



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E  
FARMACOLÓGICO DE ESPÉCIES VEGETAIS DA  
AMAZÔNIA CONTRA O CÂNCER.**

ÉLISSON DE SOUZA LEITE

MANAUS - 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ÉLISSON DE SOUZA LEITE**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E  
FARMACOLÓGICO DE ESPÉCIES VEGETAIS DA  
AMAZÔNIA CONTRA O CÂNCER.**

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração saúde.

**MANAUS – 2016**

## Ficha Catalográfica

L533c Leite, Élisson de Souza  
Contribuição ao estudo químico e farmacológico de espécies vegetais da Amazônia contra o câncer / Élisson de Souza Leite. 2016  
106 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Jefferson Rocha de Andrade Silva  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. câncer. 2. quimioterapia. 3. fontes naturais. 4. Amazônia. I. Silva, Jefferson Rocha de Andrade II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**ÉLISSON DE SOUZA LEITE**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE  
ESPÉCIES VEGETAIS DA AMAZONIA CONTRA O CÂNCER**

**Aprovado em 29/01/2016**

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva (Orientador / Presidente)  
Universidade Federal do Amazonas**

---

**Luiz André Morais Mariúba  
Membro/FIOCRUZ, Manaus**

---

**Maria Menezes  
Membro/Universidade Federal do Amazonas**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde para desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva pela credibilidade, companheirismo e orientação, sem a qual teria sido impossível vencer esta etapa de crescimento acadêmico. Por isso, minha profunda gratidão!

À Dr. Ana Claudia Fernandes Amaral pelas contribuições a este trabalho.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marne Vasconcellos, pela parceria nos ensaios de citotoxicidade no laboratório de Ciências Farmacêuticas.

Ao Dr. Emerson Silva Lima pela realização dos ensaios antioxidantes em nível celular no Laboratório de Ciências Farmacêuticas, UFAM – AM.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pela bolsa concedida.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos seus fundadores pela oportunidade e apoio durante o curso.

Aos meus pais Jacó Souza Leite e Maria Abreu Leite por tanto amor e dedicação. Obrigado pelos ensinamentos práticos de honradez e persistência.

Ao Dengo-dengo do papai pela compreensão da ausência necessária para a realização deste estudo.

À minha querida esposa pelo apoio incondicional.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais desta universidade.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

## RESUMO

LEITE, Élisson de Souza. **Contribuição ao estudo químico e farmacológico de espécies vegetais da Amazônia contra o câncer.** 2016. 106f. Dissertação – Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Este trabalho objetivou analisar as atividades citotóxica e antioxidante de extratos obtidos de 20 espécies vegetais da Amazônia. Foi demonstrada a relação entre mortalidade de *Artemia salina* com atividade antioxidante e citotoxicidade em células de cancer de boca e atividade antioxidante por método químico e biológico. Além disso, verificou-se a citotoxicidade das amostras sobre as células de câncer de mama, fibroblastos e macrófagos. O material botânico foi proveniente da Reserva Florestal Adolpho Ducke, envolvendo raízes, caules e folhas. Os extratos mais ativos foram os de elevada polaridade e o seu fracionamento foi realizado com Sefadex LH20 utilizando como eluente o metanol, acrescido de 50% de água nas últimas duas frações. O extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* foi a mais ativa nos ensaios antioxidantes em nível químico e celular. Revelou efeito citotóxico superior às demais amostras tanto no extrato bruto, quanto nas suas frações. Apesar da elevada citotoxicidade observada nas células de câncer de boca, esta espécie não induziu a morte de macrófagos. Em pequenas concentrações este extrato se demonstrou antioxidante, ao passo que nas concentrações maiores apresentou citotoxicidade expressiva. A análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência sugere a presença de quercetina e isorhamnetina 3-O-glucosídeo nos seus constituintes. Conclui-se que o extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* detém, de forma associada, as propriedades biológicas investigadas por este trabalho. Dentre todas as amostras analisadas, ela apresenta maiores probabilidades de vir a se tornar uma fonte de medicamentos antineoplásicos. Contudo, não é possível afirmar que esses efeitos sejam mantidos *in vivo*. Dessa forma, sugere-se a elaboração de nanocápsulas para constatar se haveria distribuição seletiva da droga entre os tecidos normais e cancerosos, e se a atividade desta amostra seria diferenciada em cada tecido.

**Palavras-chave:** câncer; quimioterapia; fontes naturais; Amazônia.

## ABSTRACT

LEITE, Elisson de Souza. **Contribution to chemical and pharmacological study of plant species from the Amazon against cancer.** 2016. 106f. Dissertation - Multi-Institutional Post-Gaduação Program in Biotechnology. Federal University of Amazonas, Manaus.

This study aimed to analyze the cytotoxic and antioxidant extracts obtained from 20 plant species in the Amazon. A relationship was shown between *Artemia salina* mortality with antioxidant activity and cytotoxicity in mouth cancer cells and antioxidant activity by chemical and biological method. Furthermore, it was found cytotoxicity of samples of breast cancer cells, fibroblasts and macrophages. The botanical material was from the Adolpho Ducke Forest Reserve, involving roots, stems and leaves. The most active extracts the high polarity and its fractionation was performed with Sephadex LH20 eluting with methanol plus 50% water in the last two fractions. The methanol extract of *Inga cordatolata* leaves was the most active antioxidant in tests on chemical and cellular level. Showed higher cytotoxic effect to other samples both in the crude extract, as in its fractions. In spite of the high cytotoxicity observed in mouth cancer cells, this species does not induce killing of macrophages. In small concentrations of this antioxidant extract has been shown, whereas in higher concentrations showed significant cytotoxicity. Chemical analysis by High Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography Ultra Efficiency suggests the presence of quercetin and isorhamnetin 3-O-glucoside on their constituents. It was concluded that methanol extract of the leaves has *Inga cordatolata*, associated form, the biological properties investigated in this work. Among all samples, it presents more likely to turn out to be a source of anticancer drugs. However, it is not possible to state that these effects are maintained in vivo. Thus, it is suggested the preparation of nanocapsules to see if there would be selective drug distribution between normal and cancerous tissues, and the activity of this sample would be different in each tissue.

**Keywords: cancer; chemotherapy; natural sources; Amazon.**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Atividade antioxidante da quercetina contra radicais hidroxilas em nível celular.....63.
- Figura 2: Atividade antioxidante do extrato metanol das folhas de *Aspidosperma schultesii* contra radicais hidroxilas intracelulares.....64.
- Figura 3: Atividade antioxidante do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* contra o radical hidroxila em nível celular.....65
- Figura 4: Atividade antioxidante do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* contra o radical hidroxila intracelular.....66.
- Figura 5: Atividade antioxidante do extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum* contra o radical livre hidroxila intracelular.....67.
- Figura 6: Atividade antioxidante do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* contra radicais hidroxilas intracelulares.....68.
- Figura 7: Efeito citotóxico do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* contra macrófagos.....76.
- Figura 8: Cromatograma do extrato metanol das folhas de *Theobroma cacao* obtido por análise em equipamento HPLC.....77.
- Figura 9: Cromatograma do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* obtido por análise em equipamento HPLC.....78.
- Figura 10: Cromatograma do extrato metanol das folhas de *Mezillaurus duckei* obtido por análise em equipamento HPLC.....80.
- Figura 11: Cromatograma do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* obtido por análise em equipamento HPLC.....81.



Figura 12: Cromatograma do extrato metanol das cascas de <i>Geissospermum argenteum</i> obtido por análise em equipamento HPLC.....	83.
Figura 13: Cromatograma do extrato metanol das folhas de <i>Inga cordatolata</i> obtido por análise em equipamento HPLC.....	84.
Figura 14: Cromatograma da substância padrão quercetina obtido por análise em equipamento HPLC.....	85.
Figura 15: Estrutura química do flavonoide quercetina.....	86.
Figura 16: Cromatograma de CLAE/DAD em 270 nm e os respectivos espectros UV de cada sinal.....	87.
Figura 17: Cromatogramas de massas e UV com os respectivos espectros de cada sinal.....	88.
Figura 18: Estrutura química do flavonoide isorhamnetina 3-O-glucosideo.....	88.
Figura 19: Cromatograma do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> analisado em CG-MS.....	89.
Figura 20: Cromatograma do óleo essencial de <i>Myrciaria cauliflora</i> analisado em CG-MS.....	89.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento das amostras submetidas à maceração a frio com metanol.....	43.
Tabela 2: Rendimento dos extratos vegetais obtidos com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila.....	47.
Tabela 3: Mortalidade provocada pelos extratos brutos obtidos com hexano, diclorometano acetato de etila e metanol sobre <i>Artemia salina</i> .....	48.
Tabela 4: Mortalidade das frações do extrato metanol sobre <i>A. salina</i> .....	50.
Tabela 5: Mortalidade das frações de <i>Geissospermum argenteum</i> contra <i>A. salina</i> .....	52.
Tabela 6: Mortalidade das frações do extrato metanol das folhas de <i>Inga cordatolata</i> em elevadas concentrações sobre <i>Artemia salina</i> .....	53.
Tabela 7: Mortalidade provocada por baixas concentrações das frações de <i>Inga cordatolata</i> sobre <i>Artemia salina</i> .....	53.
Tabela 8: Atividade antioxidante das frações das espécies promissoras contra o radical livre DPPH expressa em CE <sub>50</sub> (µg/mL).....	60.
Tabela 9: Atividade antioxidante das amostras promissoras contra o radical livre ABTS.....	61.
Tabela 10: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias encontradas no extrato metanol das folhas de <i>Theobroma cacao</i> .....	77.
Tabela 11: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de <i>Couma guianensis</i> .....	79.
Tabela 12: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das folhas de <i>Mezilaurus duckei</i> .....	80.

Tabala 13: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	82.
Tabala 14: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de <i>Geissospermum argenteum</i> .....	83.
Tabala 15: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de <i>Inga cordatolata</i> .....	84.
Tabela 16: Substâncias majoritárias do óleo essencial de <i>Myrciaria cauliflora</i> identificadas por análise em CG-MS.....	89.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema mundial de saúde pública que levou a óbito cerca de 8,2 milhões de pessoas no ano de 2012 (WHO, 2014). Seja pelo seu impacto epidemiológico, social, psicológico ou emocional é considerado o imperador de todos os males (ROSAS et al, 2013). A elevada incidência do câncer e a mortalidade que ainda provoca revelam que as políticas de saúde pública para o enfrentamento deste problema não têm sido eficazes. Estimativas apontam para a ocorrência de 18.560 casos novos de câncer de boca no Brasil em 2014 (BRASIL, 2014). É o tipo de câncer mais frequente entre os que atingem a região da cabeça e pescoço (BALDASQUIN et al, 2013).

As maiores taxas de incidência do câncer de cavidade oral do mundo são observadas entre a Índia e o Brasil, relacionadas diretamente ao aumento do consumo de álcool e fumo (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). A enfermidade, incide em maior grau sobre pessoas com mais de 40 anos (BRENER et al, 2007), sobretudo do sexo masculino (ABDO; GARROCHO; AGUIAR, 2002) de baixo estrato socioeconômico, estando associado à pobreza, más condições e hábitos de vida (SOUZA et al, 2012).

A cirurgia para a ressecção tumoral é o tratamento de escolha, associada ou não à radioterapia conforme as necessidades apresentadas em cada caso. No entanto, a radiação destrói células do tecido normal adjacente ao tumor e limita a sua aplicação pelos efeitos adversos que pode provocar. Dentre eles destacam-se a xerostomia, mucosite, disfagia, perda ou alteração no paladar, periodontite, trismo, e a mais severa: a osteorradionecrose, que provoca fístulas intrabucal e extrabucal, secreção purulenta, fratura patológica e dor extrema (GRIMALDI et al, 2005).

O forte impacto epidemiológico do câncer e a fragilidade das políticas públicas para o seu enfrentamento tornam imprescindíveis e inadiáveis a busca de novos medicamentos (OLIVEIRA; MACHADO; RODRIGUES, 2014). Neste contexto, o emprego de substâncias provenientes das plantas contra o câncer é bastante promissor, seja no aspecto curativo, para combater a doença já instalada, ou no aspecto preventivo como antioxidante (SILVA et al, 2014).

A natureza produziu a maior parte das substâncias orgânicas e o reino vegetal é responsável pela produção da maior diversidade química conhecida, consequência de milhões de anos de evolução e ampliação de biomas específicos. Por outro lado, a

indústria farmacêutica, baseada em métodos sintéticos, tem investido cerca de 33 bilhões de dólares anuais em pesquisas de novos fármacos. Todavia, não se tem observado um crescimento proporcional de novos medicamentos no mercado (CRISP et al, 2009). Tal realidade tem voltado o interesse empresarial do setor para os produtos naturais como fonte de novos fármacos, chegando a representar mais de 60% de toda a produção (STEVENS; MACMILAN, 2013).

Tais pesquisas utilizam modelos animais para a bioprospecção da atividade citotóxica de extratos vegetais com posteriores ensaios clínicos de eficiência e eficácia terapêutica. Um exemplo disso, a Vincristina e a Vimblastina foram descobertas por meio deste tipo de estudo. Essas substâncias foram isoladas a partir da espécie vegetal *Catharanthus roseus*, família Apocynaceae, chegando a provocar a morte das cobaias testadas por infecções associadas à forte supressão da medula óssea. Tal fato motiva seu emprego atual contra câncer de ovário, testículo, mama, linfoma Hodgkin e principalmente contra a leucemia linfoblástica aguda, que se caracteriza pela elevação patológica da produção de leucócitos pela medula óssea (SILVA, 2013; BRANDÃO et al, 2010).

Outra descoberta de grande impacto na terapêutica oncológica foi o isolamento dos anticancerígenos etoposídeo e o teniposídeo no gênero *Podophyllum*, da família Berberidaceae. Essas duas substâncias fazem parte do arsenal empregado contra os linfomas malignos, leucemia linfoblástica aguda, de alto risco, em adultos e crianças; neoplasias do aparelho urinário, tumores malignos intracranianos, em especial, o glioblastoma e o ependimoma (BRANDÃO et al, 2010).

Outra substância anticancerígena descoberta a partir de produtos naturais foi a camptotecina. Alcaloide isolado de *Camptotheca acuminata*, árvore ornamental da China. Encorajado por estes achados, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizaram um *screening* para detectar novas substâncias bioativas de materiais vegetais contra o câncer em 35 mil árvores. O resultado mais importante deste trabalho foi a descoberta do taxol presente nas cascas da *Taxus baccata* e *Taxus brevifolia* de ocorrência natural na região do Pacífico. Atualmente, o taxol é o medicamento de reconhecida eficácia terapêutica contra câncer avançado de ovário, pele, mama, pulmão e sarcoma de Kaposi (BRANDÃO et al, 2010; PRIANTE et al, 2012).

Apesar do histórico de descobertas apontar para a flora exótica, as espécies pertencentes à flora brasileira também possuem potencial imensurável, contudo ainda não explorado (BRAZ FILHO, 2010). Espécies do gênero *Annona* (Anonaceae) pertencente à flora brasileira, contém acetogenina. Estudos com esta substância mostraram um poder terapêutico mais forte do que o do taxol (CORTES et al, 2014

Outras substâncias naturais, como a eleuterobina, podem ser até 100 vezes mais potentes do que o taxol. Estudos que objetivam encontrar novas fontes de substâncias anticâncer são prementes (SOUZA, 2004). A maior parte das pesquisas de medicamentos contra o câncer foi direcionada aos produtos naturais nos trinta anos compreendidos entre 1981 a 2010 (NEWMAN; CRAGG, 2010).

### 1.1 Fisiopatologia do câncer

O câncer é uma desordem no sistema de replicação celular que promove a proliferação exacerbada de células anormais em sua forma, metabolismo e função. Essas células driblam os mecanismos de morte celular programada, formam aglomerados celulares denominados tumores e se perpetuam. Podem atingir a malignidade ao adquirir capacidade para formar metástases com consequências drásticas para todo o organismo (ALBERTS et al, 2010).

Esta patologia promove angiogênese e altera a permeabilidade do endotélio vascular com fenestrações de 5 a 10nm nos tecidos normais até 780nm em tecidos neoplásicos. Objetiva sequestrar grandes quantidades de oxigênio e nutrientes com prejuízo para os tecidos normais (POMPILHO; BORGES; MIGUEL, 2013). Entretanto, o tumor pode apresenta adaptação metabólica frente à escassez destes nutrientes, tornando-se resistente (MACHADO et al, 2010).

No processo de proliferação celular desordenada estão envolvidos pró-oncogenes, genes supressores de tumor e proteínas específicas. A progressão do ciclo celular depende da formação de complexos entre as proteínas ciclinas e quinases dependentes de ciclinas. Por outro lado, a inibição do ciclo necessita da ligação competitiva de quinases dependentes de ciclina à proteína p16 para a supressão oncogênica. Todavia, a metilação do gene p16 pode inativar sua atividade regulatória, restando à quinase ligar-se à ciclina D1. A formação deste complexo proteico induzirá a célula a passar da fase G1 à fase S, acelerando a multiplicação celular (GUERRA et al, 2005).

Dentre os fatores que contribuem para a oncogênese estão a exposição aos raios ultravioleta, alimentação pobre em frutas e verduras, estilo de vida, e contato com produtos químicos, inclusive álcool e cigarro, estando diretamente relacionados com a gravidade e evolução da doença (PAPA et al, 2013).

