woodson), usada no combate à amebíase, úlcera e gastrite, pode ser abortiva. Muitas espécies

podem estimular a motilidade uterina e provocar aborto, como por exemplo, o alho (*Allium sativum*), aloe (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphitum officinalis*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinalis*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*).

Em meados do século XX, a química de produtos naturais passou a representar a principal linha de pesquisa para a descoberta de novos agentes anticancerígenos. Nos Estados Unidos, entre 1983 e 1994, 60% dos medicamentos anticancerígenos aprovados eram de origem natural (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997) e, entre estes, muitos constituem compostos secundários do metabolismo de vegetais superiores (CORDELL, 1993). Os alcalóides bisindólicos vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae), descobertos no final dos anos 60, ainda são extensamente utilizados como medicamentos para o tratamento da leucemia. Adicionalmente, um derivado sintético chamado vinorelbina (3,5-nor-anidrovimblastina, Navelbine[®], comercializado pela Asta Médica Ltda.) foi, recentemente, desenvolvido para o tratamento de câncer de mama.

O diterpeno paclitaxel, previamente chamado Taxol[®], comercializado pela Bristol-Myers Squibb (ROWINSKY; CAZENAVE; DONEHOVER, 1990), foi isolado pela primeira vez no final dos anos 60 a partir das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), e posteriormente, foi descoberto em outras espécies do gênero *Taxus*, por exemplo, nas folhas de *Taxus baccata* L.. Inicialmente, o taxol foi utilizado para o tratamento de câncer de ovário resistente à quimioterapia clássica;

hoje em dia, este medicamento tem entrado na terapia de outros cânceres ginecológicos, além do câncer de ovário. Em 1966 foi relatado, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina, a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata*. A partir daí, foram sintetizados dois análogos da camptotecina, o topotecano (Hycantina[®]) e irinotecano (Camptosar[®]) comercializados pela GlaxoSmithKline e Pfizer, respectivamente, para o tratamento do câncer de cólon e ovário (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Outras substâncias obtidas de plantas estão em fase de estudo para o tratamento do câncer. Um exemplo é o caso da homoarringtonina isolada de *Cephalotaxus harringtonia* Var. Nana (Cephalotaxaceae), que se mostrou ativa contra vários tipos de leucemia (ZHOU et al., 1995).

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O objetivo primário da quimioterapia, terapia utilizando-se substâncias químicas, é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos indesejáveis da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Por isso, a busca por novas drogas com maior potência quimioterápica e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante.

Diante do exposto, é evidente a importância da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais através de estudos científicos necessários para que

a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade, a qual não é tão econômica quanta se pensa, visto que exige um razoável investimento para o desenvolvimento das pesquisas.

A presente tese objetivou contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação farmacológica da atividade antitumoral, *in vitro* e *in vivo*, e toxicológica *in vivo* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Rollinea leptopetala*.

Fundamentação
Fundamentação
teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Toxicologia de produtos naturais

A Toxicologia, observada sobre o âmbito da ciência moderna, é uma ciência multidisciplinar que, além de estudar os efeitos adversos ocasionado por agentes químicos no homem e no meio ambiente, estuda também as propriedades físico-químicas de cada substância avaliando a segurança de seu uso (ADEBAL, 2001).

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Um dos efeitos tóxicos relatados recentemente foi ocasionado pelo uso de cápsulas de têucrio (*Teucrium chamaedrys* L. – Labiateae) que causou uma epidemia de hepatite na França. A origem do efeito tóxico foi atribuída a diterpenos do tipo *neo-clerodano*, transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos, que apresentavam uma subunidade epóxido. Anteriormente, o uso do têucrio era tido como seguro até que a comercialização do vegetal em cápsulas associado à camomila, prescrito para dietas de emagrecimento, desencadeou os casos de hepatite tóxica (LOEPER et al., 1994; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Outro caso importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L. - Boraginaceae). Esta planta é utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998). Após diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por estes alcaloides, o uso do confrei foi condenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Diante do exposto, é evidente a importância da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais e de seus constituintes através de estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade, a qual não é tão econômica quanta se pensa, visto que exige um razoável investimento para o desenvolvimento das pesquisas. Laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre esses bioensaios, encontra-se o ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada comumente usado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

Atualmente, um dos debates éticos em ampla evidência está relacionado ao uso de animais em experimentos laboratoriais. Adicionalmente, além da questão ética, existe um fator financeiro envolvido nos estudos de toxicidade *in vivo*. Uma das soluções para essa problemática sugere a realização de ensaios de toxicidade *in vitro*, fortemente recomendados para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de predizer o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HAUN, 2001).

Inúmeros trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2009; LINS et al., 2009). Em estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como uréia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular. Portanto, é evidente a importância da avaliação desses parâmetros para detectar possível toxicidade de qualquer droga analisada.

2.2 *Artemia salina* L.

Artemia salina é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. O bioensaio consiste em avaliar a exposição de um determinado composto frente a esse crustáceo, realizando a análise do cálculo da Concentração Letal Média (CL_{50}), ou seja, a concentração que mata metade de uma população (LOPES *et al*, 2006). O emprego desta técnica apresenta diversas vantagens por apresentar baixo custo, facilidade de implantação e manutenção (MORALES *et al*, 2003). Trata-se de um teste simples e rápido onde os cistos são facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (LHULLIER; HORTA; FALKEMBERG, 2006) e não exigir técnicas assépticas (SIQUEIRA *et al*, 1998).



Figura 1: *Artemia salina* L.

2.3 Legislações referentes à Ensaios Toxicológicos

A publicação da primeira edição da Farmacopéia Brasileira, em 1929, foi o primeiro ato normativo e o mais expressivo e importante com referência a plantas medicinais no Brasil. Foi elaborada por Rodolfo Albino durante doze anos e contemplava mais de 280 espécies botânicas brasileiras e estrangeiras contendo as monografias a serem utilizadas como referência nos aspectos de controle de qualidade na preparação de medicamentos (MARQUES, 2005).

No Brasil, as normas que regiam os ensaios toxicológicos de novos produtos, constantes da Resolução Normativa nº 1/78 da Câmara Técnica de Medicamentos do Conselho Nacional de Saúde, contém informações de caráter geral sobre os testes a serem realizados (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1978), não especificando, porém, como realizá-los e interpretá-los convenientemente.

Em 1983, O Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (PPPM) foi estabelecido pela extinta Central de Medicamentos - CEME, órgão do MS criado pelo Decreto nº 68.806, de 25 de junho de 1971, responsável pela distribuição de medicamentos. O PPPM foi estruturado com o objetivo de “promover a pesquisa científica das propriedades terapêuticas potenciais das espécies vegetais utilizadas pela população, mirando o futuro desenvolvimento de medicamentos ou preparações que sirvam de suporte para o estabelecimento de uma terapêutica alternativa, considerando, inclusive, sua integração ao Relatório Nacional de Medicamentos Essenciais-RENAME”. Naquela ocasião foram selecionadas 74

espécies para o desenvolvimento de estudos, entre elas, 17 nativas. O PPPM possibilitou o desenvolvimento de pesquisas que levaram à comprovação da eficácia terapêutica de Espinheira santa *Maytenus ilicifolia* (SANT'ANA; ASSAD, 2004). Em 1983 a CEME constituiu a Comissão de Ensaios Pré-clínicos e Clínicos, através da portaria nº 104 de 29/12/82 (CEME, 1983b), destinada a elaborar protocolo detalhado de pesquisa integrada, baseada no conjunto de plantas definido pela "Comissão de Seleção de Plantas". Este protocolo conteve especificação a nível de bateria de testes a ser executada por classe terapêutica do elenco de plantas, selecionado para estudo sistemático e completo.

Em 1988 a Resolução nº 01/88 do Conselho Nacional de Saúde (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1988), aprovou Normas de Pesquisas em Saúde. Nesta resolução, define-se por pesquisa farmacológica as atividades científicas de estudos de medicamentos e produtos biológicos para uso em seres humanos, a respeito dos quais não se tenha experiência prévia no país, que não tenham sido registrados pelo Ministério da Saúde e, portanto, não sejam distribuídos em forma comercial, bem como os medicamentos registrados e aprovados para venda, quando se pesquisa seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações. A Resolução nº 01/88 ainda define as exigências da pesquisa pré-clínica e as fases para pesquisa clínica (fases I, II, III, IV) que somente deveria ser iniciada mediante expressa autorização do Comitê de Ética da instituição de atenção à saúde, devidamente credenciado pelo Conselho Nacional de Saúde.

A extinção da CEME em 1997, sem dúvida, representou uma perda para os estudos e pesquisas sobre plantas medicinais no país (SANT'ANA; ASSAD, 2004).

No início de 1995, foi publicada a Portaria nº 6 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 31 de janeiro de 1995, onde foram apresentadas as principais exigências para a concessão do Registro do produto fitoterápico tais como:

A) Apresentar estudos científicos que comprovem a segurança e a eficácia terapêutica do produto fitoterápico, de acordo com as exigências estipuladas na Resolução 1/88 do Conselho Nacional de Saúde- CNS:

-Toxicologia pré-clínica

-Toxicologia clínica

B) Apresentar estudos científicos que comprovem a eficácia do produto fitoterápico de acordo com as exigências estipuladas na Resolução 1/88 do CNS:

-Farmacologia pré-clínica

-Farmacologia clínica, estabelecendo a relação dose/ atividade.

-Definir o conjunto de indicações terapêuticas, adequadamente nominadas.

-Apresentar as contra-indicações, registro de uso, efeitos colaterais e reações adversas para cada forma farmacêutica.

Esta Portaria exigiu a revalidação do registro dos produtos fitoterápicos já comercializados, dando prazos para apresentação dos estudos de toxicidade (5 anos) e de comprovação da eficácia (10 anos). Ainda relacionada a Portaria nº6 da ANVISA, de 31 de janeiro de 1995, é divulgada a Portaria nº 116, de 08 de

agosto de 1996 emitida pela Secretaria de Vigilância Sanitária –Ministério da Saúde (SVS/MS), que publicou as Propostas de Normas para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos.

Neste mesmo ano, o Conselho Nacional de Saúde aprovou a Resolução nº 196/96 que fundamentava-se nos principais documentos internacionais que emanaram declarações e diretrizes sobre pesquisas que envolvem seres humanos. Esta resolução incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, os quatro referenciais básicos da bioética: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, visando assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

A Resolução nº 251 do Conselho Nacional de Saúde, de 07 de agosto de 1997 aprova as normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos e incorpora todas as disposições contidas na Resolução 196/96.

A Portaria nº 6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995 foi revogada pela Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, que dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. Esta Resolução incorpora as definições de medicamento fitoterápico novo, tradicional e similar.

A RDC nº17, de 24 de fevereiro de 2000 apresenta a Relação Oficial de 13 espécies cujos efeitos terapêuticos foram comprovados cientificamente, apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Lista oficial das espécies cujos efeitos terapêuticos foram comprovados cientificamente, conforme a RDC nº17, de 24 de fevereiro de 2000

NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO
<i>Cynara scolymus L.</i>	Alcachofra
<i>Allium sativum L.</i>	Alho
<i>Aloe vera L.</i>	Babosa
<i>Pneumus boldus Molina</i>	Boldo-do-Chile
<i>Calendula officinalis L.</i>	Calêndula
<i>Matricaria recutita L</i>	Camomila
<i>Symphytum officinale L.</i>	Confrei
<i>Pimpinella anisum L.</i>	Erva-doce
<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Gengibre
<i>Melissa officinalis L.</i>	Melissa
<i>Passiflora incarnata L.</i>	Maracujá
<i>Senna Alexandria L.</i>	Sene
<i>Mentha piperita L.</i>	Hortelã-pimenta

Na RDC nº17 foi determinado que os medicamentos registrados até 31/01/95, apresentassem até 31/01/2001 os estudos sobre toxicologia do medicamento fitoterápico de acordo com esta resolução.

A Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápico, revogou a RDC nº 17 de 25 de fevereiro de 2000. Esta resolução define fitoterápico como “Medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo

conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamento etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substância ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.” Ainda determinou que um dos critérios para a avaliação da segurança de uso e indicações terapêuticas é a apresentação da comprovação de segurança de uso (Toxicologia pré-clínica, Toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (Farmacologia pré-clínica, Farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde-CNS através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004.

Atualmente, a RDC nº 48 foi revogada pela RDC nº 14 de 31 de março de 2010, que tem como objetivo estabelecer os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos.

A portaria nº 971 de 3 de maio de 2006 do Ministério da Saúde, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Esta portaria define a fitoterapia como “terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a

utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal”. Tem como objetivos incorporar e implementar as Práticas Integrativas e Complementares no SUS, na perspectiva da prevenção de agravos e da promoção e recuperação da saúde, com ênfase na atenção básica, voltada para o cuidado continuado, humanizado e integral em saúde; Contribuir para a ampliação do acesso às Práticas Integrativas e Complementares, garantindo qualidade, eficácia e segurança no uso; Promover a racionalização das ações de saúde. Apresenta como uma das suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e da Relação Nacional de Fitoterápicos; Promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos no SUS; Cumprimento dos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança de uso.

O decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

As normas atuais, embora aprimoradas em muitos aspectos, não vêm sendo aplicadas em sua totalidade visto que ainda são comercializados medicamentos sem registro ou apenas com protocolo, com informações incompletas e sem embasamento científico (VIRGILIO, 2004)

2.4 Câncer e atividade antitumoral

As neoplasias, tanto benignas quanto malignas, são doenças genéticas cujas mutações que lhes dão origem podem ser hereditariamente transmitidas pela linhagem germinativa ou adquiridas nos tecidos somáticos. Resultam de uma mudança do estado celular à partir do acúmulo de alterações genéticas, que desorganizam os eventos celulares normais. As malignidades hematológicas, por sua vez, são doenças particularmente heterogêneas e complexas, tanto sob o aspecto morfológico, como biológico. O clone leucêmico pode surgir em fases diferentes do desenvolvimento de linhagens celulares diversas, resultando em doenças de comportamento variável, quanto à evolução clínica e resposta terapêutica (LESZCZYNIECKA et al., 2001). Mas, quando o assunto é câncer, hematopoético ou sólido, é inevitável o exercício intelectual exigido para compreensão de vários aspectos, como dos tantos mecanismos biológicos envolvidos no processo tumoral, dos diversos métodos e técnicas capazes de detectar as alterações envolvidas na doença, e dos tratamentos eficazes e com baixa toxicidade.

2.4.1 Atividade antitumoral *in vitro*

Cultura de células de mamíferos fornecem ferramentas importantes para avaliação da citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica. Toxicidade é um evento complexo expresso em um largo espectro de efeitos, que

variam desde simples morte celular até mudanças metabólicas complexas como neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade, onde não há morte celular necessariamente, mas sim alterações funcionais. Devido a essas considerações, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* devem abranger diversos parâmetros que avaliem diferentes alvos celulares (ROGUET et al., 1993).

Por motivos éticos e financeiros, a utilização de ensaios *in vitro* é fortemente recomendada para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de predizer o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HAUN, 2001).

Os ensaios *in vitro* tornam-se mais vantajosos em relação aos testes *in vivo* pela maior simplicidade e rapidez de execução, pela necessidade de pequena quantidade de substância teste para a realização dos experimentos, por fornecerem melhor controle sobre as condições experimentais, permitindo melhor reprodutibilidade dos ensaios e resultados, e ainda por diminuir o custo da pesquisa através da redução do número de animais utilizados nos experimentos. Outra grande vantagem é a disponibilidade atual de uma grande variedade de linhagens em bancos de células, possibilitando maior acesso à utilização de modelos *in vitro* (CHU, 1995).

Um dos procedimentos largamente utilizados para avaliar a citotoxicidade é o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium). O MTT é um corante amarelo, reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel

em solução aquosa. Nesse caso, a função metabólica celular é avaliada através da redução enzimática do MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER et al., 1963), obtendo-se assim informações sobre a integridade funcional dessa organela. Somente células viáveis reduzem o MTT para o formazan, e, portanto, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983). Entretanto, trabalhos recentes mostram que algumas substâncias são capazes de interagir de alguma forma com o MTT e assim inibir a redução do MTT sem afetar a viabilidade celular, ou ainda, induzir a redução do MTT na ausência de células vivas. Por isso, em adição a realização do ensaio de redução do MTT é recomendada a utilização de outros ensaios de citotoxicidade para avaliar o efeito de substâncias químicas na viabilidade de culturas celulares (AHMAD et al., 2006; TREVISI et al., 2006).

A viabilidade celular após exposição às drogas pode ser medida pela exclusão de corantes vitais como o azul de tripan. A exclusão do azul de tripan, juntamente com observações morfológicas, permite avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática celular. Esse ensaio baseia-se na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante vital.

A leucemogênese é um fenômeno complexo caracterizado por anomalias de proliferação e diferenciação, resultando em bloqueio de maturação, e expansão clonal de células leucêmicas (UZUNOGLU et al., 1999). A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação anômala dos precursores

granulocíticos-macrofágicos da medula óssea. A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é um subtipo muito peculiar de LMA que representa um modelo para o entendimento da origem e tratamento da leucemia em nível de desenvolvimento e genética molecular. Dados clínicos e biológicos obtidos nas últimas décadas despertaram o interesse de pesquisadores nesse subtipo de leucemia com o intuito de desenvolver novas abordagens terapêuticas. As linhagens celulares reproduzem as características biológicas de LPA humana e, grande parte dos conhecimentos atuais sobre a biologia celular da LPA adveio de estudos realizados em linhagens celulares estabelecidas a partir de pacientes com LPA, como por exemplo, a HL60.

