

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE
DO TRACHYLOBANO-360 DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil.
& Tul. (ANNONACEAE)**

JOÃO PESSOA

2010

JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE
DO TRACHYLOBANO-360 DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil.
& Tul. (ANNONACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco

JOÃO PESSOA

2010

P681a Pita, João Carlos Lima Rodrigues.

Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do Trachylobano-360 de *Xylopi*a *langsdo*rffiana St. Hil. & Tul. (Annonaceae) / João Carlos Lima Rodrigues Pita. - - João Pessoa: [s.n.], 2010.
103f. : il.

Orientador: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

Co-orientadora: Marianna Vieira Sobral Castello Branco.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1.Farmacologia. 2.*Xylopi*a *langsdo*rffiana. 3.Trachylobano-360. 4. Câncer. 5. Sarcoma 180.

UFPB/BC

CDU: 615(043)

JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE
DO TRACHYLOBANO-360 DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil.
& Tul. (ANNONACEAE)**

APROVADA EM / /2010

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Orientadora – UFPB**

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
Co-orientadora – UFPB**

**Profa. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
Examinador interno – UFPB**

**Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Examinador externo – UFPE**

*Aos meus pais, José Rodrigues Pita
Sobrinho e Maria de Fátima Lopes Lima
Rodrigues, pela presença constante, ensinamentos
e apoio em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar meus passos todos os dias.

Aos meus irmãos **Rodrigo Pita** e **Ana Luzia Pita**, pelo apoio e torcida nessa longa caminhada.

A minha melhor amiga e noiva **Patrícia Saraiva Gadelha**, pelo amor, apoio, companherismo e paciência em todos os momentos, contribuindo de forma direta e indireta para a conclusão de mais esta etapa tão importante.

A minha querida “voinha” **Luzia Lopes Lima** (*in memoriam*), por todas as palavras de incentivo e apoio, e pela grande torcida, sempre demonstrada, pelo meu sucesso.

A Profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, pelo incentivo há 5 anos, desde a iniciação científica, e contribuição na minha formação pessoal e profissional, sendo um exemplo de coragem, determinação, amor ao próximo e inteligência que levarei sempre comigo.

A Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral Castello Branco**, pela paciência e incentivo desde a iniciação científica, pelos seus ensinamentos, prestatividade e sua constante alegria, que servirão de referência na minha vida pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Sobral da Silva**, pela colaboração em nosso grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Josean Fechine Tavares**, por colaborar com as substâncias estudadas.

A Profa. Dra. **Teresinha Gonçalves da Silva**, por abrir as portas do seu laboratório para nossos treinamentos.

A Universidade Federal de Uberlândia, em particular as Professoras Doutoras **Sandra Morelli** e **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila** por permitir o uso de seus laboratórios para os ensaios *in vitro*, bem como pela doação da linhagem celular Sarcoma 180.

A Profa. Dra. **Márcia Regina Piuvezam**, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência na condução deste programa e por permitir o uso do Laboratório de Imunologia para realizarmos experimentos.

A Profa. Dra. **Hilzeth de Luna Freire Pessoa**, pelos ensinamentos em metodologias de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade.

Ao Prof. Dr. **Robson Cavalcante Veras**, pela amizade, incentivos e ensinamentos que ficarão sempre guardados na minha mente e coração.

A Profa. Dra. **Maria Salete Trigueiro de Araújo**, pela disposição, paciência e boa vontade para sempre nos atender e tirar nossas dúvidas.

Ao aluno de Pós-Graduação **Robson José de Oliveira Júnior** (UFU), pela paciência, colaboração e ensinamentos com os experimentos em linhagens de cultura celular. Sua colaboração foi e continua sendo de grande importância para minha formação.

Ao aluno de Pós-Graduação **Hermann Ferreira Costa** (UFPB), pela paciência, colaboração e ensinamentos com os experimentos na área de imunologia.

A aluna de Pós-Graduação **Jaciana dos Santos Aguiar** (UFPE), pela disponibilidade e paciência nos treinamentos com a atividade antitumoral *in vivo*.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

A todos os amigos de turma do mestrado, **Antônia, Bruna, Camila, Carlos, Maria do Carmo, Carol, Charlane, Dayseanne, Fillipe, Fábio, Garaldo, John, João Euclides, Karine, Marcelo, Renata, Thaísa, Thiago, Vinícius, Vitor, Vivyanne, Wemerson**, pelo companheirismo e incentivo.

Em especial ao meu amigo/irmão **Rubens Batista Benedito**, pelo seu companheirismo e incentivo nos momentos mais turbulentos da graduação/pós-graduação.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) **Waleska Viana, Débora Pessoa, Tatyanna Kelvia, Viviane Medeiros, Tatianne Motta e Madson Moreira**, e as pós-graduanda **Carol e Igara**, pelo incentivo e torcida durante essa caminhada.

Em especial à **Aline Lira Xavier**, pela amizade, incentivo e companheirismo em todos os momentos no LABETOX.

Ao amigo **Sócrates Golzio** sempre presente quando precisei.

Ao amigo **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

À amiga **Clébia Batista** pelo apoio na reta final.

A todos os **funcionários** do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e a secretária da Pós-graduação **Tânia Maria Araújo**, pelos serviços prestados.

Ao funcionário **Wellington de Lima Navarro** pelo apoio técnico e disponibilidade constante.

A **Luis Cordeiro e Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo fornecimento dos animais.

À **Capes** pela bolsa concedida durante o período de mestrado.

MUITO OBRIGADO!

João Carlos Lima Rodrigues Pita

PITA, J. C. L. R. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE DO TRACHYLOBANO-360 DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE).** 2010. 103f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS / LTF, João Pessoa.

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. *Xylopia langsdorffiana* é uma árvore conhecida popularmente como “pimenteira-da-terra”. Seu estudo fitoquímico caracterizou especialmente diterpenos, com atividades biológicas importantes. Diterpenos do tipo trachylobano são raros no reino vegetal, e, por isso, ainda apresentam poucos estudos de atividades biológicas. Em estudos anteriores, o ácido *ent-7 α* -acetoxitrachylobano-18-óico (trachylobano-360), obtido de *X. langsdorffiana*, mostrou atividade antitumoral *in vitro*, o que despertou o interesse para investigação de sua possível atividade *in vivo*. Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, uma triagem farmacológica, de 21 produtos naturais, foi realizada frente células da linhagem sarcoma 180, onde os mais citotóxicos foram o trachylobano-360, o ácido *ent-7 α* -hidroxitrachylobano-18-óico (trachylobano-318) e o óleo essencial das folhas de *X. langsdorffiana* (O.E.X.). Os valores de CI_{50} obtidos através dos ensaios de exclusão do azul de tripan e de redução do MTT foram, respectivamente, 54,28 e 53,28 $\mu\text{g/mL}$ para o trachylobano-360, 100,8 e 104,0 $\mu\text{g/mL}$ para o trachylobano-318, e 206,4 e 209,3 $\mu\text{g/mL}$ para o O.E.X. O trachylobano-318 foi isolado em pequena quantidade, impossibilitando a realização dos ensaios de citotoxicidade (*A. salina* e hemólise) posteriores. Os valores de CL_{50} obtidos no bioensaio com *A. salina* para o trachylobano-360 e O.E.X. foram, respectivamente, 245,3 e 10,05 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CH_{50} obtidos no experimento de citotoxicidade em eritrócitos (hemólise), para o trachylobano-360 e O.E.X. foram, respectivamente, 98,50 e 742,4 $\mu\text{g/mL}$. Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente sarcoma 180, foi utilizado o trachylobano-360, pois foi o mais ativo nos ensaios preliminares. As taxas de inibição do crescimento tumoral foram 45,60 e 71,99 % para o tratamento com o trachylobano-360, 12,5 e 25 mg/kg respectivamente, não havendo diferença significativa entre a inibição causada pela maior dose deste diterpeno, quando comparado ao tratamento com 5-FU (controle positivo). As análises toxicológicas dos animais mostraram que o uso do trachylobano-360 não alterou índice de baço e timo, nem parâmetros hematológicos em comparação com o controle transplantado-S180, alterações estas que ocorrem com quimioterápicos utilizados na prática clínica. Ainda, o trachylobano-360 não modificou índice de fígado e rins, nem causou alterações extensas microscópicas no coração, fígado e rins dos animais, corroborando com os parâmetros bioquímicos, que permaneceram inalterados. Observou-se, ainda, extensa área de necrose nos tumores dos diferentes grupos, acompanhada de uma redução no número de mitoses, sendo estes efeitos mais pronunciados após o tratamento com 25 mg/kg do trachylobano-360. Portanto, é possível inferir que o trachylobano-360 possui significativa atividade antitumoral e baixa toxicidade, balanço este essencial para sua aplicabilidade como droga farmacológica.

Palavras-chave: *Xylopia langsdorffiana*. Trachylobano-360. Câncer. Sarcoma 180.

PITA, J. C. L. R. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE DO TRACHYLOBANO-360 DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE).** 2010. 103f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS / LTF, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is a disease of the genome of our cells and experimental oncology is valuable to study the various aspects related to neoplastic processes. Many drugs currently used in chemotherapy have been isolated from species of plants or derived from natural prototype. Nevertheless, medicinal plants have aggressive substances, and for this reason, their toxicity should be assessed. *Xylopia langsdorffiana* is a tree popularly known as “pimenteira-da-terra”. Their phytochemical study characterized mainly diterpenes, with important biological activities. Diterpenes of the trachylobane type are rare in the plant kingdom, and, therefore, still have few studies of biological activities. In previous studies, the *ent*-7 α -acetoxyltrachylobane-18- α -ic acid (trachylobane-360), obtained from *Xylopia langsdorffiana*, showed activity *in vitro*, which aroused the interest to investigate their possible antitumor activity *in vivo*. Thus, this study aimed to evaluate the antitumor activity and toxicity of trachylobane-360 through *in vitro* and *in vivo* assays. Initially, a pharmacological screening of twenty-one natural products, was performed against sarcoma 180 cell line, where the most cytotoxic were trachylobane-360, the *ent*-7 α -hidroxyltrachylobane-18- α -ic acid (trachylobane-318) and the essential oil from leaves of *X. langsdorffiana* (O.E.X). IC₅₀ values obtained from the tests of trypan blue exclusion and MTT reduction were, respectively, 54,28 and 53,28 μ g/mL for trachylobane-360, 100,8 and 104,0 μ g/mL for trachylobane-318 and 206,4 and 209,3 μ g/mL for O.E.X. The trachylobane-318 was isolated in small quantities, being execution impossible of later cytotoxicity assays (*Artemia salina* and hemolysis). LC₅₀ values obtained in bioassays with *A. salina* for trachylobane-360 and O.E.X. were, respectively, 245.3 and 10.05 μ g/mL. CH₅₀ values obtained in the experiment of cytotoxicity in erythrocytes (hemolysis), for trachylobane-360 and OEX were, respectively, 98.50 and 742.4 μ g/mL. To evaluate the *in vivo* antitumor activity against sarcoma 180 was used trachylobane-360, because it was the most active in preliminary tests. The rates of inhibition of tumor growth were 45.60 and 71.99 % for treatment with trachylobane-360, 12.5 and 25 mg/kg, respectively, with no significant difference between the inhibition caused by the higher dose of this when compared to treatment with 5-FU (positive control). The toxicological analysis of the animals showed that the use of trachyloban-360 did not change spleen and thymus index, or the hematological parameters compared with mice-bearing, these changes occur with chemotherapeutic drugs used in clinical practice. Moreover, the trachylobane-360 did not modify liver index, nor it cause extensive microscopic changes in the heart, liver and kidneys of animals, corroborating with the biochemical parameters, wich remain unchanged. Necrosis area extensive, on tumors of different groups was observed, accompanied by a reduction in the number of mitoses, being these effects more pronounced after treatment with 25 mg/kg of trachyloban-360. Therefore, it is possible to infer that the trachyloban-360 has significant antitumor activity and low toxicity, this essential balance to its applicability as a pharmacological drug.

Key-words: *Xylopia langsdorffiana*. Trachylobane-360. Cancer. Sarcoma 180.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos de <i>Xylopia langsdorffiana</i> em seu habitat. (A) árvore completa, (B) detalhe dos frutos e (C) detalhe das folhas.....	29
Figura 2 – Alguns diterpenos de <i>Xylopia langsdorffiana</i> . (A) labdano-302; (B) xylodiol; (C) trachylobano-360; (D) trachylobano-318.	30
Figura 3 – Estrutura química do componente majoritário do O.E.X.: germacreno D.	31
Figura 4 – Camundongos albinos Swiss obtidos do Biotério Prof. Thomas George (ANVISA/LTF/UFPB).	38
Figura 5 – Células tumorais da linhagem Sarcoma 180 (Aumento 400x).....	39
Figura 6 – Cistos de <i>Artemia salina</i> L.....	39
Figura 7 – Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan.	41
Figura 8 – 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..	43
Figura 9 – Aspecto geral do experimento com <i>Artemia salina</i> . (A) Recipiente retangular com divisória contendo furos; (B) Parte conberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz..	44
Figura 10 – Aspecto geral do experimento com eritrócitos de camundongos. (A) Suspensão de eritrócitos a 1 %; (B) Agitação por 60 minutos.....	45
Figura 11 – Camundongo Swiss com sarcoma 180 ascítico com 8 dias de implantação.....	47
Figura 12 – (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System); (B) Analisador hematológico celular automático <i>Animal Blood Counter</i> (Vet).....	48
Figura 13 – Tumores dos camundongos transplantados com sarcoma 180 dos grupos (n = 6): (A) controle experimental, (B) trachylobano-360 (12,5 mg/kg), (C)	

trachylobano-360 (25 mg/kg), (D) 5-FU (25 mg/kg). Os grupos estão dispostos em suas respectivas colunas. 60

Figura 14 – Histopatologia do coração dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado-S180 (100x); (B) 5-FU (25 mg/kg) (400x); (C) trachylobano-360 (12,5 mg/kg) (100x) e (D) trachylobano-360 (25 mg/kg) (100x). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. 67

Figura 15 – Histopatologia do fígado dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado-S180; (B) 5-FU (25 mg/kg); (C) trachylobano-360 (12,5 mg/kg) e (D) trachylobano-360 (25 mg/kg). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (A, C e D) ou vermelho picrossírius (B) (400x). 69

Figura 16 – Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado-S180; (B) 5-FU (25 mg/kg); (C) trachylobano-360 (12,5 mg/kg) e (D) trachylobano-360 (25 mg/kg). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (400x). 70

Figura 17 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais: (A) Mitoses assimétricas; (B) Invasão do tecido adiposo; (C) Invasão do tecido muscular esquelético. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (400x para A; 100x para B e C). 71

Figura 18 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais mostrando os graus de necrose coagulativa: (A) Controle transplantado-S180; (B) 5-FU (25 mg/kg); (C) trachylobano-360 (12,5 mg/kg) e (D) trachylobano-360 (25 mg/kg). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (400x). 71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Viabilidade celular após tratamento com 21 produtos naturais, através do ensaio de redução do MTT.....	51
Gráfico 2 – Viabilidade celular após tratamento com o trachylobano-360. Concentração-resposta através do ensaio de (A) exclusão do azul de tripan e de (B) redução do MTT..	53
Gráfico 3 – Viabilidade celular após tratamento com o trachylobano-318. Concentração-resposta através do ensaio de (A) exclusão do azul de tripan e de (B) redução do MTT.	53
Gráfico 4 – Viabilidade celular após tratamento com O.E.X. Concentração-resposta através do ensaio de (A) exclusão do azul de tripan e de (B) redução do MTT.	54
Gráfico 5 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após tratamento com trachylobano-360 ($\mu\text{g/mL}$).....	55
Gráfico 6 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após tratamento com O.E.X. ($\mu\text{g/mL}$).....	56
Gráfico 7 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com trachylobano-360 ($\mu\text{g/mL}$).....	57
Gráfico 8 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com O.E.X ($\mu\text{g/mL}$).....	57
Gráfico 9 – Efeito do trachylobano-360 e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor após os diferentes tratamentos..	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista dos produtos naturais submetidos à triagem farmacológica preliminar.....	37
Tabela 2 – Viabilidade celular após tratamento com os produtos naturais mais citotóxicos frente sarcoma 180.....	52
Tabela 3 – Valores de Cl_{50} do trachylobano-360, trachylobano-318 e do O.E.X. obtidos através dos ensaios de exclusão do azul de tripan e de redução do MTT em sarcoma 180.....	54
Tabela 4 – Valores de CL_{50} obtidos através do bioensaio com <i>A. salina</i> para o trachylobano-360 e O.E.X.	56
Tabela 5 – Valores de CH_{50} obtidos através da citotoxicidade em eritrócitos para o trachylobano-360 e O.E.X.	57
Tabela 6 – Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) submetidos aos diferentes tratamentos.....	61
Tabela 7 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com sarcoma 180.....	62
Tabela 8 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.....	63
Tabela 9 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal (LTF)

CHCM – Concentração hemoglobínica corpuscular

CH₅₀ – Concentração que produz 50 % de hemólise

CI₅₀ – Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular

CL₅₀ – Concentração que produz 50 % de letalidade

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA – “Food and Drug Administration”

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

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

O.E.X. – Óleo essencial das folhas de *Xylopia langsdorffiana*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução tampão fosfato

SDS – Dodecil sulfato de sódio

VCM – Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 Toxicologia de produtos naturais.....	22
2.2 Câncer e produtos naturais	24
2.3 <i>Xylopia langsdorffiana</i> : família, gênero e espécie	27
2.4 Diterpenos biologicamente ativos.....	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Local da pesquisa.....	36
4.2 Material.....	36
4.2.1 Produtos naturais submetidos à triagem farmacológica preliminar	36
4.2.2 Animais.....	37
4.2.3 Células tumorais da linhagem sarcoma 180.....	38
4.2.4 Cistos de <i>Artemia salina</i> Leach	39
4.3 Métodos.....	40
4.3.1 <i>In vitro</i>	40
4.3.1.1 Triagem farmacológica através da citotoxicidade frente células da linhagem sarcoma 180.....	40
4.3.1.2 Determinação da concentração que inibe 50 % da proliferação celular (CI ₅₀)	42
4.3.1.3 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	43
4.3.1.4 Citotoxicidade em eritrócitos	44
4.3.2 <i>In vivo</i>	46
4.3.2.1 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células tumorais da linhagem sarcoma 180.....	46
4.3.2.2 Análises toxicológicas	47
4.3.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração.....	47
4.3.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	47
4.3.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos	48

4.3.2.2.4 Análises histopatológicas	49
4.4 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS	51
5.1. <i>In vitro</i>	51
5.1.1 Triagem farmacológica através da citotoxicidade frente células da linhagem sarcoma 180.....	51
5.1.2 Determinação da concentração que inibe 50 % da proliferação celular (CI ₅₀) .	52
5.1.3 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	55
5.1.3 Citotoxicidade em eritrócitos	56
5.2 <i>In vivo</i>	58
5.2.1 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células tumorais da linhagem sarcoma 180.....	58
5.2.2 Análises toxicológicas	60
5.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração.....	60
5.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	61
5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos	65
5.2.2.4 Análises histopatológicas	66
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	87

Introdução



1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido tradicionalmente utilizados por populações em todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas, sendo reconhecidas mais de 13.000 espécies de plantas que são mundialmente utilizadas com finalidade terapêutica ou como fonte de fármacos (SIMÕES et al., 2004)

Historicamente, o desenvolvimento da Química Farmacêutica no início do século XIX estabeleceu o uso de plantas como fonte de escolha para a obtenção de princípios ativos e para o desenvolvimento de medicamentos (WAGNER, 2007). A síntese de medicamentos teve início no final do século XIX, grandemente impulsionada a partir da década de trinta com o desenvolvimento de drogas muito eficazes que acabaram por substituir o uso de produtos naturais em diversos ramos da medicina. Entretanto, na década de 70, diversas empresas farmacêuticas passaram a desenvolver pesquisas na área de fitoterapia. Com isso, já na década de 90, metade das 250 grandes empresas do ramo farmacêutico mundial introduziu programas de pesquisa na área de produtos naturais (CARVALHO, 2001).