O consumo de álcool está envolvido na base carcinogênica da cavidade oral devido a sua conversão em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase e o acúmulo deste no epitélio bucal. A enzima aldeído desidrogenase, que faria a conversão do acetaldeído em acetato, para a biotransformação em energia, apresenta-se hipoativa na boca favorecendo a ação tóxica do acetaldeído sobre a dupla fita de DNA, promovendo a sua quebra nas células da mucosa bucal. Uma vez rompida, a dupla fita pode ligar-se a diferentes moléculas iniciando a cancerização. Associado a isso, o álcool modifica a seletividade das membranas celulares e facilita a entrada de substâncias cancerígenas provenientes da fumaça de cigarros (CARRAD et al, 2008).

A má higiene oral também propicia o surgimento do câncer bucal por permitir que metabolitos tóxicos provenientes de bactérias presentes na boca permaneçam maior período agindo sobre as células do revestimento da cavidade oral (SANTOS et al, 2009).

Dentre os sinais e sintomas do câncer de boca os mais comuns são o sangramento gengival, amolecimento dentário, áreas hiperpigmentadas na boca com superfície macular ou ulcerativa, bordas irregulares e lesões satélites, dor local e aftas persistentes. Contudo, pode desenvolver-se de forma assintomática tornando tardio o diagnóstico e mau o prognóstico pela agressividade já alcançada (BRENER et al, 2007).

## 1.2 Potencial citotóxico da família Fabaceae

A família Fabaceae é de ampla ocorrência na Amazônia (RODRIGUES; DUARTE-ALMEIDA; PIRES, 2010). Nesta família, o gênero *Inga* é o mais representativo na Reserva Florestal Adolpho Ducke quanto ao número de espécies catalogadas (RIBEIRO et al, 1999). Evidências arqueológicas apontam para a existência do gênero *Inga* desde o período Cretáceo (POSSETTE; RODRIGUES, 2010). Sua ocorrência atual é exclusiva em climas tropicais. Das 140 espécies brasileiras catalogadas, 75 são típicas da Amazônia, todavia são pouco estudadas (MIRANDA et al, 2013).

Os séculos de evolução possibilitaram ao gênero *Inga* adaptações anatômicas e morfológicas em algumas espécies propiciando ampla distribuição em terrenos



alagadiços, várzeas e terra firme (SCHULZ et al, 2014). Seus frutos são comestíveis (SILVA et al, 2012) e medem até um metro de comprimento (SILVA; GARCIA, 2009) com saponinas, esteroides, triterpenos e elevado teor de inibidores de tripsina nas suas sementes (CALDERON et al, 2010; NAZARÉ et al, 2014).

Neste gênero já foram identificados polifenóis, quercetina, proantocianidinas e galotaninos. Também já foi comprovada atividade antioxidante importante para *Inga edulis* (DIAS; SOUZA; ROGEZ, 2010). O extrato hexano das folhas da espécie *Inga alba* apresentou 100% de citotoxicidade para *Artemia salina* (OSORIO et al, 2012). Extratos em metanol de *Inga edulis*, possuem ácido gálico, catequina e epicatequina, conferindo à planta atividade antioxidante, antiinflamatória e antiproliferativa contra células tumorais (POMPEU et al, 2012).

Já os extratos etanol da raiz de *Inga laurina* W. apresentaram potencial inibitório de 80% sobre a germinação de *Panicum maximum* em testes de rastreamento de atividade citotóxica (KUMAR et al, 2010). As cascas e frutos de *I. laurina* apresentam fitoquímica semelhante com quantidade considerável de fenóis, saponinas e elevada concentração de triterpenos (SILVA et al, 2013).

O gênero *Enterolobium* pertence à tribo Ingea, sendo o Brasil o seu provável centro de dispersão. Apresenta espécies pouco exigentes quanto às características do solo. Mostra grande adaptabilidade a microambientes diversos (LIMA; BORGHETTI; SOUZA, 1997). Possui glicosídeos cianogênicos termolábeis, taninos, catequinas e flavonoides (FONSECA et al, 2014).

A algumas espécies do gênero tem sido atribuída toxicidade elevada quando consumida por animais de pequeno, médio e grande porte provocando abortos em 100% dos animais prenhes. Já foram isoladas deste gênero as saponinas triterpênicas denominadas enterolosaponinas e contortosiliosides, de elevada toxidez para linfoma murinho (ARÉVALO et al, 2008).

Para a espécie *Enterolobium cyclocarpum* está bem estabelecida a atividade repelente contra insetos, não microbicida, porém bacteriostática para *Klebsiella pneumoniae* e não tóxica contra *Artemia salina*. Modificações na estrutura química de seus componentes já foram realizadas e possibilitaram o aumento no rendimento e atividade microbicida (BLANCO; ALFARO, 2014). Nesta espécie também já foram isolados

inibidores de tripsina, ácido cianídrico e outros fatores antinutricionais que no seu conjunto resultam em ação antitumoral (ARÉVALO et al, 2008).

Em relação ao *Enterolobium schomburgkii*, uma árvore que atinge 50 metros de altura, natural da Amazônia, conhecido como orelha de macaco, possui interesse comercial e ambiental, podendo essa espécie ser utilizada em recuperação de áreas degradadas (RAMOS; FERRAZ, 2008). As análises fitoquímicas revelaram a possibilidade da presença de taninos, catequinas e flavonoides (FONSECA et al, 2014).

O gênero *Macrolobium* é formado por cerca de 80 espécies distribuídas na América Central e América do Sul (PASTANA; XAVIER JUNIOR, 2012). Ocorre em áreas alagáveis do Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela, especialmente nas áreas de várzeas da Amazônia. Os períodos sucessivos de alagação formam anéis na madeira que lhes conferem aspecto característico e mostra relação com os fatores climáticos do fenômeno El Niño (STADTLER et al, 2006). Neste microambiente são encontradas exemplares deste gênero de até 500 anos de idade (SCHONGART et al, 2005). Apesar dessas características, podem ser encontradas também em áreas de platôs baixos e relevo ondulado de solo amarelo, arenoso e aluminizados, inclusive nas savanas amapaenses (SILVA; COSTA NETO; SOARES, 2015).

Existem poucas pesquisas sobre o gênero *Macrolobium*, entretanto, já se revela com enorme potencial farmacológico tendo em vista as classes de substâncias químicas já isoladas. Foram encontrados em óleos deste gênero o ácido palmítico, ácido linoleico, ácido eicosanóico, docosanóico e tetracosanóico, ácido mirístico e  $\gamma$ -sitosterol (BEHRENS et al, 2006).

Para a espécie *Macrolobium microcalyx* não foi encontrado nenhum trabalho, aguçando a curiosidade científica em relação ao projeto proposto. Pois, estudos com espécies pouco conhecidas são fundamentais para a descoberta de propriedades químicas e biotecnológicas, principalmente com famílias e gêneros com amplo histórico de substâncias químicas e funções biológicas já identificadas (BARBOSA et al, 2006).

### 1.3 Potencial anticâncer da família Apocynaceae

A família Apocynaceae pertence à ordem Gentiales, subclasse Asteridae, sendo considerada como espécies dicotiledôneas bem evoluídas e geralmente possuem látex. Contém de 3700 a 5100 espécies em 250 a 550 gêneros, mais frequentes em regiões

tropicais. O Brasil possui mais de 400 espécies distribuídas em 41 gêneros, dos quais, 32 são encontrados apenas na Amazônia, com aplicações medicinais diversas (GOMES et al, 2010).

Do gênero *Aspidosperma* já foram isolados alcaloides indólicos que justificam seu emprego popular contra a malária. Este gênero apresenta mais de 200 alcaloides. Alguns, com atividade antimalárica que se compara a atividade da cloroquina e atividades antimicrobiana, antileishmania e antitumoral nas folhas, caules e raízes da planta. São frequentemente isolados a partir de espécies como: *A. gilbertii*, *A. nigricans*, *A. excelsum*, *A. australe*, *A. dasycarpon*, *A. eburneum*, *A. formosanum*, *A. gomezianum*, *A. multiflorum*, *A. olivaceum*, e *A. parvifolium*. Os alcaloides elipticina e N-metiltetra-hidroelipticina são encontrados em *A. vargasii* e a aspidocarpina encontrada em *Aspidosperma desmanthum* com propriedades antitumorais (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010; DOLABELA et al, 2012).

*Himatanthus sucuuba* é de ampla ocorrência na Amazônia (FERREIRA et al, 2007). É empregada pela medicina popular como antimicrobiana, antifúngica, vermífuga e para o tratamento de câncer (AMARAL et al, 2007). Sua ação fungitóxica foi estabelecida em cerca de cinco vezes superior ao do antimicrobiano Nistatina®. Apresenta nos seus constituintes químicos uma mistura de esterres triterpenicos (SILVA et al, 1998).

A espécie *H. sucuuba* possui atividade antiinflamatória similar a indometacina associada a inibição de citocinas pro-inflamatorias (LUCETTI et al, 2010). Ela possui iridoide plumerídeo como componente majoritário das cascas, representando cerca de 79% dos constituintes (MORAGAS et al, 2005; WALTEMBERGE et al, 2012). Isso confere à espécie potente ação inibitória do fator de necrose tumoral e dessa forma, intercepta o processo inflamatório comum a várias doenças (ATANASOV et al, 2012).

Apesar disso, as informações e aplicações de *H. sucuuba* são contraditórias. Pois, em algumas regiões ela é utilizada como remédio para: cicatrização de feridas, afrodisíaca, alucinógena e contra o câncer. Contudo, em outros locais é considerada como uma espécie tóxica (WOOD et al, 2011).

Da fração hexânica desta espécie já foram isolados os iridoides, plumericina e isoplumericina, que agem sinergicamente produzindo excelente atividade citotóxica, provavelmente, por inibição da topoisomerase II em leveduras (SILVA et al, 2010).

As topoisomerases são enzimas responsáveis por aliviar a tensão torsional da dupla hélice de DNA e se dividem em topoisomerase I e II. A primeira possui uma subdivisão em tipo IA e IB. As do tipo IA, rompem uma fita do DNA com uma ligação covalente 5'-fosfotirosil e relaxam o DNA por permitirem a passagem de uma fita sobre a outra. Enquanto as do tipo IB, liga-se à extremidade 3' e relaxa o DNA por torção controlada. Já a topoisomerase II, promove a quebra e o reparo das duas fitas de DNA momentaneamente. Quando esta enzima é bloqueada, o dano permanece por um tempo maior fazendo com que a célula desencadeie apoptose. Este mecanismo também é o responsável pela potente ação de quimioterápicos como etoposídeo e teniposídeo (BRANDÃO; NASCIMENTO; DAVID, 2010).

A streptonigrina é um medicamento disponível no mercado com mecanismo de ação semelhante de inibição da enzima topoisomerase II (BOLZÁN; BIANCHI, 2001). Iridoides glicosilados com elevada atividade biológica também já foram identificados do látex de *H. sucuuba* (BARRETO et al, 2007), sendo referendado como material promissor para novas pesquisas (OLIVEIRA; AMARAL; SILVA, 2011).

O gênero *Geissospermum* também é frequente na floresta amazônica, atrai a atenção de pesquisas em várias áreas da ciência (FAUSTIN et al, 2015) e apresenta substâncias de grande aplicação para futuros fármacos, ao que parece, sem efeitos tóxicos. Este gênero apresenta atividade anticolinesterásica importante (LIMA et al, 2009). Tem sido utilizado popularmente para o tratamento de várias doenças, constituindo-se fonte de alcaloides (REINA et al, 2012) presentes em medicamentos empregados rotineiramente para o tratamento de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e câncer de próstata. Mostrou-se capaz de impedir a metástese de câncer de próstata em casos resistentes *in vitro* (CHANG et al, 2014).

As espécies mais conhecidas deste gênero são: *G. argenteum*, *G. fuscum*, *G. laeve*, *G. reticulatum*, *G. sericeum*, e *G. urceolatum*. A espécie *G. argenteum* possui atividade antimicrobiana bem estabelecida contra microrganismos multirresistentes e *G. reticulatum* apresenta atividade contra *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. Já foi demonstrada excelente atividade antimalárica para *G. laeve* (MUÑOZ et al, 2000), além

de sua importância na redução do antígeno prostático específico, marcador biológico do câncer de próstata. Associado a isso, esta espécie também apresenta excelente sinergismo quando administrada conjuntamente com o medicamento carboplatina (CAMARGO et al, 2013), quimioterápico de primeira linha utilizado contra o câncer de colo uterino (GARCES et al, 2013).

#### 1.4 A família Lauraceae

A família Lauraceae possui distribuição pantropical com presença no norte da América do Sul, sudoeste da Ásia e Madagascar (ALVES; FRISON; LEHN, 2012). Revela-se economicamente importante e possui gêneros amplamente utilizados na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, outros empregados na elaboração de fragrâncias pela indústria cosmética e na indústria alimentícia. No total, perfazem cerca de 50 gêneros com aproximadamente 2500 espécies (GARCIA et al, 2012).

No Brasil, ocorrem 19 gêneros estando o *Mezilaurus* entre os mais estudados (ORLANDO; SILVA; PARREIRA, 2006). Dentre os constituintes destacam-se os monoterpenos, sesquiterpenos e benzenoides. O gênero *Mezilaurus* é encontrado na região amazônica, em especial em áreas próximas de rios. Dados sobre este gênero dificultam a ampliação do emprego em outros segmentos de interesse científico, apesar do seu enorme potencial já demonstrado em áreas como a construção civil, movelaria e indústria farmacêutica (SILVA; PASTORE; PASTORE JUNIOR, 2007).

O gênero *Endlicheria* tem despertado o interesse de pesquisadores há muito tempo. Estudos anteriores relatam o isolamento de lignanas e neolignanas, cumarinas e terpenos (SUAREZ, 1978) neste gênero, o que o inclui entre aqueles que podem apresentar atividade antitumoral (PARREIRA et al, 2006). Na América do Sul, encontram-se cerca de 60 espécies deste gênero em diferentes biomas como cerrado, pantanal e mata atlântica (ALVES; FRISON; LEHN, 2012).

Apresenta constituição química variável pela sazonalidade das chuvas. Foram observadas quantidades expressivas de monoterpenos pineno e felandreno no período chuvoso, enquanto que em períodos de estiagem os sesquiterpenos cariofileno e selineno são os mais frequentes (FERREIRA; AMARAL; SILVA, 2014). A espécie *Endlicheria bracteolata* possui características químicas favoráveis ao transporte intracelular de seus

metabólitos, tendo sido comprovada a sua promissora ação contra parasitas intracelulares obrigatórios. Já houve comprovação da atividade antitumoral para o gênero *Endlicheria* (WEN; KOZLOWSKI; MCLAUGHLIN, 1991). Apesar disso, não são encontrados dados literários sobre a citotoxicidade de *Endlicheria bracteolata* contra células tumorais humanas.

### 1.5 Família Melastomaceae

Esta família é formada por 166 gêneros e cerca de 4500 espécies distribuídas especialmente nas regiões tropicais. Podem crescer em solos pobres em nutrientes, ácidos, ricos em alumínio, regiões húmidas, frias e em savanas. O gênero *Bellucia* faz parte desta família e seu potencial químico para a utilização pelo homem está comprovado pela presença de polifenóis, flavonóis e antocianinas. É um gênero de valor econômico (PAULA, 2003), eficiente quanto à acumulação de nutrientes (SILVA et al, 2006), chegando algumas espécies a serem consideradas invasoras. Apresenta atividade antiinflamatória e alelopática moderada em algumas espécies revelando o potencial citotóxico dos seus metabólitos secundários (MOURA et al, 2014).

Espécies do gênero *Bellucia* são utilizadas pela medicina tradicional dos povos ribeirinhos no estado do Pará contra acidente ofídico. Foram identificados taninos e flavonoides nesta espécie e comprovada a sua ação anti-hemorrágica e antiinflamatória por agir inibindo a enzima Fosfolipase A<sub>2</sub>. Entretanto, poucos estudos estão disponíveis na literatura atual sobre este gênero (MOURA et al, 2014).

### 1.6 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma das mais representativas na flora brasileira compreendendo cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de ocorrência especialmente em regiões tropicais. Apesar disso, poucos gêneros têm sido estudados, revelando pequena variabilidade genética em contraste com a diversidade morfológica, especificamente no gênero *Myrciaria* (VILELA et al, 2012). Nele foram isoladas substâncias como ácido ascórbico, antocianidinas, carotenoides e substâncias fenólicas (OLIVEIRA et al, 2013).

Substâncias com atividade antioxidante, antiinflamatória, hipoglicêmica, hipocolesterolêmica, antifúngica, antiproliferativa, antibacteriana, anticolinesterásica, antiplasmódica e gastroprotetora já foram identificadas no gênero *Myrciaria*. Tais achados o colocam em patamar privilegiado para o desenvolvimento de pesquisas nas

quais se pretendam encontrar novos usos e aplicações quando se trata de química de produtos naturais (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

A espécie *Myrciaria dubia* é uma planta amazônica que possui elevado teor de ácido ascórbico e potente ação antioxidante, antimutagênica e antígenotóxica eliminando radicais livres. Mostrou-se protetora contra danos induzidos por brometo de potássio no DNA de cobaias evidenciando que altas concentrações de ácido ascórbico intracelular podem reduzir as mutações causadas pelo estresse oxidativo provocado pelo brometo de potássio (RAFAEL et al, 2010).