A linhagem celular da LPA humana HL60 foi estabelecida em 1976 a partir do sangue periférico de pacientes com LPA e foi a primeira e única linhagem de células de LMA disponível por muitos anos. Essas células proliferam continuamente em suspensão, e são sensíveis a uma grande variedade de compostos (COLLINS et al., 1978).

2.4.2 Atividade antitumoral *in vivo*

Apesar das vantagens bem descritas para a utilização de modelos desenvolvidos em computadores, animais inferiores, órgãos isolados ou culturas celulares, todos apresentam grande limitação e, em grande parte, não podem ser considerados alternativas satisfatórias para substituição dos testes com animais. Conquanto alternativas viáveis e substitutivas ao seu uso devam ser

continuamente buscadas, torna-se imperativo adotar dispositivos regulamentares lúcidos e realistas que garantam a continuação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica. Tudo isso por que a pseudomoralidade muitas vezes utilizada como subterfúgio para tentar diminuir a grandiosidade do incontestável conhecimento advindo da experimentação com animais, não pode negar que eles prestaram e prestam grandes benefícios à humanidade. Atualmente, os animais são utilizados nos processos do ensino e da pesquisa científica e, com o conhecimento que dispomos até então, eles continuam sendo indispensáveis a essa prática (MARQUES et al., 2005).

Adicionalmente, embora os testes *in vitro* sejam bastante utilizados, há uma considerável limitação dos mesmos: compostos, os quais são ativos através da transformação de metabólitos, são efetivos apenas se testados *in vivo*. A ciclofosfamida, largamente utilizada na terapia do câncer, não mostra qualquer atividade citotóxica *in vitro*. O composto pode ser transformado em metabólitos ativos alquilantes por enzimas microssomais localizadas no fígado.

O sarcoma 180 (S180) ou tumor de Crocker é um tumor indiferenciado que foi encontrado em ratos albinos machos em 1914. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástase (KURASHIGE et al., 1982). Pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90 – 100 % dos animais inoculados, havendo regressão natural de 8 – 10 % desses. Em geral, ocorre ulceração da pele ao redor do 28º dia após a inoculação subcutânea, e os animais morrem geralmente entre 200 – 300 dias (KAWAKUBO, et al., 1980). A forma sólida é

pouco hemorrágica e caracteriza-se pelo rápido crescimento, atingindo 18x14x10mm por volta de sete dias após o transplante (O'PESSOA, 1992).

2.5 A família Annonaceae e o gênero *Rollinia*

A família Annonaceae foi criada em 1789, por Jussieu (HUTCHINSON, 1973). Possui distribuição pantropical com cerca de 2.300 espécies, distribuídas em 130 gêneros (MAAS et al., 2001), sendo muitas destas espécies adaptadas para a polinização por insetos (ARMSTRONG & MARSH, 1997; GOTTSBERGER, 1999). No Brasil, a família encontra-se bem representada com 29 gêneros e aproximadamente 260 espécies distribuídas nas florestas atlântica e amazônica sendo que todos os gêneros têm ocorrência registrada na Amazônia (BARROSO et al., 1978). Na Paraíba, um levantamento no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) registrou 7 gêneros e 12 espécies dessa família (PONTES et al., 2004).

Na flora mundial a família Annonaceae é constituída por plantas arbóreas ou arbustivas sendo as trepadeiras também muito freqüentes (HEGNAUER, 1964). Possuem folhas simples, inteiras, alternadas e sem estípulas. As flores, hermafroditas, são quase sempre vistosas e geralmente solitárias. Há muitos estames, mais ou menos sésseis, inseridos em espiral. O ovário é constituído por vários carpelos (raras vezes um só). O fruto é geralmente uma baga carnosa, muitas vezes comestível, mas, freqüentemente, é uma região de várias bagas no mesmo receptáculo (SCHULTZ, 1984).

Em termos taxonômicos, a família Annonaceae constitui um grupo muito uniforme, seja do ponto de vista anatômico, estrutural e de habitat, distinguindo-se por apresentarem uma combinação de características bem marcantes. São vegetais lenhosos, arbustivos ou arborescentes.

Grande número de espécies da família Annonaceae destaca-se devido presença de óleos essenciais. Os constituintes desses óleos são geralmente mono e sesquiterpenos ou compostos aromáticos (SANTOS *et al.*, 2000), mas ésteres de ácidos alifáticos podem ser também encontrados (JIROVETZ *et al.*, 2002).

Dos 39 gêneros da família Annonaceae presentes no continente Americano, 34 podem ser encontrados na América do Sul, onde predominam os gêneros *Annona* L., *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavan e *Xylopia* L. (BRUMMITT, 1992). No Brasil, dentre os 29 gêneros presentes encontra-se o gênero *Rollinia*, constituído por 65 espécies que ocorrem, principalmente, na América do Sul, entretanto, poucas espécies podem ser encontradas no México, Caribe e América Central (LEBOEUF *et al.*, 1982).

Dados da literatura demonstram que o gênero *Rollinia* produz uma grande variedade de compostos destacando-se os alcalóides do tipo isoquinolínicos isolados de *Rollinia leptopetala* (SETTE *et al.*, 2000a; SETTE *et al.*, 2000b)), *R. emarginata* (NIETO, 1986), *R. mucosa* (CAETANO; DADOUN, 1987; KUO *et al.*, 2001), *R. papilionella* (DABRAH, 1984) e *R. serica* (ABRASH; SNEDEN, 1983), alcalóides indólicos isolados de *Rollinia mucosa* (CHAVEZ *et al.*, 1999), lignóides isolados de *R. emarginata* (FEVIER *et al.*, 1999), *R. membranacea* (SAEZ *et al.*, 1993), *R. mucosa* (CHEN *et al.*, 1996a; CHEN *et al.*, 1996b), *R. pickelii* (DE

MESQUITA *et al.*, 1988) e acetogeninas isoladas em todas as espécies de *Rollinia* estudadas.

Algumas espécies de *Rollinia*, como a *Rollinia papilionella* (DABRAH; SNEDEN, 1983) e a *Rollinia mucosa* (DONOHOE *et al.*, 2006) apresentam atividade antitumoral e citotóxica. Outras espécies, como *Rollinia sericea*, além destas atividades, apresentam ação inibidora da proteína cinase C (BARNES; SCHANEBERG; SNEDEN, 1995), e a *Rollinia ulei* possui ação inibidora de Interleucina II e da proteína fosfatase (MISKI *et al.*, 1995).

Estudos realizados com o extrato de *Rollinia exsucca* e *Rollinia pittieri*, mostraram que essas espécies possuem atividade citotóxica e antiparasitária contra *Leishmania spp.*, *Plasmodium* e *Trypanosoma cruzi*. (OSÓRIO *et al.*, 2007).

Foram isolados, do caule de *Rollinia mucosa*, alcalóides (romucosina A, B, C e D), que apresentaram significativa inibição da atividade plaquetária (KUO *et al.*, 2001).

A análise química de compostos de aroma floral de espécies amazônicas de Annonaceae polinizadas por pequenos besouros produziu um total de 58 compostos voláteis de seis espécies de Annonaceae distribuídas em quatro gêneros (*Xylopia*, *Anaxagorea*, *Duguetia*, e *Rollinia*) (JÜRGENS *et al.*, 2000).

Annona muricata, *A. cherimolia* e *Rollinia membranacea*, conhecidas pelas suas citotoxicidades foram utilizadas como controles positivos no estudo da atividade antitumoral e antiviral de plantas medicinais da Colômbia (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999).

2.6 A espécie *Rollinia leptopetala*

Rollinia leptopetala R.E. Fries, conhecida popularmente como “pinha brava”, é uma árvore ou arbusto (Figura 1), endêmica do Brasil e utilizada pela medicina popular como digestivo e contra tumores e inflamações (AGRA et al., 2007).

O estudo fitoquímico dessa espécie permitiu o isolamento de alcalóides protoberberínicos e aporfínicos (Sette et al., 2000 a,b). É pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas.



Figura 2: Foto de *Rollinia leptopetala* em seu habitat. Foto: Josean Fechine Tavares

Estudos prévios envolvendo equipes de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby F. Medeiros permitiram, através de técnicas específicas, a identificação de 22 constituintes em uma mistura complexa de

monoterpenos (54,5%) e sesquiterpenos (45,5%) do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala*. Embora o óleo essencial não tenha apresentado atividade antibacteriana significativa *in vitro*, ele apresentou atividade moduladora de resistência, quando avaliado em linhagem de *Staphylococcus aureus* portadora de bomba de efluxo responsável pela resistência ao norfloxacino.

O extrato metanólico das folhas e caule de *R. leptopetala* mostrou ainda atividade antioxidante e citotóxica, avaliada através do bioensaio com *Artemia salina*.

Adicionalmente, outra equipe de pesquisa do PgPNSB mostrou que o extrato etanólico do caule *R leptopetala* apresentou efeito antiespasmódico em íleo isolado de cobaia (MONTEIRO, et al., 2008).

2.7 Acetogeninas: principais substâncias isoladas de *Rollinia*

Quimicamente, as acetogeninas são compostos derivados dos ácidos graxos de cadeia longa e contêm tipicamente duas cadeias longas de hidrocarbonetos, uma das quais conecta um grupo terminal, podendo ser saturado ou α,β -insaturado, a um número variável de anéis tetrahydrofurano (THF) ou tetrahidropirânico (THP). As cadeias hidrocarbônicas apresentam-se geralmente oxigenadas na forma de grupos hidroxilas, acetoxilas e/ou cetonas, acetogeninas sem anéis THF, com anéis simples com ligações duplas e com presença ou ausência de grupos epóxidos. Até o momento, esses compostos foram

encontrados unicamente na família Annonaceae. (POLO-ZAFRA et al., 1998, FANG et al., 1993).

As acetogeninas possuem um amplo espectro de atividades biológicas, tais como atividade antitumoral, antiparasitária, inseticida e imunossupressora (LIAW et al., 1999).

Desde 1982, mais de 200 tipos de acetogeninas foram relatados em espécies da família Annonaceae. Como não apresentam intensa absorvância em ultra-violeta (UV), torna-se difícil o isolamento e identificação em frações cromatográficas de extratos vegetais (GU et al., 1997).

Acetogeninas e lignóides foram isolados da casca do caule de *Rollinia emarginata*, e estudos demonstraram que esses compostos possuem atividade antiprotozoária, principalmente contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* (FEVIER et al., 1999).

Em 1995, foi isolada das folhas de *Rollinia mucosa*, uma acetogenina chamada mucocina (SHI et al., 1995), que possui um anel THF e é dotada de significativa atividade citotóxica. Estudos realizados com essa acetogenina mostraram uma atividade antitumoral bem mais potente, principalmente para linhagem celular de câncer de pâncreas, do que o agente antitumoral doxorubicina, causando apoptose das células tumorais (CRIMMINS et al., 2006). Essa acetogenina também se mostrou eficaz contra linhagem celular de câncer de mama, quando comparada com adriamicina (NARAYRAN & BORHAN, 2006).

Posteriormente, foi isolado outro tipo de acetogenina dos frutos imaturos de *Rollinia mucosa*, denominada rolicosina, que possui dois terminais γ -lactona, que também possui significativa atividade antitumoral (QUINN et al., 2005).

Acetogeninas isoladas de sementes de *Rollinia membranacea* mostraram ser eficazes em inibir o crescimento de tumores humanos em linhagem de células de mama, pulmão, fígado, cólon (ROYO et al., 2003).

Além dos 40 tipos de acetogeninas já conhecidas até o momento, foram isoladas de *Rollinia mucosa* mais quatro novos tipos (GU et al., 1997)

Estudos fitoquímicos com a espécie *Rollinia papilionella* permitiram o isolamento e elucidação estrutural de uma acetogenina, que foi denominada rolinona (DABRAH; SNEDEN, 1984). Em seguida, a partir de frutos secos de *Rollinia sylvatica*, foi isolada uma acetogenina denominada silvaticina (MIKOLAJCZAK et al., 1990). Ambas as acetogeninas mostraram ser extremamente citotóxicas para células tumorais humanas (DABRAH; SNEDEN, 1984; MIKOLAJCZAK et al., 1990).

Algumas acetogeninas já foram estudadas em relação ao seu mecanismo de ação antitumoral. Observou-se que essas substâncias podem inibir seletivamente as células cancerosas através do bloqueio do complexo mitocondrial I (NADH-ubiquinona oxidorreductase), e da inibição da membrana plasmática NADH oxidase, que esgota ATP e induz a apoptose (morte celular programada) em células malignas (EVANS et al., 2003).

Considerando todos esses aspectos, nos propomos a investigar a atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico de *Rollinia leptopetala* *in vitro* e *in vivo*, bem como sua toxicidade pré-clínica em camundongos

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a toxicidade pré-clínica e o efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Rollinia leptopetala*.

3.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico das folhas de *R. leptopetala* em camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), por via oral, com base na RE n. 90/04 da ANVISA.

- Avaliar a toxicidade em *Artemia salina* L.

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas de *R. leptopetala* em linhagem de células de leucemia promielocítica humana (HL60) utilizando como marcadores de citotoxicidade os ensaios de redução do MTT e exclusão do azul de tripan;

- Avaliar a atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *R.leptopetala* em tumor sólido Sarcoma 180, utilizando-se camundongos albinos suíços (*Mus musculus*);

- Avaliar o efeito imunomodulador do extrato hidroalcoólico das folhas de *R. leptopetala* através da determinação do índice do baço e timo.

Material
Material
e métodos
e métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram realizadas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Outras atividades foram desenvolvidas no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da UFPB.

5.2 Material

5.2.1 Material botânico

O material botânico utilizado nos experimentos foi o extrato hidroalcoólico das folhas de *Rollinia leptopetala*, fornecido pelos Profs. Drs. Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares, pesquisadores e colaboradores da fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

5.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 25 e 30 g, com faixa etária em torno de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (PgPNSB/UFPB/ANVISA). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 20 ± 2 °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 (ciclo claro: 6:00h – 18:00h) 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.

A execução do experimento foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais, em setembro de 2009, nº 0409/09.



Figura 3: Camundongos albinos Swiss obtidos do biotério Prof. Thomas George

5.2.3 Cistos de *Artemia salina*

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram da San Francisco Bay Brand®, EU,A sendo guardados sob resfriamento de 5°C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., crustáceo da classe Anostracea, (Brine Shrimp Test), na forma de metanúplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL50) como parâmetro de avaliação da atividade toxicológica (LOPES *et al.*,2006).



Figura 4: Cistos de *Artemia salina* L.

Fonte: www.artemiasalinadorn.com.br

5.2.4 Células e meios de cultura

Foi utilizada cultura de células leucêmicas da linhagem HL60 fornecidas pela Dr^a Patrícia da Silva Melo do Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (IB),

UNICAMP, São Paulo, Brasil, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 100 UI de penicilina/mL e 100 µg de estreptomicina/mL.

As células tumorais do Sarcoma 180 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas no biotério Prof. Thomas George do LTF/UFPB, através de passagens intraperitoneais semanais em camundongos.

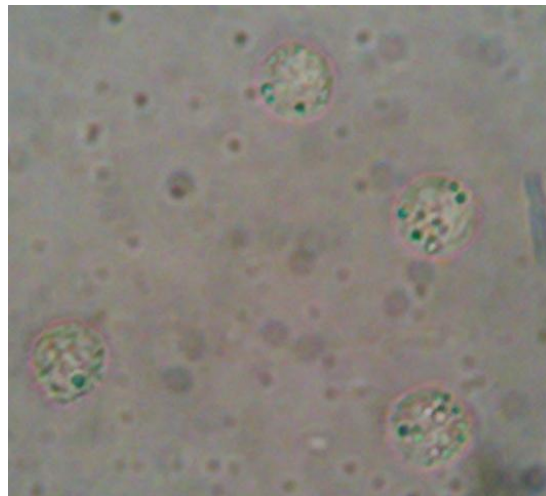


Figura 5: Células tumorais da linhagem Sarcoma 180 (Aumento 400x)
Foto: João Carlos Pita

5.2.5 Substâncias

- Solução de MTT em meio de cultura
- Solução de azul de tripan em solução fosfato tamponada (PBS)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Etanol absoluto
- Etanol 70 %

- Formol
- Hematoxilina-eosina
- Kits para análise hematológica
- Kits para análise bioquímica
- Parafina
- Solução 1 % de ácido acético e 50 % de etanol
- Tricrômico de Masson
- Xilol

5.2.6 Equipamentos

- Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus[®] - Roche Diagnostic System
- Analisador de íons seletivos, Iselab
- Analisador hematológico celular automático – Animal Blood Counter - Vet. Os esfregaços sanguíneos serão corados automaticamente no HEMATEL 200[®] e analisados em microscópio Olympus[®], para confirmação e controle da contagem de células
- Balança analítica marca AID[®] – HR – 120g – Japão
- Centrífuga BIO ENG[®] BE 4000
- Glicosímetro ADVANTAGE[®] Boehringer Mannheim: monitor de glicemia com fitas reativas

- Microscópio RML5[®] Askmania-Germany, utilizado nas análises histopatológicas
- Micrótomo
- Termômetro digital, modelo MC – 3BC[®], OMRON/China
- Rota-rod
- Open-field
- Leitor de Elisa modelo 7530 Microplate Reader (CAMBRIDGE TECHNOLOGY INC., Watertown, MA – USA)
- Estufa de CO₂ modelo 3158, série 37971-5349 (FORMA SCIENTIFIC, Marietta, Ohio- USA)
- Microscópio óptico invertido modelo CK2 (OLYMPUS, Japão)
- Fluxo laminar modelo VLFS-12, série FL 3988
- Estufa de secagem e esterilização
- Autoclave

5.3 Métodos

5.3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *Rollinia leptopetala*

As folhas foram desidratadas em estufa com ar circulante, a 38 °C, por 72 horas, e trituradas em moinho tipo Harley. Após trituração, a maceração foi realizada com etanol a 35 %, por 72 horas, a temperatura ambiente. Em seguida o material foi filtrado e uma nova extração foi realizada por igual período. O filtrado

foi concentrado a vácuo em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato hidroalcoólico bruto (EHAB), que foi submetido à liofilização. Quando requerido, o EHAB foi dissolvido em água, resultando na matéria-prima para os ensaios toxicológicos e de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, ou em DMSO para o ensaio *in vitro*.