Assim, os recursos naturais continuam sendo importantes fontes de substâncias e precursores com grande potencial terapêutico, não apenas pelo grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizados.

Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. A terapia moderna utiliza aproximadamente 120 compostos de origem natural que são obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas (POTTERAT; HOSTETTMANN et al., 2003).

O Brasil tem quase um terço da flora mundial com uma biodiversidade exuberante, estimada em cerca de 20 % do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A razão dessa afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de

produtos naturais (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). Em contrapartida, apenas cerca de 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos, e aproximadamente 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais e tóxicas (POTTERAT; HOSTETTMANN, 1995).

O uso da fitoterapia na prática médica continua crescendo visivelmente ao longo dos anos para tratar várias enfermidades, inclusive o câncer. Frente a este crescimento, é perceptível em nosso país que não somente a população, mas também profissionais de saúde carecem de informações seguras sobre os recursos fitoterápicos. Baseadas apenas na chamada sabedoria popular, inúmeras pessoas utilizam as plantas para o tratamento de doenças desconhecendo seus riscos e benefícios, o que torna os estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos indispensáveis para a proteção à saúde da população, bem como para comprovar cientificamente a eficácia terapêutica desses produtos. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, entretanto, representa 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 (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O crescente interesse por medicamentos oriundos de plantas medicinais, a possibilidade de implementação da fitoterapia no sistema público de saúde nacional e, principalmente, as Resoluções da Diretoria Colegiada RDC nº 17 de 24/02/2000 e RDC nº 48 de 16/03/2004, dispondo sobre o registro de fitoterápicos no Brasil, fizeram crescer o número de publicações referentes a etnofarmacologia, registrando-se as espécies mais popularmente conhecidas e utilizadas, tanto entre populações indígenas quanto em urbanas, assim como a utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias e no Sistema Único de Saúde (SUS). No Brasil, as espécies nativas mais citadas como de uso popular estão representadas nas famílias Bignoniaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Annonaceae, Apocynaceae, Lamiaceae e Euphorbiaceae (BRANDÃO et al., 2006).

Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos

modernos, tais como procaína, cloroquina, tropicamida, ou de fármacos imprescindíveis como, vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, taxol (Paclitaxel) e mais recentemente camptotecina e derivados, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (PINTO et al., 2002).

Considerando todos esses aspectos, a busca de novos agentes farmacologicamente ativos através da triagem de fontes naturais, levou à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente e que desempenham um importante papel no tratamento de várias doenças. Especificamente na terapia de enfermidades infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60 %, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados são derivados de fontes naturais (CRAGG et al., 2005).

Portanto, considerando a diversidade vegetal do Brasil e a pequena porcentagem de espécies de plantas investigada tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico e toxicológico, o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas (HAMBURGER; MARSTON; HOSTETTMANN, 1991; POTTERAT; HOSTETTMANN, 1995).

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Toxicologia de produtos naturais

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).

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas, e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO et al., 2000). Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial (GUIL; RODRIGUEZ-GARCIA; TORIJA, 1997). Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

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 alantoina, 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).

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente *A. salina* e atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MacRAE; HUDSON; TOWERS, 1988) parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), tripanossomicida (ZANI et al., 1995), entre outras. Há, também, correlação com a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas (MacLAUGHLIN, 1991).

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 prever o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HAUN, 2001).

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. A membrana eritrocítica é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas (AKI;

YAMAMOTO, 1991). O teste de hemólise *in vitro* é usado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos (SCHREIER et al., 1997; APARICIO, 2005).

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 Câncer e produtos naturais

O câncer é uma doença do material genético (o genoma) de nossas células, e decorre do acúmulo progressivo de mutações, ou seja, alterações no código genético. As mutações fazem com que células que antes executavam um programa bem definido, denominado ciclo celular, associado às suas funções em seu tecido de origem, cresçam de maneira descontrolada. Esse crescimento alterado é consequência não só da duplicação celular desordenada, mas também da progressiva resistência à morte celular. Além disso, as células cancerosas ultrapassam os limites dos tecidos de origem, adquirem a capacidade de modificar o ambiente que as cerca, desrespeitam fronteiras e migram pelos diversos tecidos do corpo, podendo estabelecer tumores secundários – as metástases – ao se fixarem em locais distantes do ponto de origem. A capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de formar as metástases é responsável, em última análise, pela morte de dois a cada três pacientes com o diagnóstico de câncer (OTAKE; CHAMMAS; ZATZ, 2006).

As doenças tumorais neoplásicas vêm sendo indicadas como a terceira causa *mortis* mais frequente no Brasil. Assim, as doenças cardiovasculares, o câncer e as

causas externas são, conjuntamente, responsáveis por 73 % dos óbitos (MACHADO; MELO-JUNIOR, 2009).

Os produtos naturais são amplamente utilizados no tratamento do câncer (HARTWELL, 1982). Dentre eles, encontram-se os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina de *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), cujo isolamento introduziu uma nova era do uso de plantas medicinais como agentes anticâncer. A descoberta do paclitaxel da casca de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) é outra evidência do sucesso na descoberta de drogas de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2005), sendo ativo contra câncer de ovário, câncer avançado de mama e câncer de pulmão (ROWINSKY et al., 1992). Em 1966, Wall, Wani e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (WALL et al., 1966; OBERLIES; KROLL, 2004). Quase 20 anos depois, o único mecanismo de ação identificado para este potente agente citotóxico foi a inibição da topoisomerase I no DNA. Apesar disso, esta substância não se mostrou adequada para desenvolvimento farmacêutico, principalmente por sua reduzida solubilidade. Estudos mais recentes envolvendo a triagem clínica de seu sal sódico não foram bem sucedidos, pois evidenciou-se que a abertura do anel lactônico para preparação do sal sódico inativa a substância. Esta descoberta abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos da camptotecina, como o topotecano e o irinotecano, ambos solúveis em água, na forma de sais, preparados preservando a subunidade iridídica farmacofórica, representada pelo anel lactônico hidroxilado, devido à introdução de grupos básicos em suas estruturas (MONTANARI; BOLZANI, 2001; OBERLIES; KROLL, 2004). Estas duas substâncias foram aprovadas pelo “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA, em 1996, e atualmente são comercializadas pela GlaxoSmithKline e Pfizer, respectivamente, para tratamento de câncer de cólon e de ovário.

Epipodofilotoxina é um isômero da podofilotoxina, a qual foi isolada como um agente antitumoral ativo das raízes das espécies do gênero *Podophyllum*, *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi* (Berberidaceae) (STAHELIN, 1973). Etoposídeo e teniposídeo são dois derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina e são usados no tratamento de linfomas e câncer brônquico e testicular (HARVEY, 1999; CRAGG; NEWMAN, 2005; SHOEB, 2006). Homoharringtonina, isolada de *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae), é um outro agente derivado de produto natural de uso clínico, para leucemia mielóide aguda e crônica

(KANTARJIAN et al., 1996; CRAGG; NEWMAN, 2005; ITOKAWA; WANG; LEE, 2005).

Considerando esses aspectos, é óbvio o espaço e a importância que os produtos naturais ocupam na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos para o tratamento do câncer.

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI; XU, 2006).

O Sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, foi isolado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo Swiss macho (*Mus musculus*). O tumor foi descoberto em 1914 pelo Dr. W. H. Woglom no Laboratório Crocker nos Estados Unidos e é mantido por transplantes sucessivos desde então. Inicialmente, este tumor foi caracterizado como sendo de origem epitelial, pois, em estudos com microscopia óptica e eletrônica, foram observados contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando que se tratava de um carcinoma (ZUCKERBERG, 1973). No entanto, estudos posteriores verificaram que estas células não expressam laminina e desta forma não podem ter origem epitelial, sendo realmente classificado como sarcoma, pois provavelmente se originou de um tecido conjuntivo (ASSEF et al., 2002; OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

Atualmente a linhagem de células tumorais sarcoma 180 (TIB-66) pode ser obtida pela “American Type Culture Collection” (ATCC). As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor pode ser implantado de duas maneiras - células inoculadas na cavidade intraperitoneal se desenvolvem formando um tumor ascítico (“líquido”), enquanto células neoplásicas inoculadas subcutaneamente formam tumores sólidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). Em geral, ocorre ulceração da pele ao redor do 28º dia após inoculação subcutânea e os animais morrem entre 280 e 300 dias, após esse processo (ZUCKERBERG, 1973; KAWAKUBO et al., 1980). A forma sólida é pouco hemorrágica e se

caracteriza pelo rápido crescimento, atingindo aproximadamente 18x14x10 mm por volta de sete dias após o transplante (O'PESSOA, 1992).

2.3 *Xylopia langsdorffiana*: família, gênero e espécie

A família Annonaceae compreende 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros (HUTCHINSON, 1973; MAAS et al., 2001). Sua distribuição geográfica ocorre quase que exclusivamente em regiões tropicais (HEYWOOD, 1985), sendo que no neotrópico está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies (CHATROU; RAINER; MAAS, 2004). Essa família é caracterizada pela presença de terpenoides (especialmente diterpenos), alcaloides (especialmente derivados isoquinolínicos), além de óleos essenciais cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (LEBOEUF et al., 1982; SILVA et al., 2009a).

O gênero *Xylopia* é constituído por cerca de 150 espécies (BRUMMIT, 1992), sendo algumas conhecidas por seus usos etnomedicinais e atividade farmacológica. *X. aromatica* é um agente diurético e utilizada para tratamento de edema de pele (TAKARASHI et al., 2006), é citotóxica frente a linhagem leucêmica RPMI-8226 (SUFFREDINI et al., 2007), possui atividade contra *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* (OSORIO et al., 2007), larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006) e, assim como *X. emarginata*, inibe o crescimento de *Plasmodium falciparum* (DE MESQUITA et al., 2007). *X. frutescens* apresentou atividade antimicrobiana (MACÊDO; FERREIRA, 2004), inibitória da 5-lipoxigenase (BRAGA et al., 2000) e mostrou-se ativa contra *Plasmodium falciparum* (JENETT-SIEMS et al., 1999). *X. discreta* possui atividade antileishmania e imunomodulatória (LÓPEZ; CUCA; DELGADO, 2009), enquanto que *X. parviflora* é um agente antinociceptivo (NISHIYAMA et al., 2009). *X. aethiopica* apresentou atividade citotóxica, em linhagem de carcinoma de laringe humana (HEp-2), antimicrobiana (ASEKUN; ADENIYI, 2004), antibacteriana e antifúngica (TATSADJIEU et al., 2003), possuindo ainda, atividade antioxidante (KARIOTI et al., 2004), antiparasitária em *Leishmania donovani* (FALL et al., 2003), atividade frente ao *Plasmodium falciparum* (BOYOM et al., 2003) e capacidade de diminuir a pressão intraocular em pacientes voluntários

(IGWE; AFONNE; GHASI, 2003). *X. cayennensis* mostrou atividade hipotensora (NASCIMENTO et al., 2006).

Um grande número de componentes químicos tem sido isolado do gênero *Xylopi*a, dentre eles, diterpenos (ANDRADE et al., 2003), sesquiterpenos (MOREIRA et al., 2007), alcaloides (HARRIGAN et al., 1994) e flavonoides (VEGA et al., 2007). Quatro alcaloides bisbenziltetrahidroisoquinolínicos isolados de *X. columbiana* atuam como inibidores seletivos do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (GRANELL et al., 2004). Um diterpeno kaurano isolado de *X. aethiopica* apresentou significativa atividade hipotensora sistêmica e efeito vasodilatador coronário, acompanhado com bradicardia em ratos Wistar (SOMOVA et al., 2001) e o ácido xilópico isolado dos seus frutos mostrou ser antimicrobiano (BOAKYE-YIADOM; FIAGBE; AYIM, 1977). Acetogeninas isoladas de *X. aromatica* apresentaram citotoxicidade frente linhagens tumorais humanas de carcinoma de pulmão (A-549), adenocarcinoma mamário (MCF-7) e adenocarcinoma de cólon (HT-29) (COLMAN-SAIZARBITORIA; GU; McLAUGHLIN, 1994). Alcaloides totais das raízes de *X. quintasii* possuem propriedade antiespasmódica (QUEVAUVILLER; FOUSSARD-BLANPIN, 1976). Trabalhos realizados por grupos de pesquisas no Brasil com o gênero *Xylopi*a reportaram vários tipos de metabólitos secundários, dentre eles, sesquiterpenos aromadendranos com atividade antifúngica de *X. brasiliensis* (MOREIRA et al., 2003), diterpenos diméricos de *X. emarginata* (MOREIRA et al., 2006) e *X. frutescens* (TAKAHASHI et al., 1995), sesquiterpenos diméricos de *X. aromatica* (MARTINS et al., 1998), diterpenos do tipo trachylobano e óleos essenciais com atividade acaricida de *X. sericea* (TAKAHASHI et al., 2001; PONTES et al., 2007).

*Xylopi*a *langsdorffiana* (Figura 1) é uma árvore de 5-7 m de altura, conhecida popularmente como “pimenteira-da-terra” (CORREA, 1984). Do caule desta espécie foram isolados quatro alcaloides, todos derivados do núcleo isoquinolínico (TAVARES, 2004). O estudo fitoquímico adicional permitiu o isolamento dos seguintes diterpenos: o ácido 8(17), 12*E*, 14-labdatrieno-18-óico, com peso molecular de 302, e por isso codificado como labdano-302 (Figura 2A) (ANDRADE et al., 2002; TAVARES et al., 2007a), e o *ent*-atisano-7 α , 16 α -diol, com peso molecular de 306, caracterizado como um novo diterpeno atisano, chamado xylodiol (Figura 2B) (TAVARES et al., 2007a). A partir do extrato hexânico do caule de *X. langsdorffiana* foram isolados dois novos diterpenos: o ácido *ent*-7 α -

acetoxitrachylobano-18-óico, sólido cristalino, com peso molecular de 360 e fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_4$ (trachylobano-360) (Figura 2C); e o ácido *ent*-7 α -hidroxitrachylobano-18-óico, sólido cristalino, com peso molecular de 318 e fórmula $C_{20}H_{30}O_3$ (trachylobano-318) (Figura 2D) (TAVARES et al., 2006).

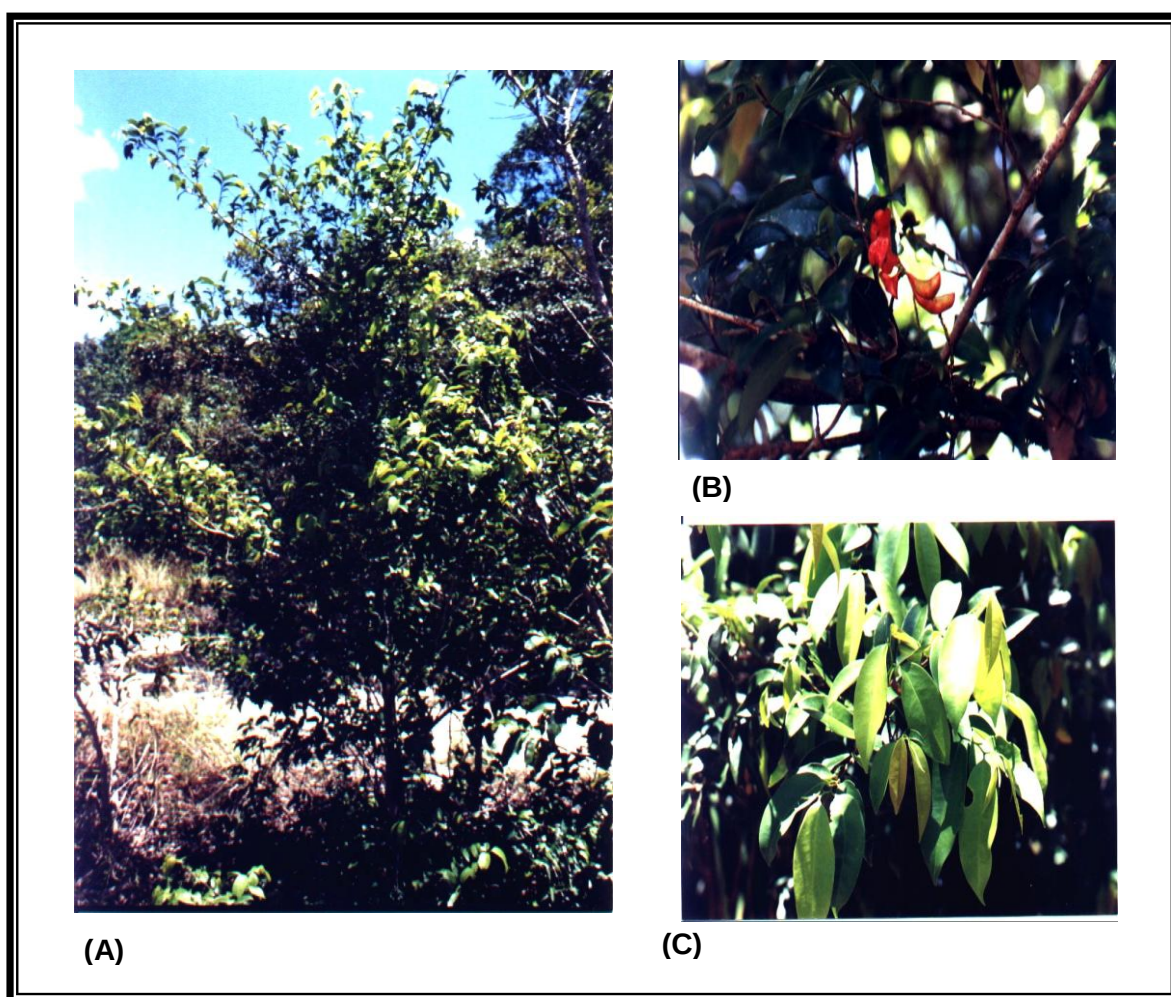


Figura 1 – Fotos de *Xylopia langsdorffiana* em seu habitat. **(A)** árvore completa, **(B)** detalhe dos frutos e **(C)** detalhe das folhas (Foto: Josean Fecine Tavares).