*Plinia cauliflora*, *Myrciaria cauliflora*, *Myrtus cauliflora*, *Eugenia cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria tenella* e *Myrciaria trunciflora* são sinônimos científicos para uma mesma espécie arbórea de folhagem simples. Pode atingir 15 metros de altura, cujas flores e frutos emergem junto ao tronco duas ou mais vezes a cada ano, ricos em antocianinas (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014). É utilizada pela medicina tradicional contra problemas intestinais e dermatológicos, além de enriquecer a alimentação humana. Em sua constituição química verificou-se a presença de fenóis, taninos, alcaloides, esteroides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides (MOREIRA et al, 2010).

Já foi identificada atividade antimicrobiana da espécie *Myrciaria cauliflora* em bactérias do biofilme dental (MACEDO-COSTA et al, 2009) e em *Escherichia coli* (BONA et al, 2014). Também, ação antioxidante promovida por compostos fenólicos presentes nas cascas dos seus frutos revelando amplas possibilidades de aplicações pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (PORFIRIO et al, 2014).

Os alcaloides e saponinas isoladas desta espécie também foram encontrados nas cascas dos frutos. A primeira classe é constituída por substâncias complexas, que proporcionam propriedades químicas relacionadas à elevada toxicidade e ação farmacológica notável. A segunda, é constituída de substâncias capazes de formar ligações com esteroides, proteínas e membranas celulares, podendo alterar sua conformação e função, bem como destruí-la. Por outro lado, a citotoxicidade do extrato das folhas desta espécie permanece controversa (CHAVASCO et al, 2014).

Os frutos de *Myrciaria vexator* possuem substâncias com atividade expressiva contra a doença pulmonar obstrutiva crônica, por inibir a ação proteolítica do processo

inflamatório subjacente à doença e neutralizar espécies reativas de oxigênio exacerbadoras da patologia. A análise química demonstrou a ocorrência de ácido elágico, cianidin-3-*O*-glicosídeo, delphinidin-3-*O*-glicosídeo, galactosídeo cianidina, arabinose cianidina, quercetin-3-*O*-glicosídeo, quercetina e rutina (DASTMALCHI et al, 2012). Estas substâncias ocorrem em outras espécies de *Myrciaria* e possuem valor importante para a saúde humana, uma vez que exercem função antioxidante e antiinflamatória (WU et al, 2012).

Entretanto, a similaridade morfológica entre os frutos de *Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria vexator*, associado à sinonímia, é fator de confusão para a coleta do verdadeiro espécime que se deseja estudar, podendo, este aspecto, estar no nascedouro da controvérsia. O marcador químico delphinidin-3-*O*-glicosídeo, na primeira e cianidin-3-*O*-glicosídeo conjuntamente ao delphinidin-3-*O*-glicosídeo na segunda, podem ser de grande valia para guiar o pesquisador, pelo menos em relação a estas duas espécies (WU et al, 2013).

### 1.7 Família Malvaceae

A família Malvaceae possui cerca de 119 gêneros e 1500 espécies, amplamente distribuídas em todo o mundo com representantes de considerável valor econômico. A espécie *Theobroma cacao* é uma delas (YANG et al, 2011). Endêmica da América do Sul, é cultivada neste continente há cerca de 3 mil anos. Alguns genes de resistência a doenças são mais antigos do que a divergência entre angiospermas e gimnospermas (ARAÚJO et al, 2011).

A composição química de suas sementes inclui triglicerídeos, ácidos graxos, substâncias polifenólicas, taninos condensados, teobromina, catequina e epicatequina (PEREIRA-CARO et al, 2013), cafeína, adenina, guanina, além de teofilina (OLIVEIRA, 2014). Apresentou importante atividade antioxidante e antienvelhecimento em ratos submetidos à exposição ultravioleta (SILVA et al, 2013). A suplementação de extrato de cacau para ratos diabéticos teve efeito de curto prazo sobre o controle da glicose pós-prandial por inibir a enzima  $\alpha$ -amilase. Provocou a diminuição de biomarcadores de estresse pela ação de seus polifenóis e metilxantinas (SARMADI et al, 2012).

Entretanto, os estudos realizados com a espécie *Theobroma cacao* têm privilegiado a identificação de substâncias no fruto e nas sementes (AFOAKWA et al,



2013) em detrimento de outras partes da planta, motivando a escolha das folhas para esta análise.

### 1.8 Potencial da família Annonaceae

A família Annonaceae possui cerca de 112 gêneros e 2.440 espécies, com distribuição pantropical. No Brasil ocorrem 29 gêneros e 386 espécies, predominantemente na Amazônia e em menor quantidade na mata atlântica (DUTRA; SALIMENA; MENINI NETO, 2012). Essa família botânica têm demonstrado ser detentora de várias espécies produtoras de metabólitos com uma gama apreciável de atividades farmacológicas, por exemplo, bioinseticida, vermicida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, antimalárica, e antitumoral com elevada citotoxicidade (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

A utilização de espécies desta família na medicina tradicional, provavelmente, decorre dos efeitos desencadeados pelos seus constituintes químicos. A maior parte deles é formada por alcaloides, acetogeninas, flavonoides, esteroides, taninos e triterpenos. A acetogenina é uma classe de substâncias exclusivas dessa família apresentando descrição crescente de estruturas e funções biológicas. Dentre elas, a antifilariose, antitripanossoma, anti-inflamatória e antineoplásica atribuídas ao pilocarpol (SILVA et al, 2015).

O gênero *Bocageopsis* pertence a esta família (MASS; WESTRA; VERMEER, 2007). Poucos estudos têm sido realizados com este gênero apesar do seu elevado potencial anti-inflamatório já identificado em estudos anteriores. Na espécie *Bocageopsis pleiosperma* foi encontrado  $\beta$ -bisaboleno em todas as partes da planta, cuja maior concentração foi constatada na parte foliar (SOARES et al, 2015).

### 1.9 A família Astraceae

A família Astraceae compreende aproximadamente 117 gêneros e 4000 espécies que vivem em ambientes diversificados em terra firme, aquáticos ou como epífitas. Existem vestígios arqueológicos de sua existência desde o período Cretáceo (GALLEGO et al, 2014). A versatilidade e resistência dessas espécies permite que sejam encontradas desde os ambientes já citados até em montanhas de 3.000 metros de altitude (LINGÁN, 2006).

Algumas espécies desta família, sobretudo do gênero *Colocasia* apresentam estreita semelhança (PEDRALLI et al, 2002). O grande problema é que algumas dessas espécies são altamente tóxicas (MARTINS; GERON, 2014), enquanto outras são utilizadas na alimentação humana (DÍAZ et al, 2011) e representam importância socioeconômica e cultural em países como Nigéria e China (OSAWARU; OGWU, 2014).

Da espécie *Colocasia esculenta* já foram isolados taninos, saponinas, alcaloides, e flavonoides com atividade hipoglicemiante e hipocolesterolêmica (ELEAZU; ELEAZU; IROAGANACHI, 2015). A espécie *Colocasia antiquorum* é utilizada na África do Sul contra reumatismo e picada de cobra (FAWOLE et al, 2012). No Brasil, apresenta registros de notificação na Agência Nacional de Vigilância Sanitária por intoxicação humana (BALBINO; DIAS, 2010). Por outro lado, representa importante fonte de estudos já tendo sido isolado o monoglicerídeo (2'S)-1-O-9-Oxo-(10E, 12E)-octadecadienoila glicerol, com atividade inibitória contra a biosíntese de melanina e pode estar relacionado a diferentes processos biológicos (ZHU; WU, 2014).

A melanina é sintetizada por células especializadas denominadas melanócitos por meio de reações enzimáticas que convertem a tirosina em melanina por meio da enzima tirosinase. Este processo está alterado em certos tipos de câncer, constituindo-se em marcador biológico de câncer (ALBERTS et al, 2010).

#### 1.10 A atividade antioxidante

A atividade antioxidante se faz importante para a prevenção do câncer, pois, impede danos no DNA precursores de câncer. Estas lesões são causadas pelo estresse oxidativo, que é um balanço desfavorável entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e a neutralização destes radicais. Quimicamente, os radicais livres podem ser definidos como portadores de um ou mais elétrons desemparelhados e por isso, altamente reativos e instáveis. Por esta razão, precisam estabelecer ligação química com outras substâncias para se estabilizarem (SANTOS; CRUZ, 2001).

Neste processo se combinam com as bases nucleotídicas do DNA originando as lesões precursoras do câncer. Entretanto, a relação entre antioxidantes e câncer é bem mais abrangente, uma vez que o mecanismo de ação dos antioxidantes interfere na produção dos radicais livres, na neutralização dos que são produzidos e no reparo dos danos que eles causam (LOPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Aliado a isso, os antioxidantes também podem minimizar os efeitos tóxicos produzidos pelos fármacos antineoplásicos. Potencializam o mecanismo de ação dos antitumorais, produzem maior regressão do tumor e aumentam a sobrevida do paciente com maior qualidade de vida (SANTOS; CRUZ, 2001). Portanto, o medicamento ideal contra o câncer deveria combinar os mecanismos da citotoxicidade com os efeitos positivos dos antioxidantes presentes nos produtos naturais. Contudo, apenas uma em cada 5 mil substâncias testadas é convertida em medicamento (BRANDÃO et al, 2010). O principal desafio é encontrar aquela que provoque efeito citotóxico seletivo (CASTRO et al, 2007), que apresente boa solubilidade, carga elétrica favorável ao seu transporte para o meio intracelular e não induza à resistência tumoral (FOREZI, 2011).

A possibilidade da descoberta desta ação combinada nos produtos naturais é proveniente da presença de substâncias fenólicas amplamente distribuídas na natureza, as quais já são conhecidas pelo seu elevado poder antioxidante. Essas moléculas possuem anel aromático com um ou mais grupos hidroxílicos e apresentam estrutura química variável, o que lhes confere propriedades biológicas multifuncionais (ANGELO; JORGE, 2007).

As substâncias fenólicas são essenciais para o crescimento dos vegetais, havendo cerca de cinco mil já descritas. Dentre elas destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os fenóis simples, as cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Podem apresentar-se na forma simples ou com elevado grau de polimerização associados a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007).

Dessa forma, populações que baseiam sua dieta alimentar em vegetais podem adquirir estes compostos antioxidantes na alimentação (GANDRA et al, 2013). Este fato tem propiciado impacto epidemiológico de câncer menor do que naquelas populações com outros hábitos alimentares. Muitos dessas substâncias apresentam maior efeito na sua forma combinada *in natura* do que seus componentes isolados (AGGARWAL et al, 2013).

No entanto, já foram identificadas em plantas substâncias fenólicas capazes de reduzir a incidência tumoral e o tamanho do tumor, bem como a sua agressividade, especialmente em câncer de boca, considerado o mais frequente da cabeça e pescoço e de pior prognóstico (BALDASQUÍN, 2013).

Isso acontece porque os antioxidantes agem por três mecanismos distintos sobre o câncer, a saber: a) impedem a formação do radical livre quando o citocromo C, presente na membrana mitocondrial interna, transporta os elétrons na respiração celular; b) uma vez formados os radicais livres, os antioxidantes os neutralizam impedindo a sua ligação e subsequentes lesões precursoras de câncer ao DNA celular; c) induzindo a ação da enzima topoisomerase para o reparo do DNA lesionado por algum radical livre que tenha conseguido driblar os dois mecanismos de defesa anteriores. Emerge daí a relação dos antioxidantes com o câncer, seja no seu aspecto preventivo ou na doença já instalada (LOPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Neste sentido, avaliar a capacidade de neutralização destes radicais livres formados é fundamental para correlacionar o efeito antioxidante deste objeto de estudo com a sua citotoxicidade.

#### 1.11 *Artemia salina* - o organismo teste para citotoxicidade

*Artemia salina* é um artópode muito primitivo com cerca de 10 milhões de anos. Habita águas com elevado teor de salinidade, originária do mediterrâneo, mas pode ser encontrada em outros continentes. Pode tolerar, deficiência de oxigênio, soluções de permanganato de potássio e nitrato de prata, todavia é sensível ao iodo. O macho adulto mede de 8-10mm de comprimento e a fêmea de 10-12mm. Os adultos têm três olhos e 11 pares de pernas. Podem ser ovíparos e ovovivíparos, segundo as condições ambientais. Seus ovos permanecem viáveis por anos até encontrar condições favoráveis para eclodir nauplios em torno de 24 a 36 horas, atingindo a fase adulta em três semanas. São frequentemente utilizados para testes de citotoxicidade de produtos químicos pela sua elevada resiliência. Pertence ao reino Animalia; filo Arthropoda; subfilo Crustacea; classe Branchiopoda; ordem Anostraca; família Artemide; gênero *Artemia*; espécie *Artemia salina* (ATES et al, 2015).

Esta espécie tem sido utilizada como eficiente método para avaliar a impregnação de alumínio bem como seus efeitos sobre organismos vivos. Mostrou-se eficaz na avaliação de mutagenicidade, toxicidade e possíveis danos induzidos pelo sulfato de cobre, sendo recomendado para futuras análises envolvendo a avaliação de citotoxicidade de extratos vegetais (LEITE et al, 2015).

O ensaio de citotoxicidade com *A. salina* é considerado simples, eficiente e essencial como bioensaio preliminar além de ser um método que permite adaptações, é rápido e de baixo custo. Estas características popularizaram a sua utilização

principalmente a partir de 1990, quando passou a ser empregado para verificar a toxicidade da exposição a metais pesados, algas marinhas, toxinas fúngicas, materiais dentários, pesticidas, novos fármacos antiespasmódicos, antimaláricos e rastrear citotoxicidade em células tumorais humanas (RAJABI; RAMAZANI; NAJI, 2015). A citotoxicidade não difere estatisticamente de forma significativa quando analisada em *A. salina* e em células tumorais (MESARIC et al, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

Ao câncer é atribuído o título de imperador de todos os males, seja pela sua elevada frequência, pelo seu efeito avassalador na vida do doente ou pelas perdas familiares, sociais, emocionais e econômicas que causa. Apresenta variadas formas de acordo com o órgão comprometido podendo metastizar para outros locais e originar novos tumores. Pode ser considerada também doença infecciosa pela presença de vírus na base oncogênica de cânceres específicos. No entanto, na maioria dos casos relaciona-se aos fatores genéticos e epigenéticos distintos dificultando o seu controle (KETTELHUT; MODENA, 2008).

Atualmente, o tratamento disponível produz efeitos colaterais (TANGERINA; SANNOMIYA; VILEGAS, 2011) como teratogenicidade (KETTELHUT; MODENA, 2008; MONTEIRO et al, 2013a), problemas bucais, infertilidade (OLIVEIRA; OSELAME; NEVES, 2014), cardiotoxicidade, que no seu conjunto, tornam quase inaplicáveis em casos específicos (SANTOS, 2013). Esses efeitos decorrem da citotoxicidade indiscriminada dos medicamentos, pois matam células cancerígenas, mas também aquelas que são saudáveis com consequências drásticas para todo o organismo (POMPILHO; BORGES; MIGUEL, 2013)

Apesar dos fortes efeitos indesejáveis da quimioterapia, ainda pode haver recorrência tumoral (TANAKA; TORRES; TENÓRIO, 2012) e um gasto de até 3,9 milhões de reais ao ano para evitá-la em um único paciente (MARTINS; YAMAMOTO, 2008). O elevado custo do tratamento tem resultado em ações judiciais da ordem de 500 milhões de reais contra o governo federal (LOPES et al, 2010).

Contudo, há variabilidade de resposta individual e o sucesso do tratamento atualmente disponível não é garantido (MONTEIRO et al, 2013b). Por essas razões, torna-se premente a busca de novos agentes farmacológicos para diminuir a resistência tumoral, a mortalidade e as sequelas físicas, sociais e emocionais que causa (LIMA et al, 2010).

O estigma produzido por esta doença tem levado a um grande esforço científico mundial, com destaque para os Estados Unidos (MORAIS; SIMÕES; PESSOA, 2012), na busca do entendimento dos fatores relacionados à oncogênese (PERON;

CAMILLOTO; VICENTINI, 2008) e a uma crescente medicalização da sociedade numa íntima relação com o lucro (SPADACIO; BARROS, 2009).

O mercado farmacêutico mundial movimentou 505 bilhões de dólares relativos ao ano de 2004 apontando para factibilidade de pesquisas com este enfoque. Pois, representa amplas possibilidades de detectar substâncias já preparadas pela natureza e que podem ser utilizadas pelo homem para tratar ou prevenir esta doença com menor custo de produção (BRAZ FILHO, 2010) e maior eficácia terapêutica (RODRIGUES; FEITOZA; FLORES, 2014).

Neste sentido, os compostos citotóxicos aliados aos antioxidantes assumem significativa relevância. Isso coloca a região Amazônica em destaque pelo potencial farmacêutico exacerbado advindo da imensa biodiversidade que possui cuja maior parte ainda é desconhecida (BRAZ FILHO, 2010).

Dessa forma, espera-se que os resultados aqui descritos possam contribuir com o conhecimento químico e farmacológico de espécies vegetais da Amazônia numa tentativa de ampliar as ferramentas de enfrentamento contra esta doença. A perspectiva investigativa deste estudo, portanto, foi a de analisar as atividades antioxidante e citotóxica em associação para apontar uma possível fonte de fitoterápicos antineoplásicos com mínimos efeitos adversos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

Analisar as atividades citotóxica e antioxidante de extratos obtidos de 20 espécies vegetais da Amazônia.

#### **3.2 Específicos:**

Obter os extratos vegetais das espécies identificadas.

Testar a atividade citotóxica das espécies selecionadas contra *Artemia salina* e células tumorais humanas.