5.3.2 Ensaios toxicológicos pré-clínicos

Os estudos de verificação do grau de toxicidade e as etapas clínicas, regulamentados pela ANVISA, incluem testes de laboratório com animais e, numa fase posterior, experimentação em humanos. O estudo toxicológico pré-clínico deve indicar o grau de confiança a ser depositado em uma droga vegetal, sendo classificado em estudo de toxicidade aguda (administração de uma dose única ou fracionada em 24h), em curto período de tempo, e estudo de toxicidade de doses repetidas (toxicidade sub-crônica, 28 dias, ou crônica, 13 semanas).

5.3.2.1 Ensaios toxicológicos pré-clínicos agudos

O ensaio toxicológico agudo permite conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte, as alterações hematológicas e bioquímicas, além de avaliar as lesões em órgãos específicos através dos exames histopatológicos (LARINI, 1999). Os ensaios agudos são

obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (LARINI, 1999)

✓ **Investigação da DL₅₀**

No ensaio toxicológico agudo foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), seis machos e seis fêmeas, por grupo, incluindo o controle. Os animais foram submetidos a doses de até 2000 mg/kg, via oral, e ao grupo controle administrado apenas o veículo. O número de animais mortos foi contabilizado para determinação da dose responsável pela morte de 50 % dos animais experimentais (DL₅₀), com limite de confiança de 95 %, segundo o método de Litchfield e Wilcoxon (1949).

✓ **Triagem farmacológica**

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 extrato por via oral, foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de carácter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; a cada 4 horas, até completar 24 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo

Setor de Psicofarmacologia do LTF-UFPB e descrito por Almeida e colaboradores (1999).

✓ **Consumo de água, alimentos e evolução ponderal**

Desde a 24^a hora e até 14 dias após administração da dose, foram observados a variação de peso e o consumo de água e alimentos pelos animais experimentais de ambos os sexos.

✓ **Avaliação laboratorial do sangue**

No 14^o dia, os animais tratados com a maior dose utilizada e o grupo controle foram sacrificados por tração cervical, sendo retirado o sangue, através de sangria do plexo braquial, para análise laboratorial de parâmetros hematológicos e bioquímicos. O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA, para avaliação dos parâmetros hematológicos (hemograma e contagem das plaquetas) e em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas de glicose, uréia, creatinina, transaminases (Aspartato transaminase - AST e Alanina transaminase - ALT), colesterol, triglicerídios, ácido úrico, fosfatase alcalina, proteínas totais e frações, sódio, potássio, cálcio e magnésio), sendo observado um jejum de 12 horas antes da coleta de sangue.



Figura 6 – (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System); **(B)** Analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter* (Vet) (Foto: João Carlos Pita).

5.3.2.2 Ensaios toxicológicos pré-clínicos subcrônicos

No ensaio subcrônico (4 semanas), animais pré-selecionados foram distribuídos em cinco grupos de vinte animais cada, dez machos e dez fêmeas. foram utilizadas três doses: 10, 30 e 90mg/kg. O quarto grupo é o controle, ao qual foi administrado água, veículo utilizado na dissolução do EHAB das folhas de *R. leptopetala*. O quinto grupo (satélite) recebeu a maior dose utilizada no ensaio e só foi sacrificado 30 dias após o término do experimento, para a verificação da reversão de um possível quadro de intoxicação. Foram avaliados os efeitos da administração prolongada do EHAB das folhas de *R. leptopetala* sobre os seguintes parâmetros:

✓ **Temperatura corporal**

Para medida da temperatura corporal foi utilizado um termômetro digital, cujo termosensor foi lubrificado com vaselina líquida e introduzido 5 cm pelo reto (atingindo o cólon), semanalmente em todos os animais, durante todo o período de tratamento.

✓ **Glicemia**

Durante as treze semanas de tratamento, foram avaliados quinzenalmente os níveis glicêmicos dos animais da seguinte forma: os camundongos foram imobilizados em contêntores plásticos e uma gota de sangue foi coletada na veia caudal e analisada em fita reativa para dosagem de glicemia. A leitura foi efetivada em monitor de glicemia, sendo observado jejum prévio de 12 horas.

✓ **Consumo de água, alimentos e evolução ponderal**

Foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, nas 13 semanas de tratamento, diariamente. Colocou-se 100mL de água nas mamadeiras e, no dia seguinte, registrou-se o volume de água ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente e, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de

ração. A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para cálculo da dose administrada, e para os cálculos de evolução da curva ponderal.

✓ **Avaliação comportamental (Teste do campo aberto) e da atividade motora (Teste de Rota-rod)**

Foi utilizado o aparelho de campo aberto, seguindo o descrito por Carlini e colaboradores (1986) para avaliar a atividade exploratória dos animais através:

- Da movimentação espontânea (ambulação), registrada pelo número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo;
- Da quantificação dos comportamentos de auto-limpeza, de levantar e a defecação (número de bolos fecais).

Esses parâmetros foram utilizados como índice da interferência do EHAB das folhas de *R. leptopetala* sobre o comportamento emocional do animal, indicando alterações sobre o sistema nervoso central.

Quinzenalmente, uma hora após a administração do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, os animais tratados e animais controle foram expostos (durante 3 minutos para cada animal) ao aparelho para a observação dos parâmetros acima descritos (MANSUR et al., 1971).

Também quinzenalmente, uma hora após administração do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, os animais tratados e animais controle foram colocados na barra giratória do aparelho Rota-rod, com velocidade constante de 9,0 rpm, e

registrado o tempo de permanência dos mesmos, com três reconduções no aparelho (CARLINI,1986).



Figura 7: Campo aberto / PgPNSB / UFPB



Figura 8: Rotarod

Fonte: zhongtongcompany.cn

✓ **Avaliação laboratorial do sangue**

Após as 4 semanas de tratamento, foram coletadas amostras de sangue, através de sangria do plexo braquial, de todos os animais, machos e fêmeas, dos grupos tratados com diferentes doses do EHAB das folhas de *R. leptopetala* e do grupo controle, para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, como descrito no ensaio agudo.

5.4 Bioensaios com *Artemia salina* Leach

A toxicidade do EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* foi avaliada utilizando-se o teste de letalidade com *Artemia salina*, segundo Meyer et al. (1982) e Nascimento; Araújo (1999). Os cistos de *A. salina* (San Francisco Bay Brand®, EUA) foram armazenados sob resfriamento a 4 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostracea, na forma de náuplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

Em um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura e distribuídos uniformemente, foi adicionada água salina artificial preparada pela solubilização de 38 g de sal marinho (Marinex®) em 1 litro de água destilada. O recipiente permaneceu sob iluminação através de uma lâmpada incandescente. Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 24 horas (22 - 29 °C) em um dos lados do recipiente.

A parte do sistema contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo coletadas com auxílio de uma pipeta de *Pasteur*.

O EHAB das folhas de *R. leptopetala* foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 % e água salina artificial, separadamente, a fim de se obter uma solução mãe de 2 mg/mL.

A partir desta, foram efetuadas diluições para concentrações de intervalo 0 - 1000 µg/mL. Colocou-se 5 mL de cada uma dessas soluções em tubos de ensaio aos quais foram adicionados 10 náuplios. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em pelo menos três experimentos. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o solvente e as larvas.

O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para posterior determinação da CL₅₀.

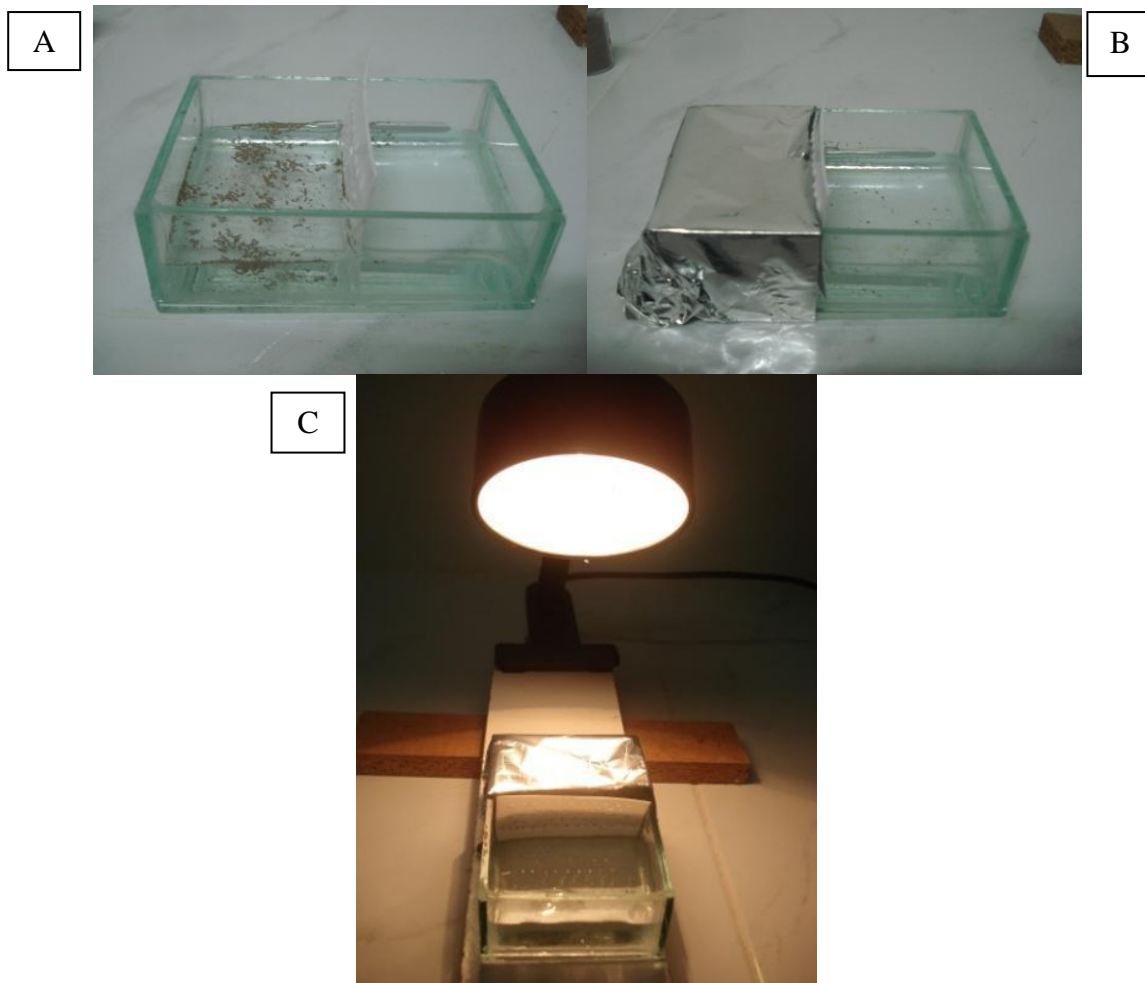


Figura 9 – Aspecto geral do experimento com *Artemia salina*. **(A)** Recipiente retangular com divisória contendo furos; **(B)** Parte conberta do sistema contendo os cis2qtos; **(C)** Exposição à luz. (Fotos: João Carlos Pita).

5.5 Citotoxicidade em eritrócitos

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

coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 2 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 finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a solução de eritrócitos a 1 % que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O EHAB de *Rollinia leptopetala* foi solubilizado em DMSO (5 %) preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 1 mL dessas soluções foi adicionado 1 mL da solução de eritrócitos, em quadruplicata. O controle positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos com 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) em PBS (1 mL) e DMSO (5 %) em PBS (1 mL), respectivamente. Os tubos foram mantidos sob agitação suave por 60 minutos (Figura 10). Logo após esse período, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm para cálculo da CH50 (concentração que produz 50 % de hemólise) através da determinação da percentagem de hemólise pela fórmula:

$$\% \text{Hemólise} = \frac{\text{DO} - \text{DOcontrole negativo}}{\text{DOcont. posit.} - \text{DOcont. neg.}} \times 100$$

DO = Densidade óptica do tubo com o produto teste

DOCONTROLE NEGATIVO = Densidade óptica do controle negativo

DOCONTROLE POSITIVO = Densidade óptica do controle positivo

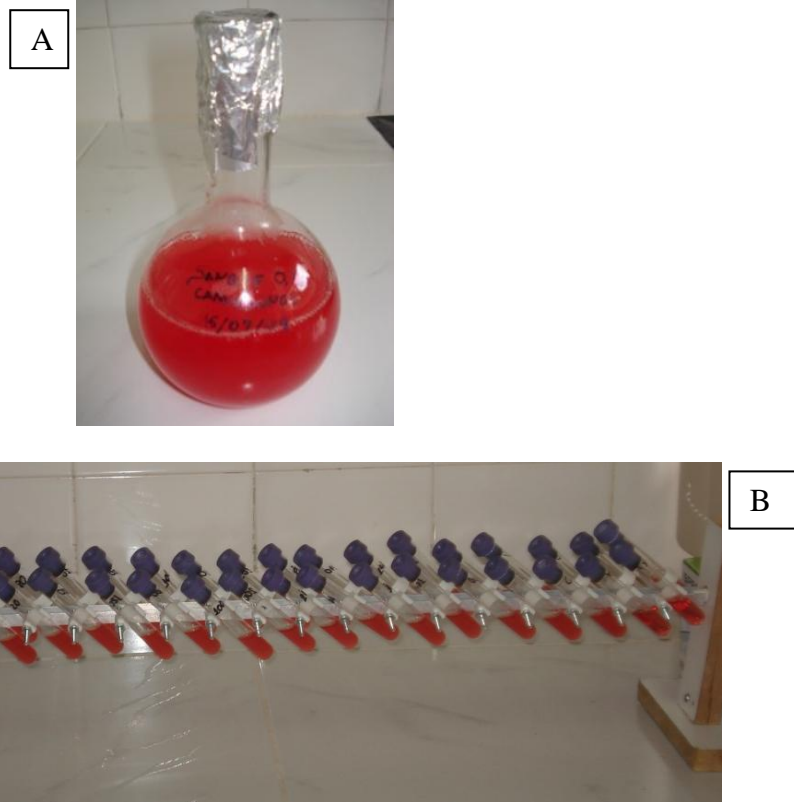


Figura 10 – Aspecto geral do experimento com eritrócitos de camundongos. **(A)** Suspensão de eritrócitos a 1 %; **(B)** Agitação por 60 minutos. (Foto: João Carlos Pita).

5.6 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

5.6.1 Cultura de células leucêmicas

As células leucêmicas da linhagem HL60 foram gentilmente fornecidas pela Dra. Patrícia da Silva Melo do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, São Paulo, Brasil. As células foram cultivadas em suspensão, em

meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de SBF, 100 UI de penicilina/mL e 100 µg de estreptomicina/mL em atmosfera umidificada de 5 % de CO₂, à 37 °C. O EHAB das folhas de *R. leptopetala* foi inicialmente solubilizado em DMSO e então em meio RPMI 1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle será de 0,1%.

5.6.2 Ensaios de citotoxicidade

✓ Redução do sal de tetrazólio (MTT)

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. Uma vez solubilizado em etanol absoluto, a quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983). Dessa forma, a redução do sal tetrazólio MTT para um produto azul (formazan), principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER et al., 1963), é muito utilizada para ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular. Somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), portanto a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Denizot e Lang (1986). As células foram tratadas com diferentes concentrações (0

– 1000 μM) do EHAB das folhas de *R. leptopetala* por 72 h. Em seguida, foram lavadas com PBS antes da adição de 0,1 mL de meio livre de soro contendo 0,05 % do MTT para cada poço. Após incubação por 4 horas, o meio de cultura foi removido e 0,1 mL de etanol foi adicionado a cada poço para solubilizar o formazan produzido. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância será lida em 570 nm.