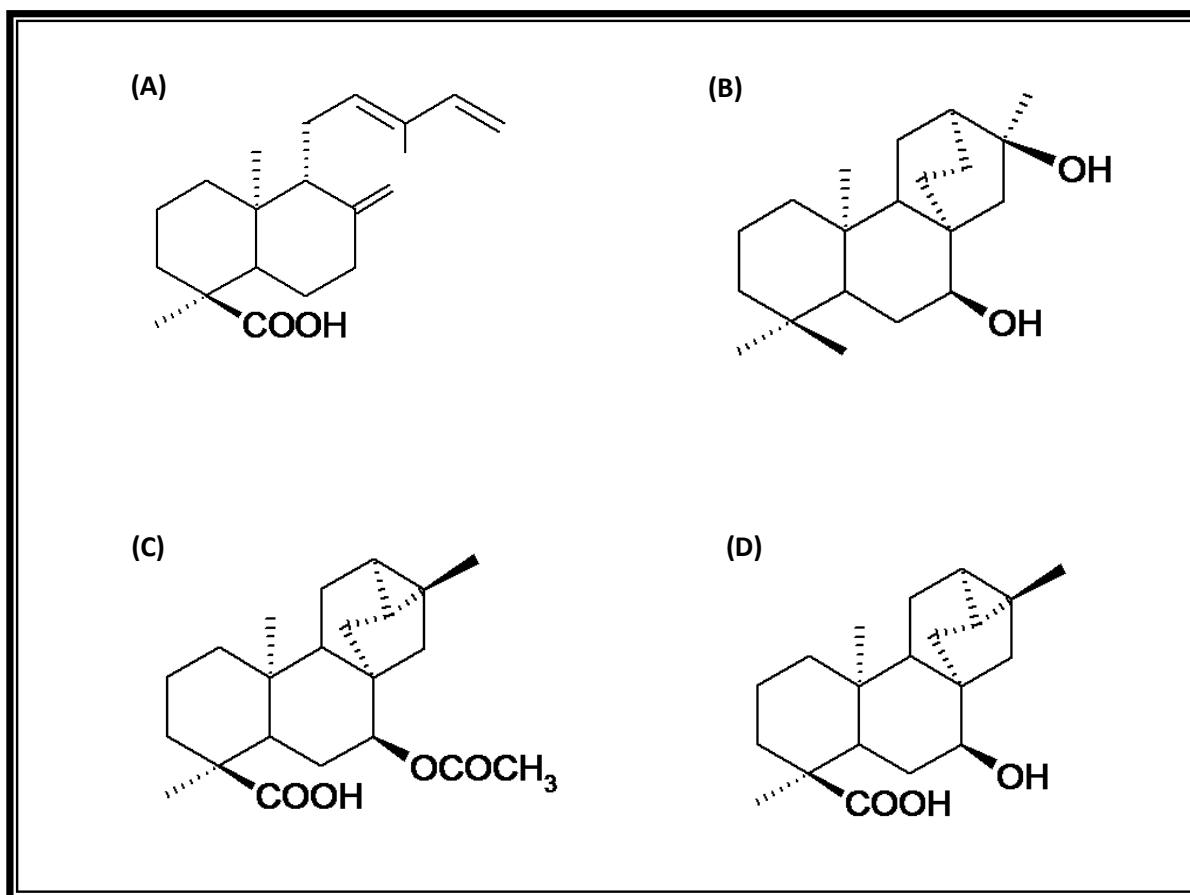


Figura 2 – Alguns diterpenos de *Xylopia langsdorffiana*. (A) labdano-302; (B) xylodiol; (C) trachylobano-360; (D) trachylobano-318.

Adicionalmente, estudos posteriores com esta espécie mostraram o isolamento e caracterização estrutural de quatro alcaloides, coritenchina, xylopinina, discretamina e xylopina; um diterpeno, o ácido *ent*-16 α -hidroxi-atisan-18-óico; um feoforbídeo, o 13² (S)-hidroxi-17³-etoxifeoforbídeo; além do flavonoide glicosilado quercetina-3- α -raminosídeo (SILVA et al., 2009a). O alcaloide discretamina apresentou atividade antioxidante acima de 90 % em todas as concentrações testadas, sendo comparáveis aos padrões ácido ascórbico e quercetina (SILVA et al., 2009a). O óleo essencial de suas folhas, cujos componentes majoritários são germacreno D (22,9 %) (Figura 3) e *trans*- β -guaieno (22,6 %), apresentou significativa atividade moluscicida (TAVARES et al., 2007b). Também, foi relatada atividade hipotensora (OLIVEIRA et al., 2006) e relaxante em traquéia isolada de cobaia do labdano-302 (RIBEIRO et al., 2007).

Considerando todos os aspectos citados, *Xylopi* *langsдорffiana* é caracterizada como uma espécie rica em diferentes constituintes, bioativos nos mais diversos modelos experimentais e, portanto, a espécie e seus constituintes são promissores no estudo e desenvolvimento de drogas com atividades biológicas, dentre elas, antitumoral.

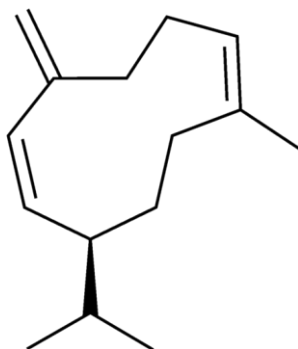


Figura 3 – Estrutura química do componente majoritário do O.E.X.: germacreno D.

2.4 Diterpenos biologicamente ativos

Os terpenoides formam uma família ampla e estruturalmente diversa de produtos naturais derivados de unidades do isopreno (C_5) unidos de modo cabeça-calda. O isopreno tem sido caracterizado como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais e foi sugerido como a unidade fundamental de construção. São classificados como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (DEWICK, 2002).

Diterpenos do tipo trachylobano são substâncias raras no reino vegetal, e, por isso, ainda apresentam poucos estudos de atividades biológicas.

Porém, algumas dessas substâncias isoladas de diversas espécies têm demonstrado atividades biológicas, como: citotóxica em várias linhagens de células tumorais (BLOCK et al., 2004; GRAIKOU et al., 2004; LI et al., 2005), dentre elas, células de câncer de colo uterino (HeLa) (BLOCK et al., 2002), carcinoma epidermóide oral humano (KB), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), carcinoma de pulmão (H460), e astrocitoma humano (SF-268) (LI et al., 2005); vasorrelaxante associada ao bloqueio de canais de cálcio operados por voltagem

tipo L (MARTINSEN et al., 2009); antimicrobiana (LI et al., 2005); e antiosteoclastogênica (PAN et al., 2006). Adicionalmente, foi reportado um diterpeno trachylobano capaz de induzir apoptose em células de leucemia promielocítica humana, HL60 (BLOCK et al., 2005).

Em estudos anteriores, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o diterpeno trachylobano-360 mostrou fraca citotoxicidade frente fibroblastos V79 e hepatócitos (TAVARES et al., 2006), e ainda inibiu o crescimento e induziu diferenciação em células leucêmicas HL60 e K562 (CASTELLO-BRANCO et al., 2009), o que despertou o interesse para investigação de sua possível atividade antitumoral *in vivo*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do ácido *ent-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico* (trachylobano-360) obtido de *Xylopia langsdorffiana*, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma triagem farmacológica preliminar de diferentes produtos naturais, avaliando a atividade antitumoral *in vitro*, frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180;
- Determinar a Concentração Inibitória 50 % (CI₅₀) dos diterpenos trachylobano-360 e trachylobano-318, e do óleo essencial das folhas de *X. langsdorffiana* em sarcoma 180, bem como comparar os resultados obtidos nos diferentes ensaios de citotoxicidade utilizados;
- Avaliar a toxicidade do trachylobano-360 e do óleo essencial das folhas de *X. langsdorffiana* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a citotoxicidade do trachylobano-360 e do óleo essencial das folhas de *X. langsdorffiana* em eritrócitos de camundongos Swiss;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do trachylobano-360 frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do trachylobano-360 através da determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, e da investigação anatomopatológica de órgãos vitais;
- Avaliar o efeito imunomodulador do trachylobano-360 através da determinação dos índices do baço e timo.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Ainda, nos Laboratórios de Citogenética e de Química de Proteínas e Produtos Naturais, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em Minas Gerais.

4.2 Material

4.2.1 Produtos naturais submetidos à triagem farmacológica preliminar

Os produtos naturais submetidos à triagem farmacológica preliminar foram obtidos por técnicas específicas e gentilmente fornecidos pelos colaboradores da fitoquímica, os Professores Doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fechine Tavares (Tabela 1).

Tabela 1 – Lista dos produtos naturais submetidos à triagem farmacológica preliminar.

Código	Espécie	Especificação	Parte da planta
Prod.1	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Trachylobano-360	Caule
Prod.2	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Trachylobano-318	Caule
Prod.3	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Óleo essencial	Folhas
Prod.4	<i>Lipia microphila</i>	Óleo essencial	Folhas
Prod.5	<i>Rollinia leptopetala</i>	Óleo essencial	Folhas
Prod.6	<i>Croton grewoides</i>	Óleo essencial	Folhas
Prod.7	<i>Combretum duarteanum</i>	Óleo essencial	Folhas
Prod.8	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Extrato clorofórmico	Folhas
Prod.9	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Extrato clorofórmico	Caule
Prod.10	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Extrato metanólico	Frutos
Prod.11	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Extrato etanólico	Raiz
Prod.12	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Extrato etanólico (+NH ₄ OH)	Folhas
Prod.13	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	Extrato hexânico	Folhas
Prod.14	<i>Chondrophyucus papillosus</i>	Extrato diclorometano:metanol (3:1)	Inteira
Prod.15	<i>Chondrophyucus furcatus</i>	Extrato diclorometano:metanol (3:1)	Inteira
Prod.16	<i>Chondrophyucus papillosus</i>	Fase diclorometano	Inteira
Prod.17	<i>Combretum duarteanum</i>	Extrato etanólico	Folhas
Prod.18	<i>Combretum duarteanum</i>	Fase hexânica	Cascas
Prod.19	<i>Combretum duarteanum</i>	Fase acetato de etila	Cascas
Prod.20	<i>Combretum duarteanum</i>	Fase clorofórmica	Cascas
Prod.21	<i>Strycnos atlantica</i>	Extrato etanólico	Folhas

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) (Figura 4) pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária próxima de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/LTF/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo pellets de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno,

com bicos, colocadas nas grades metálicas das gaiolas na sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF / UFPB (CEPA), sob a certidão N° 0206/09.



Figura 4 – Camundongos albinos Swiss obtidos do Biotério Prof. Thomas George (ANVISA/LTF/UFPB).

4.2.3 Células tumorais da linhagem sarcoma 180

Para os ensaios *in vitro*, foram utilizadas células tumorais da linhagem sarcoma 180 (Figura 5) cultivadas no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, coordenado pela Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila. As células utilizadas nos ensaios *in vivo* foram gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, e são mantidas no Biotério Prof. Thomas George através de passagens intraperitoneais semanais em camundongos.

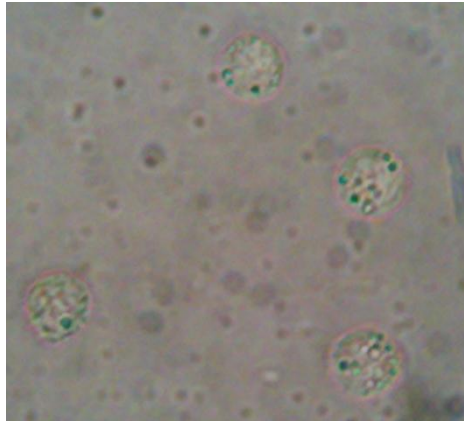


Figura 5 – Células tumorais da linhagem Sarcoma 180 (Aumento 400x). (Foto: João Carlos Pita)

4.2.4 Cistos de *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram da San Francisco Bay Brand®, EUA (Figura 6).



Figura 6 – Cistos de *Artemia salina* L.

4.3 Métodos

4.3.1 *In vitro*

4.3.1.1 Triagem farmacológica através da citotoxicidade frente células da linhagem sarcoma 180

Células da linhagem sarcoma 180, mantidas em cultura, foram utilizadas para o ensaio antitumoral *in vitro*. As células foram transferidas para tubo Falcon (BD/Labware®) (15 mL) com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e posteriormente centrifugadas (1.000 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Nutricell®) suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10 % de soro fetal bovino (Nutricell®). Foi retirada uma alíquota de 10 µL para avaliar a viabilidade celular com 10 µL de Azul de tripan (Sigma-Aldrich®) (0,4 %) em câmara de Neubauer. As células tumorais da linhagem sarcoma 180 foram semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware®) e incubadas com diferentes produtos naturais (Tabela 1) incluindo extratos, fases, óleos essenciais (5.000 µg/mL) e substâncias isoladas (500 µg/mL) por 24 h (37 °C e 5 % CO₂). Os produtos testados foram inicialmente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt CHEMICALS®) e então em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,1 %. O ensaio de citotoxicidade utilizado na triagem farmacológica preliminar foi o ensaio de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] (Sigma-Aldrich®).

✓ 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 (Figura 7). Uma vez solubilizado, a quantidade de formazan pode ser

determinada espectroscopicamente (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). Dessa forma, a redução do sal tetrazólio MTT para um produto azul (formazan), principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em 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).

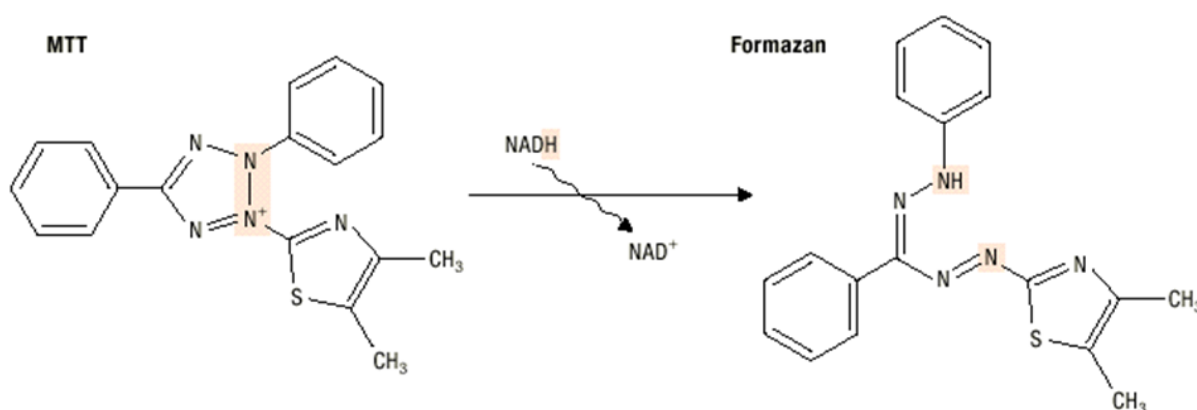


Figura 7 – Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan (MOSMANN, 1983).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Melo et al. (2003). Da placa de 96 poços com as células sob 24 h de tratamento, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada poço para o ensaio de exclusão do azul de tripan, e então adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 h (37 °C e 5 % CO₂), foram adicionados, aos 96 poços, 50 µL de uma solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) (Vetec®) (10 %) em HCl 0,1 N para solubilizar o formazan produzido. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância foi lida em 570 nm para cálculo da CI₅₀ através da determinação da percentagem de células viáveis pela fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade e celular} = \frac{[(DO_{\text{Células tratadas}} - DO_{\text{Branco}})]}{[(DO_{\text{Controle negativo}} - DO_{\text{Branco}})]} \times 100$$

Onde:

DO_{Células tratadas} = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO_{Controle negativo} = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DO_{Branco} = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

4.3.1.2 Determinação da concentração que inibe 50 % da proliferação celular (CI₅₀)

Os três produtos mais citotóxicos na triagem farmacologia preliminar (trachylobano-360, trachylobano-318 e o óleo essencial de *Xylopija langsdoeffiana*-O.E.X.) foram avaliados para o cálculo da CI₅₀ através do ensaio de redução do MTT, como descrito anteriormente, e do ensaio de exclusão do azul de tripan (Sigma-Aldrich®). Para os diterpenos, foi utilizado o intervalo de concentração de 0 a 150 µg/mL, e para o O.E.X. de 0 a 500 µg/mL.

✓ Exclusão do azul de tripan

Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluirmo o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação do número de células viáveis (RENZI et al., 1993) (Figura 8).

Da placa de 96 poços com as células sob 24 h de tratamento, retirou-se uma alíquota de 10 µL, de cada poço, colocando-a em tubos de 1,5 mL. A esses 10 µL foram adicionados 10 µL de azul de tripan (0,4 %) para quantificação do número de células mortas e vivas em câmara de Neubauer e determinação da CI₅₀.

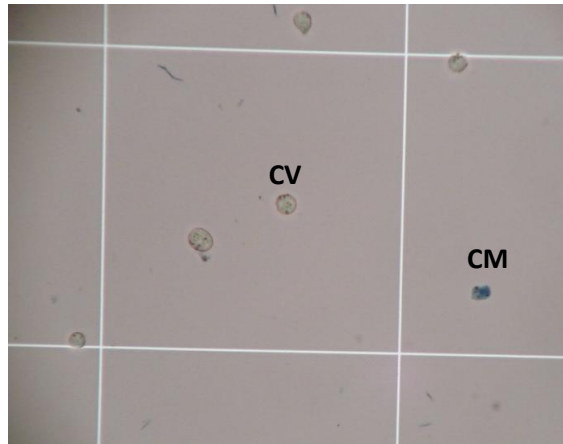


Figura 8 – Câmara de Neubauer utilizada para quantificar o número de células vivas e mortas pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. **CV**: célula viva; **CM**: célula morta. (Foto: João Carlos Pita).