Avaliar o potencial antioxidante dos extratos e frações das espécies selecionadas para o estudo.

Realizar análise cromatográfica dos extratos e frações ativos.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Local de estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Química de Produtos Naturais para análises químicas. Para os ensaios biológicos foram utilizados os laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambos da Universidade Federal do Amazonas.

### 4.2 Material Botânico

O material botânico selecionado para o presente projeto foi coletado na Reserva Florestal Ducke, localizada no Km 26 da Rodovia AM 010, ao norte de Manaus, sob as coordenadas geográficas 03°00'00" a 03°08'00"S e 59°52'40" a 59°52'00"W (PINTO; MORELLATO; BARBOSA, 2008). No total, foram analisadas 43 amostras de material botânico constituído conforme demonstra o quadro 1:

**Quadro 1: Descrição do material botânico em estudo**

<b>Ordem</b>	<b>Espécie utilizada</b>	<b>Parte da planta</b>
01	<i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (espécime 1)	Raiz
02	<i>A. amazonicus</i> (espécime 1)	Cascas da raiz
03	<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	Raiz
04	<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	Cascas da raiz
05	<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	Raiz
06	<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	Cascas da raiz
07	<i>Aspidosperma marcgravianum</i>	Cascas
08	<i>A. marcgravianum</i>	Folhas
09	<i>A. schultesii</i>	Cascas
10	<i>A. schultesii</i>	Folhas
11	<i>Bellucia dichotoma</i> (extrato diclorometano)	Cascas

12	<i>B. dichotoma</i> (extrato hexano)	Cascas
13	<i>B. dichotoma</i> (extrato metanol)	Cascas
14	<i>Bocageopsis multijuga</i> (extrato diclorometano)	Folhas
15	<i>Bocageopsis pleiosperma</i> (extrato diclorometano)	Folhas
16	<i>C. antiquorum</i> (coletado na montanha)	Folhas
17	<i>C. antiquorum</i> (coletado na várzea)	Folhas
18	<i>C. antiquorum</i> (coletado terra firme)	Folhas
19	<i>Couma guianensis</i>	Cascas
20	<i>C. guianensis</i>	Folhas
21	<i>Endlicheria bracteolata</i> (extrato diclorometano 1)	Folhas
22	<i>E. bracteolata</i> (extrato diclorometano 2)	Folhas
23	<i>E. bracteolata</i> (extrato hexano)	Folhas
24	<i>E. bracteolata</i> (extrato metanol 1)	Folhas
25	<i>E. bracteolata</i> (extrato metanol 2)	Folhas
26	<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Folhas
27	<i>Geissospermum argenteum</i>	Folhas
28	<i>G. argenteum</i>	Cascas
29	<i>G. urceolatum</i>	Folhas
30	<i>G. urceolatum</i>	Cascas
31	<i>Himatantus sucuuba</i>	Caule
32	<i>H. sucuuba</i>	Raiz
33	<i>Ingá chrysantha</i>	Folhas

34	<i>Ingá cordatolata</i>	Folhas
35	<i>Macrolobium microcalyx</i>	Folhas
36	<i>Mezilaurus duckei</i> (extrato hexano)	Folhas
37	<i>M. duckei</i> (extrato metanol)	Folhas
38	<i>Myrciaria cauliflora</i> (extrato diclorometano)	Folhas
39	<i>M. cauliflora</i> (extrato hexano)	Folhas
40	<i>M. cauliflora</i> (extrato metanol)	Folhas
41	<i>M. cauliflora</i> (óleo essencial)	Folhas
42	<i>M. floribunda</i> (óleo essencial)	Folhas
43	<i>Theobroma cacao</i>	Folhas

Destas 43 amostras, 23 são provenientes de trabalho prévio do grupo de pesquisa do Laboratório de Cromatografia de responsabilidade do Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva, docente da Universidade Federal do Amazonas à qual está vinculada esta pesquisa. As outras 20 foram coletadas e preparadas na vigência deste estudo.

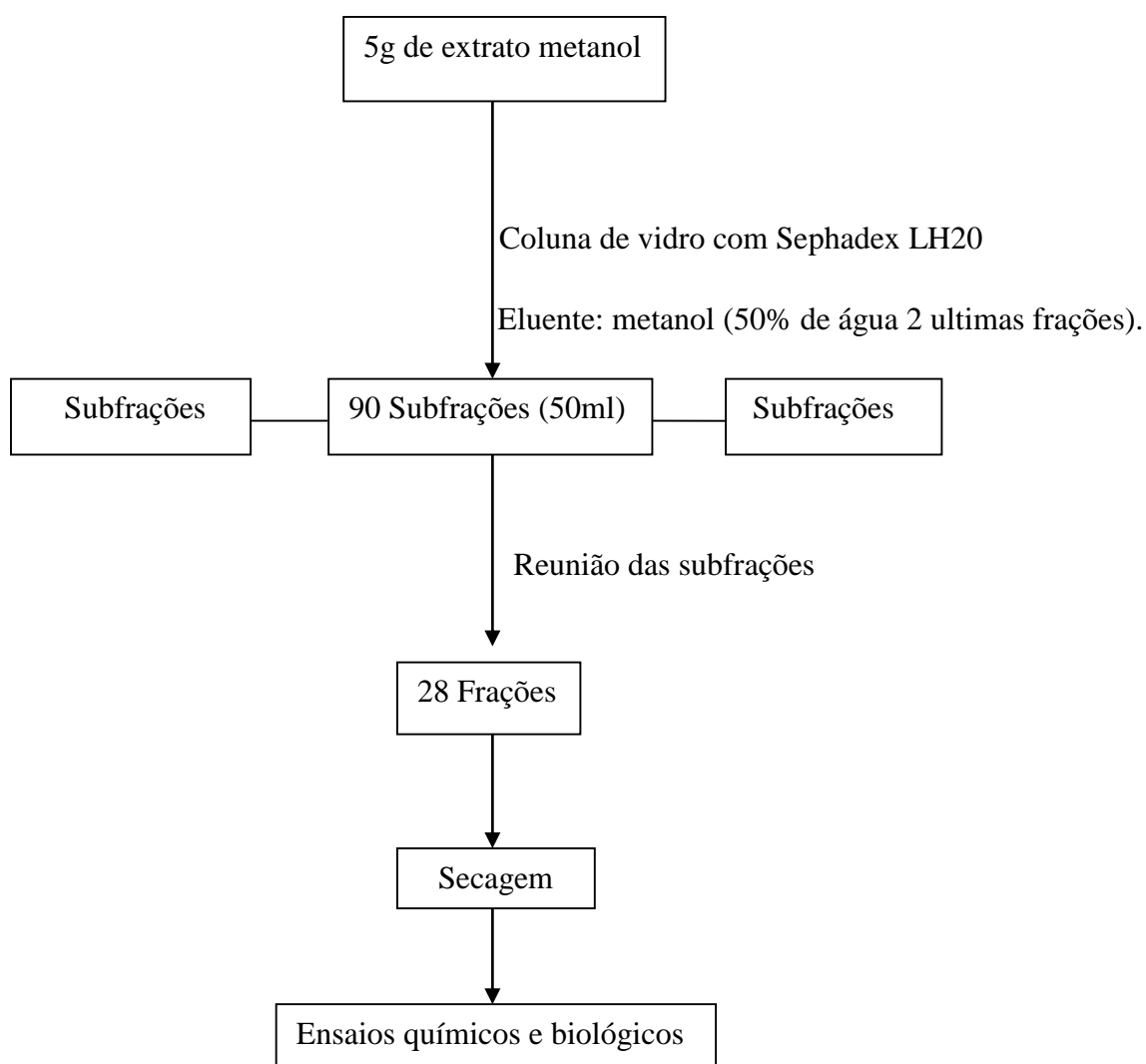
O material botânico foi submetido à secagem em ar ambiente por um período de 36 horas, após o qual foi encaminhado para a estufa de material botânico com circulação de ar e permaneceu secando a 40<sup>o</sup>C por um período de 6 horas. Após moagem, foram pesados e retirados 100g de cada amostra, sendo o restante do material mantido sob refrigeração a -6<sup>o</sup>C.

#### 4.3 Produção de extratos e frações

Inicialmente foram pesados 100g de cada amostra acondicionadas em frascos âmbar de 1 litro revestidos de papel alumínio aos quais adicionou-se metanol. Procedeu-se à maceração a frio com agitação seguindo três ciclos de 72h e rotaevaporação à 40<sup>o</sup>C com pressão reduzida ao final de cada ciclo.

Os extratos considerados promissores passaram por maceração a frio com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em três ciclos de 48h. Foram rotaevaporados à 40<sup>o</sup>C com pressão reduzida ao final de cada ciclo para concentração e posterior secagem.

Das massas obtidas, que apresentaram alguma atividade, foram pesadas cinco gramas para realizar o fracionamento com Sephadex LH20. As frações foram reunidas segundo o perfil apresentado na Cromatografia em Camada Delgada passando por secagem por período variável até a retirada dos solventes residuais, como ilustra o esquema 1:



**Esquema 1: Fracionamento cromatográfico dos extratos polares ativos.**

#### 4.4 Análises Químicas

A obtenção do perfil cromatográfico dos extratos e frações foi realizado inicialmente por meio de CCD (Cromatografia em Camada Delgada). As análises para o desenvolvimento do perfil cromatográfico foram realizadas em cromatofolhas com fase estacionária normal ou inversa, sendo as amostras aplicadas com capilares com volume

fixo ou seringas. A revelação das cromatofolhas foi realizada em lâmpada UV ou reagentes químicos, segundo as características apresentadas por cada amostra.

#### 4.5 Extração dos óleos essenciais

As folhas das espécies vegetais foram separadas manualmente e lavadas em água corrente. O material fresco (500g) foi seco em estufa de circulação a 35°C e moído. As folhas frescas/secas de cada espécie foram colocadas em um balão de fundo redondo de 5000 mL contendo água destilada (100g/1000mL). A hidrodestilação foi realizada durante 4 horas a 100° C no aparelho do tipo Clevenger. Aos óleos voláteis obtidos foi adicionado cerca 1 mg de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e após centrifugação foram armazenados em frascos de vidro âmbar, sob refrigeração.

#### 4.6 CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) – Analítica

As análises para desenvolvimento de perfil cromatográfico foram realizadas em coluna RP18. O sistema de solventes foi composto por acetonitrila e água com ácido fórmico a 0,05%. Utilizou-se o fluxo de 0,5ml/minuto iniciando o gradiente com 5% de água deionizada contendo 0,05% de ácido fórmico. Elevando até 100% de água aos 18 minutos da corrida, retornando a 60% de água e 40% de acetonitrila ao final de 20 minutos. O volume total de injeção da amostra foi de 2 $\mu$ L e os cromatogramas e respectivos espectros dos principais sinais e dos padrões isolados foram detectados pelos detectores DAD (LANÇAS, 2009).

#### 4.7 CLUE e Espectrometria de Massas

Foi empregado sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE - Shimadzu) acoplado com um espectrômetro de massa de alta resolução (Q ToF Bruker compact) controlada pela análise de dados Compass 4.2. Q ToF Bruker compact, corrida no modo ESI negativo, 4500 tensão capilar, tensão de carregamento 2000V, nebulizador em 5,5 bar, aquecedor a 220° C, gás seco a 12,0 L / min e massa de m/z 50-1500. A separação foi realizada numa coluna Shim Pack ODS III (2,0 x 100 mm, 2 $\mu$ m de partícula). O fluxo foi de 0,4 mL/min com um gradiente de ácido fórmico a 0,1% (fase A) e acetonitrila (fase B) como fases móveis. O gradiente iniciou-se com 3% até 70% da fase B em 10 min. Esta análise foi realizada pela Fiocruz no Rio de Janeiro.

#### 4.8 CG-EM (Cromatografia com fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas)

A análise dos extratos apolares foi realizada em CG-EM (Cromatografia com fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas) – da marca Shimadzu com coluna capilar (30 m × espessura de 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm), usando He como o gás de arraste (1,0 mL min<sup>-1</sup>). As temperaturas do injetor e detector foram de 230 °C e 280 °C, respectivamente.

A identificação dos componentes foi baseada na comparação entre os índices de retenção, análise do padrão de fragmentação observado no espectro de massas e dados da literatura (ADAMS, 2009) e com as informações da biblioteca do aparelho, Wiley (275). Para comparação entre os tempos de retenção com os diferentes componentes obtidos da literatura, foi utilizado o índice de retenção de Kovats, que utiliza uma série de alcanos saturados de cadeia normal (ADAMS, 2009).

#### 4.9 Toxicidade em *Artemia salina*

O ensaio de letalidade de *Artemia salina* é considerado uma ferramenta importante na determinação preliminar de toxicidade de extratos de plantas. Esse método é bem difundido nos laboratórios de Química de Produtos Naturais por ser um teste biológico rápido, reprodutível, não dispendioso, além de utilizar pouca quantidade de amostra (MEYER et al, 1982).

A solução salina foi preparada solubilizando 35,0 g de sal marinho em 1000 mL de H<sub>2</sub>O deionizada. Em seguida, os ovos de *A. salina* (10,0 mg) foram incubados na solução marinha por 24 horas sob iluminação artificial e temperatura controlada a 28 °C. Após este período, os náuplios foram separados e incubados em solução salina por mais 24 horas, nas mesmas condições descritas anteriormente, para garantir a formação do estágio larval metanáuplio.

As amostras analisadas foram preparadas em triplicata inicialmente na concentração de 500µg/mL, após o que sofreram ajustes para adequar-se ao cálculo da Concentração Letal para 50% dos indivíduos expostos. O solvente utilizado na diluição das amostras foi o dimetilsulfóxido (DMSO) ou metanol, segundo as características de polaridade de cada amostra e colocadas em tubos de ensaio. Em cada um foi adicionado 5,0 mL de solução salina e 10 larvas de *A. salina* no estágio metanáuplios. Os frascos permaneceram sob iluminação artificial (lâmpada de 40W) a 28 °C e, após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas de *A. salina* vivas e mortas.

Os valores de  $CL_{50}$  (Concentração Letal para 50%) foram obtidos após análise dos dados no programa Excel 2010, com intervalos de confiança de 95%. Para a comparação da toxicidade dos extratos foi adotado o parâmetro estabelecido por Padmaja e colaboradores (2002) que correlacionou a toxicidade dos extratos da seguinte forma:

$1000 \mu\text{g/ mL} > CL_{50} > 500 \mu\text{g/ mL}$  baixa toxicidade;

$500 \mu\text{g/ mL} > CL_{50} > 100 \mu\text{g/ mL}$  moderada toxicidade e;

$100 \mu\text{g/ mL} > CL_{50} > 0 \mu\text{g/ mL}$  altamente tóxicos.

#### 4.10 Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH e ABTS

A atividade sequestrante do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi determinada de acordo com a literatura (SOUZA et al, 2007). O DPPH é um radical estável de coloração violeta que na presença de um antioxidante é reduzido adquirindo uma coloração amarela.

Inicialmente foram preparadas soluções estoques das amostras e padrão na concentração 1mg/mL utilizando metanol como solvente. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços com 300 $\mu\text{L}$  de volume total, onde foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  da amostra ou padrão e 270  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH e após diluições sucessivas foi obtida a faixa de atividade com sete pontos nas concentrações de 1mg/mL, 500 $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125 $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , 31,25  $\mu\text{g/mL}$  e 15,62  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, a reação foi incubada por 30 minutos na ausência de luz. Após a incubação foi realizada a leitura da microplaca no espectrômetro de ultravioleta em 517 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Foi utilizada a quercetina como padrão de referência. O controle negativo constituiu-se de 270  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de DPPH e 30  $\mu\text{L}$  de metanol. Foi feita a leitura da microplaca no espectrômetro de ultravioleta em 517 nm onde a concentração da solução metanólica de DPPH (2mg/ mL) foi ajustada até a obtenção da absorbância aproximadamente 1,00 ( $\pm 0,5$ ).

A capacidade de capturar o radical foi expressa em termos de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Concentração Eficiente para 50%) calculado através de uma curva de regressão linear feita com o programa Excel, 2010. A atividade antioxidante foi calculada pela equação:

$AA (\%) = 100 - [(ABS_{amostra} - ABS_{branco}) * 100] / ABS_{controle}$  onde,

$ABS_{amostra}$  = absorvância em 517 nm de 30  $\mu$ L de amostra + 270  $\mu$ L da solução metanólica de DPPH;

$ABS_{branco}$  = absorvância em 517 nm de 30  $\mu$ L de metanol + 270  $\mu$ L de DPPH;

$ABS_{controle}$  = absorvância em 517 nm de 30  $\mu$ L de metanolica de quercetina + 270  $\mu$ L da solução metanólica de radical;

O método de redução do ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi realizado conforme descrito por Re et al., (1999) com modificações. Foi preparada uma solução catiônica de ABTS (7 mM, 50% de solução de ABTS, 50% solução de persulfato de potássio 2,45 mM), que reagiu por 14 horas, em temperatura ambiente e ausência de luz. Antes de usar a solução catiônica de ABTS, realizou-se a diluição com etanol até a absorvância de  $0,700 \pm 0,02$ . Esta solução foi monitorada pela leitura em 734 nm no leitor de microplaca (Biochrom ASYS UVM 340). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços onde adicionou-se 270  $\mu$ L da solução etanólica de ABTS mais 30 $\mu$ L de etanol como controle negativo. Em seguida, 270  $\mu$ L da solução etanólica de ABTS foi adicionado, assim como 30  $\mu$ L das amostra em diluição seriada iniciando em 30 $\mu$ g/mL até 0,46875 $\mu$ g/mL com ajustes para a execução do cálculo de  $CE_{50}$ . A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após esse período realizou-se a leitura no leitor de microplaca em 734 nm. Para expressar a atividade antioxidante foi calculado a  $CE_{50}$  utilizando-se o trolox como controle positivo.