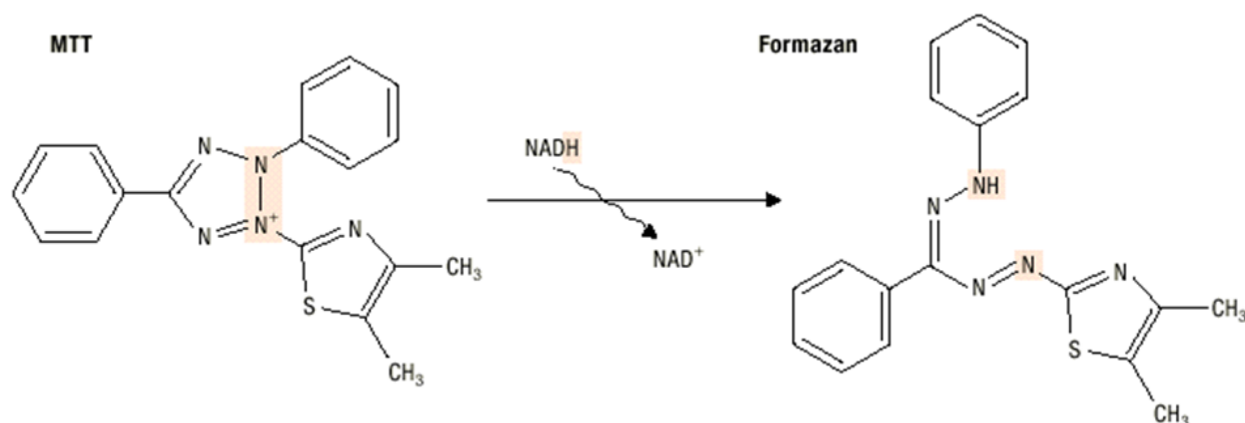


Figura 11: Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan (MOSMANN, 1983).

$$\% \text{ da viabilidade celular} = \frac{[(\text{DOcélulas tratadas} - \text{DObranco})]}{[(\text{DOcontrolenegativo} - \text{DObranco})]} \times 100$$

Onde:

DOcélulas tratadas = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DOcontrole negativo = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DObranco = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

✓ Exclusão azul de tripan

Esse ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluir o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação do número de células viáveis (RENZI et al., 1993).

O ensaio de exclusão azul de tripan será realizado como descrito por Renzi et al. (1993). As células cresceram em garrafas de cultura (3×10^5 células /mL) e foram tratadas com diferentes concentrações do EHAB das folhas de *R. leptopetala* por 72 h. Ao final desse período, as células foram analisadas para observação de alterações morfológicas. A solução azul de tripan (0,08 % em PBS) e as células em suspensão foram misturadas em volumes iguais (0,1 mL) e o número de células foi estimado usando o microscópio. As células coradas em azul foram consideradas mortas.

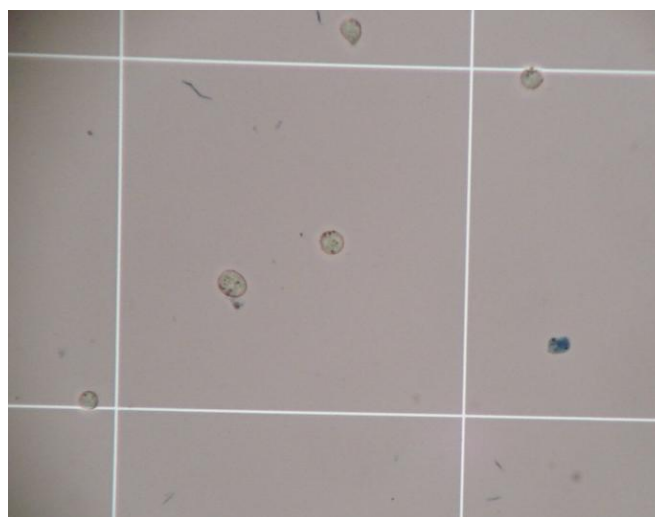


Foto 12: Câmara de Neubauer utilizada para quantificar o número de células vivas e mortas pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. **CV:** célula viva; **CM:** célula morta. (Foto: João Carlos Pita).

5.6.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

Foram utilizadas células tumorais malignas (sarcoma 180 – figura 13) de animais portadores do tumor com oito dias de implantação. Os animais doadores foram anestesiados para aspiração tumoral e, o tumor na forma ascítica foi introduzido nos animais receptores, na região subaxilar, numa concentração de 5×10^5 células/mL. Vinte e quatro horas após a inoculação, o EHAB das folhas de *R. leptopetala* será solubilizado em 10 % de DMSO e administrado por via intraperitoneal durante 7 dias. 5-Fluorouracil (5-FU) (25 mg/kg) foi usado como controle positivo. Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução de 10 % de DMSO.



Figura 13 – Camundongo Swiss com sarcoma 180 ascítico com 8 dias de implantação (Foto: João Carlos Pita).

No nono dia, os animais foram sacrificados para a extirpação da massa tumoral. A inibição tumoral foi calculada seguindo a fórmula abaixo:

$$PI \% = [(A - B)/A] \times 100$$

Onde:

PI % = percentual de inibição do peso tumoral

A = média dos pesos dos tumores do grupo controle negativo

B = média dos pesos dos tumores de cada grupo tratado

Após o sacrifício dos animais, o baço e o timo foram removidos e pesados. O peso final dos órgãos foi utilizado para determinação dos índices dos órgãos (peso do baço ou timo (mg) / peso corporal (g)).

5.7 Análise estatísticas

Para o ensaio de citotoxicidade frente células de sarcoma 180, bioensaio com *Artemia salina* e citotoxicidade em eritrócitos, foram realizados três experimentos com quatro, três e quatro replicatas, respectivamente. Os valores de CI50, CL50 e CH50 foram calculados através da expressão dos resultados como uma percentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95 %.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se o teste análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste

de Tukey onde os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Bioensaios com *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade com o microcrustáceo *A. salina* foi utilizado para avaliar a toxicidade do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, utilizando a CL_{50} como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

A viabilidade das larvas foi reduzida de maneira dependente de concentração após tratamento com o EHAB das folhas de *R. leptopetala* em concentrações até 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

O valor de CL_{50} obtido no bioensaio com *A. salina* para o referido extrato foi 78,49 (44,59 a 138,2) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Gráfico 1).

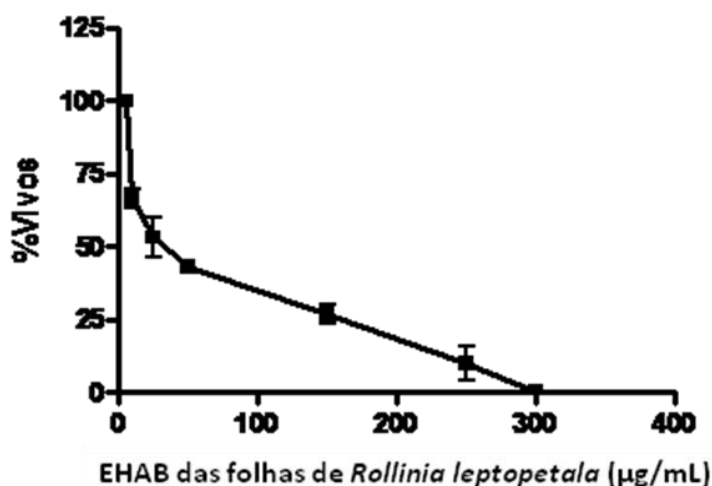


Gráfico 1 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com o EHAB das folhas de *R. leptopetala* ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

6.2 Citotoxicidade em eritrócitos

O EHAB das folhas de *R. leptopetala* não mostrou atividade hemolítica significativa em eritrócitos de camundongos, produzindo apenas 10 % de hemólise em concentrações acima de 1250 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo baixa toxicidade para o extrato (Gráfico 2).

Considerando que a planta é utilizada pela população como digestivo, antitumoral e antiinflamatório, a ausência de toxicidade nas concentrações testadas (0-5000 $\mu\text{g/mL}$) no ensaio de hemólise fornece um indício importante em relação à segurança do seu uso.

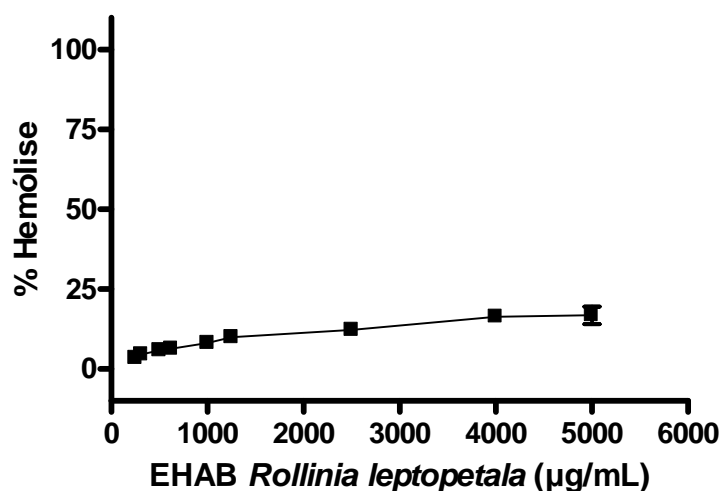


Gráfico 2: Citotoxicidade dos eritrócitos de camundongos tratados com o EHAB das folhas de *R. leptopetala*.

6.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

Após o tratamento agudo com doses de 300, 400, 600 e 1000 mg/kg do EHAB de *Rollinia leptopetala*, os efeitos adversos bem como a letalidade aumentaram progressivamente (nenhuma morte na dose de 300 mg/kg e 10 mortes na dose de 1000mg/kg). O número de animais mortos foi contabilizado e determinou-se a dose responsável pela morte de 50 % dos animais experimentais (DL_{50}), sendo esse valor em torno 457 mg/kg (Gráfico 3). Alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) foram observados, sendo mais exacerbados nas doses mais elevadas tanto em machos como em fêmeas, como mostra a Tabela 2 .

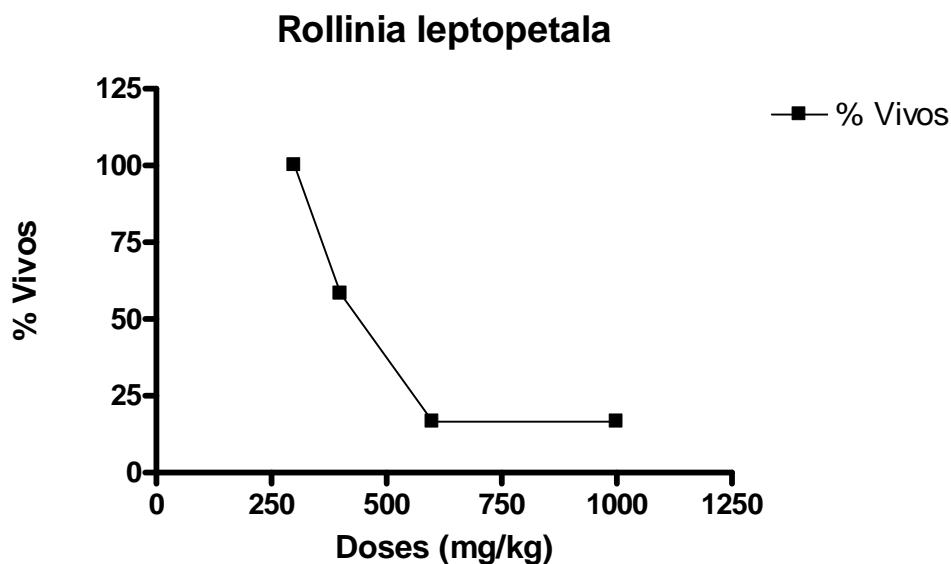


Gráfico 3: Mostra o valor da DL_{50} , sendo em torno de 457 mg/kg

Tabela 2: Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas do EHAB de *Rollinia leptopetala* em camundongos.

Dose (mg/kg)	Sexo	M/T*	Sintomas
0	Machos	0/6	Nenhum
	Fêmeas	0/6	Nenhum
300	Machos	0/6	Resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal.
	Fêmeas	0/6	Diarréia.
400	Machos	2/6	Constipação, ptose.
	Fêmeas	4/6	Agressividade, abdução das patas do trem posterior, constipação.
600	Machos	5/6	Sedação, ptose, contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior, respiração forçada, tono muscular.
	Fêmeas	5/6	Sedação, contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior, tono muscular, respiração forçada.
1000	Machos	5/6	Tono muscular, sedação, piloereção, contorções abdominais, constipação.
	Fêmeas	5/6	Tono muscular, sedação.

*M/T= numero de camundongos mortos/ número de camundongos tratados.

6.3.1 Avaliação do consumo de água e ração

Não foi possível fazer o comparativo do consumo de água e ração entre os grupos tratados e o controle, devido à morte de uma grande quantidade de animais dos grupos tratados. Indicando grande toxicidade do extrato.

6.3.2 Evolução ponderal

Não foi possível fazer o comparativo da evolução ponderal entre os grupos tratado e o controle, devido à morte de uma grande quantidade de animais dos grupos tratados.

6.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Não foi possível realizar a avaliação dos índices dos órgãos e fazer o comparativo entre os grupos tratado e o controle, devido à morte de uma grande quantidade de animais dos grupos tratados.

6.3.4 Efeito imunomodulador do EHAB de *Rollinia leptopetala*

Não foi possível realizar o estudo do efeito imunomodulador do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, devido à morte de uma grande quantidade de animais dos grupos tratados

6.4 Avaliação da atividade antitumoral do EHAB de *Rollinia leptopetala*

6.4.1 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

A citotoxicidade do EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* foi avaliada em células da linhagem tumoral sarcoma 180, utilizando-se como marcador o ensaio de exclusão do azul de tripan.

Os resultados mostram que EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* apresenta atividade antitumoral *in vitro* de maneira dependente de concentração. O valor de CI_{50} obtido através dos ensaios de exclusão do azul de tripan foi 512,3 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 4).

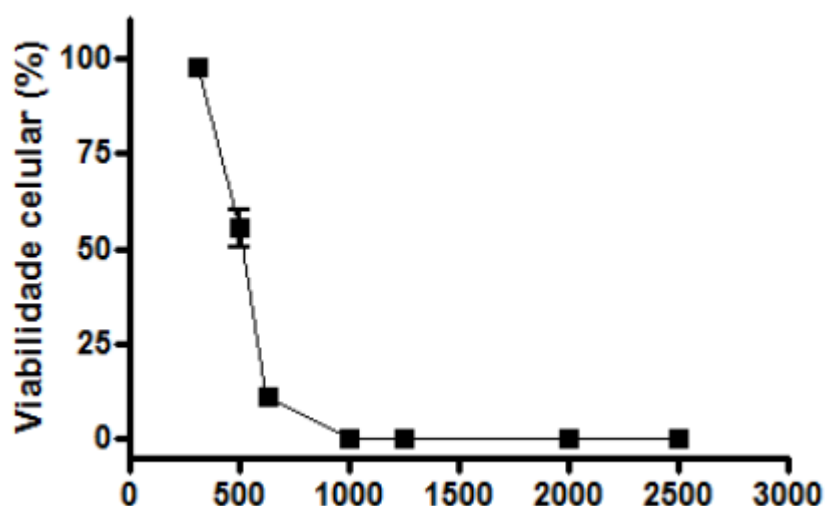


Gráfico 4 – Viabilidade celular após tratamento com o EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala*. Concentração-resposta através do ensaio de exclusão do azul de tripan. Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

6.4.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais da linhagem sarcoma 180

Para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais da linhagem sarcoma 180, o EHAB das folhas de *R. leptopetala* foi utilizado nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, estas foram determinadas experimentalmente, de forma preliminar, usando o mesmo modelo de avaliação, e considerando ainda que a maior dose usada representa 1/3 do valor da DL₅₀.

Os efeitos inibitórios do EHAB das folhas de *R. leptopetala* no crescimento do tumor, em camundongos transplantados com sarcoma 180, estão mostrados no Graf. 4. Redução significativa dose-dependente do peso do tumor foi observada nos animais tratados com o EHAB das folhas de *R. leptopetala*, bem como nos tratados com 5-FU. No 9º dia, a média do peso do tumor do grupo controle transplantado foi $2,196 \pm 0,235$ g. Na presença de 150 mg/kg do EHAB das folhas de *R. leptopetala* a média dos pesos dos tumores reduziu significativamente para $1,104 \pm 0,126$ g. Após o tratamento com 50 e 100 mg/kg do extrato esse efeito não foi significativo sendo as médias dos pesos dos tumores reduzidas para $2,019 \pm 0,321$ g e $1,345 \pm 0,243$ g, respectivamente. Para o grupo tratado com 5-FU, a média do peso do tumor foi $0,44 \pm 0,08$ g. As taxas de inibição do crescimento tumoral foram 8,05, 38,72 e 49,73 % para o tratamento com o EHAB das folhas de *R. leptopetala*, 50, 100 e 150 mg/kg respectivamente. 5-FU reduziu o peso do tumor em 80,06 %.

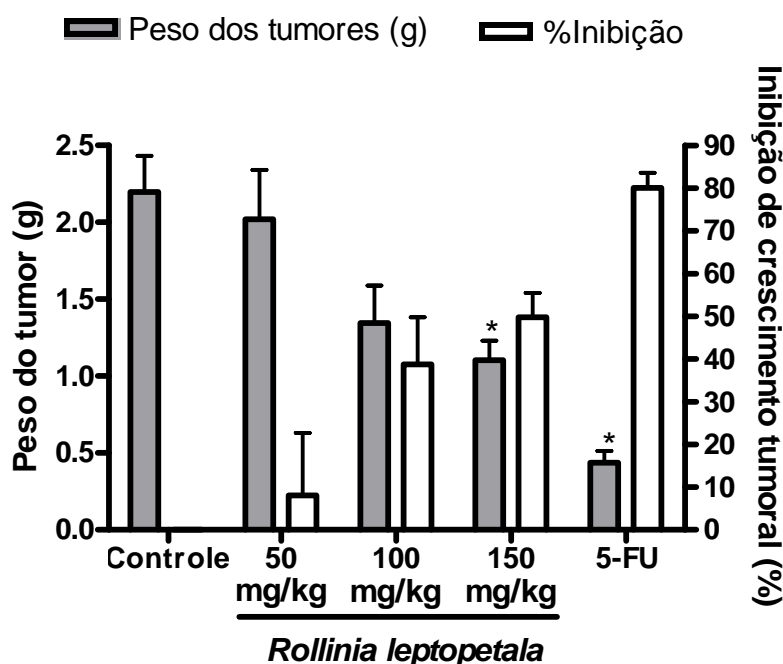


Gráfico 5 – Efeito antitumoral do E HAB das folhas de *R. leptopetala*. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor. Média \pm erro padrão da média de 8 animais.