4.3.1.3 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

A toxicidade do trachylobano-360 e do O.E.X., selecionados através da triagem farmacológica *in vitro*, 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* foram armazenados sob resfriamento a 4 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostraca, 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* (Figura 9).

O trachylobano-360 e o O.E.X. foram solubilizados em DMSO (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 (concentração que produz 50 % de letalidade).

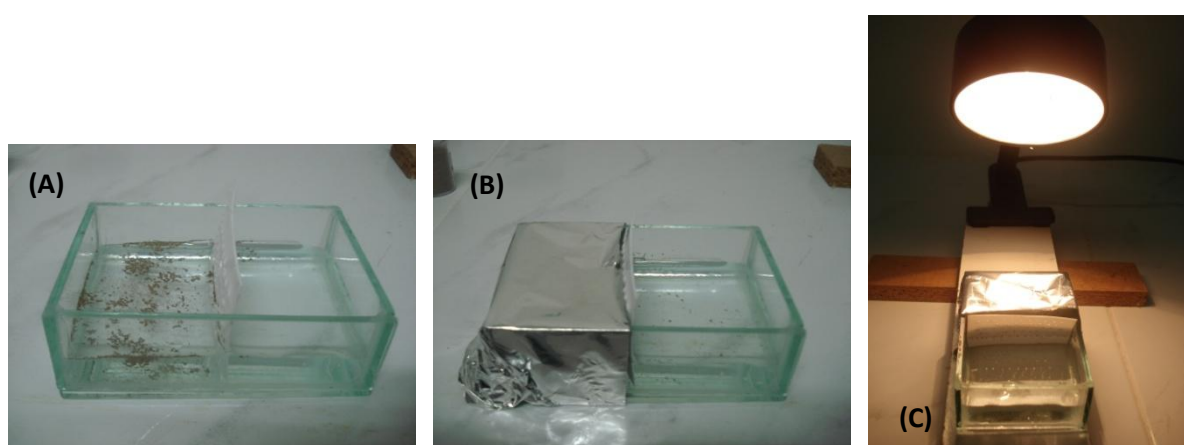


Figura 9 – Aspecto geral do experimento com *Artemia salina*. **(A)** Recipiente retangular com divisória contendo furos; **(B)** Parte conberta do sistema contendo os cistos; **(C)** Exposição à luz. (Fotos: João Carlos Pita).

4.3.1.4 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 trachylobano-360 e O.E.X. foram solubilizados 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 CH_{50} (concentração que produz 50 % de hemólise) através da determinação da percentagem de hemólise pela fórmula:

$$\%Hemólise = \left[\frac{(DO - DO_{CONTROLE NEGATIVO})}{(DO_{CONTROLE POSITIVO} - DO_{CONTROLE NEGATIVO})} \right] \times 100$$

Onde:

DO = Densidade óptica do tubo com o produto teste

$DO_{CONTROLE NEGATIVO}$ = Densidade óptica do controle negativo

$DO_{CONTROLE POSITIVO}$ = Densidade óptica do controle positivo

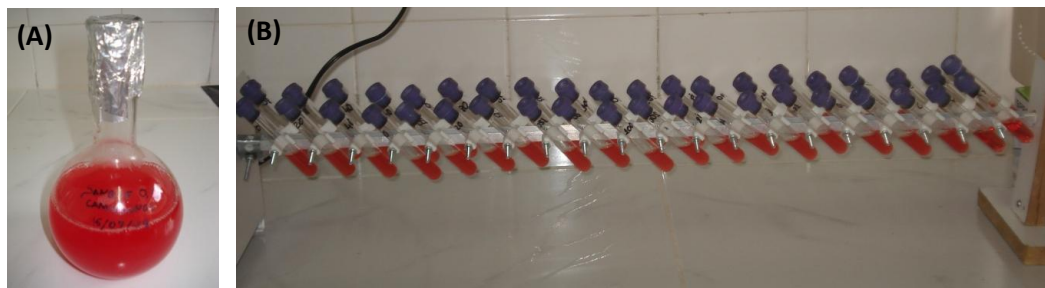


Figura 10 – Aspecto geral do experimento com eritrócitos de camundongos. **(A)** Suspensão de eritrócitos a 1 %; **(B)** Agitação por 60 minutos. (Foto: João Carlos Pita).

4.3.2 *In vivo*

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

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizadas células tumorais malignas (sarcoma 180) de animais portadores do tumor com oito dias de implantação (Figura 11). Os animais doadores foram eutanasiados para aspiração tumoral, e o tumor na forma ascítica foi introduzido nos animais receptores ($n = 6$), pela via subcutânea, na região subaxilar, numa concentração de 25×10^6 células/mL. Vinte e quatro horas após a implantação, o trachylobano-360 foi solubilizado em Tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5 %) e administrado por via intraperitoneal durante sete dias, nas doses de 12,5 e 25 mg/kg (MONTENEGRO et al., 2008). 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®) (25 mg/kg) foi usado como controle positivo. Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução de 5 % de Tween 80. Foi utilizado ainda um quinto grupo (controle sadio), cujos animais ($n = 6$) permaneceram nas mesmas condições experimentais dos grupos tratados e controle, porém não foram transplantados com as células tumorais (sarcoma 180). No nono dia, todos os animais foram eutanasiados e os tumores extirpados, pesados e fixados em formaldeído (10 %). 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 transplantado-S180

B = média dos pesos dos tumores de cada grupo tratado

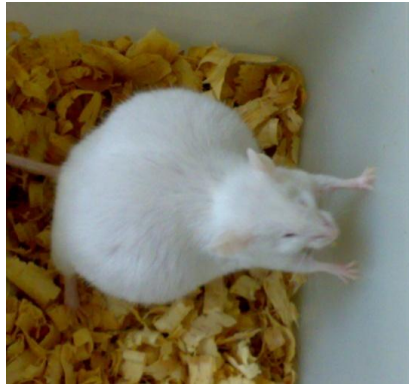


Figura 11 – Camundongo Swiss com sarcoma 180 ascítico com 8 dias de implantação (Foto: João Carlos Pita).

4.3.2.2 Análises toxicológicas

4.3.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos após o tratamento com o trachylobano-360, os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados o consumo de água e ração.

4.3.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No nono dia, antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos). Com agulha heparinizada, o sangue, obtido pelo *sinus orbital*, foi coletado em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas de uréia, creatinina e transaminases (aspartato aminotransferase, AST, e alanina aminotransferase, ALT), e em tubos para avaliação de parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma) sendo observado um jejum de 6 horas antes da coleta do sangue. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para

o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) (Figura 12A) e para o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter* (Vet) (Figura 12B), respectivamente. Os esfregaços sanguíneos foram corados automaticamente no HEMATEL 200® e analisados em microscópio óptico TAIMIN®, para confirmação e controle da contagem de células.

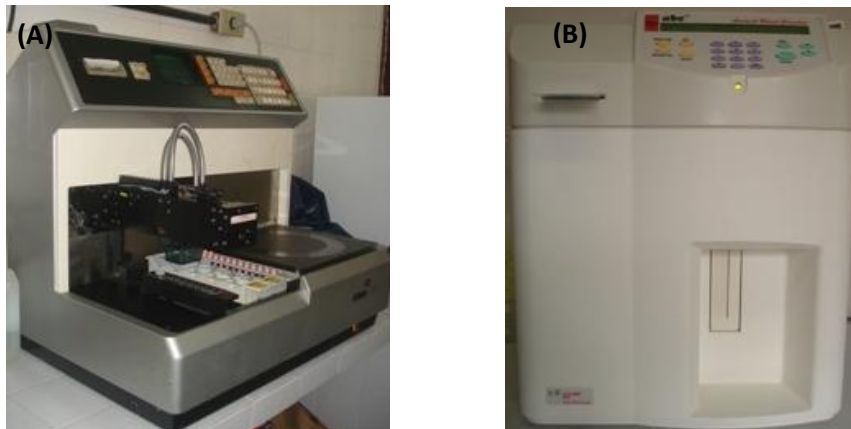


Figura 12 – (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System); **(B)** Analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter* (Vet) (Foto: João Carlos Pita).

4.3.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta do sangue, para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados e os órgãos (timo, baço, fígado e rins) extirpados, pesados e fixados em formaldeído (10 %). O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{ÍNDICE} = \frac{\text{peso do órgão}(mg)}{\text{peso do animal}(g)}$$

Os índices, especificamente de baço e timo, representam um indicativo de uma possível atividade imunomoduladora do trachylobano-360.

4.3.2.2.4 Análises histopatológicas

Após a pesagem, 50 % dos camundongos dos grupos controle e tratados tiveram os órgãos excisados (coração, fígado, rins) e tumor, seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10 %) tamponada e após 24 horas, foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo convencional (LEIKA®), os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 μm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e vermelho pricosírius, e examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os procedimentos descritos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo e as imagens histopatológicas foram obtidas na Escola Técnica de Enfermagem do Centro de Ciências da Saúde da Universidade federal da Paraíba.

4.4 Análise estatística

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 CI_{50} , CL_{50} e CH_{50} 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

5 RESULTADOS

5.1. *In vitro*

5.1.1 Triagem farmacológica através da citotoxicidade frente células da linhagem sarcoma 180

Para a triagem farmacológica preliminar, foram selecionados inicialmente 21 produtos naturais (codificados na Tabela 1), incluindo extratos, fases, óleos essenciais e substâncias isoladas de diferentes produtos naturais. Na triagem, as substâncias isoladas foram testadas na concentração de 500 µg/mL e os outros produtos na concentração de 5.000 µg/mL, através do ensaio de redução do MTT, obtendo-se o resultado da porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle (Gráfico 1).

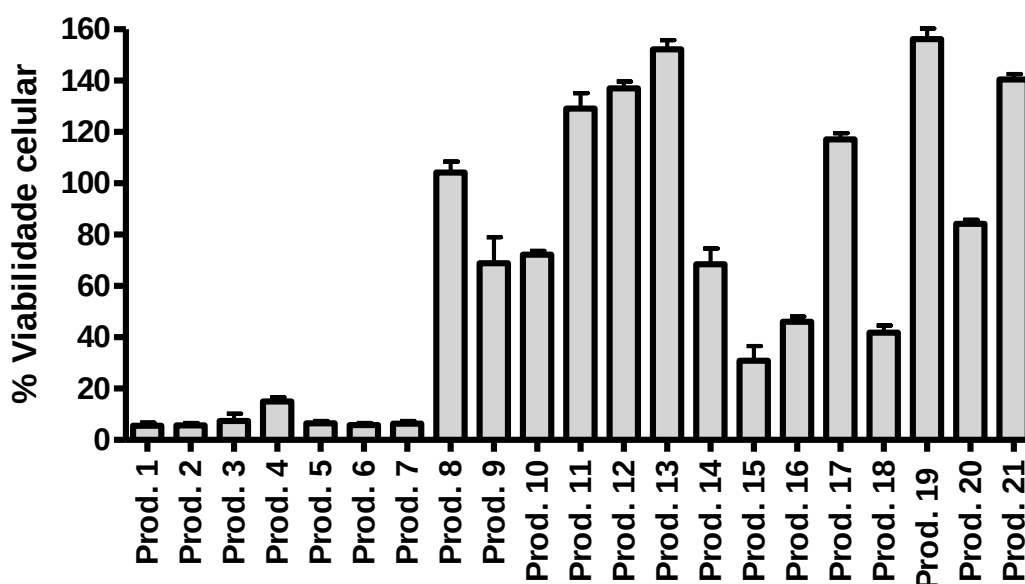


Gráfico 1 – Viabilidade celular após tratamento com 21 produtos naturais, através do ensaio de redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média.

Através da determinação da viabilidade celular, observa-se que os sete primeiros produtos foram os mais citotóxicos frente células de sarcoma 180. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Viabilidade celular após tratamento com os produtos naturais mais citotóxicos frente sarcoma 180.

Código	Espécie	Especificação	% Viabilidade celular
Prod.1	<i>Xylopi langsdorffiana</i>	Trachylobano-360	5,5
Prod.2	<i>Xylopi langsdorffiana</i>	Trachylobano-318	5,7
Prod.3	<i>Xylopi langsdorffiana</i>	Óleo essencial	7,4
Prod.4	<i>Lipia microphila</i>	Óleo essencial	15,0
Prod.5	<i>Rollinia leptopetala</i>	Óleo essencial	6,5
Prod.6	<i>Croton grewioides</i>	Óleo essencial	5,8
Prod.7	<i>Combretum duarteanum</i>	Óleo essencial	6,3

Os dados estão expressos como percentagem.

Diante dos resultados obtidos na triagem farmacológica preliminar, foram selecionados os dois diterpenos do tipo *ent*-trachylobano de *Xylopi langsdorffiana*: o trachylobano-360 (Figura 2C) e o trachylobano-318 (Figura 2D), bem como o seu óleo essencial (O.E.X.) (Figura 3), para a sequência dos experimentos.

5.1.2 Determinação da concentração que inibe 50 % da proliferação celular (CI₅₀)

A citotoxicidade do trachylobano-360, trachylobano-318 e O.E.X. foi avaliada em células da linhagem tumoral sarcoma 180, utilizando-se como marcadores o ensaio de exclusão do azul de tripan e o ensaio de redução do MTT.

Os resultados mostram que todos os constituintes de *X. langsdorffiana* avaliados apresentam atividade antitumoral *in vitro* de maneira dependente de concentração (Gráficos 2, 3 e 4). Os valores de CI₅₀ obtidos através dos ensaios de

exclusão do azul de tripan e de redução do MTT foram respectivamente 54,28 e 53,28 $\mu\text{g/mL}$ para o trachylobano-360 (Gráfico 2), 100,8 e 104,0 $\mu\text{g/mL}$ para o trachylobano-318 (Gráfico 3) e 206,4 e 209,3 $\mu\text{g/mL}$ para o O.E.X. (Gráfico 4). Os resultados estão compilados na Tabela 3.

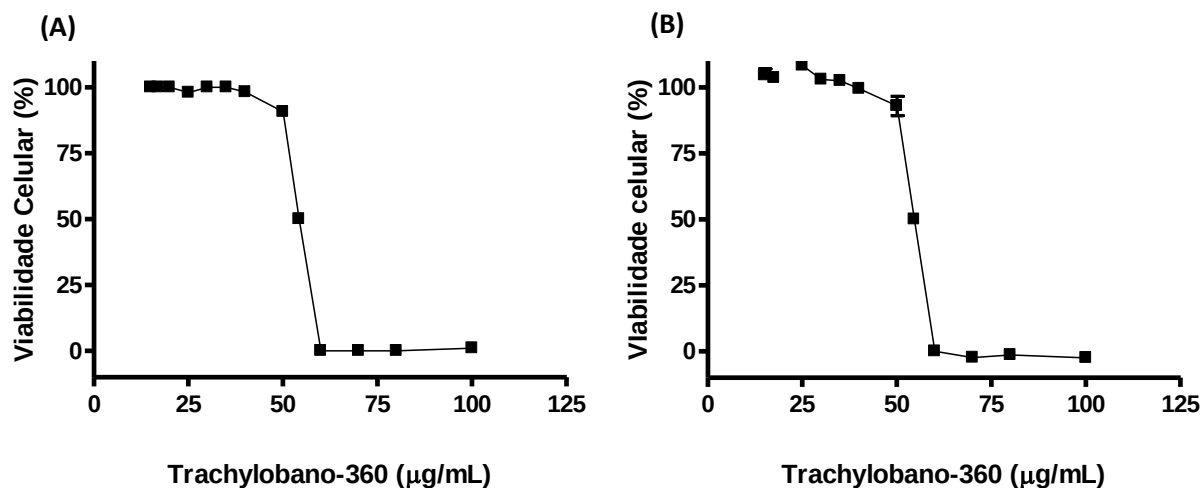


Gráfico 2 – Viabilidade celular após tratamento com o trachylobano-360. Concentração-resposta através do ensaio de **(A)** exclusão do azul de tripan e de **(B)** redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

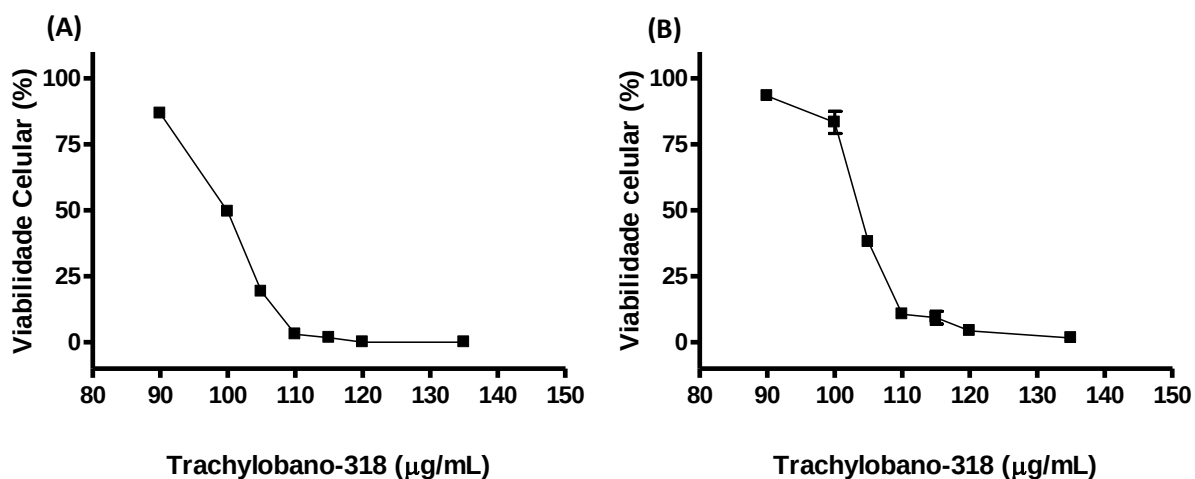


Gráfico 3 – Viabilidade celular após tratamento com o trachylobano-318. Concentração-resposta através do ensaio de **(A)** exclusão do azul de tripan e de **(B)** redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

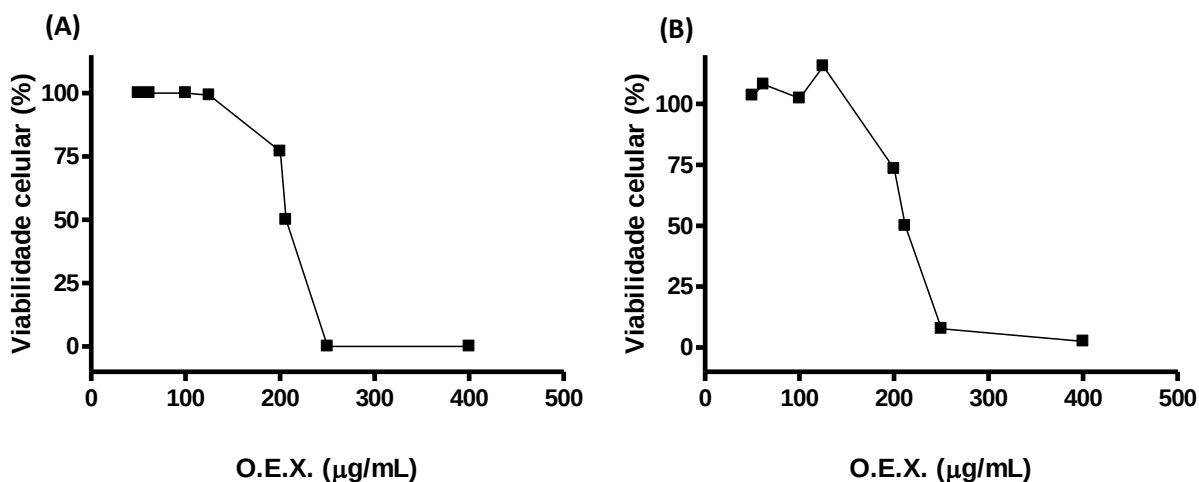


Gráfico 4 – Viabilidade celular após tratamento com O.E.X. Concentração-resposta através do ensaio de **(A)** exclusão do azul de tripan e de **(B)** redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

Tabela 3 – Valores de CI_{50} do trachylobano-360, trachylobano-318 e do O.E.X. obtidos através dos ensaios de exclusão do azul de tripan e de redução do MTT em sarcoma 180.