#### 4.11 Atividade antioxidante em nível celular

Na atividade antioxidante celular o diacetato de diclorofluoresceína pode ser desacetilada nas células e reagir com radicais quantitativamente intracelulares, derivados principalmente de  $H_2O_2$  e são convertidos em seu produto fluorescente. A diclorofluoresceína é, então, retida no interior das células (WOLFE; LIU, 2007). Assim, as células J774 ( $6 \times 10^4$  células/ poço em placas de 96 cavidades) foram incubadas a 37°C com 10 pM de diacetato de diclorofluoresceína, durante 1 h. Depois as células foram lavadas com tampão de Hank e tratadas com a amostra nas concentrações de: 50, 5, 0,5,



0,05 e 0,005 $\mu$ g/mL e 250  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A fluorescência foi medida imediatamente com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de comprimentos de onda de 520nm utilizando um leitor de microplacas (DTX 800, Beckman, CA, EUA). Controles com e sem diacetato de diclorofluoresceína foram feitos e a quercetina foi utilizada como controle positivo. Actividade antioxidante intracelular foi expressa como a percentagem de inibição de ROS intracelulares produzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-exposição.

#### 4.12 Determinação da atividade citotóxica

O método de avaliação da atividade citotóxica foi o colorimétrico utilizando o Alamar Blue. O cultivo celular empregou meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 0,024 M de 2- (4 (2-hidroxiethyl) -1-piperazina) ácido etano-sulfônico (HEPES), em placa de 96 poços contendo 5x10<sup>3</sup> células/poço incubada sob condições padrão de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera úmida.

A redução de reagente Alamar Blue foi quantificada por leitura da absorbância na faixa de 590nm. O controle positivo utilizado foi a Doxorubicina e o negativo solução fisiológica estéril (IBÁÑES-COSTA et al, 2015). Neste ensaio, foram utilizadas duas linhagens celulares neoplásicas, à saber: CAL-27 (câncer de boca); MCF-7 (adenocarcinoma de Mama) e uma não neoplásica (MRC5 – fibroblasto humano). Inicialmente foi realizada uma avaliação citotóxica preliminar frente a fibroblastos humanos saudáveis e células de câncer de boca. As amostras que demonstraram efeito importante tiveram suas frações testadas em células MCF-7 de câncer de mama.

As células foram primeiramente descongeladas e mantidas em meio de cultura enriquecido com glicose. Após um período de uma semana foi adicionado tripsina para promover o crescimento adequado da célula de forma que ela se desprendesse da superfície do recipiente. Em seguida passaram por um processo de distribuição em cubetas sendo adicionadas em placas de 96 poços totalizando 5x10<sup>3</sup>células/poço da linhagem CAL-27 ou MRC-5. Cada poço recebeu 50 $\mu$ g do extrato bruto ao qual as células ficaram expostas por um período de 24h, com leitura de absorbância na faixa de 580nm para a contagem da viabilidade celular.

Para as células de câncer de mama foram seguidos os procedimentos iniciais de preparo e tripsinização celular dando sequência ao teste com a dose 25 $\mu$ g das amostras

consideradas de alta citotoxicidade no ensaio anterior. Esses extratos brutos promissores também tiveram suas frações testadas em células da linhagem MCF-7. A preferência por este método se justifica por ser amplamente referendado pela literatura, apesar de não esclarecer o mecanismo da morte celular (DUTRA et al, 2012; SANTANA et al, 2012). Os ensaios biológicos de citotoxicidade contra células tumorais foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 O *screening* inicial

Neste estudo foram avaliadas 43 amostras de extratos vegetais amazônicos na tentativa de encontrar uma que pudesse conter as atividades biológicas: antioxidante e citotóxica. Para realizar essa triagem, empregou-se uma pequena quantidade de material botânico para a maceração. Como o grupo de pesquisa forneceu 23 amostras, foram obtidos inicialmente 20 extratos brutos, como mostra a tabela 1:

**Tabela 1: Rendimento das amostras submetidas à maceração a frio com metanol**

<b>Ordem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Solvente</b>	<b>Rendeu (%)</b>
<b>01</b>	Folhas de <i>Macrobium microcalyx</i>	100	Metanol	6,85
<b>02</b>	Folha de <i>Eenterolobium schomburgkii</i>	100	Metanol	9,41
<b>03</b>	Raiz de <i>Himatanthus sucuuba</i>	100	Metanol	9,27
<b>04</b>	Caule de <i>H. sucuuba</i>	100	Metanol	25,78
<b>05</b>	Folhas de <i>Inga chrysantha</i>	100	Metanol	16,48
<b>06</b>	Folhas de <i>Geissospermum argenteum</i>	100	Metanol	6,37
<b>07</b>	Cascas de <i>G. argenteum</i>	100	Metanol	4,47
<b>08</b>	Folhas de <i>Inga cordatolata</i>	100	Metanol	5,43
<b>09</b>	Folhas de <i>Couma guianensis</i>	100	Metanol	12,36
<b>10</b>	Cascas de <i>C. guianensis</i>	100	Metanol	13,25
<b>11</b>	Folhas de <i>Aspidosperma schultesii</i>	100	Metanol	11,97
<b>12</b>	Cascas de <i>A. schultesii</i>	100	Metanol	5,2
<b>13</b>	Folhas de <i>A. marcgravianum</i>	100	Metanol	13,65
<b>14</b>	Cascas de <i>A. marcgravianum</i>	100	Metanol	4,55
<b>15</b>	Folhas de <i>Geissospermum urceolatum</i>	100	Metanol	5,83
<b>16</b>	Cascas de <i>G. urceolatum</i>	100	Metanol	1,20
<b>17</b>	Folhas de <i>Theobroma cacao</i>	100	Metanol	4,84
<b>18</b>	Folha <i>Colocasia antiquorum</i> - planalto	100	Metanol	7,15
<b>19</b>	Folha <i>C. antiquorum</i> - várzea	100	Metanol	9,85
<b>20</b>	Caule de <i>C. antiquorum</i> - planalto	100	Metanol	7,36

Os extratos que apresentaram maior rendimento foram provenientes do caule de *H. sucuuba*, com quase 26% de material extraído e das folhas de *I. crysanta* das quais foi possível a obtenção de aproximadamente 16% de extrato bruto, seguida pela espécie *A. marcgravianun* que apresentou mais de 13% de rendimento nas folhas.

Estes extratos brutos foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante pelo método químico; atividade citotóxica em *A. salina*, em fibroblastos humanos saudáveis (MRC-5) e em células tumorais humanas da boca (CAL-27). Este *screening* possibilitou identificar as amostras que apresentaram maior atividade nestes ensaios visando à seleção da espécie a ser estudada mais detalhadamente, conforme se descreve a seguir.

### 5.1.2 Citotoxicidade frente à *Artemia salina*

O estudo de potenciais substâncias anticancerígenas tem sido facilitado pela utilização de bioensaios. Eles oferecem vantagem especial na padronização e controle de qualidade. Podem envolver organismos inferiores, como o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, que permite avaliar a toxicidade geral preliminar no estudo de extratos com potencial atividade biológica. Trata-se de um teste simples, sensível, rápido, preciso e de baixo custo sugerido como uma pre-avaliação de ensaios mais onerosos, trabalhosos e demorados (MESARIC et al, 2015).

Para as amostras analisadas, pôde-se verificar uma variedade de respostas da *Artemia salina* segundo o material botânico em teste. A Concentração Letal para matar 50% dos indivíduos expostos (CL<sub>50</sub>) ficou definida conforme se observa no quadro 02:

#### **Quadro 02: CL<sub>50</sub> das amostras analisadas para a mortalidade de *Artemia salina*:**

<b>Ordem</b>	<b>Espécie em análise</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
01	<i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (espécime 1)	Raiz	62,5
02	<i>A. amazonicus</i> (espécime 1)	Cascas da raiz	31,2
03	<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	Raiz	125,0,3
04	<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	Cascas da raiz	83,30
05	<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	Raiz	125

06	<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	Cascas da raiz	41,7
07	<i>Aspidosperma marcgravianum</i>	Cascas	41,7
08	<i>A. marcgravianum</i>	Folhas	41,7
09	<i>A. schultesii</i>	Cascas	41,7
10	<i>A. schultesii</i>	Folhas	215
11	<i>Bellucia dichotoma</i> (extrato diclorometano)	Cascas	31,5
12	<i>B. dichotoma</i> (extrato hexano)	Cascas	31,5
13	<i>B. dichotoma</i> (extrato metanol)	Cascas	24,0
14	<i>Bocageopsis multijuga</i> (extrato diclorometano)	Folhas	25,0
15	<i>Bocageopsis pleiosperma</i> (extrato diclorometano)	Folhas	12,5
16	<i>C. antiquorum</i> (coletado na montanha)	Folhas	300,0
17	<i>C. antiquorum</i> (coletado na várzea)	Folhas	50,0
18	<i>C. antiquorum</i> (coletado terra firme)	Folhas	250
19	<i>Couma guianensis</i>	Cascas	100,0
20	<i>C. guianensis</i>	Folhas	31,2
21	<i>Endlicheria bracteolata</i> (extrato diclorometano 1)	Folhas	62,5
22	<i>E. bracteolata</i> (extrato diclorometano 2)	Folhas	50,0
23	<i>E. bracteolata</i> (extrato hexano)	Folhas	125,0
24	<i>E. bracteolata</i> (extrato metanol 1)	Folhas	62,5
25	<i>E. bracteolata</i> (extrato metanol 2)	Folhas	62,5

26	<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Folhas	25,0
27	<i>Geissospermum argenteum</i>	Folhas	27,8
28	<i>G. argenteum</i>	Cascas	125,0
29	<i>G. urceolatum</i>	Folhas	125,0
30	<i>G. urceolatum</i>	Cascas	31,25
31	<i>Himatantus sucuuba</i>	Caule	125,0
32	<i>H. sucuuba</i>	Raiz	62,5
33	<i>Ingá chrysanta</i>	Folhas	500,0
34	<i>Ingá cordatolata</i>	Folhas	125,0
35	<i>Macrolobium microcalyx</i>	Folhas	50,0
36	<i>Mezilaurus duckei</i> (extrato hexano)	Folhas	50,0
37	<i>M. duckei</i> (extrato metanol)	Folhas	34,7
38	<i>Myrciaria cauliflora</i> (extrato diclorometano)	Folhas	125
39	<i>M. cauliflora</i> (extrato hexano)	Folhas	41,7
40	<i>M. cauliflora</i> (extrato metanol)	Folhas	31,2
41	<i>M. cauliflora</i> (óleo essencial)	Folhas	0,4
42	<i>M. floribunda</i> (óleo essencial)	Folhas	0,8
43	<i>Theobroma cacao</i>	Folhas	125
44	Lapachol	-	3,9

Dentre todas as amostras em estudo, constatou-se que a maior atividade citotóxica frente a *A. salina* é proveniente do óleo essencial de *Myrciaria cauliflora* que matou 50% dos organismos expostas à menor concentração testada, ou seja 0,4µg/ml. A segunda espécie mais tóxica foi a *M. floribunda*, que manteve sua toxicidade até 0,7µg/ml

suficiente para matar 50% dos microcrustáceos expostos. Estas espécies mantiveram o efeito superior ao Lapachol, utilizado como controle positivo, mesmo na menor concentração. As espécies do gênero *Myrciaria* deste estudo já haviam sido identificadas como microbicidas (BONA et al, 2014). Já foram isolados alcaloides e saponinas destas espécies. Essas substâncias encontram facilidade para se diluir nas membranas celulares e alcançar seu sítio ativo na célula (CHAVASCO et al, 2014).

## 5.2 Espécies citotóxicas promissoras apontadas pela triagem inicial com *A. salina*

As amostras que apresentaram elevada letalidade contra *A. salina* foram em seguida selecionadas para a extração com maior quantidade de material botânico. Excepcionalmente, utilizou-se menor quantidade de material botânico das raízes de *H. sucuuba* pela impossibilidade de ser realizada uma coleta mais volumosa sem provocar a mortalidade da planta. Os solventes utilizados foram o hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foi obtido o seguinte rendimento:

**Tabela 2: Rendimento dos extratos vegetais obtidos com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila.**

Amostr a	Quantidad e utilizada (%)	Rendiment o com Hexano (%)	Rendimento com Diclorometan o (%)	Rendiment o com Acetato de Etila (%)	Rendiment o com Metanol (%)
E1F	500	0,79	1,0	0,37	1,07
E2F	1000	0,24	0,37	0,16	0,53
E3R	80	1,16	0,59	0,37	0,62
E3T	500	0,45	0,21	0,22	1,85
E11F	1000	0,5	1,37	0,77	4,86
E12F	1000	0,2	0,83	2,16	2,81
E14F	1000	0,67	1,87	1,51	2,02
E15F	1000	4,43	0,87	1,27	2,39
E16F	1000	0,61	1,36	1,12	3,07
E16C	780	0,05	0,12	0,21	1,07
E17F	900	0,53	1,1	1,22	1,94

E1F: folhas de *Macrolobium Microcalyx*; E2F: folhas de *Enterolobium schomburgkii*; E3R: raízes de *H. sucuuba*; E3T: tronco de *H. sucuuba*; E11F: folhas de *Inga chysanta*; E12F: folhas de *Geissospermum argenteum*; E14F: folhas de *Couma guianensis*; E15F: folhas de *Aspidosperma schultesii*; E16C: cascas de *Aspidosperma marcgravianum*; E17F: folhas de *Geissospermum urceolatum*.

Procedeu-se ao teste de citotoxicidade contra *A. salina* com os extratos das espécies identificadas como mais relevantes no ensaio preliminar para verificar qual o extrato seria mais ativo. Aquelas amostras que apresentaram mortalidade muito alta sofreram nova diluição em busca dos valores adequados para o cálculo de CL<sub>50</sub>. Por outro lado, as que apresentaram pequena mortalidade foram experimentadas em concentrações maiores. O resultado deste ensaio está demonstrado resumidamente na tabela 3:

**Tabela 3: Mortalidade provocada pelos extratos brutos obtidos com hexano, diclorometano acetato de etila e metanol sobre *Artemia salina*.**

<b>Ordem</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/mL) extrato hexano</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/mL) extrato diclorometano</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/mL) extrato acetato de etila</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/mL) extrato metanol</b>
<i>A. marcgravianum</i> (folhas)	46,9	56,6	52,6	46,9
<i>A. marcgravianum</i> (cascas)	56,6	46,9	52,6	38,4
<i>A. schultesii</i> (folhas)	62,5	29,8	15,6	9,6
<i>C. guianensis</i> (folhas)	67,0	74,3	99,9	7,2
<i>E. schomburgkii</i> (folhas)	56,6	33,5	60,2	44,4
<i>G. argenteum</i> (folhas)	15,6	62,5	50,8	25,7
<i>G. argenteum</i> (cascas)	259,1	306,8	225,1	76,0
<i>G. urceolatum</i> (folhas)	31,2	19,2	17,7	15,6
<i>H. sucuuba</i> (caule)	5,4	5,5	30,5	81,5
<i>H. sucuuba</i> (raiz)	31,4	15,6	56,6	59,3
<i>I. cordatolata</i> (folhas)	225,0	225,1	113,8	15,6
<i>I. chrysanta</i> (folhas)	77,9	62,5	82,8	0,0
<i>M. microcalyx</i> (folhas)	46,9	75,4	42,4	34,8
<b>Lapachol</b>	<b>4,2</b>	<b>3,9</b>	<b>4,0</b>	<b>3,6</b>

Dentre os extratos analisados, aquele obtido com diclorometano a partir das cascas de *Geissospermum argenteum* foi o que promoveu menor mortalidade sobre os microcrustáceos. Somente conseguiu eliminar 50% da população exposta quando atingiu a concentração de 306,8µg/mL. Juntamente com os extratos hexano e acetato de etila



foram classificados como pertencentes ao grupo de moderada letalidade. Já o extrato metanol deste mesmo material foi classificado dentre os que induzem à alta mortalidade.

Constatou-se apenas três amostras para as quais o extrato metanol demonstrou-se menos ativo do que as massas extraídas com outros solventes, são elas: *H. sucuuba* (caule); *H. sucuuba* (raiz) e *I. chrysanta* (folhas), a qual não foi capaz de induzir nenhuma mortalidade com seu extrato metanol. Já a espécie *A. marcgravianum* (folhas) demonstrou a mesma toxicidade nos estratos hexano e metanol.

As demais amostras exibiram maior efeito na porção extraída com metanol. A atividade citotóxica mais forte das amostras promissoras deste grupo foi constatada no extrato metanol das folhas de *Couma guianensis*, seguida pelo extrato metanol das folhas de *Aspidosperma schultesii* e *Inga cordatolata*.

Não foram encontrados estudos de atividade biológica ou de fitoquímica da espécie *Couma guianensis*. Todos os extratos desta espécie mostraram-se altamente tóxicos contra *Artemia salina*. Entretanto, foi na porção extraída com metanol que se observou a maior atividade para esta espécie dentre todos os extratos obtidos por maceração. A dose deste extrato necessária para eliminar 50% dos indivíduos expostos foi calculada em 7,2µg/mL. Apesar da sua potente toxicidade, o controle positivo foi duas vezes mais forte do que a amostra.