* $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado por ANOVA seguido por Tukey.

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos e pesados, e seus índices foram calculados (Tabela 2). Nenhuma alteração significativa no índice de rins foi observada entre os grupos de animais saudáveis e transplantados. O índice de fígado dos animais tratados com 5-FU ($57,52 \pm 0,92$) reduziu significativamente quando comparado ao grupo controle transplantado ($77,41 \pm 2,057$). O E HAB das folhas de *R. leptopetala* nas doses de 50, 10, 150 mg/kg induziu uma diminuição no índice do fígado dos animais tratados $61,20 \pm 3,257$, $64,50 \pm 3,645$ e $61,20 \pm 3,257$, respectivamente, quando comparado com o grupo controle transplantado. Os índices de baço foram significativamente

aumentados em animais do grupo controle transplantado com sarcoma 180 ($6,85 \pm 0,50$), quando comparados com o grupo controle sadio ($5,21 \pm 0,24$). Após o tratamento com o 5-FU, houve diminuição do índice de baço, quando comparado ao grupo controle transplantado. Nos grupos tratados com o EHAB das folhas de *R. leptopetala* não houve alteração significativa nos índices de baço em relação ao grupo tratado com 5-FU ($5,46 \pm 0,25$) e ao controle sadio.

Os índices de timo, também, foram significativamente aumentados em animais do grupo controle transplantado com células sarcoma 180 ($4,36 \pm 0,50$), quando comparado com o grupo de camundongos sadios ($3,09 \pm 0,30$). Após o tratamento com o 5-FU, houve diminuição do índice de timo, quando comparado ao grupo controle transplantado. O tratamento com o EHAB das folhas de *R. leptopetala*, em ambas as doses, não alterou o índice timo e de coração dos animais tratados em relação ao grupo controle transplantado com sarcoma 180.

Tabela 3: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* (50, 100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.

Grupos	Doses (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de timo (mg/g)
Controle Sadio		4,58 ± 0,15	59,84 ± 3,53	12,23 ± 0,74	5,47 ± 0,32	3,38 ± 0,38
Controle S-180		3,35 ± 0,21	77,41 ± 2,06 ^a	11,83 ± 0,45	7,59 ± 0,35 ^b	7,59 ± 0,35 ^b
5-FU	25	4,51 ± 0,26	58,28 ± 1,07	10,67 ± 0,60	5,46 ± 0,25 ^a	2,40 ± 0,29 ^{a,b}
EHAB das folhas de <i>R. leptopetala</i>	50	3,64 ± 0,13	61,20 ± 3,26 ^a	12,16 ± 0,87	7,60 ± 0,63	7,60 ± 0,63
EHAB das folhas de <i>R. leptopetala</i>	100	3,73 ± 0,19	64,50 ± 3,65 ^a	11,640 ± 0,33	7,39 ± 0,32	7,39 ± 0,32
EHAB das folhas de <i>R. leptopetala</i>	150	3,73 ± 0,23	61,20 ± 3,26 ^a	10,16 ± 1,18	7,64 ± 0,77	7,64 ± 0,77

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey

b $p < 0,05$ comparado com grupo controle sadio (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey

6.4.3 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Tabela 4: Efeitos do EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* (50, 100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) no consumo de água e ração e evolução ponderal de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle Sadio	-	35,00 ± 1,05	31,74 ± 0,85	32,07 ± 0,79	32,38 ± 0,62
Controle S180	-	55,00 ± 5,813	26,28 ± 1,165	30,50 ± 0,48	36,14 ± 0,77
5-FU	25	38,21 ± 4,05	27,09 ± 1,28	30,27 ± 0,49	30,35 ± 0,73
EHAB das folhas de <i>R. leptopetala</i>	50	41,67 ± 4,90	30,41 ± 2,86	31,35 ± 0,74	34,91 ± 1,33
EHAB das folhas de <i>R. leptopetala</i>	100	27,08 ± 2,715	20,87 ± 2,296	30,05 ± 0,60	32,48 ± 1,34
EHAB das folhas de <i>R. leptopetala</i>	150	58,57 ± 16,59	20,77 ± 1,198	29,21 ± 0,43	31,71 ± 1,11

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média ; $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado-S180 por ANOVA seguido de Tukey.

Na Tabela 4 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal, avaliados durante os sete dias de tratamento.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que não houve diferenças significantes no consumo de água e ração, nem no peso corporal dos animais tratados com o EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* (50, 100, 150 mg/kg) ao término do 9º dia quando comparado com o grupo controle transplantado com sarcoma 180.

6.5 Avaliação toxicológica pré-clínica subcrônica

6.5.1 Temperatura

Tabela 5: Temperatura de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB de *R. leptopetala*.

Grupos	15 dias	30 dias
Machos		
Controle	35,81 ± 0,47	35,81 ± 0,47
D1	36,01 ± 0,29	35,96 ± 0,28
D2	37,49 ± 0,29 ^a	37,40 ± 0,28 ^a
D3	35,50 ± 0,14 ^{c,#}	35,64 ± 0,17 ^{c,#}
Satélite	36,57 ± 0,56	36,65 ± 0,53
Fêmeas		
Controle	34,46 ± 0,33	34,92 ± 0,26
D1	36,14 ± 0,28 ^a	36,14 ± 0,28
D2	36,29 ± 0,36 ^a	36,40 ± 0,31
D3	37,71 ± 0,26 ^a	37,72 ± 0,25 ^{a,b}
Satélite	38,09 ± 0,31 ^{a,b,c}	38,00 ± 0,22 ^{a,b,c}

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

Na primeira quinzena de tratamento, houve um aumento significativo na temperatura do grupo D2 dos machos, quando comparado com o controle; e uma diminuição significativa do grupo D3 quando comparado com o D2. No grupo das fêmeas houve um aumento significativo nos valores da temperatura de todos os grupos, quando comparado ao controle.

Já na segunda quinzena de tratamento, houve um aumento significativo na temperatura do grupo D2 dos machos, quando comparado com o controle; e uma diminuição significativa do grupo D3 quando comparado com o D2. No grupo das fêmeas houve um aumento significativo nos valores da temperatura dos grupos D3 e satélite, quando comparados ao controle e ao grupo D1, e o satélite também apresentou um aumento significativo da temperatura quando comparado ao D2.

Na diferença entre os sexos, houve um aumento significativo na temperatura das fêmeas, quando comparado aos machos do mesmo grupo (D3), na primeira quinzena de tratamento. O mesmo ocorreu na segunda quinzena de tratamento.

6.5.2 Glicemia

Na primeira quinzena de tratamento, houve um aumento significativo nos valores da glicemia dos machos tratados com D3 e satélite, quando comparados ao controle e ao grupo tratado com D1. O mesmo ocorreu com as fêmeas, sendo o grupo D3 também tendo um aumento significativo com relação ao grupo D2.

Já na segunda quinzena, não houve diferença significativa nos valores da glicemia, tanto nos machos, quanto nas fêmeas, quando comparados ao controle e aos grupos tratados com diversas doses.

No comparativo entre os sexos, houve uma diminuição significativa nos valores da glicemia das fêmeas dos grupos controles, D2, D3 e satélite, quando comparados com os machos de mesmo grupo.

Tabela 6: Glicemia (mg/dL), de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB das folhas de *R. leptopetala*.

Grupos	15 dias	30 dias
Machos		
Controle	72,80 ± 2,90	98,22 ± 3,46 [#]
D1	66,00 ± 1,43	91,44 ± 5,19
D2	80,18 ± 7,67	103,10 ± 3,20 [#]
D3	95,20 ± 2,59 ^{a,b}	92,00 ± 4,68 [#]
Satélite	96,30 ± 3,63 ^{a,b}	96,44 ± 3,42 [#]
Fêmeas		
Controle	74,30 ± 3,00	73,30 ± 2,65
D1	71,10 ± 2,05	80,33 ± 2,58
D2	65,70 ± 1,54	82,30 ± 3,22
D3	94,20 ± 2,81 ^{a,b,c}	74,80 ± 2,11
Satélite	93,30 ± 2,70 ^{a,b}	79,70 ± 3,66

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

6.5.3 Consumo de água e ração e avaliação ponderal

Tabela 7: Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 10) submetidos aos diferentes tratamentos.

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Variação de peso (g)
Machos			
Controle	132,3 ± 2,6 [#]	65,6 ± 0,7	5,47 ± 0,91
D1	123,8 ± 2,0 [#]	62,9 ± 0,6 ^a	6,43 ± 1,36
D2	126,8 ± 3,1 [#]	62,5 ± 0,7 ^a	6,16 ± 1,08 [#]
D3	127,5 ± 3,2 [#]	61,2 ± 0,6 ^a	6,04 ± 0,88 [#]
Satélite	121,0 ± 2,3 ^{a,#}	59,9 ± 0,9 ^{a,b,#}	5,69 ± 0,87 [#]
Fêmeas			
Controle	98,2 ± 3,3	68,9 ± 0,9	2,55 ± 1,11
D1	106,2 ± 3,1	66,2 ± 0,9	3,64 ± 0,99
D2	101,8 ± 3,2	66,5 ± 0,9	0,59 ± 0,51
D3	102,3 ± 2,8	64,4 ± 0,9 ^a	0,56 ± 0,95
Satélite	102,0 ± 3,5	65,8 ± 0,9	0,64 ± 1,13

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

Pode-se observar que os machos do grupo satélite (grupo tratado com maior dose e eutanásia 30 dias após a eutanásia dos outros grupos), consumiu menos água e ração, quando comparado com os machos grupo controle; e menos ração quando comparado com os machos do grupo D1.

Já o consumo de ração entre os machos tratados com as diferentes doses teve uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle.

Não houve alteração estatisticamente significativa do consumo de água entre os grupos de fêmeas, quando comparadas entre si e entre as diferentes doses e o controle. Porém, o consumo de água das fêmeas do D3 foi estatisticamente menor quando comparado com o grupo controle. Os demais grupos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas entre si e entre o grupo controle.

Já a comparação do consumo de água dos machos foi significativamente maior que o consumo das fêmeas, em todos os grupos. Com relação ao consumo de ração, houve um aumento significativo nas fêmeas do grupo satélite, quando comparado ao mesmo grupo dos machos.

Na variação do peso dos animais, não houve diferença significativa quando comparado os grupos tratados com o controle, tanto em machos quanto em fêmeas. Porém, quando comparado entre os sexos, houve um aumento significativo no peso dos machos do grupo D2, D3 e satélite, com relação aos meus grupos das fêmeas.

6.5.4 Avaliação comportamental

I- Teste do Campo aberto

Tabela 8: Resultados do teste do campo aberto para os submetidos aos diferentes tratamentos com EHAB das folhas de *R. leptopetala*

Grupos	Ambulação		Rearing	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
Machos				
Controle	43,4 ± 10,3	38,6 ± 6,8	14,8 ± 2,8	13,6 ± 2,5
D1	38,0 ± 10,0	32,0 ± 1,2	17,7 ± 4,3	13,7 ± 3,2
D2	58,0 ± 1,0	55,7 ± 3,5	20,7 ± 5,2	19,7 ± 6,5
D3	44,4 ± 12,3	39,4 ± 8,9	14,8 ± 2,4	13,6 ± 2,3
Satélite	43,0 ± 2,4	35,8 ± 4,3	16,6 ± 2,8	15,4 ± 2,8
Fêmea				
Controle	52,0 ± 4,2	53,0 ± 4,6	19,0 ± 1,9	20,8 ± 1,4
D1	79,6 ± 17,6	67,4 ± 9,9	31,0 ± 6,9	25,6 ± 5,3
D2	83,6 ± 7,5	38,6 ± 1,2	27,6 ± 3,9	22,2 ± 2,2
D3	39,8 ± 5,6 ^{b,c}	40,4 ± 1,9	12,8 ± 2,7 ^b	10,4 ± 1,8
Satélite	42,6 ± 2,9 ^b	39,0 ± 1,5	15,8 ± 1,3	13,8 ± 1,5

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

Tabela 9: resultados do teste do campo aberto para os submetidos aos diferentes tratamentos com EHAB das folhas de *R. leptopetala*

Grupos	Grooming		Defecação (nº de bolos fecais)	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
Machos				
Controle	4,6 ± 1,2	5,2 ± 1,2	3,6 ± 0,5	3,4 ± 0,9
D1	7,7 ± 0,7	7,7 ± 0,3	3,0 ± 1,5	6,3 ± 0,7
D2	5,7 ± 1,2	5,7 ± 1,9	2,3 ± 1,3	1,3 ± 0,7
D3	5,8 ± 1,3	5,0 ± 0,9	6,0 ± 1,1	6,8 ± 1,0 ^c
Satélite	6,6 ± 1,2	5,0 ± 0,8	6,4 ± 0,8	5,6 ± 0,8
Fêmeas				
Controle	10,2 ± 3,7	10,2 ± 3,4	3,2 ± 1,5	3,8 ± 1,2
D1	8,4 ± 2,3	7,6 ± 1,1	4,4 ± 1,3	1,2 ± 0,6
D2	2,4 ± 1,0	4,8 ± 2,2	2,0 ± 0,7	1,6 ± 0,5
D3	7,6 ± 2,7	6,4 ± 1,7	2,8 ± 1,1	2,4 ± 0,9
Satélite	8,4 ± 1,2	9,4 ± 0,9	3,2 ± 1,3	1,8 ± 0,9

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

a) Defecação

Houve um aumento significativo no número de bolos fecais dos machos na D3, na segunda quinzena de análise do campo aberto.

Não houve diferença significativa na contagem dos bolos fecais das fêmeas, tanto na primeira, quanto na segunda quinzena de análise do campo aberto.

b) Rearing

Não houve diferença significativa no grupo dos machos, quando comparado com o controle e entre os grupos tratados.

Já entre as fêmeas, houve diferença significativa apenas entre os camundongos tratados com a D3 quando comparados com D1.

Não houve diferença significativa quando comparado entre os sexos.

II- Teste do Rota-rod

Observando-se o tempo de permanência (segundos) dos camundongos na barra giratória do rota-rod, no 15º dia de tratamento, não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparado o grupo controle com os tratados com diferentes doses e quando comparado entre as doses. Isto pode ser visto tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Já, no 28º dia de tratamento, pode-se observar que houve uma diminuição estatisticamente significativa do tempo de permanência dos camundongos machos, tratados com D1 e D3, quando comparado ao grupo controle. No grupo D1 das fêmeas pode-se observar um aumento do tempo de permanência nas barras giratórias do rota-rod, quando comparado ao grupo controle, e uma diminuição deste tempo quando comparado o grupo D3 e o satélite com o D1.

Houve uma diminuição significativa no tempo de permanência nas barras giratórias dos machos tratados com D1 quando comparados com as fêmeas de mesmo grupo.

Tabela 10: Tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do aparelho Rota –rod, de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala*

Grupos	14 dias	28 dias
Machos		
Controle	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0
D1	156,0 ± 6,0	146,0 ± 2,4 [#]
D2	168,0 ± 7,3	152,0 ± 8,0
D3	168,0 ± 7,3	146,0 ± 9,3 ^a
Satélite	162,0 ± 7,3	150,0 ± 8,4
Fêmeas		
Controle	162,0 ± 7,3	150,0 ± 0,0
D1	168,2 ± 7,2	180,0 ± 0,0 ^a
D2	180,0 ± 0,0	162,0 ± 7,3
D3	174,0 ± 6,0	142,0 ± 3,7 ^b
Satélite	168,0 ± 7,3	152,0 ± 7,3 ^b

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

6.5.5 Análise bioquímica do sangue

Tabela 11: Efeitos do HEAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicédeos (mg/dL)
Machos							
Controle	130,2 ± 9,8	389,3 ± 40,3	82,9 ± 5,1	67,2 ± 2,7	0,48 ± 0,04	93,7 ± 3,9 [#]	141,8 ± 9,2
D1	147,7 ± 6,3	366,8 ± 63,8	85,5 ± 7,5	58,3 ± 5,8	0,32 ± 0,07	87,5 ± 4,6	106,0 ± 5,7
D2	120,0 ± 11,6	389,1 ± 22,5	80,0 ± 7,4	63,8 ± 2,4	0,36 ± 0,02	97,6 ± 5,5 [#]	160,3 ± 31,9
D3	169,5 ± 9,4 ^c	544,9 ± 45,6	96,0 ± 9,8	86,7 ± 5,7 ^{a,b,c,#}	0,32 ± 0,08	92,7 ± 4,1	78,5 ± 8,9 ^{a,c}
Fêmeas							
Controle	152,2 ± 8,7	443,3 ± 76,7	81,3 ± 7,2	57,3 ± 3,3	0,50 ± 0,05	76,1 ± 1,7	125,7 ± 6,4
D1	161,8 ± 6,7	509,6 ± 60,3	98,4 ± 9,9	59,9 ± 5,5	0,6 ± 0,09	85,3 ± 3,9	122,3 ± 10,8
D2	131,7 ± 10,8	366,4 ± 56,3	75,8 ± 7,8	58,8 ± 4,4	0,49 ± 0,21	74,9 ± 3,5	110,8 ± 11,9
D3	136,8 ± 19,3	412,4 ± 69,2	77,2 ± 6,2	55,4 ± 2,2	0,74 ± 0,10	85,0 ± 5,6	144,0 ± 20,3

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

✓ Glicemia

O tratamento durante as 4 semanas com EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala*, levou a um aumento estatisticamente significativo da glicemia dos machos tratados com a maior dose (90mg/kg), quando comparado com os machos tratados com a dose intermediária de 50mg/kg.