Constituinte	CI_{50} (µg/mL) (limite de confiança)	
	Azul de tripan	MTT
Trachylobano-360	54,28 (54,03 – 54,54)	53,28 (52,11 – 54,47)
Trachylobano-318	100,8 (100,1 – 101,4)	104,0 (103,6 – 104,3)
O.E.X.	206,4 (206,2 – 206,6)	209,3 (202,3 – 216,6)

Os resultados estão expressos em µg/mL com seus respectivos limites de confiança (95 %).

O trachylobano-318 foi isolado em pequena quantidade, impossibilitando, até o momento, a realização dos ensaios de citotoxicidade, e também, dos ensaios de atividade antitumoral *in vivo*. Dessa forma, os ensaios de citotoxicidade seguintes, envolveram o estudo dos efeitos do trachylobano-360 e O.E.X..

5.1.3 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade com o microcrustáceo *A. salina* foi utilizado para avaliar a toxicidade do trachylobano-360 e do O.E.X., 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 trachylobano-360 em concentrações até 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 5), enquanto que, o O.E.X. produziu 100 % de mortalidade na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 6).

Os valores de CL_{50} obtidos no bioensaio com *A. salina* para o trachylobano-360 e O.E.X. foram 245,3 e 10,05 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4), respectivamente.

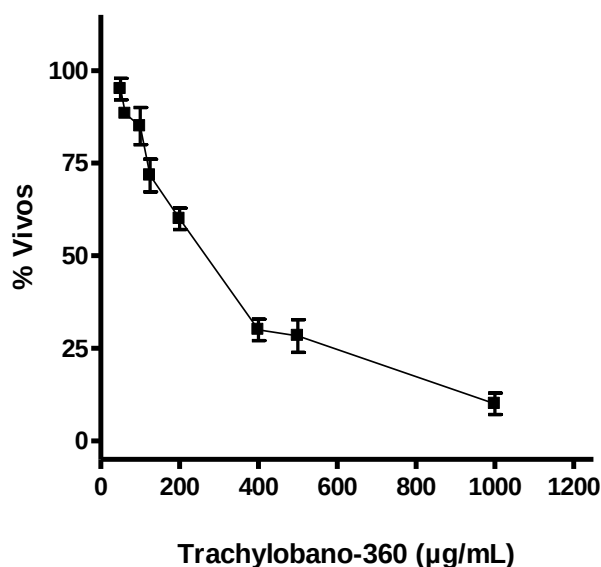


Gráfico 5 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com trachylobano-360 ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

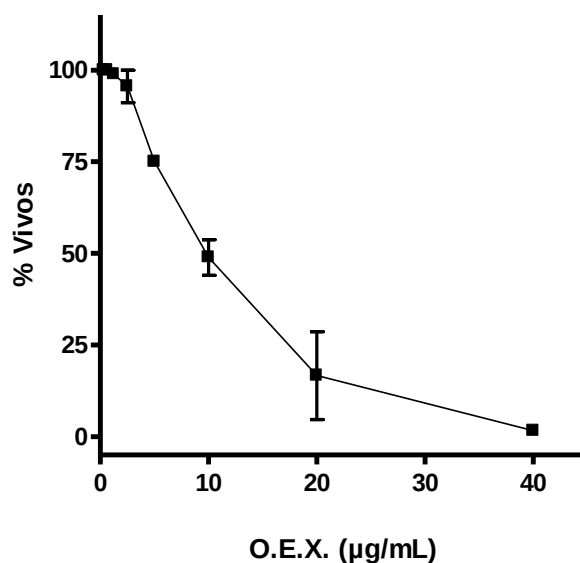


Gráfico 6 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com O.E.X. (µg/mL). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

Tabela 4 – Valores de CL₅₀ obtidos através do bioensaio com *A. salina* para o trachylobano-360 e O.E.X.

Constituinte	CL ₅₀ (µg/mL) (limite de confiança)
Trachylobano-360	245,3 (213,7 – 281,5)
O.E.X	10,05 (9,51 – 10,62)

Os resultados estão expressos em µg/mL com seus respectivos limites de confiança (95 %).

5.1.3 Citotoxicidade em eritrócitos

A citotoxicidade do trachylobano-360 e do O.E.X. foi avaliada em cultura de eritrócitos de camundongos Swiss. A percentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com ambos os constituintes de *X. langsdorffiana*, com o trachylobano-360 produzindo 100 % de hemólise em concentrações acima de 200 µg/mL. Os valores de CH₅₀ obtidos nesse experimento para o trachylobano-360 (Gráfico 7) e O.E.X. (Gráfico 8) foram, respectivamente, 98,50 e 742,4 µg/mL (Tabela 5).

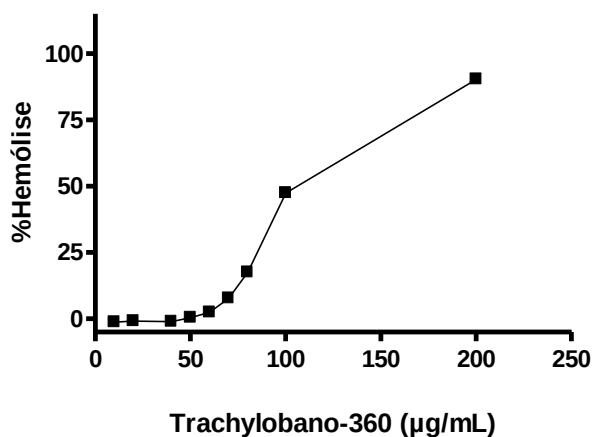


Gráfico 7 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com trachylobano-360 (µg/mL). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

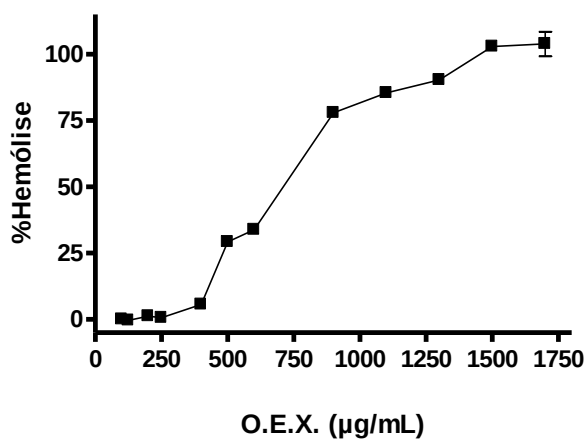


Gráfico 8 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com O.E.X (µg/mL). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

Tabela 5 – Valores de CH_{50} obtidos através da citotoxicidade em eritrócitos para o trachylobano-360 e O.E.X.

Constituinte	CH_{50} (µg/mL) (limite de confiança)
Trachylobano-360	98,50 (98,35 - 98,65)
O.E.X.	742,4 (706,8 – 779,7)

Os resultados estão expressos em µg/mL com seus respectivos limites de confiança (95 %).

5.2 *In vivo*

5.2.1 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, foi utilizado o trachylobano-360, pois foi o produto natural mais ativo nos ensaios preliminares. Suas doses (12,5 e 25 mg/kg) foram determinadas experimentalmente, de forma preliminar, usando o mesmo modelo de avaliação.

Os efeitos inibitórios do trachylobano-360 no crescimento do tumor, em camundongos transplantados com sarcoma 180, estão mostrados no Gráfico 9. Redução significativa dose-dependente do peso do tumor foi observada nos animais tratados com o trachylobano-360, bem como nos tratados com 5-FU. No 9º dia, a média do peso do tumor do grupo controle transplantado foi $2,19 \pm 0,17$ g. Na presença do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) as médias dos pesos dos tumores reduziram para $1,19 \pm 0,15$ e $0,61 \pm 0,05$ 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 45,60 e 71,99 % para o tratamento com o trachylobano-360, 12,5 e 25 mg/kg respectivamente. 5-FU reduziu o peso do tumor em 80,06 %. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre a inibição do crescimento do tumor produzida pelo trachylobano-360 (25 mg/kg) e àquela produzida pelo 5-FU na mesma dose. Os tumores dos animais dos grupos tratados com o trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg), 5-FU (25 mg/kg) e do controle transplantado estão mostrados na Figura 13.

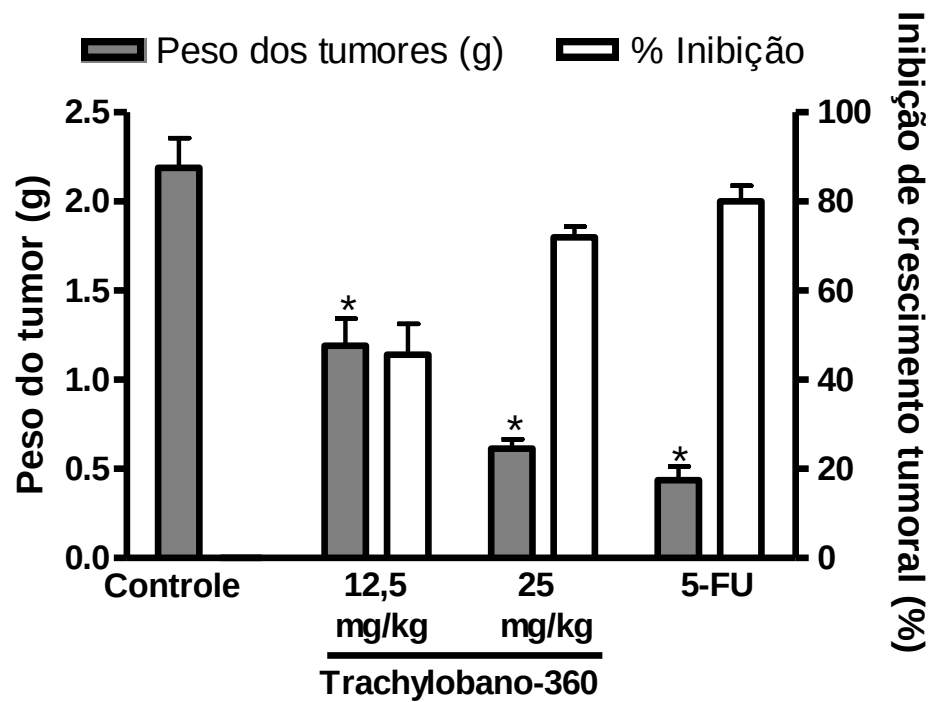


Gráfico 9 – Efeito do trachylobano-360 e 5-FU em camundongos transplantedados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor após os diferentes tratamentos. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 6 animais. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantedado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido por Tukey.



Figura 13 – Tumores dos camundongos transplantados com sarcoma 180 dos grupos (n = 6): **(A)** controle experimental, **(B)** trachylobano-360 (12,5 mg/kg), **(C)** trachylobano-360 (25 mg/kg), **(D)** 5-FU (25 mg/kg). Os grupos estão dispostos em suas respectivas colunas.

5.2.2 Análises toxicológicas

5.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Na Tabela 6 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, avaliados durante os sete dias de tratamento, bem como a evolução ponderal dos animais.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que não houve diferenças significantes no consumo de água e ração, entre os grupos experimentais.

Houve diminuição no peso corporal dos animais tratados com 5-FU e trachylobano-360 (25 mg/kg), ao término do 9º dia quando comparado com o grupo controle transplantado com sarcoma 180.

Tabela 6 – Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) submetidos aos diferentes tratamentos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle sadio					
5 % Tween-80	-	35,00 ± 1,05	31,74 ± 0,85	32,07 ± 0,79	32,38 ± 0,62
Controle -S180					
5 % Tween-80	-	34,82 ± 1,68	28,13 ± 1,00	31,43 ± 0,99	34,54 ± 0,90
5-Fluorouracil	25	38,21 ± 4,05	27,09 ± 1,28	30,27 ± 0,49	30,35 ± 0,73 ^a
Trachylobano-360	12,5	34,29 ± 1,27	32,65 ± 2,26	32,10 ± 0,68	33,77 ± 0,70
Trachylobano-360	25	36,07 ± 1,97	28,68 ± 1,23	29,73 ± 0,50	31,37 ± 0,53 ^a

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado-S180 por ANOVA seguido de Tukey

5.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica dos efeitos do trachylobano-360 incluiu também a avaliação de alterações bioquímicas e hematológicas. Nenhuma mudança significativa nos parâmetros renais (uréia e creatinina) e hepáticos (atividade enzimática de transaminases AST e ALT) foi observada em nenhum animal tratado com o trachylobano-360 e 5-FU quando comparados com controle transplantado (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com sarcoma 180.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle sadio					
5 % Tween-80	-	217,6 ± 26,2	122,6 ± 19,1	41,2 ± 2,2	0,28 ± 0,02
Controle-S180					
5 % Tween-80	-	287,8 ± 20,2	71,8 ± 7,3	39,8 ± 4,4	0,28 ± 0,02
5-Fluorouracil	25	219,7 ± 18,4	63,8 ± 9,7	48,0 ± 3,5	0,32 ± 0,02
Trachylobano-360	12,5	275,0 ± 15,5	76,0 ± 10,4	48,8 ± 5,8	0,36 ± 0,06
Trachylobano-360	25	298,3 ± 13,5	109,0 ± 10,1	51,2 ± 4,7	0,40 ± 0,04

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

Em relação à avaliação hematológica, não houve nenhuma alteração significativa nos parâmetros Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) entre os grupos experimentais (Tabela 8).

Entretanto, foram encontradas alterações no número de hemácias e na quantidade de hemoglobina. Os resultados mostram que houve uma redução significativa no número hemácias e na quantidade de hemoglobina no grupo controle transplantado em relação ao controle sadio. O tratamento com o trachylobano-360 (25 mg/kg) não alterou esses parâmetros em relação ao controle sadio, com seus valores significativamente maiores que àqueles obtidos para o controle transplantado (Tabela 8).

Tabela 8 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Controle sadio				
5 % Tween-80	-	43,40 ± 0,93	14,66 ± 0,34	33,70 ± 0,29
Controle-S180				
5 % Tween-80	-	44,50 ± 1,52	14,60 ± 0,34	32,95 ± 0,53
5-Fluorouracil	25	43,67 ± 0,49	15,08 ± 0,23	34,45 ± 0,68
Trachylobano-360	12,5	42,83 ± 0,79	14,80 ± 0,30	34,63 ± 0,33
Trachylobano-360	25	43,33 ± 0,56	14,92 ± 0,13	34,60 ± 0,28

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

Tabela 8 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 (Continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Controle sadio				
5 % Tween-80	-	9,87 ± 0,25	14,46 ± 0,27	42,94 ± 0,62
Controle-S180				
5 % Tween-80	-	7,89 ± 0,36 ^c	11,45 ± 0,73 ^c	34,80 ± 2,35
5-Fluorouracil	25	8,60 ± 0,18 ^c	12,95 ± 0,10	37,73 ± 0,93
Trachylobano-360	12,5	8,79 ± 0,18 ^c	13,03 ± 0,36	37,63 ± 1,10
Trachylobano-360	25	9,67 ± 0,15 ^{a,b}	14,28 ± 0,18 ^a	40,55 ± 0,57

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 experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

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

Adicionalmente, animais transplantados com as células sarcoma 180 mostraram um significativo aumento no número de leucócitos totais circulantes

quando comparados com os animais sadios. Houve um aumento na percentagem de neutrófilos e diminuição na percentagem de linfócitos no sangue periférico de animais transplantados com sarcoma 180, quando comparados com o grupo sadio tratado apenas com 5 % de Tween-80 (Tabela). O tratamento com 5-FU levou à diminuição no número de leucócitos totais circulantes, quando comparado ao grupo controle transplantado, bem como na percentagem de neutrófilos. Por outro lado, os animais tratados com 5-FU mostraram aumento na percentagem de linfócitos quando comparado aos do grupo controle transplantado.

Tabela 8 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180 (Continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Controle sadio						
5 % Tween-80	-	7,08 ± 0,51	77,80 ± 3,73	18,40 ± 3,25	3,40 ± 0,51	0,40 ± 0,24
Controle-S180						
5 % Tween-80	-	13,34 ± 2,58 ^c	44,00 ± 2,54 ^c	50,50 ± 3,16 ^c	4,33 ± 0,56	0,67 ± 0,33
5-Fluorouracil	25	3,95 ± 0,51 ^a	77,17 ± 2,18 ^a	18,50 ± 2,32 ^a	3,50 ± 0,62	0,50 ± 0,34
Trachylobano-360	12,5	11,15 ± 1,28 ^b	51,83 ± 4,66 ^{b,c}	41,17±5,25 ^{b,c}	6,00 ± 1,57	1,00 ± 0,45
Trachylobano-360	25	11,42 ± 0,92 ^b	53,17 ± 5,08 ^{b,c}	38,67±4,56 ^{b,c}	6,83 ± 1,11	0,50 ± 0,22

Dados estão apresentados como média $\pm$ 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 experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

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

O tratamento com o trachylobano-360 não induziu alteração significativa nos níveis de leucócitos, nem nas percentagens de linfócitos e neutrófilos, em relação ao grupo controle transplantado. Além disso, houve uma diminuição significativa nas percentagens de linfócitos dos animais tratados com ambas as doses do trachylobano-360, quando comparado aos animais sadios e tratados com 5-FU. No entanto, as percentagens de neutrófilos dos animais tratados com as duas doses do

trachylobano-360 aumentaram significativamente quando comparadas com as dos grupos sadio e tratado com 5-FU (Tabela).