Várias espécies do gênero *Aspidosperma* possuem substâncias com elevado poder biológico. Muitas, com atividade demonstrada como bactericida, leishmanicida, antitumoral e antimicrobiana (KRENTKOWSKI; DUARTE, 2012). Entretanto, é a primeira descrição dessa espécie quanto a essa atividade observada.

As atividades observadas na espécie *Inga cordatolata* também apresentam descrição inédita e sua ação talvez se justifique pela presença de saponinas, esteroides, triterpenos e elevado teor de inibidores de tripsina apresentados no gênero (CALDERON et al, 2010; NAZARÉ et al, 2014), para o qual, também já foi comprovada atividade antioxidante e antitumoral importantes (DIAS; SOUZA; ROGEZ, 2010; POMPEU et al, 2012).

### 5.2.1 Toxicidade das frações do extrato metanol sobre *Artemia salina*

As amostras mais promissoras na atividade citotóxica em células tumorais CAL-27, e ação antioxidante pelo método químico foram as cascas de *Geissospermum argenteum*, cascas de *Bellucia dichotoma* e as folhas de *Inga cordatolata*. Essas amostras são provenientes do extrato metanol e tiveram suas frações testadas contra *Artemia salina* para verificar a sua toxicidade. A tabela 4 mostra a citotoxicidade provocada pelas frações de *Bellucia dichotoma* sobre este organismo:

**Tabala 4: Mortalidade das frações do extrato metanol sobre *A. salina*.**

Fração	Mortalidade (%) observada com dose de 1000µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 500µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 250µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 125µg/ml
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	60	40	20	10
6	0	0	0	0
7	70	40	10	10
8	80	60	20	10
9	20	0	0	0
10	30	0	0	0
11	90	60	20	10
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	100	70	60	40
18	90	60	20	10
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0

23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	100	80	40	30
<b>Lapachol</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

A Concentração Letal necessária para matar 50% da população de *A. salina* exposta (CL<sub>50</sub>) foi calculada para as frações de *Bellucia dichotoma* que apresentaram atividade tóxica contra o organismo teste. A fração 5 do extrato metanol das cascas desta espécie apresentou CL<sub>50</sub> somente quando atingiu a concentração de 780µg/mL, com um coeficiente de determinação calculado em 96%.

A fração 7 do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* também apresentou baixa atividade contra *A. salina*. Foram necessários 688,5µg/mL desta amostra para produzir mortalidade de 50% dos indivíduos expostos. O coeficiente de determinação de dependência entre as variáveis dose/mortalidade mostrou-se superior a 99%.

A fração 8 também demonstrou baixa atividade citotóxica pelo teste com *Artemia salina*. Somente ao atingir a concentração de 560,8µg/mL a amostra conseguiu eliminar 50% dos indivíduos expostos.

A fração 11 não apresentou mortalidade significativa sobre *Artemia salina*. A toxicidade constatada nesta amostra possibilitou classificá-la no grupo daquelas que apresentam baixa citotoxicidade, por apresentar CL<sub>50</sub> maior do que 500µg/mL. Esta análise foi realizada com coeficiente de determinação superior a 95% e demonstrou a eliminação de 50% da população exposta com 522,5µg/mL do extrato.

A fração 17 desempenhou uma atividade citotóxica melhorada em relação às outras frações desta espécie. Produziu a morte de 50% dos microrganismos em teste na concentração de 192,3µg/mL com coeficiente de determinação entre as variáveis dose/mortalidade superior a 96%. A CE<sub>50</sub> da fração 18 foi determinada em 522,4µg/mL, sendo classificado no grupo de baixa citotoxicidade. A outra fração que apresentou mortalidade foi a 28, com CE<sub>50</sub> estabelecida em 315,1µg/mL. Já as frações de

*Geissospermum argenteum* que mostraram mortalidade significativa foram apenas as de número 3; 4 e 10, conforme mostra a tabela 5:

**Tabela 5: Mortalidade das frações de *Geissospermum argenteum* contra *A. salina*.**

Fração	Mortalidade (%) observada com dose de 1000µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 500µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 250µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 125µg/ml
<b>1</b>	20	0	0	0
<b>2</b>	10	0	0	0
<b>3</b>	60	40	20	10
<b>4</b>	80	60	30	10
<b>5</b>	20	0	0	0
<b>6</b>	0	0	0	0
<b>7</b>	0	0	0	0
<b>8</b>	0	0	0	0
<b>9</b>	30	0	0	0
<b>10</b>	100	80	60	40
<b>11</b>	0	0	0	0
<b>Lapachol</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

A fração 3 do extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum* apresentou mortalidade de 50% dos indivíduos expostos ao atingir a concentração de 780µg/mL, com coeficiente de determinação das variáveis do teste superior a 96% . A fração 4 apresentou coeficiente de determinação maior do que 90% e CE<sub>50</sub> determinada em 534,2µg/mL. Já a fração 10 deste extrato foi a que demonstrou maior mortalidade nesta espécie. Todavia, seu efeito foi considerado moderado por apresentar CL<sub>50</sub> de 156,2µg/mL.

As frações de *Inga cordatolata* que apresentaram mortalidade sobre *Artemia salina* foram: 4; 5; 6; 7; 8 e 9, conforme mostra a tabela 6:

**Tabela 6: Mortalidade das frações do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* em elevadas concentrações sobre *Artemia salina*.**

Fração	Mortalidade (%) observada com dose de 1000µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 500µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 250µg/ml	Mortalidade (%) observada com dose de 125µg/ml
<b>1</b>	0	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0	0
<b>3</b>	30	0	0	0
<b>4</b>	100	100	100	100
<b>5</b>	100	100	100	100
<b>6</b>	100	100	80	60
<b>7</b>	100	100	100	100
<b>8</b>	100	100	90	60
<b>9</b>	100	100	90	0
<b>Lapachol</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

As frações de *Inga cordatolata* apresentaram toxicidade mais pronunciada em relação às outras espécies e necessitaram passar por novo ensaio em menores concentrações para possibilitar o cálculo da dose necessária para matar 50% da população exposta. Esta nova análise é mostrada na tabela 7:

**Tabela 7: Mortalidade provocada por baixas concentrações das frações de *Inga cordatolata* sobre *Artemia salina*:**

Fração	Morte (%) observada com 62,5µg/ml	Morte (%) observada com 31,25µg/ml	Morte (%) observada com 15,62µg/ml	Morte (%) observada com 7,812µg/ml	Morte (%) observada com dose de 3,9µg/ml
<b>4</b>	70	40	20	0	0
<b>5</b>	100	80	60	40	10
<b>6</b>	40	20	0	0	0
<b>7</b>	100	100	80	60	40
<b>8</b>	30	10	0	0	0
<b>9</b>	30	10	0	0	0

A fração 4 do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* ficou com  $CL_{50}$  determinada em 48,0 $\mu$ g/mL. A fração 5 foi capaz de provocar a morte da metade dos indivíduos expostos com apenas 9,8 $\mu$ g/mL, sendo classificadas no grupo de elevada toxicidade sobre o microrganismo teste. Apesar do seu efeito pronunciado, foram menos ativas do que o controle positivo utilizado no teste. A  $CL_{50}$  do lapachol foi estabelecida em 3,6 $\mu$ g/mL com um coeficiente de determinação maior do que 97%.

Já a fração 6 do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* apresentou moderada toxicidade sobre *A. salina*. Somente ao atingir 117,2 $\mu$ g/mL foi capaz de induzir a mortalidade de 50% dos indivíduos expostos. O poder letal da fração 7 desta espécie definiu sua  $CL_{50}$  em 4,9 $\mu$ g/mL. Foi o que mais se aproximou o efeito produzido pelo controle positivo, todavia, ainda inferior a ele. Já a fração 8 e 9 apresentaram moderada citotoxicidade com  $CL_{50}$  estabelecida em 124,2 $\mu$ g/mL para a primeira e 150,5 $\mu$ g/mL para a segunda, com coeficiente de determinação superior a 95% e 97%, respectivamente.

A mortalidade induzida pelo material botânico em teste é um método eficiente de rastrear atividade citotóxica (RAJABI; RAMAZANI; NAJI, 2015). Neste trabalho mostrou-se capaz de correlacionar os resultados possibilitando otimizar recursos e ganhar tempo para outras análises.

As amostras que continuaram apresentando atividade tóxica contra o microrganismo teste após as sucessivas macerações foram submetidas ao ensaio antioxidante pelo método químico.

### **5.3 Atividade antioxidante do material botânico avaliado por método químico.**

Para avaliar a capacidade antioxidante destas amostras pelo método químico foram empregados dois ensaios. Cada teste verificou a habilidade da amostra em neutralizar um radical livre diferente. Inicialmente, foi utilizado o radical livre DPPH para rastrear a atividade no material botânico em análise. Posteriormente, as amostras que apresentaram efeito antioxidante expressivo foram submetidas à confirmação da atividade por meio do ensaio de captura do radical ABTS.

#### **5.3.1 Capacidade do material botânico para inibir os radicais livres DPPH.**

Os extratos que seguiram para o ensaio antioxidante tiveram respostas variadas e na maioria das vezes não correlacionadas com a toxicidade em *Artemia salina*. Embora

tenha havido uma expressiva atividade tóxica dos óleos do gênero *Myrciaria* sobre os microcrustáceos, não foi encontrada atividade antioxidante em nenhum destes óleos. Os efeitos observados nas demais amostras estão relacionados no quadro 3:

**Quadro 3: Atividade antioxidante constatada na triagem inicial pelo método do radical DPPH.**

Amostra testada	Parte da planta	CE <sub>50</sub> extrato hexano (µg/mL)	CE <sub>50</sub> extrato DCM (µg/mL)	CE <sub>50</sub> extratoa cetato de etila (µg/mL)	CE <sub>50</sub> extrato metanol (µg/mL)
<i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (espécime 1)	Raiz	-	-	-	14,3
<i>A. amazonicus</i> (espécime 1)	Cascas da raiz	-	-	-	17,2
<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	Raiz	-	-	-	19,8
<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	Cascas da raiz	-	-	-	13,1
<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	Raiz	-	-	-	14,9
<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	Cascas da raiz	-	-	-	15,3
<i>Aspidosperma marcgravianum</i>	Cascas	49,2	39,0	19,3	23,3
<i>A. marcgravianum</i>	Folhas	34,2	47,9	34,1	5,7
<i>Aspidosperma schultesii</i>	Cascas	-	-	-	8,7

<i>A. schultesii</i>	Folhas	26,0	101,9	99,5	4,5
<i>Bellucia dichotoma</i>	Cascas	96,8	21,7	-	2,6
<i>Bocageopsis multijuga</i>	Folhas	-	-	-	20,1
<i>Bocageopsis pleiosperma</i>	Folhas	-	22,9	-	2,7
<i>Colocasia antiquorum</i> caule (coletado terra firme)		-	-	-	52,8
<i>C. antiquorum</i> (coletado na várzea)	Folhas	-	-	-	15,3
<i>C. antiquorum</i> (coletado terra firme)	Folhas	-	-	-	49,5
<i>Couma guianensis</i>	Cascas	-	-	-	1,9
<i>C. guianensis</i>	Folhas	21,1	97,1	93,6	2,6
<i>Endlicheria bracteolata</i> (extrato 1)	Folhas	83,1	5,5	-	8,7
<i>E. bracteolata</i> (extrato 2)	Folhas	-	93,6	-	11,3
<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Folhas	54,8	4,7	39,7	2,5
<i>Geissospermum argenteum</i>	Folhas	59,4	55,6	87,7	42,8
<i>G. argenteum</i>	Cascas	-	-	-	5,6



<i>Geissospermum urceolatum</i>	Folhas	7,1	55,4	98,9	23,8
<i>G. urceolatum</i>	Cascas	-	-	-	19,4
<i>Himatantus sucuuba</i>	Caule	130,2	86,1	48,7	43,8
<i>H. sucuuba</i>	Raiz	70	54,4	55,9	22,4
<i>Ingá chrysanta</i>	Folhas	30,8	53,2	41,6	2,1
<i>Ingá cordatolata</i>	Folhas	-	-	-	2,3
<i>Macrolobium microcalyx</i>	Folhas	24,5	23,3	41,1	14,2
<i>Mezilaurus duckei</i>	Folhas	53,2	-	-	7,2
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Folhas	11,3	57,6	-	1,4
<i>M. cauliflora</i>	Folhas	0,0	0,0	0,0	0,0
(óleo essencial)					
<i>M. floribunda</i>	Folhas	0,0	0,0	0,0	0,0
(óleo essencial)					
<i>Theobroma cacao</i>	Folhas	-	-	-	15,8
<b>Quercetina</b>					<b>2,8</b>

O extrato diclorometano obtido das folhas de *Enterolobium somburgkii* demonstrou atividade antioxidante importante no ensaio com DPPH. Com um desvio padrão de 0,491 e coeficiente de determinação de dependência entre as variáveis dose/resposta superior a 93% a CE<sub>50</sub> desse extrato foi determinada em 4,7µg/mL, aproximando-se da quercetina, substância de referencia utilizada no teste que apresentou CE<sub>50</sub> na concentração de 2,8µg/mL.

Por outro lado, o extrato metanol das folhas de *Enterolobium schomburgkii* revelou-se altamente antioxidante com  $CE_{50}$  em  $2,5\mu\text{g/mL}$ , superando o efeito da quercetina. O coeficiente de determinação do ensaio mostrou-se maior que 94% com desvio padrão de 0,485. A atividade antioxidante observada em *Enterolobium schomburgkii* possivelmente se deva aos compostos flavonoídicos de potente ação antioxidante presentes no gênero (FONSECA et al, 2014).

Apenas o extrato metanol das folhas de *Myrciaria cauliflora* revelou atividade antioxidante significativa nesta espécie. Sua  $CE_{50}$  foi definida em  $1,4\mu\text{g/mL}$  com  $R^2$  superior a 97% e desvio padrão de 0,132. Estes achados confirmam os dados da literatura sobre o gênero *Myrciaria*. Pois, já foram isoladas substâncias fenólicas de elevado efeito antioxidante em outras espécies (OLIVEIRA et al, 2013).

O extrato diclorometano das folhas de *Endlicheria bracteolata* proveniente da Reserva Florestal Ducke revelou discreta ação contra os radicais livres de DPPH neutralizando 50% da concentração desses radicais com  $5,5\mu\text{g/mL}$  do extrato testado. Com coeficiente de determinação superior a 95% e desvio padrão de 0,342 foi possível demonstrar que o espécime 1, coletado da região na floresta mais fechada possui maior poder antioxidante do que o espécime 2, de área mais próxima da ação antrópica.

Na espécie *Bocageopsis pleiosperma* somente o extrato metanol das folhas revelou capacidade elevada para capturar os radicais livres. Sua  $CE_{50}$  foi estabelecida em  $2,7\mu\text{g/mL}$  com desvio padrão de 0,263 e coeficiente de determinação maior que 97%, o que permite afirmar que a espécie possui efeito discretamente superior à quercetina. Já o extrato metanol das folhas de *Bocageopsis multijuga* não teve atividade antioxidante significativa neste estudo.

Na espécie *Inga chrysanta* somente o extrato metanol das folhas demonstrou atividade antioxidante expressiva. A sua concentração eficiente para estabilizar 50% dos radicais livres ( $CE_{50}$ ) foi estabelecida em  $2,6\mu\text{g/mL}$  com  $R^2$  definido em 98,2% e desvio padrão de 0,142. Esta amostra, portanto apresentou-se mais ativa do que a quercetina que apresentou  $CE_{50}$  em  $2,8\mu\text{g/mL}$ . A potente ação antioxidante dos flavonoides encontrados no gênero (GANDRA et al, 2013) podem ter sido responsáveis pela ação observada.

A outra espécie deste gênero foi ainda mais ativa no extrato metanol das folhas. Fenóis e flavonoides já foram encontrados neste gênero, sendo que substâncias fenólicas podem ser responsáveis por significativa atividade antioxidante. *Inga cordatolata*

apresentou efeito antioxidante expressivo com Concentração Eficiente para neutralizar 50% dos radicais livres ( $CE_{50}$ ) determinada em  $2,3\mu\text{g/mL}$ , com desvio padrão de 0,112 e  $R^2$  definido em 99,5%.

Por outro lado, a espécie *Geissospermum argenteum* não apresentou atividade antioxidante muito importante. Apenas o extrato metanol de suas cascas apresentou atividade mais próxima ao controle positivo. A  $CE_{50}$  desta amostra foi calculada em  $5,6\mu\text{g/mL}$  com desvio padrão de 0,098 e coeficiente de determinação definido em 98,9%.