Já entre as fêmeas, não houve diferença significativa entre os valores de glicemia, quando comparado entre os grupos.

✓ AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase)

Nos valores das enzimas hepáticas AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase), entre machos e entre fêmeas, não houve diferença estatisticamente significativa dos grupos.

✓ Uréia

Houve um aumento significativo dos valores de ureia do grupo D3 dos machos, quando comparado com o grupo controle e com os grupos D1 e D2.

Já nos valores de ureia das fêmeas, não houve diferença significativa quando entre os grupos.

Quando comparado os valores entre machos e fêmeas, houve diferença significativa nos grupos tratados com a D3.

✓ Creatinina

Não houve diferença significativa nos valores de creatinina, quando comparado entre os grupos, tanto dos machos quanto das fêmeas.

✓ Colesterol

Não houve diferença significativa nos valores de colesterol total, quando comparado entre os grupos, tanto dos machos quanto das fêmeas.

Quando comparado os valores entre machos e fêmeas, houve diferença significativa nos grupos tratados com a D2 e entre os controles.

✓ Triglicerídeos

Houve uma diminuição significativa nos valores de triglicerídeos dos machos tratados com a maior dose (D3), quando comparado com o grupo controle e com o grupo D2.

Tabela 12: Efeitos do HEAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	HDL (mg/dL)	Proteínas Totais (U/L)	Albumina (mg/dL)	Ácido Úrico (mg/dL)
Macho				
Controle	45,0 ± 2,9	5,97 ± 0,14	2,14 ± 0,08	5,14 ± 0,67
D1	70,3 ± 2,4 ^a	6,01 ± 0,12	2,08 ± 0,07 [#]	33 ± 0,32
D2	75,9 ± 2,7 ^a	6,23 ± 0,18	2,33 ± 0,06	6,18 ± 0,64
D3	80,6 ± 4,8 ^a	6,29 ± 0,15	2,30 ± 0,09	5,92 ± 0,49
Fêmea				
Controle	38,0 ± 1,4	5,83 ± 0,08	2,33 ± 0,08	4,95 ± 0,51
D1	55,0 ± 5,2 ^a	6,23 ± 0,18	2,63 ± 0,08	5,34 ± 0,34
D2	57,4 ± 3,3 ^a	6,53 ± 0,13 ^a	2,38 ± 0,05	4,44 ± 0,75
D3	61,3 ± 1,9 ^a	6,60 ± 0,18 ^a	2,68 ± 0,06	5,16 ± 0,46

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

✓ HDL

Houve um aumento significativo nos valores do colesterol HDL, dos grupos tratados, tanto machos quanto fêmeas, quando comparados ao grupo controle.

✓ Proteínas totais

Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de proteínas totais entre os grupos tratados e o controle dos machos.

Já entre as fêmeas, houve um aumento significativo dos grupos D2 e D3 quando comparados aos valores do grupo controle.

✓ Albumina

Não houve diferença significativa nos valores da albumina, tanto nos machos, quanto nas fêmeas, quando comparados com o controle e entre os grupos tratados.

Já no comparativo entre os sexos, houve uma diminuição significativa nos valores da albumina dos machos tratados com D1 quando comparados com as fêmeas de mesmo grupo.

✓ Ácido úrico

Não houve diferença significativa nos valores de ácido úrico, quando comparado entre os grupos, tanto dos machos quanto das fêmeas.

6.5.6 Análise hematológica

Tabela 13: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico

Grupos	VCM (fm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Machos			
Controle	43,00 ± 0,67	13,93 ± 0,28	32,40 ± 0,76
D1	43,25 ± 0,59	12,45 ± 0,34 ^a	29,38 ± 1,15
D2	43,00 ± 0,60	12,91 ± 0,42	30,13 ± 0,89
D3	44,22 ± 0,60	12,19 ± 0,30 ^a	27,13 ± 0,64
Satélite	48,33 ± 1,17 ^{a,b,c,d}	13,14 ± 0,35	27,14 ± 0,22
Fêmeas			
Controle	43,70 ± 0,6155	12,96 ± 0,36	30,00 ± 0,99
D1	43,67 ± 0,7071	12,87 ± 0,23	30,11 ± 0,63
D2	43,00 ± 0,6236	12,83 ± 0,27	27,13 ± 3,02
D3	42,50 ± 0,7638	12,96 ± 0,24	30,90 ± 0,55
Satélite	49,78 ± 0,98 ^{a,b,c,d}	13,81 ± 0,20	27,71 ± 0,27

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

^d $p < 0,05$ comparado com grupo D3 por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

O Volume corpuscular médio (VCM) dos machos e fêmeas teve um aumento significativo do grupo satélite, quando relacionado ao controle e a todos os grupos tratado.

A hemoglobina corpuscular média (HCM) dos machos, teve uma diminuição significativa nos camundongos tratados com D1 e D3. Já nas fêmeas, não teve nenhuma alteração significativa.

Nos valores da hemoglobina corpuscular média (CHCM), não houveram alterações significativas em nenhum dos grupos.

Nos valores das hemácias não houve alterações significativas nos machos e fêmeas, quando comparados com o controle e com os grupos tratados.

Nos valores da hemoglobina, não houve alterações dos valores das fêmeas, mas houve uma diminuição significativa dos valores nos machos tratados com D3, quando comparados ao controle.

Já nos valores do hematócrito dos machos, houve um aumento significativo do grupo satélite, quando comparado com o controle e o grupo tratado com D2. Nas fêmeas, houve um aumento significativo no grupo satélite, quando comparado com o grupo controle e todos os grupos tratados com as diferentes doses.

Tabela 14: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico

Grupos	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Machos			
Controle	9,1 ± 0,1	12,66 ± 0,12	41,00 ± 0,65
D1	9,4 ± 0,2	11,75 ± 0,22	40,25 ± 0,99
D2	9,1 ± 0,2	11,78 ± 0,26	39,13 ± 0,91
D3	9,2 ± 0,2	11,21 ± 0,17 ^a	39,10 ± 0,85
Satélite	9,15 ± 0,15	12,06 ± 0,43	44,34 ± 1,47 ^{a,c}
Fêmeas			
Controle	9,3 ± 0,1	12,03 ± 0,30	40,40 ± 0,93
D1	9,2 ± 0,1	11,88 ± 0,24	39,78 ± 0,94
D2	9,4 ± 0,2	12,08 ± 0,15	40,11 ± 0,79
D3	9,2 ± 0,2	12,01 ± 0,26	39,10 ± 0,64
Satélite	9,15 ± 0,14	12,63 ± 0,14	45,60 ± 0,81 ^{a,b,c,d}

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

^d $p < 0,05$ comparado com grupo D3 por ANOVA seguido de Tukey

Tabela 15: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico

Grupos	Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
		Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Machos					
Controle	3.640 ± 306,7	62,1 ± 3,9	36,4 ± 2,8	3,2 ± 1,1	0,1 ± 0,1
D1	3.525 ± 208,5	65,1 ± 6,2	31,7 ± 5,9	3,0 ± 0,4	0,1 ± 0,1
D2	3.438 ± 556,2	66,0 ± 3,4	30,4 ± 3,4	3,4 ± 0,7	0,2 ± 0,1
D3	4.411 ± 252,5	59,4 ± 5,4 [#]	37,2 ± 4,2 [#]	4,2 ± 1,5	0,0 ± 0,0
Satélite	4.556 ± 708,3	70,2 ± 6,1	25,3 ± 5,2	4,3 ± 0,9	0,0 ± 0,0
Fêmeas					
Controle	4.380 ± 657,4	70,5 ± 4,5	31,1 ± 4,9	2,0 ± 0,6	0,2 ± 0,1
D1	3.922 ± 377,8	65,1 ± 2,4	31,2 ± 2,3	3,9 ± 0,8	0,0 ± 0,0
D2	3.222 ± 236,7	76,1 ± 2,6	20,8 ± 2,5	3,0 ± 0,6	0,1 ± 0,1
D3	2.870 ± 120,2	79,5 ± 2,9	17,5 ± 2,4	3,2 ± 0,8	0,0 ± 0,0
Satélite	3.767 ± 312,2	74,6 ± 2,2	21,3 ± 1,9	4,1 ± 0,9	0,0 ± 0,0

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

Na contagem total e diferencial dos leucócitos, não houve alterações significativas nos grupos dos machos e fêmeas, quando comparados com o controle e entre os grupos tratados.

Quando comparado entre os sexos, houve um aumento da quantidade de linfócitos das fêmeas tratadas com D3, quando comparadas com machos do mesmo grupo. Já com relação aos neutrófilos, houve um aumento na quantidade dos machos tratados com D3, quando comparados com as fêmeas de mesmo grupo.

Tabela 16: Efeitos do EHAB das folhas de *R. leptopetala* nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos durante o tratamento subcrônico

Grupos	
Plaquetas	
Machos	
Controle	521.700 ± 29.061
D1	514.750 ± 13.610
D2	507.875 ± 22.088
D3	653.000 ± 48.554 ^c
Satélite	858.556 ± 59.491 ^{a,b,c,d,#}
Fêmeas	
Controle	505.000 ± 28.586
D1	501.333 ± 23.209
D2	545.778 ± 17.273
D3	759.700 ± 39.777 ^{a,b,c}
Satélite	653.000 ± 48.554

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

^d $p < 0,05$ comparado com grupo D3 por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

Houve um aumento significativo nos valores das plaquetas dos machos tratados com D3 quando comparados com o D2; e do grupo satélite quando comparado com o controle, D1, D2 e D3. Nas fêmeas, houve um aumento

significativo das plaquetas no grupo tratado com o D3 quando comparados ao grupo controle e os grupos tratados com D1 e D2.

Quando comparado entre os sexos, houve um aumento significativo do grupo satélite dos machos, em relação às fêmeas de mesmo grupo.

6.5.7 Índice dos órgãos

Tabela 17: Índice dos órgãos, de camundongos durante o tratamento subcrônico com o EHAB de *R. leptopetala*

Grupos	Timo	Baço	Fígado	Coração	Rins
Machos					
Controle	0,129 ± 0,003	0,229 ± 0,010	2,181 ± 0,072	0,135 ± 0,007	0,367 ± 0,008
D1	0,113 ± 0,003	0,227 ± 0,011 [#]	2,006 ± 0,079	0,132 ± 0,010	0,340 ± 0,008
D2	0,109 ± 0,002	0,175 ± 0,011 ^{a,b}	1,973 ± 0,054	0,135 ± 0,008	0,368 ± 0,013
D3	0,227 ± 0,130	0,171 ± 0,011 ^{a,b}	2,012 ± 0,023	0,142 ± 0,004	0,357 ± 0,008
Satélite	0,103 ± 0,004	0,191 ± 0,004	2,102 ± 0,034	0,123 ± 0,006	0,342 ± 0,012
Fêmeas					
Controle	0,081 ± 0,039	0,216 ± 0,008	2,175 ± 0,062	0,1337 ± 0,006	0,366 ± 0,009
D1	0,111 ± 0,004	0,179 ± 0,007	1,912 ± 0,086	0,1228 ± 0,007	0,344 ± 0,009
D2	0,101 ± 0,004	0,161 ± 0,014 ^a	2,043 ± 0,065	0,1289 ± 0,008	0,343 ± 0,008
D3	0,092 ± 0,005	0,165 ± 0,012 ^a	1,847 ± 0,041 ^a	0,1323 ± 0,004	0,359 ± 0,011
Satélite	0,108 ± 0,003	0,189 ± 0,005	1,926 ± 0,061	0,1281 ± 0,007	0,315 ± 0,006 ^{a,d}

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo Controle por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado com grupo D1 por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo D2 por ANOVA seguido de Tukey

^d $p < 0,05$ comparado com grupo D3 por ANOVA seguido de Tukey

[#] $p < 0,05$ comparado com o mesmo grupo do sexo oposto por ANOVA seguido de Tukey

Na avaliação do índice dos órgãos dos machos, pode-se observar que houve uma diminuição significativa no índice do baço dos animais tratados com a D2 e D3, quando comparados com o controle e com os animais tratados com D1. Não houve alterações nos valores dos índices do timo, fígado, coração e rins.

Já no grupo das fêmeas, houve uma diminuição significativa nos valores dos índices do baço dos grupos D2 e D3, quando comparado com o grupo controle. O mesmo foi observado nos valores do fígado das fêmeas tratadas com D3. No grupo satélite, houve uma diminuição significativa no índice dos rins, quando comparado ao grupo controle e D3.

Discussão

7 DISCUSSÃO

O uso de plantas é uma prática prevalente na população, principalmente onde as condições sociais e econômicas são mais precárias. Considerando a importância destes aspectos é que foi realizado um estudo que objetivou a investigação da toxicidade pré-clínica aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Rollinia leptopetala*. Além do estudo toxicológico, também foi realizado o estudo da atividade antitumoral desse mesmo extrato.

A utilização de produtos naturais como agentes anticâncer tem uma longa história que iniciou com a medicina popular e através dos anos foi incorporada à medicina alopática. Muitas drogas usadas atualmente na quimioterapia foram isoladas de espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural (COSTA-LOTUFO et al., 2005). De acordo com Cragg e Newman (2000), cerca de 50 % das drogas utilizadas na clínica com atividade anticâncer foram isoladas de fontes naturais ou relacionadas a elas. Portanto, o uso de produtos naturais representa a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos usados na terapia anticâncer (BEZERRA et al., 2008).

O estudo foi iniciado com a triagem toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* L, que teve como finalidade direcionar os estudos toxicológicos subsequentes em camundongos. *Artemia salina* L. é um microcrustáceo da ordem *Anostracea*, encontrado em águas salgadas (CALOW, 1993), amplamente utilizado como indicador de toxicidade em um bioensaio que utiliza a CL50 (Concentração letal 50%) como parâmetro de avaliação da atividade biológica

(NÓBREGA, 2005). O valor médio da CL50 determinado no teste foi 78,49 g/mL (Gráfico 1), desta forma, segundo o método utilizado, constatou-se que a espécie em estudo é considerada de alta toxicidade. Para CL50 menor que 1000 g/mL, as espécies são consideradas de alta toxicidade (MCLAUGHIN e ROGERS, 1998).

O teste com *Artemia salina* tem demonstrado boa aceitabilidade decorrente da sua alta sensibilidade, baixo custo, rapidez e por ser de fácil manuseio (CAVALCANTE, 2000). É utilizada como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Essa espécie marinha tem sido utilizada em experimentos laboratoriais como um bioindicador, sendo o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo que apresenta uma resposta nítida frente a pequenas variações na qualidade do ambiente (ABEL, 1989). A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de repostas biológicas, onde as variáveis morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982). O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* consiste em avaliar a toxicidade aguda do extrato e por isso é fator determinante em bioensaios preliminares, onde o estudo de compostos com potencial atividade biológica é investigado (COLEGATE; MOLYNEUX, 1993). McLaughlin e colaboradores têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais (MEYER et al., 1982; McLAUGHLIN, 1991; RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990). As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. A significativa correlação entre o bioensaio e a inibição do crescimento *in vitro* de linhagens de células

tumorais mostra que esse método pode ser uma ferramenta útil para triagem na pesquisa de drogas antitumorais (ANDERSON et al., 1991).

Carballo et al. (2002) compararam os resultados com extratos de produtos marinhos, com o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina*, em relação à citotoxicidade em duas linhagens de células tumorais. Segundo os autores, os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já estabelecido para extratos de plantas (McLAUGHLIN, 1991), sugerindo que este bioensaio seja utilizado para testar produtos naturais com potencial atividade farmacológica.

Na avaliação da toxicidade de produtos naturais com o bioensaio com *A. salina*, valores de CL50 menores que 1000 µg/mL representam produtos bioativos (MEYER et al., 1982). Os valores de CL50 obtidos para o EHAB das folhas de *R. leptopetala* é menor que 1.000 µg/mL, indicando que o produtos é um possível candidato a droga antitumoral.

O ensaio farmacológico pré-clínico agudo consiste numa avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, o que permite obter informações acerca dos riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida, servindo como base para a pesquisa crônica / subcrônica (BRITO, 1994).

Após o tratamento agudo com doses de 300, 400, 600 e 1000 mg/kg do EHAB de *Rollinia leptopetala*, os efeitos adversos bem como a letalidade aumentaram progressivamente (nenhuma morte na dose de 300 mg/kg e 10 mortes na dose de 1000mg/kg) (Tabela 2). O número de animais mortos foi contabilizado e determinou-se a dose responsável pela morte de 50 % dos

animais experimentais (DL_{50}), sendo esse valor 457 mg/kg (Gráfico 3). Devido à morte da maior parte dos animais em experimento, não foi possível determinar o consumo de água e ração durante os 14 dias de tratamento, bem como observar o ganho ou peso dos animais tratados, nem realizar as análises bioquímicas e hematológicas, concluindo-se que a droga é bastante tóxica.

Para investigar a possível atividade anticâncer do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, foi avaliada a viabilidade de células da linhagem tumoral sarcoma 180, tratadas com este extrato. Diante dos resultados obtidos no ensaio de atividade antitumoral *in vitro*, o EHAB das folhas de *R. leptopetala* foi considerado promissor em relação à sua bioatividade, de forma dose-dependente (Gráfico 4).