5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos e pesados. Nenhuma alteração significativa no índice de rins foi observada entre os grupos de animais saudáveis e transplantados (Tabela 9). O índice de fígado dos animais tratados com 5-FU ($57,52 \pm 0,92$) reduziu significativamente quando comparado ao grupo controle transplantado ($63,30 \pm 1,17$). Entretanto, o trachylobano-360, em ambas as doses utilizadas, não induziu alteração significativa no índice do fígado dos animais tratados, 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. Em contrapartida, o trachylobano-360, independente da dose (12,5 e 25 mg/kg), causou um aumento nos índices de baço, para $7,62 \pm 0,37$ e $7,59 \pm 0,36$, respectivamente, sendo este significativamente diferente em relação ao grupo tratado com 5-FU ($5,24 \pm 0,15$) 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 trachylobano-360, em ambas as doses, não alterou o índice timo, nem de baço, dos animais tratados em relação ao grupo controle transplantado com sarcoma 180 (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeitos do trachylobano-360 (12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos transplantados com tumor sarcoma 180.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle sadio					
5 % Tween-80	-	3,09 ± 0,30	5,21 ± 0,24	56,33 ± 0,49	12,23 ± 0,74
Controle-S180					
5 % Tween-80	-	4,36 ± 0,50 ^c	6,85 ± 0,50 ^c	63,30 ± 1,17	10,62 ± 0,13
5-Fluorouracil	25	2,13 ± 0,11 ^a	5,24 ± 0,15 ^a	57,52 ± 0,92 ^a	10,67 ± 0,59
Trachylobano-360	12,5	3,80 ± 0,31 ^b	7,62 ± 0,37 ^{b,c}	63,04 ± 1,60	11,39 ± 0,28
Trachylobano-360	25	3,41 ± 0,16 ^b	7,59 ± 0,36 ^{b,c}	58,75 ± 1,07	10,96 ± 0,56

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 experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

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

5.2.2.4 Análises histopatológicas

Análises histopatológicas dos corações removidos dos grupos controle transplantado (Figura 14A) e tratados com o 5-FU (Figura 14B), trachylobano-360, 12,5 mg/kg (Figura 14C) e 25 mg/kg (Figura 14D) não apresentaram alterações, estando todos os órgãos dentro dos limites de normalidade histológica. Assim, ao exame microscópico observou-se: endocárdio delineado por endotélio apoiado em delgada membrana basal; miocárdio com fibrocélulas em arranjos plexiformes anastomosantes, com estriações transversais e núcleos únicos ou duplos, centralmente posicionados; válvulas cardíacas formadas por tecido fibroconjuntivo denso e revestimento endotelial.

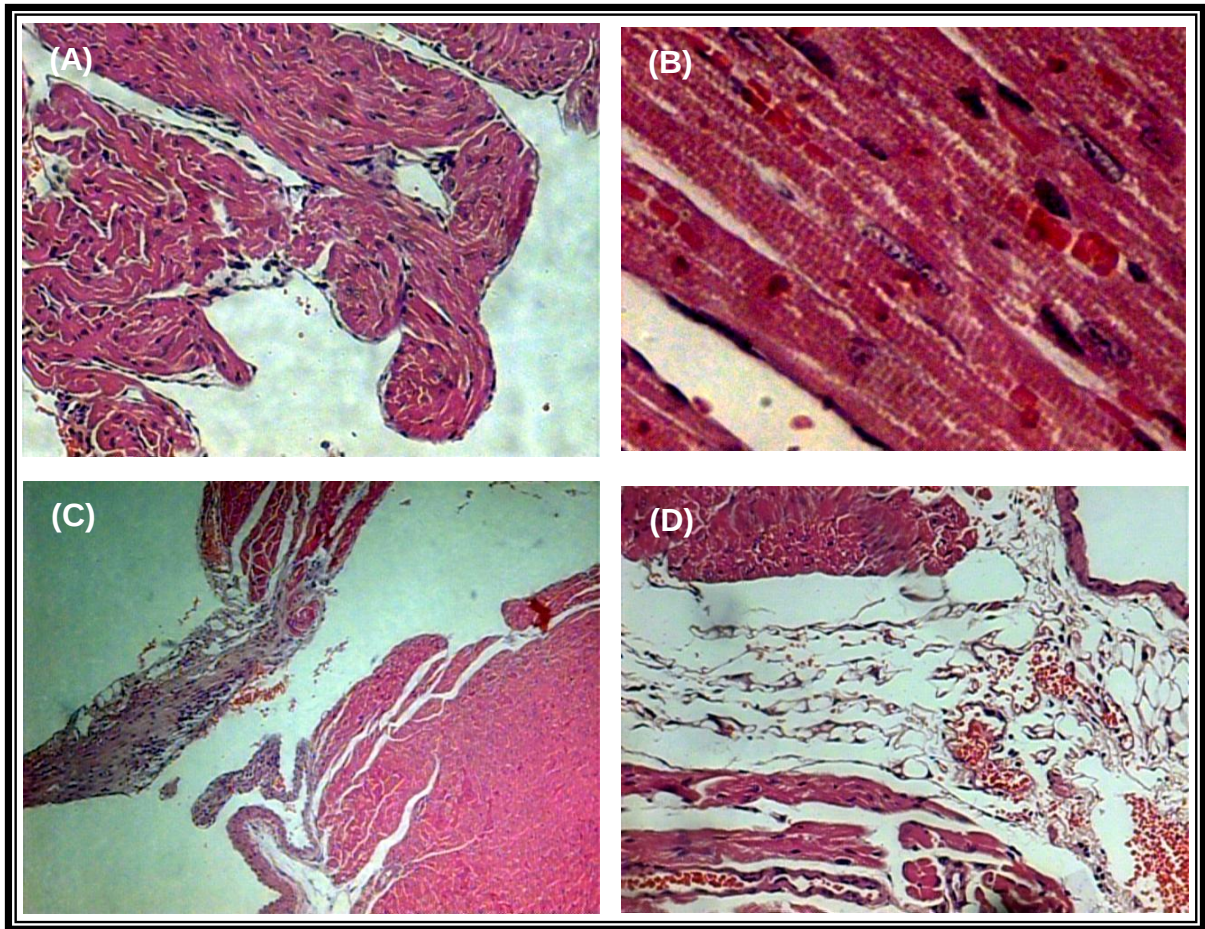


Figura 14 – Histopatologia do coração dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado-S180 (100x); **(B)** 5-FU (25 mg/kg) (400x); **(C)** trachylobano-360 (12,5 mg/kg) (100x) e **(D)** trachylobano-360 (25 mg/kg) (100x). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina.

Os fígados analisados dos animais de todos os grupos experimentais apresentaram arquitetura lobular normal e hepatócitos normais isomorfos. No grupo controle transplantado, foram observadas alterações histológicas reacionais (“fígado reacional”) com raras atipias regenerativas hepatocelulares. Dentre as alterações reacionais podemos citar inflamação sinusoidal mista (Figura 15A), principalmente em zona III, observando macrófagos luminares (células de Kupffer ativadas); infiltrado inflamatório linfoistiocítico e neutrocitário em espaços portal. O uso do quimioterápico 5-FU, na dose de 25 mg/kg, causou necrose parenquimatosa multifocal, portite mista, atipias regenerativas hepatocelulares, e ainda inflamação mista sinusoidal e necrose em zona III associada à produção de fibras colagênicas finas, às vezes acompanhadas de septalização incipiente de forma focal (fibrose), evidenciada pela coloração especial vermelho de picrossírius (Figura 15B). Chamou a

atenção a ocorrência de vários focos de necrose parenquimatosa associados a fluxo inflamatório misto além de necrose hialina hepatocelular, e ocupação por exsudato inflamatório linfocitário e neutrocitário, nos espaços portais de intensidade variando de leve a intensa.

Os animais tratados com a menor dose do trachylobano-360 (12,5 mg/kg) apresentaram necrose parenquimatosa, entretanto, caracterizada como discreta e provavelmente droga-induzida, com eventuais focos de exsudação linfomonocitária e neutrocitária, além de portite mista e perivenulite focal (zona III) (Figura 15C), inflamação sinudoidal e atipias regenerativas hepatocelulares focais. Os animais tratados com 25 mg/kg do trachylobano-360 apresentaram, além de todas as alterações descritas para dose de 12,5 mg/kg, necrose parenquimatosa multifocal (Figura 15D), provavelmente droga-induzida.

A histopatologia dos rins dos animais de todos os grupos experimentais mostrou glomérulos preservados numericamente, envolvidos por fina cápsula de Bowman, tufo capilar sustentado por delicado mesângio, túbulos contorcidos proximais, parte espessa da alça de Henle e túbulos contorcidos distais sem particularidades histológicas (Figura 16A – D). Os tratamentos com o 5-FU (Figura 16B), 12,5 mg/kg (Figura 16C) e 25 mg/kg (Figura 16D) do trachylobano-360 produziram apenas nefrite intersticial crônica, com focos de mobilização linfocítica.

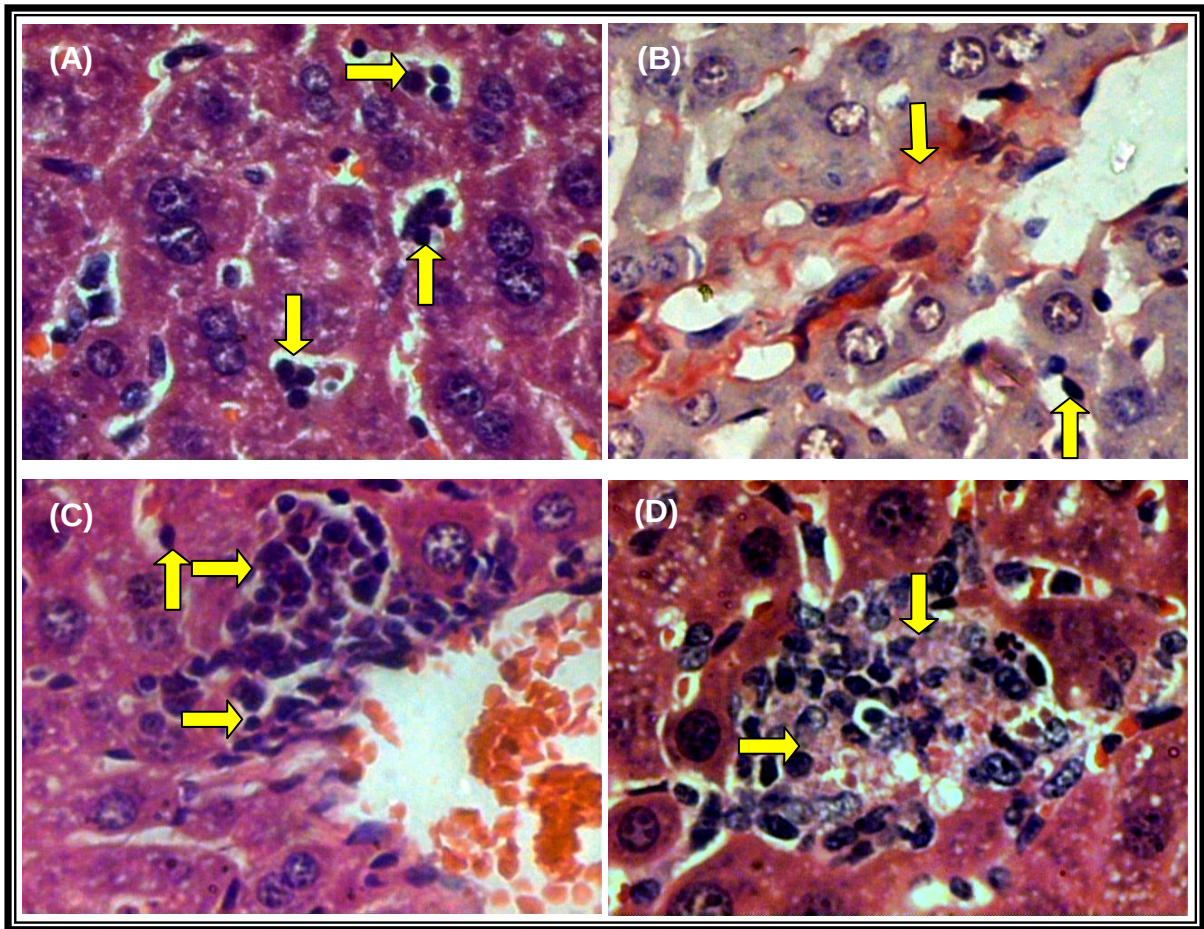


Figura 15 – Histopatologia do fígado dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado-S180; **(B)** 5-FU (25 mg/kg); **(C)** trachylobano-360 (12,5 mg/kg) e **(D)** trachylobano-360 (25 mg/kg). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (**A**, **C** e **D**) ou vermelho picrossírius (**B**) (400x).

Análises microscópicas realizadas nos tumores (sarcoma 180) dos animais experimentais, mostraram que o tumor apresenta-se como crescimento neoplásico maligno de alto grau, sólido, com áreas de necrose coagulativa e mitoses assimétricas (Figura 17A), variando entre os grupos. Observou-se ainda que tal neoplasia invade naturalmente tecido adiposo (Figura 17B) e muscular esquelético (Figura 17C), ilhando ainda diminuto linfonodo, que permanece preservado, sem produzir metástases nos órgãos estudados (fígado, rins e coração). As avaliações ainda mostraram produção de células imaturas, pequenas ou de tamanhos medianos, de formatos irregulares, com citoplasmas eosinofílicos, às vezes, em girino, evocando aspectos rabdóides, nucléolos frequentes e, não raro,

proeminentes. Nos tumores do grupo controle transplantado contabilizou-se cerca de oito mitoses e áreas limitadas de necrose coagulativa (Figura 18A). Os tumores dos animais do grupo 5-FU apresentaram de quatro a cinco mitoses por campo de grande aumento com grandes áreas de necrose coagulativa (Figura 18B) associadas à exsudação polimorfonuclear. Em contrapartida, na análise dos tumores dos animais tratados com 12,5 mg/kg (Figura 18C) e 25 mg/kg (Figura 18D) do trachylobano-360 observou-se de três a quatro e de duas a três mitoses assimétricas, respectivamente, com extensas áreas de necrose coagulativa, onde aparecem ilhas de células tumorais.

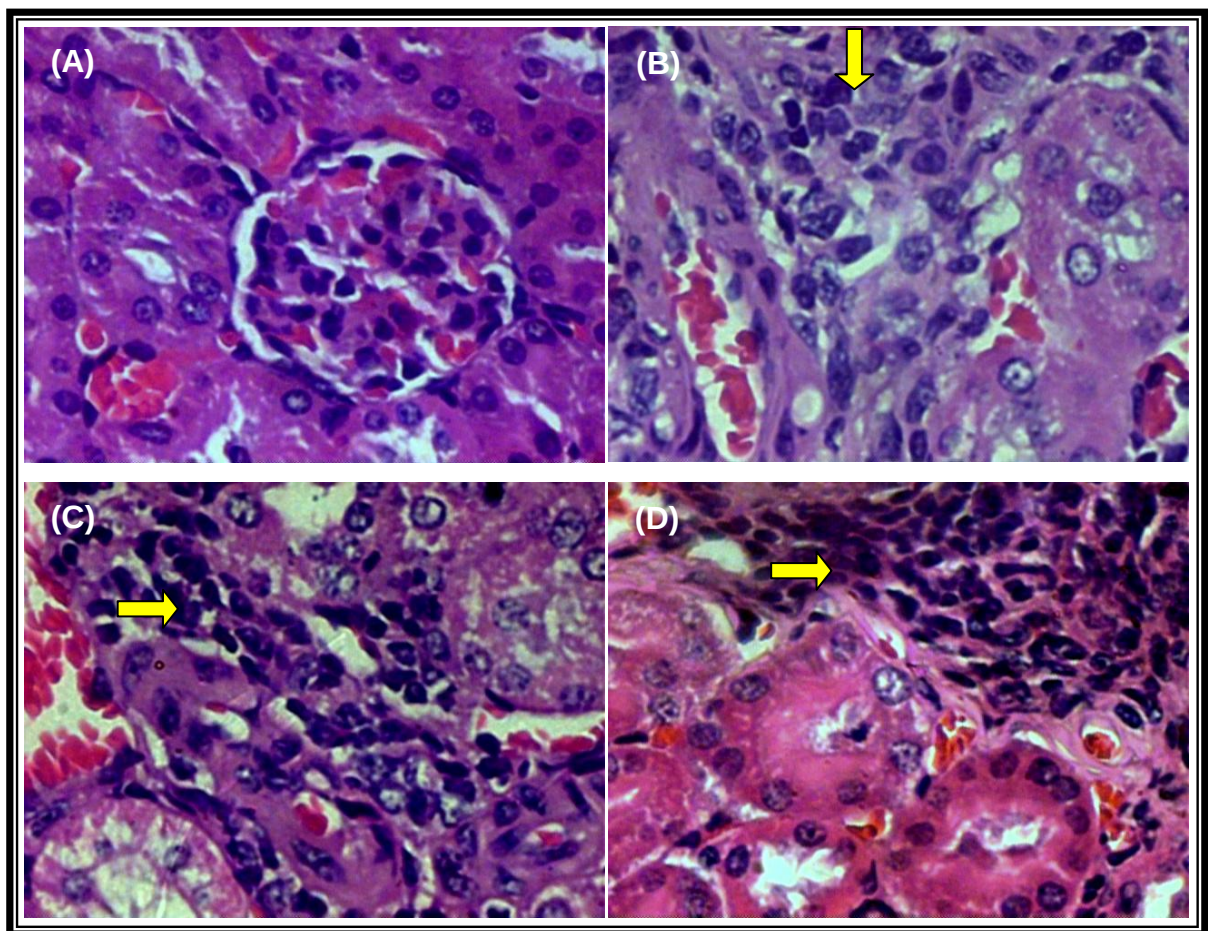


Figura 16 – Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado-S180; **(B)** 5-FU (25 mg/kg); **(C)** trachylobano-360 (12,5 mg/kg) e **(D)** trachylobano-360 (25 mg/kg). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (400x).