A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada pela citotoxicidade através dos ensaios de exclusão do azul de tripan e redução do MTT. O sistema MTT é quantitativo e mais sensível. Por causa da relação linear entre atividade celular e absorvância, o crescimento ou taxa de morte de células pode ser mensurado. O teste de exclusão do azul de tripan é um teste qualitativo e indica se a célula está viva. Fatores que interferem na acurácia (exatidão de uma operação) do método de avaliação da citotoxicidade pelo MTT estão relacionados à contaminação do reagente com substâncias redutoras, células ou microrganismos; à exposição da placa à luz; aos erros relacionados ao cálculo do número de células por poço ou ao volume pipetado; à diminuição do tempo de incubação da cultura com a solução de MTT; à diminuição do tempo de incubação necessário para solubilização do formazan; e à técnicas de cultura inadequadas que comprometem o crescimento celular (ATCC, 2001).

Adicionalmente, trabalhos recentes mostram que algumas substâncias são capazes de interagir de alguma forma com o MTT e assim inibir a redução do MTT sem afetar a viabilidade celular, ou ainda, induzir a redução do MTT na ausência de células vivas. Por isso, em adição a realização do ensaio de redução do MTT é recomendada a utilização de outros ensaios de citotoxicidade para avaliar o efeito de substâncias químicas na viabilidade de culturas celulares, incluindo o ensaio de exclusão do azul de tripan (AHMAD et al., 2006; TREVISI et al., 2006).

Diante dos resultados, verifica-se efeito inibitório do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, frente às células tumorais da linhagem sarcoma 180. As doses utilizadas, de 50, 100 e 150mg/kg, mostraram inibição dos tumores transplantados nos camundongos de forma dose-dependente, da mesma forma que os tumores tratados com 5-FU (Gráfico 5).

A citotoxicidade do extrato foi previamente avaliada em células V79 (fibroblastos pulmonares de Hamster chinês) e hepatócitos de ratos, através do ensaio de redução do MTT, fornecendo valores de CI50 de 512,3µg/mL (TAVARES et al., 2006). Comparando esses resultados com o valor de CI50 obtido em sarcoma 180, pode-se observar que o HEAB das folhas de *R. leptopetala* é mais citotóxico em célula tumoral do em que células normais, não neoplásicas.

Considerando que as substâncias citotóxicas não são letais às células neoplásicas de modo seletivo, ou seja, estruturas celulares normais também são afetadas significativamente, a busca por novas drogas com maior potência quimioterápica e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante. Sendo

assim, os resultados preliminares dão um indício de que a aplicabilidade do extrato das folhas *R. leptopetala* como droga farmacológica é uma possibilidade.

Estudos indicam que alguns compostos isolados de plantas, tais como terpenoides, podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e subsequentemente produzir hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; BADER et al., 1996; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997). A estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um bom indicador de danos *in vitro* em triagens de citotoxicidade, já que drogas podem alterar esta delicada estrutura (SHARMA; SHARMA, 2001; AKI; YAMAMOTO, 1991). Eritrócitos também fornecem 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 (APARICIO et al., 2005; LEXIS; FASSETT; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2006; SILVA et al., 2009b). Os resultados obtidos sugerem que a toxicidade observada do EHAB de *R. leptopetala* frente células tumorais de sarcoma 180 não é devido ao estresse oxidativo ou dano à membrana celular, já que observou-se apenas 10 % de hemólise em concentrações acima de 1250 µg/mL e a inibição tumoral com dose de 512,3 µg/mL) (Gráfico 4). Experimentos adicionais são necessários para quantificar o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de ação citotóxico do HEAB de *R. leptopetala*.

Desde 1957, 5-FU tem um importante papel no tratamento do câncer de cólon e é usado por pacientes com câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço (PETERS; KÖHNE, 1999). O seu mecanismo inclui inibição da timidilato

sintase (TS) pelo 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), incorporação de 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação do 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA. A inibição da TS, uma enzima importante na síntese de pirimidina, resulta na depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoxiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA. Incorporação do 5-FU ao RNA também tem sido relatada a sua ação citotóxica (NOORDHUIS et al., 2004).

Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, os animais tratados com a maior dose do EHAB de *R. leptopetala* (150 mg/kg) e com o 5-FU não houve alteração significativa no peso corporal quando comparados ao grupo controle transplantado. Este quimioterápico (5-FU) possui muitas reações adversas tais como mielossupressão, diarreia, perda de peso e hemorragias nos pulmões e intestinos (HEIDELBERGER et al., 1958; EL-SAYYAD et al., 2009; GOODMAN; GILMAN, 2006). Ao subtrair o peso dos tumores dos pesos dos animais, para avaliar apenas o ganho de massa corpórea (dados não mostrados), verificou-se que houve apenas diminuição significativa do peso no grupo tratado com 5-FU, o que corrobora com dados da literatura (EL-SAYYAD et al., 2009).

No uso do extrato por 28 dias, observou-se que muito provavelmente, a variação da temperatura não está relacionada com o uso do extrato, sendo importante observar, que mesmo com variações significativas, as temperaturas dos animais tratados e do controle mantiveram-se em níveis normais, variando entre 35 – 38°C, podendo observar que a relação metabolismo/regulação manteve-se preservada durante a administração prolongada da planta (Tabela 5).

Os efeitos da administração contínua sobre o consumo de ração, mostraram alterações significativas em ambos os sexos (Tabela 7). Houve uma diminuição significativa no consumo de ração, principalmente nos animais tratados com a maior dose, mesmo assim, foi observado um aumento no peso dos animais, no final do experimento, mais evidenciado nos machos, mostrando que esse extrato pode ter ativado, de forma direta ou indireta, o centro regulador de saciedade no sistema nervoso central. Já o consumo de água foi mais evidenciado nos machos do que nas fêmeas (Tabela 7).

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o órgão excretor mais importante, e ambos são susceptíveis a drogas quimioterápicas. Como exemplos, pode-se citar disfunções hepáticas induzidas por mitramicina e toxicidade renal causada por docetaxel (KATZUNG, 2003; BEZERRA et al., 2008).

Como células metabolicamente complexas, os hepatócitos contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática. No hepatócito, as enzimas comumente medidas são encontradas em localizações específicas; o tipo de lesão hepática determina o padrão de alteração enzimática. As enzimas citoplasmáticas incluem a lactato desidrogenase (LDH), a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As enzimas mitocondriais, como a isoenzima mitocondrial da AST, são liberadas mediante o dano mitocondrial (HENRY, 2008). As enzimas são liberadas pelos hepatócitos por meio de uma variedade de mecanismos, os quais determinam o padrão de elevação enzimática. O padrão mais comum de

elevação na lesão é o dano irreversível à membrana celular seguido de morte da célula, levando ao extravasamento das enzimas citoplasmáticas. O álcool rapidamente causa a liberação da AST mitocondrial pelos hepatócitos e sua expressão nas superfícies celulares (ZHOU et al., 1998). Os principais marcadores de lesão celular são as enzimas citoplasmáticas e mitocondriais, que não são específicas dos hepatócitos, e podem estar aumentadas com lesão em outros órgãos; todavia, as hepatopatias são a causa mais comum de elevação (HENRY, 2008). Como os resultados obtidos não mostraram alteração significativa nos níveis de AST e ALT, não há indício enzimático de comprometimento hepático (Tabelas 11 e 12).

Os compostos nitrogenados não protéicos (NPN) são formados no organismo como resultado do catabolismo de ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas. Concentrações elevadas dos principais componentes NPN (uréia, creatinina e ácido úrico) ocorrem como consequência da função renal reduzida.

A uréia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da uréia hepática. A uréia é filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos dutos coletores juntamente com a água (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). A produção de uréia é afetada pela ingestão de proteína e pela taxa de síntese; a nutrição deficiente leva a valores plasmáticos reduzidos de uréia, enquanto os estados catabólicos (queimaduras) e cargas elevadas de proteína, como sangramento do trato gastrintestinal superior (CHALASANI; CLARK; WILCOX, 1997), causam aumento da uréia. Uma vez que a uréia é sintetizada no fígado, a hepatopatia avançada frequentemente está

associada com uréia plasmática reduzida (LUM; LEAL-KHOURI, 1989). Os resultados obtidos mostraram um aumento na concentração de ureia nos machos tratados por 4 semanas ($86,7 \pm 5,7$ mg/dL) com a maior dose do extrato (90mg/kg), corroborando uma possível ação diurética do extrato, causando insuficiência renal pré-renal. Também é sugerido que haja um quadro de desidratação dos animais em experimento, perda muscular ou até mesmo um catabolismo proteico aumentado. Todos esses fatores levam ao aumento dos níveis de ureia. Mesmo a ureia não tendo a boa especificidade para diagnosticar mudanças da função renal geral, ela é mais sensível a alterações primárias das condições renais, por isso é um marcador que tem forte importância em casos que envolvam esta condição (Tabelas 11 e 12).

No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina, que serve como uma fonte rica em energia. Sob condições fisiológicas, a creatina perde água espontaneamente, formando sua amida cíclica, creatinina. Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A taxa de produção da creatinina está relacionada à massa muscular, à atividade muscular e à ingestão de creatina na carne, bem como à ingestão total de proteína; essas variáveis também interferem nas concentrações plasmáticas de creatinina (RAHN; HEIDENREICH; BRUCKNER, 1999). As elevações em cada uma das variáveis aumentam a creatinina plasmática, enquanto as reduções levam à concentração plasmática reduzida. A creatinina é excretada na circulação em uma taxa relativamente constante. Uma fração substancial da excreção da creatinina nos

rins é resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. A creatinina sérica elevada está associada com uma redução da taxa de filtração glomerular (HENRY, 2008), o que não foi observado com o uso contínuo do extrato, demonstrando que não houve alterações nas funções renais (Tabelas 11 e 12).

Tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da uréia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da uréia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina. Como os níveis de creatinina deram normais e o de ureia deram aumentados, pode-se sugerir que os animais, ao serem eutanasiados, estavam com início de insuficiência renal aguda.

A dosagem isolada da proteína total tem pouco valor clínico porque a alteração em uma das frações pode ser compensada por alteração de outra fração, como ocorre nas doenças crônicas, em que há diminuição de albumina com aumento de gamaglobulina. As fêmeas que foram tratadas com 30 e 90mg/kg do extrato, tiveram um aumento nos níveis de proteínas totais, sendo um quadro possível de desidratação (Tabelas 11 e 12).

A albumina, que é uma proteína plasmática sintetizada pelo fígado, não teve alteração em seus valores, que juntamente com os valores normais de AST e ALT, mostram que o uso contínuo do extrato não é hepatotóxico (Tabelas 11 e 12).

O uso do extrato não alterou os níveis do colesterol LDL, mas houve um aumento significativo dos níveis de HDL nos machos e fêmeas, sugerindo que o

extrato, induz ao aumento da produção da Apo A-1, que aumenta os níveis de HDL (Tabelas 11 e 12).

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são uma família de partículas heterogêneas que variam de tamanho, densidade e composição química como resultado de suas taxas de síntese e catabolismo e de um remodelamento intravascular contínuo pela ação de enzimas e de proteínas de transporte. A função principal da HDL parece ser a remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos, a condução ao fígado e a promoção da metabolização e secreção na bile, o que é conhecido como transporte reverso de colesterol.

As partículas de HDL são originadas a partir de um complexo fosfolípideo-apolipoproteína chamado de HDL-nascente. A Apo AI constitui 70%-80% de sua estrutura. Essas partículas captam colesterol livre pela ligação a um receptor das células periféricas conhecido como ABC A-1 (ATP Binding Cassette A-1). A enzima LCAT (lecitina:colesterol aciltransferase) age na transformação da HDL-nascente em HDL3 que são partículas pequenas, ainda pobres em colesterol. Essa enzima, além de facilitar o transporte de colesterol livre das células periféricas para as partículas de HDL, também promove a conversão do colesterol livre em ésteres de colesterol, facilitando uma maior aceitação pelas HDL3 que, progressivamente, aumentam de tamanho, transformando-se em HDL2:

Também tem sido sugerido que a HDL poderia exercer efeitos pleiotrópicos que vão além do transporte reverso de colesterol. Esses incluiriam propriedades antiinflamatórias, antioxidativas, antiagregantes, anticoagulantes e pró-fibrinolíticas, já demonstradas em estudos *in vitro*, algumas das quais também

presentes com a infusão de HDL-colesterol *in vivo*. Fatores ambientais como dieta, obesidade e exercícios, assim como fatores genéticos e ligados ao gênero também exercem influência nos níveis séricos de HDL-C.

O teste de campo aberto foi realizado para a avaliação de alterações comportamentais mediante o uso do aparelho de campo aberto proposto por Carlini *et al* (1986), com finalidade de avaliar a atividade exploratória dos animais mediante sua movimentação espontânea (ambulação), o número de comportamentos de auto limpeza (grooming), de levantar (rearing) e o número de bolos fecais como índice de emocionalidade (MANSUR *et al*, 1971). Esses parâmetros foram utilizados como índice da interferência do EHAB de *R. leptopetala* sobre o comportamento emocional do animal, indicando alterações sobre o sistema nervoso central. Durante o ensaio subcrônico, as fêmeas tratadas com 90mg/kg e as do grupo satélite, tiveram uma diminuição na ambulação e também uma diminuição no rearing, nos grupos tratados com a mesma dose, sugerindo que esta dose do extrato pode causar depressão do SNC das fêmeas, que foi observado na primeira quinzena de uso do extrato. Os machos não demonstraram alterações na ambulação e no rearing em nenhum momento. Já na segunda semana de uso do extrato, houve um aumento significativo da defecação dos machos e nenhuma alteração nos parâmetros das fêmeas (Tabelas 8 e 9).

O teste no aparelho de Rota-rod foi realizado para a avaliação de alterações motoras, e pôde-se observar que, na segunda semana de tratamento, houve uma diminuição significativa no tempo de permanência dos animais

(machos e fêmeas), dos grupos tratados com a maior dose do extrato, indicando ação do extrato no SNC (Tabela 10).

No estudo subcrônico do EHAB das folhas de *R. leptopetala*, foi realizada também a análise de parâmetros hematológicos (Tabela 13). Nos machos, não houve alterações significativas nos valores das hemácias e CHCM. Já nos camundongos tratados com 90mg/kg, houve uma diminuição significativa nos valores de hemoglobina e HCM, sugerindo que o extrato pode influenciar na formação da hemoglobina, causando anemia com seu uso. Pacientes portadores de doenças neoplásicas apresentam alta frequência de anormalidades das células sanguíneas. Uma diminuição nos níveis de hemoglobina e hemácias é uma complicação comumente observada em pacientes oncológicos. No grupo satélite, houve um aumento significativo nos valores do hematócrito e do VCM, sugerindo quadro de anemia megaloblástica. A anemia megaloblástica, quando não causada pela deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico, pode ser causada por antimetabolitos que interferem diretamente na produção de DNA, como alguns agentes quimioterápicos.

Não houve alteração significativa no valor total dos leucócitos, nem na contagem diferencial das células, mostrando que o uso contínuo do extrato não interferiu na linhagem leucocitária. O aumento significativo do número de plaquetas do grupo satélite e do grupo tratado com 90mg/kg, pode estar associado com o maior risco de causar trombose e patologias mieloproliferativas, com o uso do extrato em doses mais elevadas. Já a análise hematológica das fêmeas, a única alteração encontrada, foi o aumento significativo do VCM e hematócrito, sugerindo

um quadro de anemia megalblástica, da mesma forma que ocorreu nos machos. A contagem total e diferencial dos leucócitos foi normal e trombocitose foi observada apenas nas fêmeas tratadas com a maior dose (90mg/kg).

Os dados mostram que o EHAB das folhas de *R. leptopetala* não apresenta atividade imunoestimulante, porém, também não produz imunossupressão, que representa um dos principais efeitos indesejáveis da maioria dos quimioterápicos.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Diante dos experimentos realizados, é possível concluir que:

- O EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* apresentou atividade antitumoral *in vitro*, frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180.
- O EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* mostrou ser bioativo frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e apresentou baixa toxicidade frente eritrócitos de camundongos Swiss.
- O EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* mostrou atividade antitumoral *in vivo* na dose de 150 mg/kg. Os animais tratados com o EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* não apresentaram sinais de toxicidade comumente encontrados para os quimioterápicos da prática clínica, não havendo alterações significantes nos modelos experimentais avaliados.
- O EHAB das folhas de *Rollinia leptopetala* também não apresentou atividade imunoestimulante (determinada através do índice de baço e timo) como parte do seu mecanismo de ação antitumoral, porém, também não produziu imunossupressão. Entretanto, outros ensaios relacionados à sua atividade no sistema imune devem ser realizados para uma melhor análise desse processo.
- O uso contínuo do extrato leva à algumas alterações, como anemia megaloblástica e aumento de ureia, reações comuns ocorrentes com o uso de quimioterápicos, que pode ser reversível com o término da administração.

Referências

9 REFERÊNCIAS

ABEL, P. D. **Water Pollution Biology**. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.

ABRASH, R. M.; SNEDEN, A. T. – Oxoaporphine alkaloids from *Rollinia sericea*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, n. 3, p. 437, 1983.

ADEBAL, A. F; DÉLIO, C.; DIAS, M.B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, 2001.

AGRA, M.F.; et al. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacognosia**, v.17, p 114-140.

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano” , Brazil. **Journal of Ethno-Pharmacology**, 2006.

AHMAD, S.; AHMAD, A.; SCHNEIDER, K. B.; WHITE, C. W. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells. **International Journal of Toxicology**, v. 25, p. 17-23, 2006.

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, p. 133-138, 1991.

ALMEIDA, R.N. *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev. Bras. Farm.**, v.80, p.72-76, 1999.

ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochem. Anal.**, v. 2, p. 107–111, 1991.

APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.