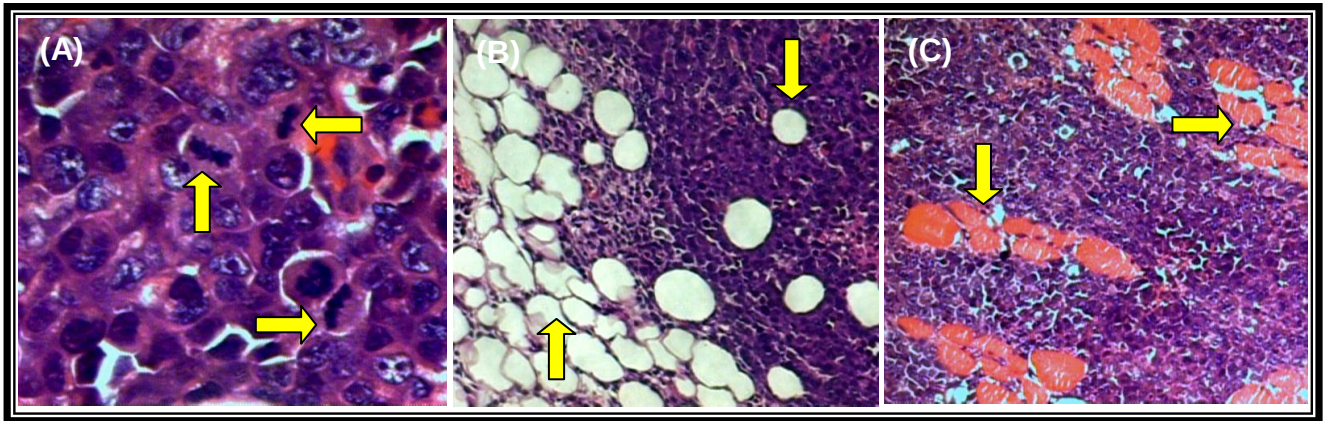


Figura 17 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Mitoses assimétricas; **(B)** Invasão do tecido adiposo; **(C)** Invasão do tecido muscular esquelético. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (400x para A; 100x para B e C).

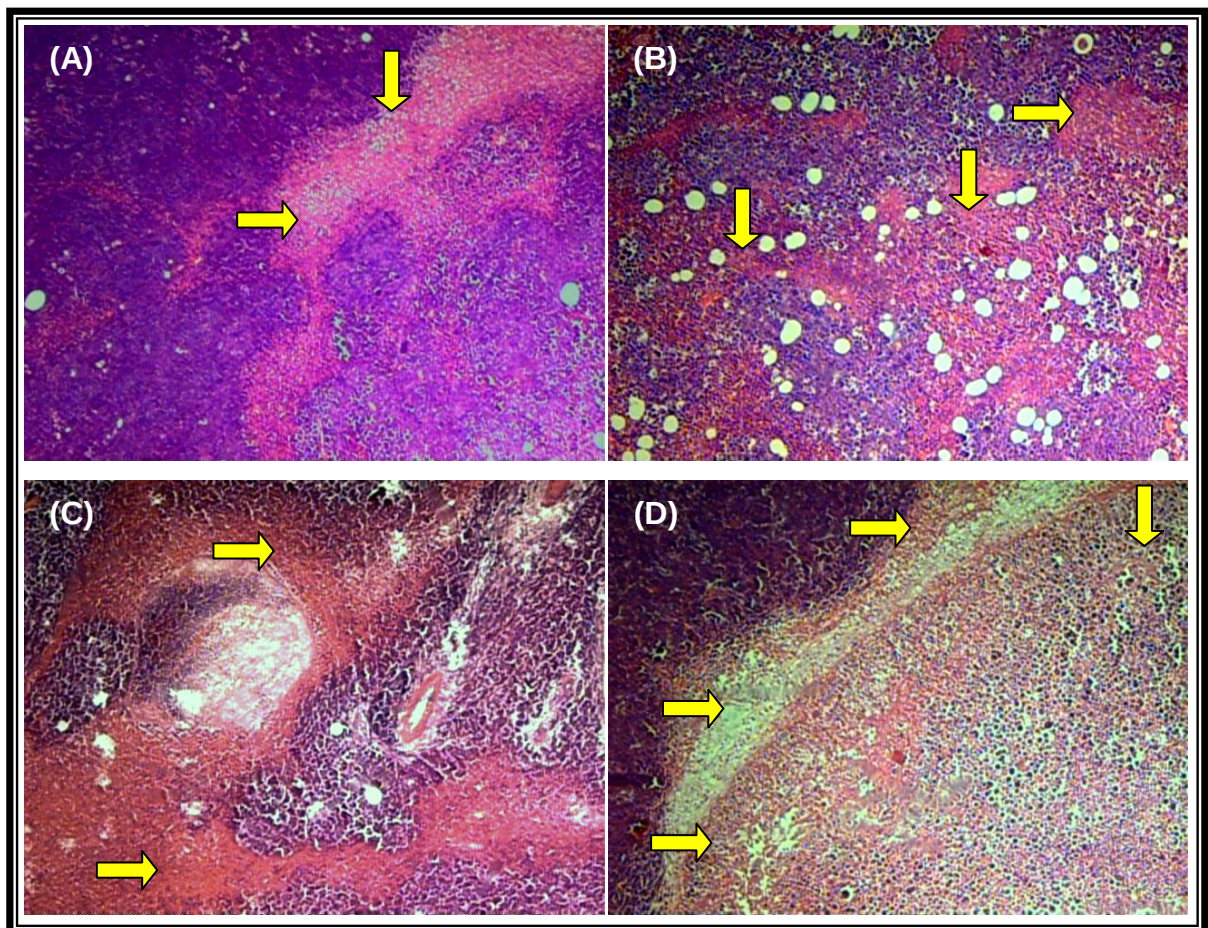


Figura 18 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais mostrando os graus de necrose coagulativa: **(A)** Controle transplantado-S180; **(B)** 5-FU (25 mg/kg); **(C)** trachylobano-360 (12,5 mg/kg) e **(D)** trachylobano-360 (25 mg/kg). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (400x).

Discussão



6 DISCUSSÃO

O uso 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).

Para investigar a possível atividade anticâncer de produtos naturais, foi avaliada a viabilidade de células da linhagem tumoral sarcoma 180, tratadas com produtos isolados, óleos essenciais, extratos e fases obtidos de diferentes produtos naturais. Diante dos resultados obtidos no ensaio de atividade antitumoral *in vitro*, os constituintes de *X. langsdorffiana* (trachylobano-360, trachylobano-318 e O.E.X.) foram considerados promissores em relação à sua bioatividade (Tabela 2). O passo seguinte seria a avaliação da citotoxicidade desses produtos a fim de selecionar o constituinte de *X. langsdorffiana* que apresentasse um balanço entre atividade biológica *versus* toxicidade favorável à sua utilização como droga farmacológica. Este produto seria então avaliado em relação à sua atividade antitumoral e toxicidade *in vivo*.

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 absorbância, 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, o trachylobano-360 foi o produto natural mais ativo frente células de sarcoma 180, seguido pelo trachylobano-318 e por último, o O.E.X.. Os dois diterpenos diferem apenas na substituição do carbono 7, onde o trachylobano-360 apresenta um grupo acetoxi (CH_3COO) e o trachylobano-318, um grupo hidroxil (OH). Realizando uma análise da relação estrutura-atividade, pode-se verificar que a substituição do grupo acetoxi no trachylobano-360 o conferiu o dobro de potência, possuindo uma Cl_{50} duas vezes menor, quando comparada a Cl_{50} do trachylobano-318. A partir deste resultado, sugere-se que esse efeito seja devido à maior lipofilicidade do trachylobano-360, conferido pelo grupo acetoxi, quando comparado ao trachylobano-318, já que o aumento desta característica aumenta o seu coeficiente de partição. Quanto maior o coeficiente de partição, maior a facilidade do composto atravessar as biomembranas das células neoplásicas (BARREIRO; FRAGA, 2001; BOGO, 2009). Os dois métodos de avaliação de citotoxicidade forneceram Cl_{50} semelhantes, tendo suas curvas quase que superponíveis ponto a ponto. Dessa forma, observa-se que não houve ação de nenhum interferente citado para o método de redução do MTT (Tabela 3).

A citotoxicidade do trachylobano-360 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 Cl_{50} de 80,6 e 83,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (TAVARES et al., 2006). Comparando esses resultados com o valor de Cl_{50} obtido em sarcoma 180, pode-se observar que o trachylobano-360 é mais citotóxico em célula tumoral do que em células normais, não neoplásicas. Corroborando esses resultados, Castello-Branco et al. (2009) mostraram que o trachylobano-360 é mais citotóxico em células de leucemia humana (HL60, U937 e K562) do que em V79 e hepatócitos. 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 trachylobano-360 como droga farmacológica é uma possibilidade.

O teste frente *Artemia salina* tem demonstrado boa aceitabilidade decorrente da sua alta sensibilidade, baixo custo, rapidez e por ser de fácil manuseio (CAVALCANTE, 2000). *A. salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas (CALOW, 1993). 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 CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ representam produtos bioativos (MEYER et al., 1982). Os valores de CL_{50} obtidos para o trachylobano-360 e o O.E.X. são menores que 1.000 $\mu\text{g/mL}$, indicando que ambos os produtos são possíveis candidatos a drogas antitumorais (Tabela 4).

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; COOMBES, 2006; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2006; SILVA et al., 2009b). Os resultados obtidos sugerem que a toxicidade observada do O.E.X. frente células tumorais de sarcoma 180 não é devido ao estresse oxidativo ou dano à membrana celular, já que não observou-se lise de eritrócitos de camundongos em concentrações abaixo de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 8), concentração esta que produziu 100 % de morte em células de sarcoma 180 (Gráfico 4). Além disso, os resultados da toxicidade do trachylobano-360 frente células tumorais de sarcoma 180, sugerem que pode haver um envolvimento, pelo menos parcial, do estresse oxidativo, pois na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, onde houve 100 % de morte das células tumorais (Gráfico 2), ocorreu 2,42 % de hemólise (Gráfico 7). Experimentos adicionais são necessários para quantificar o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de ação citotóxico do trachylobano-360.

Diterpenos do tipo trachylobano são uma classe química relativamente rara, sendo relatados poucos estudos de suas atividades biológicas. Apesar de alguns trabalhos mostrarem o potencial antitumoral *in vitro* em diferentes linhagens celulares de substâncias dessa classe (BLOCK et al., 2002; BLOCK et al., 2005; LI et al., 2005; CASTELLO-BRANCO et al., 2009), não há na literatura estudos de atividade antitumoral *in vivo* com nenhuma delas.

Sarcoma 180 é um tumor de origem murina e é uma das linhagens mais frequentemente utilizadas em pesquisas de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* (ITO et al., 1997; LEE et al., 2003; KINTZIOS, 2004).

Após sete dias de tratamento, o trachylobano-360 inibiu o crescimento tumoral *in vivo* de maneira dose-dependente, reduzindo o peso do tumor, não havendo diferença significativa entre a inibição causada pela maior dose (25 mg/kg) deste diterpeno e àquela provocada pelo tratamento com o quimioterápico 5-FU (Gráfico 9).

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 trachylobano-360 (25 mg/kg) e com o 5-FU tiveram uma redução no peso corporal quando comparados ao grupo controle transplantado (Tabela 6). Este quimioterápico 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).

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 (Tabela 7).

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 gastrointestinal 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). Como os resultados obtidos não mostraram nenhuma alteração significativa nos níveis de uréia entre os grupos experimentais, sugere-se que os danos hepáticos encontrados

no exame histopatológico, especialmente após o tratamento com o 5-FU, não caracterizam hepatopatia avançada, podendo ser considerados reversíveis (BEZERRA et al., 2008). 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.

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). Existe uma variação diária relativamente pequena da creatinina em um indivíduo saudável, com variação média de aproximadamente 5 % (KEEVIL et al., 1998). Portanto, pequenas alterações nos limiares de creatinina em uma pessoa servem como marcadores sensíveis de alterações na função renal se outras causas de alteração da creatinina puderem ser eliminadas (HENRY, 2008).

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. Frequentemente não existem sinais de infiltração neoplásica da medula óssea, perdas sanguíneas, hemólise, distúrbios endócrinos, renais ou hepáticos, nem de deficiências nutritivas que justifiquem a anemia: deve-se, exclusivamente, à presença do próprio tumor. A anemia presente no paciente oncológico pode ter diversas causas: i) reações imunológicas, tais como produção de citocinas

inflamatórias em resposta à presença das células tumorais (a chamada anemia crônica do câncer); *ii*) supressão da hematopoiese induzida pelo tratamento; *iii*) produção deficiente de eritropoetina pelos rins; e *iv*) supressão intrínseca da medula óssea pelo clone celular maligno (como em neoplasias hematológicas), dentre outras (ZUCKERMAN, 1998). Os resultados obtidos demonstram que o implante do tumor, por si só, foi capaz de reduzir significativamente o número de hemácias e a quantidade de hemoglobina, como se observa comparando os dados para o grupo controle transplantado com sarcoma 180 em relação ao controle sadio. Em contrapartida, nos animais tratados com 25 mg/kg do trachylobano-360 não houve alteração significativa no número de hemácias nem na quantidade de hemoglobina em relação ao grupo controle sadio (Tabela 8). Isso significa que a forte influência do tumor em induzir redução nesse parâmetros, por diversos mecanismos, foi compensada pelo tratamento com o trachylobano-360 (25 mg/kg), mostrando que esse diterpeno mesmo na presença do tumor não interfere nesses parâmetros e portanto, não induz toxicidade em nível de células sanguíneas, bem como na hematopoiese.

A inoculação do tumor, por si só, causa uma reação leucemóide nos animais transplantados, caracterizada por granulocitose e esplenomegalia (KODAMA; SENDO; KOBAYASHI, 1974; OKAWA et al., 1992; SATO et al., 2005; LINS et al., 2009). Além disso, fator estimulante de colônia (CSF) produzido por células tumorais no sarcoma 180, aumenta o número de células polimorfonucleares (PMN) periféricas circulantes (OKAWA et al., 1992). Esses resultados demonstraram que o tumor sarcoma 180 modifica significativamente o parâmetro leucócito. Os dados apresentados corroboram com esses achados, uma vez que, animais inoculados com sarcoma 180 mostraram um aumento no índice de baço e timo, acompanhado por supra-regulação de granulócitos (Tabela 8). Um dos riscos da quimioterapia e radioterapia no tratamento de pacientes com câncer é o desenvolvimento de leucopenia, a qual substancialmente aumenta o risco de infecções (TAKIGUCHI et al., 2001; BEZERRA et al., 2008). Contudo, todos os parâmetros hematológicos analisados após o tratamento com o trachylobano-360 permaneceram inalterados quando comparados com o grupo controle transplantado (Tabela 8), sugerindo que, diferentemente de muitos quimioterápicos, este diterpeno não altera o número células hematopoiéticas, o que representa um dos principais efeitos indesejáveis do tratamento do câncer. De acordo com Okawa et al. (1992), foi observado um

aumento na resistência do hospedeiro à infecção fúngica em camundongos transplantados com tumor, e a supressão da resposta imune desses animais e pacientes é geralmente causada pela quimioterapia do câncer, como observado nos resultados aqui apresentados, quando os camundongos transplantados foram tratados com 5-FU (Tabela 8), apresentando leucopenia.

O sistema imune é uma rede de células e órgãos que trabalham juntos para defender o corpo contra ataques por invasores. A degeneração ou atrofia de órgãos imune podem influenciar a função normal do sistema imune. Por exemplo, o baço serve como reservatório para sangue e filtra ou purifica o sangue e linfa que flui através dele. Quando o baço sofre danos ou é removido, o indivíduo é mais susceptível à infecções (YU et al., 2007). O timo, no neonato, exerce um papel essencial no desenvolvimento de tecidos linfóides e no estabelecimento das funções imune (MILLER, 1962a; MILLER et al., 1962), e a timectomia de animais neonatos levam a sua diminuição (MILLER, 1962b; MILLER, 1964). Em animais adultos, o timo está envolvido no estabelecimento e restauração das funções imunes, em particular a produção e desenvolvimento de linfócitos (YOKOZI, 1973). Assim, o timo fornece resistência contra o desenvolvimento de tumores em animais (OGISO et al., 1976). Agentes antitumorais, como o 5-FU, causam significativa involução do baço e timo (BEZERRA et al., 2008). Esse efeito é observado imediatamente após a administração, sugerindo alterações tissulares devido à inibição da síntese de RNA e DNA (OGISO et al., 1976). Eichhorst et al. (2001) mostraram que 5-FU causa apoptose em diferentes tipos celulares como hepatócitos e células do sistema imune, que é parcialmente mediada pelo sistema CD95 devido a uma supra-regulação de CD95 e CD95L. Timócitos, e em menor extensão esplenócitos, em camundongos sofrem apoptose após administração de 5-FU com forte supra-regulação de CD95L nos timócitos e menor nos esplenócitos. Os resultados obtidos mostraram que os índices de baço e timo aumentaram significativamente em animais inoculados com sarcoma 180, quando comparados com animais não transplantados sadios (Tabela 9), dados estes que corroboram com Lins et al. (2009). Apesar do 5-FU ter produzido efeito tóxico (imunossupressor), reduzindo o peso do baço e timo nos animais experimentais, o trachylobano-360 não alterou este parâmetro (Tabela 9). Portanto, os dados mostram que o trachylobano-360 não apresenta atividade imunoestimulante, porém, também não produz imunossupressão, que representa um dos principais efeitos indesejáveis da maioria

dos quimioterápicos utilizados atualmente na prática clínica. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a influência do trachylobano-360 no sistema imune, como por exemplo, seus efeitos na proliferação de esplenócitos, na atividade de células *Natural Killer* (NK), na atividade fagocítica de macrófagos e na ativação do sistema complemento.

Dados da literatura mostram que hepatócitos, expostos a altas concentrações do 5-FU após administração intraperitoneal, apresentam pequena supra-regulação de CD95L e redução de aproximadamente 5 % do peso do órgão (EICHHORST et al., 2001), corroborando com os resultados do presente trabalho, onde os animais tratados com 5-FU tiveram seus índices de fígado reduzidos em aproximadamente 10 %, quando comparado ao grupo controle (Tabela 9).

A análise histopatológica dos fígados dos animais do grupo controle transplantado mostrou a presença de fígado reacional que pode ser consequência local de um efeito sistêmico (tumor), ou pode ser mediada por administração de drogas. Os animais tratados com o 5-FU sofreram um dano hepático maior que os tratados com ambas as doses do trachylobano-360. Entretanto, em ambos os grupos não houve alterações suficientemente extensas para que ocorresse a liberação de enzimas hepáticas para o plasma.

No presente estudo, a análise histopatológica dos rins dos animais tratados mostrou a presença de alterações semelhantes em todos os grupos, no entanto, estas não foram extensas o suficiente, já que os glomérulos, cápsula de Bowman, células mesangiais, túbulos contorcidos proximais, parte espessa da alça de Henle e túbulos contorcidos distais foram preservados, sem particularidades histológicas, corroborando com os resultados dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, onde não houve alteração nos níveis de uréia e creatinina.

A histopatologia do sarcoma 180 mostrou invasão de músculo esquelético e tecido adiposo, ilhando diminuto linfonodo, corroborando com Kurashige e Mitsuhashi (1982). Da mesma forma, não se observou metástases, apesar de seu comportamento agressivo local. Observou-se, ainda, extensa área de necrose nos tumores dos diferentes grupos, acompanhada de uma redução no número de mitoses, sendo estes efeitos mais pronunciados após o tratamento com 25 mg/kg do trachylobano-360.

Conclusões



7 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com os diterpenos trachylobano-360, trachylobano-318 e o óleo essencial, obtidos de *Xylopiá langsdorffiana*, pode-se concluir que:

- Os diterpenos trachylobano-360 e trachylobano-318, e o O.E.X. apresentaram atividade antitumoral *in vitro*, frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180;
- Dos três constituintes de *X. langsdorffiana*, verificou-se que o trachylobano-360 foi o mais citotóxico, de maneira concentração-dependente, mostrando ainda, que a substituição do grupo acetoxi, no carbono 7 desse composto, confere maior potência que o grupo hidroxí;
- O trachylobano-360 e o O.E.X. mostraram ser bioativos frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- O trachylobano-360 e o O.E.X. apresentaram baixa toxicidade frente eritrócitos de camundongos Swiss, sendo que, para o O.E.X. não há indícios de envolvimento do estresse oxidativo na sua atividade antitumoral *in vitro*, enquanto que, para o trachylobano-360, pode haver um envolvimento, pelo menos parcial, desse processo;
- O trachylobano-360 mostrou atividade antitumoral *in vivo*, de maneira dependente de dose, equivalente àquela do quimioterápico 5-FU, na mesma dose;
- Os animais tratados com o trachylobano-360 não apresentaram sinais de toxicidade, comumente encontrados para os quimioterápicos da prática clínica, não havendo alterações significantes nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, nem na avaliação histopatológica dos órgãos dos animais, nos modelos experimentais avaliados;

- O trachylobano-360 não apresentou atividade imunoestimulante como parte do seu mecanismo de ação antitumoral, porém, também não produziu imunossupressão, que representa um dos principais efeitos indesejáveis da maioria dos quimioterápicos utilizados atualmente na prática clínica;
- Portanto, é possível inferir que o trachylobano-360 possui significativa atividade antitumoral e baixa toxicidade nos modelos experimentais avaliados, balanço este essencial para sua aplicabilidade como droga farmacológica.

Referências

REFERÊNCIAS

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

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. **Int. J. Toxicol.**, 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.

AMES, B. N. Dietary Carcinogens and Anti-carcinogens (Oxygen Radicals and Degenerative Diseases). **Science**, v. 221, p. 1256-64, 1983.

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.

ANDRADE, N. C.; FRANÇA, V. C.; FECHINE, I. M.; TAVARES, J. F.; MAOIR, J. F. A. S.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, M. S. Diterpenos kaurano e labdano do gênero *Xylopi*a. In: 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 2002. **Livro de resumos**, Poços de Caldas, 2002, p. PN-168.

ANDRADE, N. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. Terpenoids of the Annonaceae: Distribution and compilation of 13 C NMR data. **Recent. Res. Devel. Phytochem.**, v. 7, p. 1-85, 2003.

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.

ASEKUN, O. T.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopi*a *aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v. 75, p. 368-70, 2004.

ASSEF, M. L. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; MORETÃO, M. P.; AZAMBUJA, A. P.; IACOMINI, M.; BUCHI, D. F. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an α -d-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 19, p. 49-54, 2002.

ATCC – “American Type Culture Collection”. **MTT Cell Proliferation Assay. Instructions**. 2001. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/2273.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2009.

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.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre, RS: Artmed Editora, 2001.

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 piplartine 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.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; HABIB JIWAN, J. L.; LLABRÈS, G.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1165-71, 2004.

BLOCK, S.; GERKENS, P.; PEULEN, O.; JOLOIS, O.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. **Anticancer Res.**, v. 25, p. 363-8, 2005.

BLOCK, S.; STÉVIGNY, C.; DE PAUW-GILLET, M. C.; DE HOFFMANN, E.; LLABRÈS, G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. *ent*-trachyloban-3 β -ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. **Planta Med.**, v. 68, p. 647-9, 2002.

BOAKYE-YIADOM, K.; FIAGBE, N. I.; AYIM, J. S. Antimicrobial properties of some West African medicinal plants iv. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constituents of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae). **Lloydia**, v. 40, p. 543-5, 1977.

BOGO, D. **Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lacanórico e de seus produtos de modificação estrutural**. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2009.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1269-75, 2003.

BRAGA, F. C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, p. 447-52, 2000.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, p. 408-420, 2006.

BRUMMITT, R. K. **Vascular Plant** - Families and Genera, Royal Botanic Gardens: Kew, 1992.

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

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

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. 58-65, 2000.

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.

CARVALHO, J. E. Fitoterápico: Alimento ou medicamento? In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M. **Ciências de alimentos: Avanços e perspectivas**. Campinas: Unicamp, p. 196-202, 2001.

CASTELLO-BRANCO, M. V. S.; ANAZETTI, M. C.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; DINIZ, M. F. F. M.; FRUNGILLO, L.; HAUN, M.; MELO, P. S. Diterpenes from *Xylopia*

langsdorffiana inhibit cell growth and induce differentiation in human leukemia cells. **Z. Naturforsch.**, v. 64, p. 650-6, 2009.

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.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Annonaceae (Soursop Family)**, eds.; Princeton University Press: New Jersey, p. 18, 2004.

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

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 1661-9, 1994.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, p. 315, 1984.

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. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 9, p. 1-15, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

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

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 165-70, 2007.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DEWICK, P. M. The mevalonate and Deoxyxylulose phosphate Pathways: terpenoids and Steroids. In: DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 2 ed. United Kingdom, School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, John Wiley & Sons, Ltd, Cap. 5, p. 167, 2002.

EICHHORST, S. T.; MÜERKÖSTER, S.; WEIGAND, M. A.; KRAMMER, P. H. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes *in vivo* via activation of the CD95(APO-1/Fas) system. **Cancer Res.**, v. 61, p. 243-8, 2001.

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.

FALL, D.; BADIANE, M.; BA, D.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic effect of Senegalese Annonaceae used in traditional medicine. **Dakar Med.**, v. 48, p. 112-6, 2003.

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

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.

GRAIKOU, K.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L.; CHINOU, I.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; LITAUDON, M. New diterpenes from *Croton insularis*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 685-8, 2004.

GRANELL, S.; ANDREU, I.; MARTÍ, D.; CAVÉ, A.; ARAGÓN, R.; ESTORNELL, E.; CORTES, D.; ZAFRA-POLO, M. C. Bisbenzyltetrahydroisoquinolines, a new class of inhibitors of the mitochondrial respiratory chain complex I. **Planta Med.**, v. 70, p. 266-8, 2004.

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.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clin. Nephrol.**, v. 46, p. 273-6, 1996.

GUIL, J. L.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; TORIJA, E. Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 51, p. 99-107, 1997.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for new Drugs of Plant Origin. In: **Advances in Drug Research**. London: Academic Press, v. 20, 1991.

HARRIGAN, G. G.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; CHAN, G. W.; JOHNSON, R. K. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two annonaceous plants, *Xylopia aethiopica* and *Miliusa cf. banacea*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 68-73, 1994.

HARTWELL, J. L. Plants used against cancer: a survey. Lawrence, MA. **Quarterman Publications**, pp. 438-39, 1982.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 196-98, 1999.

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.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**, Oxford University Press: Oxford, 1985.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**, Clarendon Press: Oxford, p. 22-168, 1973.

IGWE, S. A.; AFONNE, J. C.; GHASI, S. I. Ocular dynamics of systemic aqueous extracts of *Xylopi aethiopica* (African guinea pepper) seeds on visually active volunteers. **J. Ethnopharmacol.**, v. 86, p. 139-42, 2003.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Res.**, v. 17, p. 277-284, 1997.

ITOKAWA, H.; WANG, X.; LEE, K-H. Homoharringtonine and related compounds. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN D. (eds). Anticancer agents from natural products. Boca Raton, Florida, **Brunner-Routledge Psychology Press**, Taylor & Francis Group, pp. 47-70. 2005.

JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; GUPTA, M. P.; EICH, E. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Trop. Med. Int. Health**, v. 4, p. 611-5, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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.

KANTARJIAN, H. M.; O'BRIEN, S.; ANDERLINI, P.; TALPAZ, M. Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigational options. **Blood**, v. 87, p. 3069-81, 1996.

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 8094-8, 2004.

KAWAKUBO, Y.; KOMIYAMA, K.; UMEZAWA, I.; NISHIYAMA, Y. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. **Cancer Chem. and Pharmacol.**, v. 5, p. 113-118, 1980.

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

KEEVIL, B. G.; KILPATRICK, E. S.; NICHOLS, S. P.; MAYLOR, P. W. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. **Clin. Chem.**, v. 44, p. 15-35, 1998.

KINTZIOS, S. E. What do we know about cancer and its therapy. In: KINTZIOS, S. E.; BARBERAKI, M. G. **Plants That Fight Cancer**, Boca Raton / Florida: CRC Press LLC, p. 1-14, 2004.

KODAMA, T.; SENDO, F.; KOBAYASHI, H. Leukemoid reaction in BALB/c mice bearing transplanted tumors. **Cancer Res.**, v. 34, p. 176–180, 1974.

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v. 52, p. 371-375, 2003.

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A-treated rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 98, p. 68-73, 2006.

LI, C.; LEE, D.; GRAF, T. N.; PHIFER, S. S.; NAKANISHI, Y.; BURGESS, J. P.; RISWAN, S.; SETYOWATI, F. M.; SARIBI, A. M.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; FALKINHAM, J. O. 3rd.; KROLL, D. J.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; OBERLIES, N. H. A hexacyclic *ent*-trachylobane diterpenoid possessing an oxetane ring from *Mitrephora glabra*. **Org. Lett.**, v. 7, p. 5709-12, 2005.

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.

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.

LÓPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopi* *discreta*. **Parasite Immunol.**, v. 31, p. 623-30, 2009.

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.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. D.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 65-98, 2001.

MACÊDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, p. 45-47, 2004.

MACHADO, M. C. F. P.; MELO-JUNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Rev. Eletrôn. de Farm.**, v. VI, p. 1-6, 2009.

MacRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, p. 143-72, 1988.

MARTINS, D.; OSSHIRO, E.; ROQUE, N. F.; MARKS, V.; GOTTLIEB, H. E. A sesquiterpene dimer from *Xylopi* *aromatica*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 677-80, 1998.

MARTINSEN, A.; BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; ABAD, A.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOREL, N. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. **Vascul. Pharmacol.**, v. 29, p. 63-9, 2009.

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.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicol. Letters**, v. 142, p. 143–151, 2003.

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.

MILLER, J. F. A. P. The thymus and the development of immunologic responsiveness. **Science**, v. 144, p. 1544-51, 1964.

MILLER, J. F. A. P.; MARSHALL, A. H. E.; WHITE, R. G. The immunological significance of the thymus. **Adv. Immunol.**, v. 2, p. 111-162, 1962.

MILLER, J. F. A. P. Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 156, p. 410–428, 1962b.

MILLER, J. F. A. P. Role of the thymus in transplantation immunity. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 99, p. 340–354, 1962a.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Drug design based on natural products. **Quim. Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MONTENEGRO, R. C.; FARIAS, R. A. F. F.; PEREIRA, M. R. P.; ALVES, A. P. N. N.; BEZERRA, F. S.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 454-7, 2008.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Diterpene adducts from branches of *Xylopia emarginata*. **Biochem. System. Ecol.**, v. 34, p. 883-37, 2006.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; ROQUE, N. F. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopia brasiliensis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, p. 828-31, 2003.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 55-58, 2007.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mut. Res.**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. 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 adriamycininduced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicol. Lett.**, v. 160, p. 196-203, 2006.

NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, E. A. N.; OLIVEIRA, J. M.; MEDEIROS, F. A.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopia cayennensis* in rats. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 17-21, 2006.

NASCIMENTO, I. A.; ARAÚJO, M. M. S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicol. and Envir. Rest.**, v. 2, p. 41-47, 1999.

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.

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

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P. B.; JUMA, F. D. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopia parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **Nat. Med.**, v. 64, p. 9-15, 2009.

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.

O'PESSOA, C. **Testes “in vivo” e “in vitro” para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro**. 1992. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 1992.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research.. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 129-135, 2004.

OGISO, T.; NODA, N.; ASAI, N.; KATO, Y. Antitumor agents. I. Effect of 5-fluorouracil and cyclophosphamide on liver microsomes and thymus of rat. **Japan J. Pharmacol.**, v. 26, p. 445-453, 1976.

OKAWA, Y.; MURATA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, M.; SUZUKI, S. Augmentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascites tumor-bearing mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 36, p. 517–521, 1992.

OLIVEIRA JUNIOR, R. J. **Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2008.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. F.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vasc. Pharmacol.**, v. 44, p. 338-344, 2006.

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

OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Câncer. Novos alvos para tratamento. **Ciência hoje**, v. 38, n. 223, p. 28-33, 2006.

PAN, L.; ZHOU, P.; ZHANG, X.; PENG, S.; DING, L.; QIU, S. X. Skeleton-rearranged pentacyclic diterpenoids possessing a cyclobutane ring from *Euphorbia wallichii*. **Org. Lett.**, v. 8, p. 2775-8, 2006.

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.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; GONDIM-JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Acaricidal activity of the essential oils leaves and fruits of *Xylopia sericea* St. Hill. on the two spotted spide mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Quim. Nova**, v. 30, p. 838-841, 2007.

POTTERAT, O.; HOSTETTMANN, K. Plant Sources of Natural Drugs and Compounds. In: **Encyclopedia of environmental Biology**. London: Academic Press, v. 3, 1995.

QI, L.; XU, Z. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic Med. Chem. Letters**, v. 16, p. 4243-4245, 2006.

QUEVAUVILLER, A.; FOUSSARD-BLANPIN, O. The properties, especially antispasmodic, of total alkaloids of the roots of *Xylopia quintasii* Engl. and Diels. Annonaceae. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v. 170, p. 1187-8, 1976.

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

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

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. The (8)17,12E,14-labdatrien-18-oic acid (labdane302), labdane-type diterpene isolated from *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxes the guinea-pig trachea. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 197-203, 2007.

RODRIGUES, A. M.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 22, p. 314-7, 2006.

ROWINSKY, E. K.; ONETTO, N.; CANETTA, R. M.; ARBUCK, S. G.; Taxol-the 1st of the texanes, an important new class of anti-tumor agents. **Semin. Oncol.**, v. 19, p. 646-62, 1992.

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

SAHPAZ, S.; BORIS, C. H.; LOIEAU, P. M.; CORTES, D; HACQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, p. 538-40, 1994.

SATO, D. Y. O.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R. I. I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, p. 26–32, 2005.

SCHREIER, H.; GAGNÉ, L.; BOCK, T.; ERDOS, G. W.; DRUZGALA, P.; CONARY, J. T.; MÜLLER, B. W. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharm. Acta Helv.**, v. 72, p. 215-23, 1997.

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.

SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh J. Pharmacol.**, v. 1, p. 35-41. 2006.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Quím. Nova**, v. 32, p. 1566-70, 2009a.

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.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2004.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four tetrazolium salts. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 77, p. 383–393, 1963.

SOMOVA, L. I.; SHODE, F. O.; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p.165-74, 2001.

STAHELIN, H. Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. **Eur. J. Cancer**, v. 9, p. 215-21, 1973.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 223-6, 2007.

TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; BAYMA, J. C.; OLIVEIRA, A. B. Frutoic Acid, a Dimeric Kaurane Diterpene from *Xylopi frutescens*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 607-609, 1995.

TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; HANSON, J. R.; HITCHCOCK, P. B.; OLIVEIRA, A. B.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopi sericea*. **Quim. Nova**, v. 24, p. 616-618, 2001.

TAKARASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. E. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Nat. Prod. Res.**, v. 20, p. 21-26, 2006.

TAKIGUCHI, N.; SAITO, N.; NUNOMURA, M.; KOUUDA, K.; ODA, K.; FURUYAMA, N.; NAKAJIMA, N. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 47, p. 11–14, 2001.

TATSADJIEU, L. N.; ESSIA NGANG, J. J.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 469-72, 2003.

TAVARES, J. F. **Alcalóides de *Xylopia langsdorffiana* A. St. Hil & Tul (Annonaceae)**. 2004. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2004.

TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, M. S. *ent*-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 960-2, 2006.

TAVARES, J. F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; HAUN, M.; MELO, P. S.; SILVA, M. S. Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Z. Naturforsch.**, v. 62b, p. 742-744, 2007a.

TAVARES, J. F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; MARTINS, R. M.; SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-SILVA, M. S. Composition and molluscicidal properties of essential oils from leaves of *Xylopia langsdorffiana* A. St. Hil. etTul. (Annonaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 19, p. 282-284, 2007b.

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.

VEGA, M. R. G.; SOUZA-ESTEVEES, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 1554-59, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova**, v. 28, p. 519-528 , 2005.

WAGNER, H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: Yunes, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Editora da UNIVALI, p. 34-47, 2007.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, p. 3888-3890, 1966.

YOKOZI, K.: **Men-eki No Byori**, Edited. by MIHASHI, S.; AIZAWA, M.; HANAOKA, M., Asakura, Tokyo, 1973.

YU, F.; YU, F.; MCGUIRE, P. M.; LI, R.; WANG, R. Effects of *Hydrocotyle sibthorpioides* extract on transplanted tumors and immune function in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 166-71, 2007.

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, p. 47-50, 1995.

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, 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.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v.33, p.2278-2282, 1973.

ZUCKERMAN, K. S. Hematopoietic abnormalities in patients with cancer. **Cancer Control**, v. 5, p. 6-11, 1998.