ARMSTRONG, J.E.; MARSH, D. Floral herbivory, floral phenology, visitation rate, and fruit set in *Anaxagorea crassipetala* (Annonaceae), a lowland rain forest tree of Costa Rica. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v.124, n.3, p.228-235, 1997.

BADER, G.; PLOHMANN, B.; HILLER, K.; FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, v. 51, p. 414-417, 1996.

BARNES, JN: SCHANEBERG, BT: SNEDEN, AT. Bistetrahydrofuranoid Acetogenins From *Rollinia sericea*. **Planta Med**, v. 61, n. 5. p. 486-487, 1995.

BETANCUR-GALVIS, L.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, 1999.

BARROSO, G. M.; Sistemática das angiospermas do Brasil. **LTC – Livros Técnicos e Científicos**. Ed. S. A./ Ed. Da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 1, p. 28-33, 1978.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with pipartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, p. 156-63, 2008.

BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chem. Biodivers.**, v. 6, p. 1224-31, 2009.

BRASIL.Ministério da Saúde.Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000.Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União** , Poder Executivo, Brasília,DF, 25 de fevereiro de 2000.

BRASIL.Ministério da Saúde.Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 48 de 16 de março de 2004.Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União** , Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL.Ministério da Saúde.Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União** , Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL.Ministério da Saúde.Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “GUIA PARA A

REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE”. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 01 de Fevereiro de 1995

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1994

BRUMMITT R. K. Vascular plant families and genera. Royal Botanic Gardens, Kew List of families as recognized at Kew, with their genera. Notes on 8 systems of classification. Monocots, dicots, ferns and gymnosperms. **J 580.4. taxon, Coniferae**, General article Review article, Gen_dicots, Gen_monocots, Gymnospermae, Pteridophyta Equisetaceae, 1992.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 155-163, 1998

CAETANO, L. C; DADOUN, H. Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 50, n. 2, p. 330, 1987.

CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology**. Blackwell, Oxford, UK, vol. 1, 1993.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.**, v. 2, p. 1-5, 2002.

CARLINI, E.A; et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory. **Journal of Ethnopharmacology**. v.17, p37-64. 1986.

CAVALCANTE, M. F. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia Salina*. **Quim. Nova**, v. 23, n.1, p. 20-22, 2000.

CHALANSANI, N.; CLARK, W. S.; WILCOX, C. M. Blood urea nitrogen to creatinine concentration in gastrointestinal bleeding: A reappraisal. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, p. 1796-9, 1997.

CHAVEZ, D.; ACEVEDO, L. A. MATA, R. – Tryptamine derived amides and acetogenins from the seeds of *Rollinia mucosa*. **J Nat Prod**, v. 62, n. 8, p. 1119-1122, 1999.

CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. – Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. **J Nat Prod**, v. 59, n. 9, p. 904-906, 1996a.

CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; YEN, H. F.; WU, Y. C. – Epomusenins A And B, Two Acetogenins From Fruits Of *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v.42, n. 4, p. 1081-1083, 1996b

CHU, I. Alternative methods to animal testing: A Canadian health protection branch perspective. **ATLA**, v. 23, p. 257-261, 1995.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**. CRC Press. London, 1993.

COLLINS, J. S.; RUSCETTI, W. F.; GALLAGHER, R. E.; GALLO, R. C. Terminal differentiation promyelocytic leukemia cells induced by dimetil sulfoxide and other polar compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 75, p. 2458-2462, 1978.

CORDELL, G. A. The discovery of plant anticancer agents. **Chemistry and Industry**, Nov 1, n. 21, 841-844, 1993.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 21–30, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52, 1997.

CRIMMINS, M. T.; ZANG, Y.; DIAZ, F. A. Total Synthesis of (-)-Mucocin. **Org Lett**, v. 8, p. 2369–2372, 2006

DABRAH, T. T.; SNEDEN, A. T. – Oxoaporphine Alkaloids from *Rollinia papilionella*. **J Nat Prod**, v. 46, n. 3, p. 436, 1983.

DABRAH, T. T. Cytotoxic Principles From *Rollinia papilionella* **Diss Abstr Int B**, v. 44, n. 8, p. 2425, 1984.

DE MESQUITA, L.M.; ROQUE, N. F.; QUINTANA, L. M. B.; DE Q PAULO, M.; BARBOSA FILHO, J.M. Lignans from *Rollinia* species (annonaceae). **Biochem Syst Ecol**, v. 16, n. 4, p. 379-380, 1988.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolio dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunology Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DONOHOE, T. J.; HARRIS, R. M.; BURROWS, J.; PARKER, J. Total Synthesis of (+)-*cis*-Sylvaticin: Double Oxidative Cyclization Reactions Catalyzed by Osmium. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 13704–13705, 2006.

EL-SAYYAD, H. I.; ISMAIL, M. F.; SHALABY, F. M.; ABOU-EL-MAGD, R. F.; GAUR, R. L.; FERNANDO, A.; RAJ, M. H. G.; OUHTIT, A. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, p. 466-473, 2009.

EVANS, P. A.; CUI, J.; GHARPURE, S. J.; POLOSUKHIN, A.; ZHANG, H. R. Enantioselective Total Synthesis of the Potent Antitumor Agent (-)-Mucocin Using a Temporary Silicon-Tethered Ring-Closing Metathesis Cross-Coupling Reaction. **Journal of American Chemistry Society**, v. 125, n. 48, p. 14702–14703, 2003.

FANG, X. P.; RIENZER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; MCLAUGHLIN, J. L. **Phytochemistry Anal.**, v. 4, p. 27, 1993.

FERRO, D. História da Fitoterapia. In: **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006

FRESHNEY, R. I. In: Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique. **New York: Wiley-Liss**, 3^a Ed., p. 486, 1994.

FEVIER, A; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A.; VALUFF, G.; INCHAUSTI, A; DE ARIAS, A. R.; HOCQUEMILLER, R.; WAECHTER, A. I. – Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta Med**, v. 65, n. 1, p. 47-49, 1999.

GONZAGA, M. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; SOARES, S. A.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **J. Nat. Med.**, v. 63, p. 32-40, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GOTTSBERGER, G. Pollination and evolution in Neotropical Annonaceae. **Pl. Sp. Bio.**, 14, p. 143–152, 1999.

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. **Biochem. Pharmacol.**, v. 54, p. 973-978, 1997.

GU, Z. M.; ZHOU, D. W.; LEWIS, N. J.; WU, J.; SHI, G.; Mc LAUGHLIN, J. L. – Isolation Of New Bioactive Annonaceous Acetogenins From *Rollinia mucosa* Guided By Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Bioorg Med Chem**, v. 5. n. 10, p. 1911-1916, 1997.

HEIDELBERGER, C.; GRIESBACH, L.; MONTAG, B. J.; MOOREN, D.; CRUZ, O.; SCHNITZER, R. J.; GRUNBERG, E. Studies on Fluorinated Pyrimidines: II. Effects on Transplanted Tumors. **Cancer Res.**, v. 18, p. 305-317, 1958.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HUTCHINSON, J. The families of flowering plants. **Oxford**, 1973.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M. B.; GEISLER, M. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry. **Journal of Chromatography**, v. 976, p. 265-275, 2002.

JURGENS, A.; WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry** 55: 551-558, 2000.

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. **Comp. Biochem. and Physiol.**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KATZUNG, B. G. 2003. **Farmacologia básica e clínica**. 9 ed. McGraw-Hill Medical: USA, 1088, 2003.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in Sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v. 73, p. 85- 90, 1982.

KAWAKUBO, Y. *et al.* Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, p. 113- 118, 1980.

KUO, R. Y. CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; TENG, C.M.; YEN, H.F.; WU, Y.C. Antiplatelet activity of n-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa* **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 421-425, 2001.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 1999.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, R.; **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783, 1982.

LESZCZYNIECKA, M.; ROBERTS, T.; DENT, P.; GRANT, S.; FISHER, P. B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. **Pharmacology Therapy**, v. 90, p. 105-156, 2001.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.16, p.158-163, 2006

LIAW, C.C.; CHENG, F.R.; CHEN, Y.Y.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. – New annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **J Nat Prod**, v. 62, n. 12, p. 1613-1617, 1999.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 20-6, 2009.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Phamacol**, v. 96, p. 99 – 113, 1949.

LOEPER, J.; DESCATOIRE, V.; LETTERON, P.; MOULIS, C.; DEGOTT, C.; DANSETTE, P.; FAU, D.; PESSAYRE, D. Hepatotoxicity of germander in mice. **Gastroenterol.**, v. 106, p. 464-72, 1994.

LOPES, W.B.L. *et al.* **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais**. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/B/Desenvolvimento.PDF> Acesso: 27 de novembro de 2006

LUM, G.; LEAL-KHOURI, S. Significance of low serum urea nitrogen concentrations. **Clin. Chem.**, v. 35, p. 639-40, 1989.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MAAS P. J. M.; H.M.-V.D. KAMER, L. JUNIKKA, R. D. MELLO-SILVA, H. RAINER: Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 65, 2001.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

McLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, p.1-32, 1991. McLAUGHLIN, J. L. In: **Methods in Plant Biochemistry**, vol. 6, Ed. Hostettmann K., Academic Press, London, p. 1-32 1991.

MANSUR, J. et al. Effects of acute and chronic administration of Cannabis sativa and (-) – trastetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open-field arena. **Psychopharmacology**, v. 9, p. 388 – 397, 1971.

MARQUES, R. G.; MIRANDA, M. L.; CAETANO, C. E. R.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira** v. 20, p. 262-267, 2005.

MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. HPLC quantification of Kaurene diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 40-45, 2001.

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135-141, 2001.

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 Med.**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MIKOLAJCZAK, K. J.; MADRIGAL, R. V.; RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; LIU, Y. M.; SMITH, D. L.; Mc LAUGHLIN, J. L.; Sylvaticin: A New Cytotoxic And Insecticidal Acetogenin From *Rollinia sylvatica* (Annonaceae), 1990.

MISKI, M.; SHEN, X.; COOPER, R.; GILLUM, A. M.; FISHER, D.; K.; MILLER, R. W.; HIGGINS, T.; J. – Alkaloids, CD45 Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors, from *Rollinia ulei*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 5, n. 14, p. 1519-1522, 1995.

MONTEIRO. F. S. ; COSTA, V. C. O. ; QUEIROGA, C. S. ; TAVARES, J. F. ; SANTOS, B. V. O. ; SILVA, M. S. . Comparação do efeito antiespasmódico de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries e *Rollinia exsucca* A. DC. em íleo isolado de cobaia. 2008

MORALES, G. *et al.* Secondary metabolites from medicinal plants from northern Chile: antimicrobial activity and biotoxicity against *Artemia salina*. **Journal of Chilean Chemical society**. v 48, p--, 2003

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

MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R.; MUNTANÉ, J.; MUÑOZ, M. C.; BUJALANCE, I.; MONTILLA, P.; TUNEZ, I. Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicol. Lett.**, v. 160, p. 196-203, 2006.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, p. 143-148, 2008.

NARAYAN, R. S.; BORHAN, B. Synthesis of the Proposed Structure of Mucoxin via Regio and Stereoselective Tetrahydrofuran Ring-Forming Strategies. **J. Org. Chem**, v. 71, p. 1416- 29, 2006.

NG, T. B.; LI, W. W.; YEUNG, H. W. A sterol glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 18, p. 55-61, 1986.

NIETO, M. Alkaloids from *Rollinia emarginata*. **J Nat Prod**, v. 49, n. 4, p. 717, 1986.

NÓBREGA, E. M. M. A. *et al.* Avaliação da toxicidade do extrato de *Erythrina mulungu* frente a *Artemia salina* L each. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.18, p.90, 2005

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Onc.**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

OBERLIES, N.H.; McLAUGHLIN, J.L., "Use of Annonaceous Acetogenins to Treat Multidrug Resistant Tumors," disclosed to **Purdue Research Foundation**, February 17, 1997.

O'PESSOA, C. Testes *in vivo* e *in vitro* para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro. **Ceará: Universidade Federal do Ceará**, 1992. Tese de Mestrado.

OBERLIES, N.H., CHANG, C. J.; McLAUGHLIN, J.L. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF- 7/adr) cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 2102-2106, 1997.

OSÓRIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMENÉZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v.111, p. 630- 5, 2007.

PETERS, G. J.; KÖHNE, C. H. Fluoropyrimidines as antifolate drugs. In: JACKMAN, J. L. (ed.): **Antifolate Drugs in Cancer Therapy**. Totowa, NJ: Humana Press; 101–145, 1999.

POLO-ZAFRA, M. C.; FIGADERE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J. R.; CORTES, D. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms de action. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 908-1117, 1998.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. **Flora Paraibana: Annonaceae Juss. Acta Bot. Bras.** [online]. 2004, v. 18, n. 2, pp. 281-293.

RAHN, K. H.; HEIDENREICH, S.; BRUCKNER, D. How to assess glomerular function and damage in human. **J. Hypertens.**, v. 17, p. 309-17, 1999.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y-H.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: A Review. **J. Nat. Prod.**, v. 53, p. 237-278, 1990.

QUINN, J. K.; ISAACS, A. K.; DeCHRISTOPHER, B. A.; SZKLARZ, S. C.; ARVARY, R. A. Asymmetric Total Synthesis of Rollicosin. **Org. Lett**, v. 7, p. 1243–1245, 2005.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

ROGUET, R.; COTOVIO, J.; GAETANI, Q.; DOSSOU, K. G.; ROUGIER, A. Cytotoxicity of 28 MEIC chemicals to rat hepatocytes using two viability endpoints: correlation with acute toxicity data in rat and man. **ATLA**, v. 21, p. 216-224, 1993.

ROWINSKY, E. K.; CAZENAVE, L. A.; DONEHOVER, R. C. Taxol – a novel investigational antimicrotubule agent. **Journal of the Nacional Cancer Institute**, v. 82, p. 1247, 1990.

ROYO I.; DePEDRO, N.; ESTORNELL, E.; CORTES, D.; PELÁEZ, F.; TORMO, J. R. In vitro antitumor SAR of threo/cis/threo/cis/erythro bis-THF acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial Complex I. **Oncology Research**, v. 13, n. 12, p. 521- 528, 2003.

SAEZ, J.; SAHPAZ, S.; VILLAESCUSA, L.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; CORTES, D. – Rioclarin and membranacin, two novel bistetrahydrofuran acetogens from the seeds of *Rollinia membranacea*. **J Nat Prod**, v. 56, n. 3, p. 351-356, 1993.

SANT'ANA, P.; ASSAD, A. L. D. Programa de Pesquisa em Produtos Naturais: A Experiência da CEME. **Química Nova**, v.27, p.508-512, 2004.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SILVA, E. C.; CAVALCANTI, B. C.; AMORIM, R. C.; LUCENA, J. F.; QUADROS, D. S.; TADEI, W. P.; MONTENEGRO, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; NUNOMURA, R. C.; NUNOMURA, S. M.; MELO, M. R.; ANDRADE-NETO, V. F.; SILVA, L. F.; VIEIRA, P. P.; POHLIT, A. M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 48-56, 2009b.

SIQUEIRA, J.M., *et al.* Estudo fitoquímico de *unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química nova**, v.21,p.557-559, 1998

SCHULTZ, A. R. H. Introdução à botânica sistemática. Porto Alegre: 4ª Ed. Editora UFRGS, 1984.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 239-243, 2001.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. D. Studies on succinate-tetrazolio reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolio salts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.

SETTE, I. M. F.; da CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; da SILVA, M. S.. Tetrahydroprotoberberine and aporphine alkaloids from *Rollinia leptopetala*. **Pharmaceutical Biol**, v. 38, n. 4, p. 318-320, 2000a.

SETTE, I. M. F.; da CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; da SILVA, M. S. The first tetrahydroprotoberberine alkaloid from the genus *rollinia* **Biochem Syst Ecol**, v. 28, n. 4, p. 393-394, 2000b.

SHI, G.; ZENG, L.; GU, Z. M.; MAC DOUGAL, J. M.; MC LAUGHLIN, J. L.; Absolute Stereochemistries Of Sylvaticin And 12, 15-Cis- Sylvaticin, Bioactive C-20, 23-Cis Non-Adjacent Bistetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins, From *Rollinia mucosa*. **Heterocycles**, v. 41, n. 8, p. 1785-1796, 1995.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. D. Studies on succinate-tetrazolio reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolio salts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.

POLO-ZAFRA, M. C.; FIGADERE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J. R.; CORTES, D. Natural acetogenins from annonaceae, syntesis and mecanisms de action. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 908-1117, 1998.

TREVISI, L.; PIGHIN, I.; BAZZAN, S.; LUCIANI, S. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2769-2773, 2006.

UZUNOGLU, S.; USLU, R.; TOBU, M.; SAYDAM, G.; TERZIOGLU, E.; BUYUKKECECI, F.; Omay, S. B. Argumentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors. **Leukemia Research**, v. 23, p. 507-512, 1999.

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

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

VIRGÍLIO, L.J.; MARQUES, L.C. Avaliação dos efeitos da resolução RDC 17 sobre fitoterápicos de registros antigos. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.14, p03-06, 2004

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 free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sci.**, v. 61, p. 383-394, 1997.

ZHOU, D. C.; ZITTOUN, R.; MARIE, J. P. Homoharringtonine: An effective new natural product in cancer chemotherapy. **Bulletin du Cancer**, v. 82, p. 987-995, 1995.

ZHOU, S. L.; GORDON, R, E.; BRADBURY, M.; STUMP, D.; KIANG, C. L.; BERK, P. D. Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells. **Hepatology**, v. 27, p. 1064-1074, 1998.