Para a espécie *Couma guianensis* tanto o extrato metanol das folhas quanto o das cascas demonstraram expressiva atividade antioxidante. A Concentração Eficiente para neutralizar 50% dos radicais livres ( $CE_{50}$ ) foi estabelecida em  $2,6\mu\text{g/mL}$  no extrato das folhas com  $R^2$  de 96,7% e desvio padrão de 0,248. No teste com as cascas ficou definida a  $CE_{50}$  em  $1,9\mu\text{g/mL}$  com coeficiente de determinação 98,2% e desvio padrão de 0,432. Tais achados permitem afirmar que a atividade antioxidante demonstrada por *Couma guianensis* é maior do que a apresentada pela quercetina, com mais eficácia nas cascas do que nas folhas. Não foram encontrados estudos fitoquímicos sobre esta espécie, o que evidencia a importância de trabalhos mais aprofundados para o conhecimento de suas propriedades e constituição química. Também a possível aplicação biotecnológica de espécies que demonstram elevada atividade biológica (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

Todas as amostras que apresentaram ação antioxidante e citotóxica importantes foram provenientes dos extratos obtidos com metanol. Assim, foram fracionadas com sephadex LH20 e suas frações passaram pelo rastreamento dessas atividades para identificar a fração mais ativa. Os resultados do ensaio antioxidante dessas frações podem ser observados na tabela 8:

**Tabela 8: Atividade antioxidante das frações das espécies promissoras contra o radical livre DPPH expressa em CE<sub>50</sub> (µg/mL).**

Fr	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
1	390,2	43,2	40,1	54,4	55,4	39,6	22,8	28,5
2	213,9	18,7	41,7	51,6	57,4	23,2	77,4	27,7
3	103,1	3,5	34,2	27,2	48,8	16,1	113,7	35,8
4	217,5	2,2	26,3	22,2	0,6	17,7	88,0	13,6
5	103,8	2,6	13,6	62,5	0,3	92,4	41,8	7,2
6	22,5	49,4	0,0	73,4	2,1	172,8	463,0	12,6
7	12,2	57,2		59,4	0,14	237,6	3,5	40,3
8	2,1	147,2		80,9	1,5	119,4	2,6	88,1
9	3,3	178,1		54,1	2,3	215,5	6,9	185,9
10	3,4	166,2		16,8	58,2	223,7	6,8	208,2
11	3,6	299,0		45,3			4,1	184,1
12	17,6	290,1					11,0	176,1
13	83,3	141,4					10,5	
14	114,6	136,1					10,0	
15	116,6	192,1					89,2	
16	113,0	289,4					110,3	
17	108,4	279,7					108,6	
18	99,4	163,7					70,1	
19	215,7	170,1					8,9	
20	186,2	159,1					28,6	
21	194,0						20,5	
22	104,0						5,7	
23	97,0						3,3	
24	70,9						5,1	
25	97,1							
26	86,4							
27	88,0							
29	212,6							
<b>Q</b>	<b>2,7</b>	<b>2,9</b>	<b>3,5</b>	<b>4,8</b>	<b>2,8</b>	<b>5,8</b>	<b>2,8</b>	<b>4,9</b>

Fr: fração; E1: *B. dichotoma*; E2: *C. guianensis*; E3: *E. bracteolata*; E4: *G. argenteum*; E5: *I. cordatolata*; E6: *M. duckei*; E7: *M. cauliflora*; E8: *T. cacao*; Q: quercetina.

De forma geral, as amostras que apresentaram expressiva capacidade antioxidante podem possuir substâncias flavonoídicas e fenólicas que além de serem excelentes antioxidantes também possuem habilidade em se dissolver nas biomembranas, penetrar na célula e alterar seu metabolismo (GANDRA et al, 2013), podendo levá-la à morte (ALBERTS et al, 2010).

### 5.3.2 Atividade antioxidante das frações promissoras contra o radical livre ABTS

As amostras que mais apresentaram atividade antioxidante pelo método de inibição do radical livre DPPH foram submetidas à outro método de análise antioxidante para a confirmação da atividade, utilizando-se para isso o radical livre ABTS. Foi observada uma correlação importante dos resultados entre os dois métodos. Entretanto, o ultimo produziu efeitos mais pronunciados do que o primeiro. Os resultados do teste antioxidante por ABTS estão consolidados na tabela 9:

**Tabela 9: Atividade antioxidante das amostras promissoras contra o radical livre ABTS.**

<b>Amostra</b>	<b>Equivalente de Trolox (µg/mL)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de determinação</b>
<i>A. schultesii</i> (extrato metanol das folhas)	526,7	4,7	92%
<i>B. dichotoma</i> (extrato metanol das cascas)	551,2	4,1	90%
<i>C. guianensis</i> (extrato metanol das cascas)	41,3	4,9	97%
<i>E. schomburgkii</i> (extrato metanol das folhas)	526,7	4,2	91%
<i>G. argenteum</i> (extrato metanol das folhas)	18,2	4,6	96%
<i>I. chrysanta</i> (extrato metanol das folhas)	105,8	4,4	95%
<i>I. cordatolata</i> (extrato metanol das folhas)	241,8	3,2	93%
<i>I. cordatolata</i> fração 4	101,7	2,6	95%
<i>I. cordatolata</i> fração 5	191,1	2,9	96%
<i>I. cordatolata</i> fração 6	145,4	1,9	93%
<i>I. cordatolata</i> fração 7	551,2	2,4	92%

<i>I. cordatolata</i> fração 8	221,5	3,8	96%
<i>I. cordatolata</i> fração 9	18,0	4,2	97%
<i>M. duckei</i> (extrato metanol das folhas)	22,8	3,5	99%
<i>M. cauliflora</i> (extrato metanol das folhas)	127,4	4,3	97%
<i>T. cacao</i> (extrato metanol das folhas)	12,8	4,1	92%

O controle positivo empregado neste ensaio foi o trolox, com leitura da absorbância realizada decorridos 30 minutos após a placa de 96 poços ter sido preparada. A utilização do ABTS para detecção de atividade antioxidante em extratos brutos vegetais é controversa. Pois, apesar do seu consagrado uso, a literatura aponta a possibilidade de que ocorra impedimento estérico por parte de substâncias com estruturas químicas extensas, muito prováveis em extratos brutos. Essas substâncias acabariam por bloquear a reação de inibição do ABTS que ocorreria após o primeiro minuto, sendo desnecessário esperar maior período para o ocorrer a reação (TIAN; SCHAICH, 2013).

Coadunando-se com os dados da literatura, neste trabalho, a leitura da absorbância no primeiro minuto ou com 30 minutos não demonstrou diferença significativa. Entretanto, foi utilizado o período de 30 minutos para esta análise por ser considerado mais usual.

Pelo método do ABTS, quanto maior os valores de equivalentes de trolox mais intensa é a atividade antioxidante (RABELO et al, 2013). Assim, as amostras que demonstraram maior atividade antioxidante neste ensaio foram o extrato metanol das cascas de *B. dichotoma* com 551,2µg/mL equivalentes de trolox e CE<sub>50</sub> definida em 2,6µg/mL pelo ensaio do DPPH; a fração 7 do extrato metanol das folhas de *I. cordatolata* que também atingiu 551,2µg/mL equivalentes de trolox e CE<sub>50</sub> estabelecida no DPPH em 0,14 µg/mL.

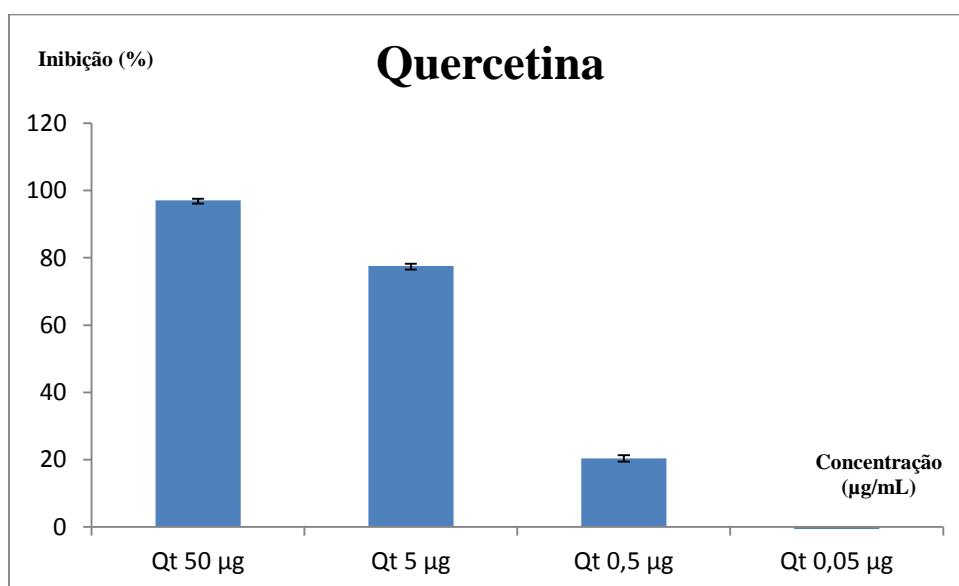
O extrato metanol das folhas de *E. schomburgkii* e o extrato metanol das folhas de *I. cordatolata* apresentaram equivalentes de trolox em 526,7µg/mL e 241,8µg/mL, respectivamente. Já no método que emprega o DPPH, as CE<sub>50</sub> dessas espécies foram determinadas em 2,5µg/mL, para a primeira e 2,3µg/mL para a segunda. Tais achados demonstram a elevada capacidade antioxidante dessas amostras, que tiveram seu efeito confirmado pelos dois métodos.

### 5.3.3 Atividade antioxidante em nível celular

Como os resultados foram muito expressivos nos ensaios antioxidantes pelos métodos químicos já descritos, foram solicitados ensaios antioxidantes biológicos independentes em nível celular. Objetivou-se verificar se esses efeitos antioxidantes seriam mantidos na célula viva.

Uma vez que as amostras promissoras apresentaram grande atividade citotóxica em células humanas cancerosas, poderiam não ser antioxidantes, mas somente citotóxicas em nível celular. Isso inviabilizaria a produção de um medicamento antitumoral com características diferenciadas dos quimioterápicos usuais e seus efeitos indesejáveis.

Cinco extratos brutos obtidos com metanol foram considerados promissores, haja vista a associação das atividades antioxidante e citotóxica dessas amostras nos ensaios anteriores. Assim, a mensuração foi balizada utilizando-se a quercetina como controle positivo. Neste ensaio, 50µg/mL de quercetina foram capazes de inibir 97% dos radicais hidroxilas formados na célula. Na concentração de 5µg/mL ela conseguiu inibir 77% desses radicais. Com 0,5µg/mL, a quercetina neutralizou 20% do desses radicais livres e na dose de 0,05µg/mL não houve inibição, como mostra a figura 1:

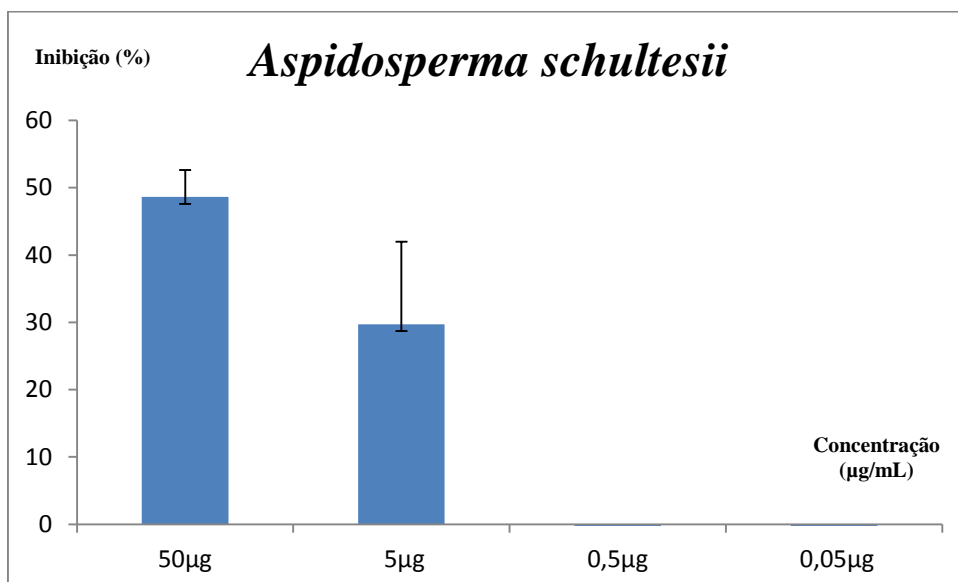


**Figura 1: Atividade antioxidante da quercetina contra radicais hidroxilas em nível celular.**

Partindo da potente ação da quercetina como referência, buscou-se avaliar a similaridade do efeito das amostras em teste com essa resposta promovida em nível celular pela quercetina. Seu desvio padrão foi de 0,4%, 0,6%, 0,9 % para as triplicatas ativas e 4,03% para a que não apresentou atividade.

O extrato metanol das folhas de *Aspidosperma schultesii* apresentou inibição de 48% dos radicais livres formados com a maior concentração testada, à saber 50µg/mL. Na concentração de 5µg/mL apenas conseguiu inibir 29% desses radicais e não apresentou nenhuma atividade nas concentrações menores. O desvio padrão das triplicatas viáveis para o cálculo ficou determinado em 4,5%.

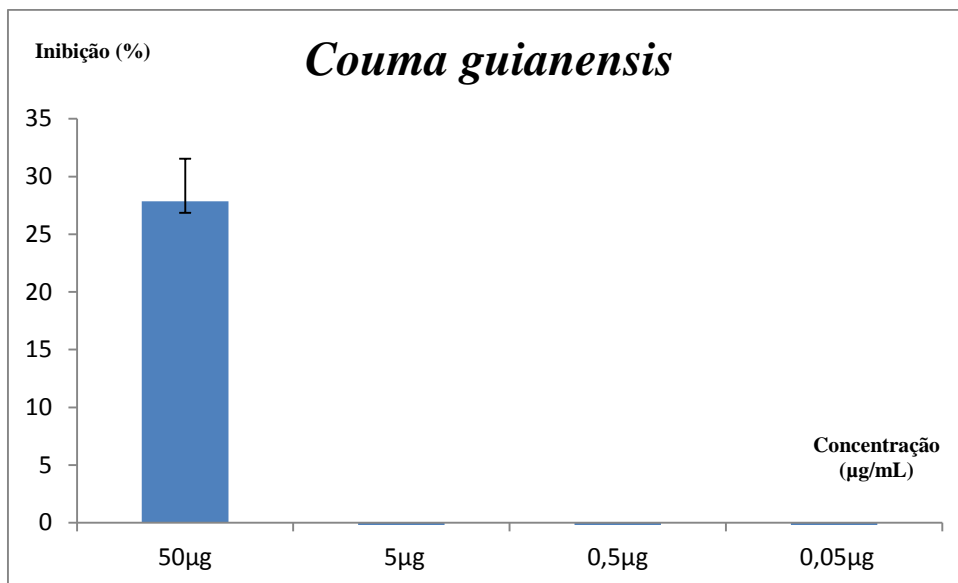
Tais achados são muito inferiores aos demonstrados pelo controle positivo deixando a espécie em desvantagem para o seguimento deste estudo, uma vez que em pequenas concentrações não apresentou capacidade de neutralizar os radicais livres de hidroxilas formados pelos macrófagos utilizados neste ensaio. O resultado do experimento realizado pode ser visualizado na figura 2:



**Figura 2: Atividade antioxidante do extrato metanol das folhas de *Aspidosperma schultesii* contra radicais hidroxilas intracelulares.**

Já o extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* que havia apresentado atividade antioxidante expressiva no método químico, não foi capaz de sustentar esse efeito em macrófagos humanos. Na maior concentração, este extrato demonstrou inibição de somente 27% dos radicais hidroxilas formados pelas células. Por outro lado, não apresentou nenhuma atividade nas doses menores, como pode ser constatado ao exame da figura 3:



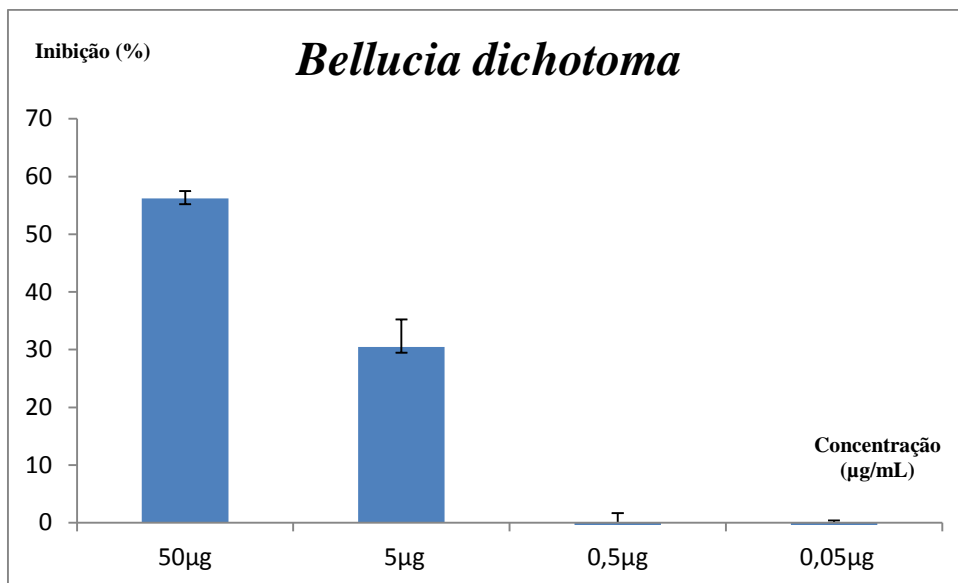


**Figura 3: Atividade antioxidante do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* contra o radical hidroxila em nível celular.**

Tais achados evidenciam o baixo potencial do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* para ser empregado em sistemas biológicos como antioxidante. Uma vez que não manteve sua ação no meio intracelular pelo período transcorrido para efetivar a reação, pode-se inferir a neutralização das substâncias presentes nas menores concentrações deste extrato.

Provavelmente, caso houvesse maior tempo de reação, poderia ser constatada a neutralização de maior quantidade dessas substâncias com consequente perda desta atividade residual observada.

O extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* apresentou atividade antioxidante na concentração de 50µg/mL capaz de neutralizar 56% dos radicais hidroxilas intracelulares. Na dose de 5µg/mL inibiu 30% dos radicais e nas concentrações de 0,5µg/mL e 0,05µg/mL não houve nenhuma atividade observada. O desvio padrão foi definido em 1% e 4% nas concentrações ativas respectivamente. A figura 4 ilustra os resultados obtidos nesta análise:

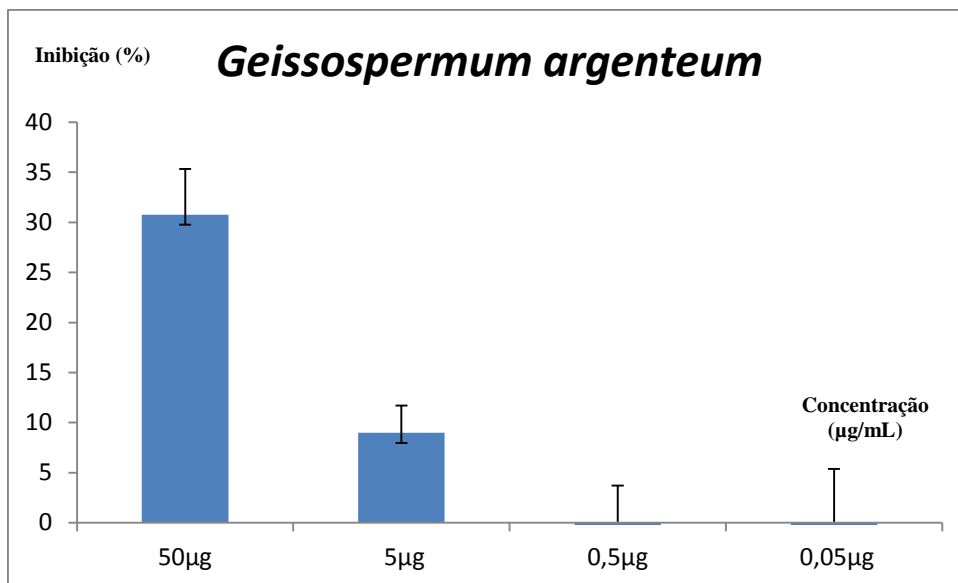


**Figura 4:** Atividade antioxidante do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* contra o radical hidroxila intracelular.

Muito embora tenha apresentado elevada atividade citotóxica em células tumorais e antioxidante pelos dois métodos químicos anteriores, neste ensaio, o extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* foi menos ativo do que a quercetina e não sustentou a atividade antioxidante em nível celular.

O extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum* apresentou excelente atividade citotóxica contra células cancerígenas da boca, sendo considerada uma espécie promissora. Entretanto, nos ensaios antioxidantes pelos métodos químicos empregados neste estudo, sua atividade foi considerada mais discreta. Dessa forma, procedeu-se à análise antioxidante em nível celular para constatar se esta espécie teria ou não a associação das duas atividades biológicas investigadas.

Na concentração de 50µg/mL, o extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum* atingiu a inibição de 30% dos radicais hidroxilas produzidos pelos macrófagos. Com 5µg/mL houve a inibição de apenas 8% dos radicais livres intracelulares. Por outro lado, nas concentrações menores não apresentou nenhuma inibição, como é demonstrado pela figura 5:



**Figura 5: Atividade antioxidante do extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum* contra o radical livre hidroxila intracelular.**

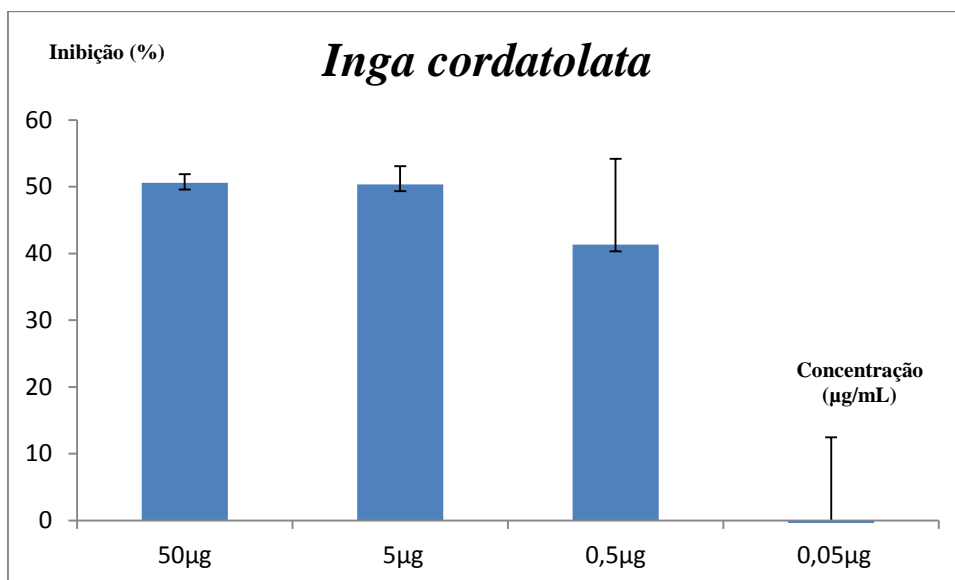
O desvio padrão deste teste ficou estabelecido em 4,9% e 2,7% para a primeira e segunda concentração respectivamente. Portanto, ficou demonstrado que o extrato em questão realmente não é capaz de desempenhar um efeito antioxidante significativo em sistema biológico, haja vista a sua degradação física ou enzimática no macrófago.

O extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* foi a amostra que mais apresentou atividade antioxidante pelos métodos químicos utilizados neste estudo. Além disso, os resultados dos testes citotóxicos comprovaram a excelente atividade deste extrato. Como esta amostra foi capaz de lisar 95% das células cancerígenas CAL-27 e também 95% dos fibroblastos saudáveis MRC-5 houve a necessidade de verificar se os efeitos antioxidantes seriam preservados em nível celular; se a amostra provocaria a morte da célula testada, ou se seria degradada pelo sistema fagocítico mononuclear.

Após a realização do teste foi confirmado que este material possui atividade antioxidante significativa em nível celular. Apesar de apresentar menor resposta contra os radicais hidroxilas nas concentrações maiores, conseguiu manter sua atividade quase estabilizada numa concentração onde o controle positivo demonstrou apenas 50% da atividade da amostra.

Na concentração de 50µg/mL o extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* demonstrou inibição intracelular de 50% desses radicais. Na dose de 5,0µg/mL ainda foi observado 50% de inibição, com desvio padrão de 1,2% e 2,7%. Nestas duas

concentrações, apresentou efeito antioxidante inferior à quercetina. Contudo, na dosagem de 0,5µg/mL revelou inibição de 41% dos radicais livres em análise, enquanto o controle positivo utilizado inibiu apenas 20% desses radicais nessa mesma concentração. Com 0,05µg/mL não foi observada atividade antioxidante nem na quercetina e nem na amostra. A figura 6 ilustra esses resultados abaixo:



**Figura 6: Atividade antioxidante do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* contra radicais hidroxilas intracelulares.**

Percebeu-se que esta amostra, quando em concentrações de 50µg/mL, desempenhou atividade citotóxica mais importante do que o quimioterápico utilizado como referência neste estudo. Por outro lado, foi constatado que em pequenas concentrações a amostra possui atividade antioxidante expressiva com efeito sustentado superior ao apresentado pelo controle positivo na concentração de 0,5µg/mL.

Dessa forma, procedeu-se ao rastreamento de citotoxicidade das frações das amostras consideradas mais promissoras para detectar se estes efeitos observados residem em uma única fração ou se a coexistência múltipla das substâncias do extrato metanol bruto são necessárias para a constatação das atividades encontradas. Utilizou-se inicialmente o teste com *Artemia salina* para esta finalidade com posterior confirmação nas células cancerígenas sempre contrastando com os efeitos produzidos nos fibroblastos saudáveis.

#### **5.4 Triagem de amostras com atividade citotóxica contra células humanas**

Este ensaio utilizou como controle positivo o antineoplásico doxorrubicina, por ser considerado potente e disponível no mercado para tratamento de vários tipos de câncer

(SCHELIGA et al, 2011; CAVALLERO et al, 2012). Foram testados quatro linhagens celulares, sendo duas cancerosas e duas saudáveis. Inicialmente foram testados fibroblastos humanos saudáveis e células de câncer de boca. Posteriormente, as de câncer de mama e macrófagos saudáveis.

#### 5.4.1 citotoxicidade das amostras frente aos fibroblastos humanos saudáveis

Existe dupla importância de verificar a capacidade das amostras para produzir a morte dos fibroblastos saudáveis. Primeiro, porque as células saudáveis possuem metabolismo diferente das cancerosas, entretanto, algumas substâncias anticancerígenas acabam por conseguir mata-las trazendo os efeitos adversos da quimioterapia. Segundo, porque os tumores sólidos possuem um estroma formado por fibroblastos que os circundam dando sustentação ao tumor e dificultando a absorção de substâncias antitumorais (ALBERTS et al, 2010).

Dessa forma, o estroma tumoral constitui-se num importante alvo terapêutico para combater os tumores sólidos. Procedeu-se, então, ao ensaio de citotoxicidade das amostras na concentração de 50µg/mL em estudo contra os fibroblastos, como pode ser observado no quadro 5:

**Quadro 5: Citotoxicidade comparativa do material botânico inicial contra fibroblastos humanos saudáveis (MCR-5) e células de câncer de boca (CAL-27).**

N	Amostra testada	Morte de MRC-5 (%)	Morte de CAL-27 (%)
01	<i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (espécime 1)	20,0	0,0
02	<i>A. amazonicus</i> (espécime 1)	30,0	25,0
03	<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	60,0	40,0
04	<i>A. amazonicus</i> (espécime 2)	25,5	40,0
05	<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	35,0	80,0
06	<i>A. amazonicus</i> (espécime 3)	20,0	65,0
07	<i>Aspidosperma marcgravianum</i> (cascas)	30,0	70,0

08	<i>A. marcgravianum</i> (folhas)	20,0	80,0
09	<i>Aspidosperma schultesii</i> (cascas)	50,0	60,0
10	<i>A. schultesii</i> (folhas)	50,0	80,0
11	<i>Bellucia dichotoma</i> (extrato diclorometano das cascas)	95,0	88,0
12	<i>B. dichotoma</i> (extrato hexano das cascas)	10,0	45,0
13	<i>Bellucia dichotoma</i> (extrato metanol das cascas)	80,0	95,0
14	<i>Bocageopsis multijuga</i> (extrato diclorometano das folhas)	50,0	20,0
15	<i>Bocageopsis pleiosperma</i> (extrato diclorometano das folhas)	10,0	70
16	<i>Colocasia antiquorum</i> (extrato metanol do caule - terra firme)	0,0	0,0
17	<i>C. antiquorum</i> (extrato metanol das folhas-várzea)	0,0	0,0
18	<i>C. antiquorum</i> (extrato metanol das folhas-terra firme)	0,0	10,0
19	<i>Couma guianensis</i> (extrato metanol das cascas)	95,0	95,0
20	<i>C. guianensis</i> (extrato metanol das folhas)	0,0	0,0
21	<i>Endlicheria bracteolata</i> (extrato diclorometano 1 das folhas)	0,0	0,0
22	<i>E. bracteolata</i> (extrato diclorometano 2 das folhas)	0,0	0,0
23	<i>E. bracteolata</i> (extrato hexano das folhas)	0,0	0,0

24	<i>E. bracteolata</i> (extrato metanol 1 das folhas)	90,0	85,0
25	<i>E. bracteolata</i> (extrato metanol 2 das folhas)	80,0	70,0
26	<i>Enterolobium schomburgkii</i> (extrato metanol das folhas)	40,0	80,0
27	<i>Geissospermum argenteum</i> (extrato metanol das cascas)	95,0	95,0
28	<i>G. argenteum</i> (extrato metanol das folhas)	10,0	70,0
29	<i>Geissospermum urceolatum</i> (extrato metanol das cascas)	0,0	0,0
30	<i>G. urceolatum</i> (extrato metanol das folhas)	0,0	65,0
31	<i>Himatantus sucuuba</i> (extrato metanol do caule)	72,0	82,0
32	<i>H. sucuuba</i> (extrato metanol da raiz)	40,0	60,0
33	<i>Ingá chrysanta</i> (extrato metanol das folhas)	0,0	60,0
34	<i>Ingá cordatolata</i> (extrato metanol das folhas)	95,0	95,0
35	<i>Macrolobium microcalyx</i> (extrato metanol das folhas)	40,0	80,0
36	<i>Mezilaurus duckei</i> (extrato hexano das folhas)	0,0	0,0
37	<i>M. duckei</i> (extrato metanol das folhas)	95,0	87,0
38	<i>Myrciaria cauliflora</i> (extrato diclorometano das folhas)	20,0	70,0

39	<i>M. cauliflora</i> (extrato hexano das folhas)	0,0	0,0
40	<i>M. cauliflora</i> (extrato metanol das folhas)	60,0	86,0
41	<i>M. cauliflora</i> (óleo das folhas)	35,0	60,0
42	<i>M. floribunda</i> (óleo das folhas)	10,0	40,0
43	<i>Theobroma cacao</i> (extrato metanol das folhas)	95,0	85,0
44	Doxorrubicina	90,0	86,0

Após esta análise, constatou-se que os extratos obtidos com metanol: das cascas de *Bellucia dichotoma*; das folhas de *Mezilaurus duckei*; das folhas de *Myrciaria cauliflora*; das folhas de *Endlicheria bracteolata*; das cascas de *Geissospermum argenteum*; das folhas de *Inga cordatolata*; das cascas de *Couma guianensis* e das folhas de *Theobroma cacao* possuem maior atividade citotóxica associada com a antioxidante. Procedeu-se ao fracionamento destes extratos em coluna de vidro com sephadex para verificar se as atividades observadas concentravam-se em uma fração específica ou se a coexistência das múltiplas substâncias é determinante para o fenômeno em estudo.

Os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante aliada à atividade citotóxica nas células tumorais foram aqueles extraídos com metanol. Procedeu-se ao fracionamento destas amostras, conforme a metodologia descrita, para verificar se essas atividades ficariam concentradas em uma única fração.

As diversas frações obtidas a partir dos extratos promissores passaram então por novos ensaios para detectar a atividade citotóxica em *Artemia salina* e sua capacidade antioxidante para neutralizar o radical livre DPPH. Estes ensaios objetivaram detectar as frações mais ativas para serem testadas em cultura de células humanas saudáveis e tumorais.

Os extratos analisados, após o processo de fracionamento cromatográfico com Sephadex LH20, não concentrou sua atividade antioxidante em uma fração específica. Existe a possibilidade de que haja sinergismo das substâncias presentes no extrato bruto para desempenhar a atividade observada anteriormente.



Outra hipótese que poderia explicar tal fenômeno se baseia no possível tamanho diversificado das moléculas antioxidantes presentes no extrato bruto e que ao passarem pelo referido fracionamento tenham se distribuído em pequenas concentrações em todas as frações obtidas. Isso motivaria uma pequena atividade em cada uma delas sem ser comparável ao efeito da quercetina, sendo consideradas, por esta razão, como não antioxidantes.

Todavia, não se pode descartar outras justificativas para o evento sob análise, haja vista a possibilidade da degradação de substâncias hipoteticamente fotossensíveis, responsáveis pela atividade observada nestes extratos brutos. Pois, a sua obtenção foi feita ao abrigo da luz, enquanto que o fracionamento não o foi. Também pode ter havido a remota possibilidade da interação das substâncias antioxidantes com a fase fixa da coluna cromatográfica impedindo a sua saída e concentração em uma das frações obtidas ao final do processo.

A espécie *Inga cordatolata* também foi considerada promissora nos ensaios anteriores e passou pelo mesmo processo de fracionamento com Sefadex LH20. Foi observado que algumas frações apresentaram atividade antioxidante muito expressiva.

#### 5.4.2 Citotoxicidade das frações em cultura de células humanas de câncer de mama (MCF-7).

As frações das espécies *Bellucia dichotoma*, *Geissospermum argenteum* e *Inga cordatolata* foram testadas na concentração de 25µg/mL em placas de 96 poços contendo 10<sup>4</sup> células/poço. Nas frações de *Bellucia dichotoma* foi observada uma grande limitação quanto à diluição, haja vista a persistência de resíduos precipitados mesmo após a tentativa de diluir com solventes, tais como: água, acetona, etanol, metanol, diclorometano, acetato de etila, hexano e DMSO. Talvez, esta limitação tenha influenciado nos resultados de baixa citotoxicidade observada.

Entretanto, os extratos das outras duas espécies não tiveram esta limitação e também não demonstraram nenhum efeito sobre as células cancerosas da mama. A doxorubicina, empregada como controle positivo foi a única substância presente no ensaio que conseguiu induzir a mortalidade celular na placa. Foi observado 62% de células mortas, bem abaixo dos 86% apresentados nas células inicialmente utilizadas neste trabalho.

Este fenômeno demonstra a importância do metabolismo diferenciado das células e seus intrincados mecanismos de sobrevivência que influenciam na resistência tumoral, bem como na maior gravidade da doença em alguns casos de câncer (ALBERTS et al, 2010). Pois, mesmo a espécie *Inga cordatolata*, considerada mais promissora nos ensaios químicos e biológicos realizados, não demonstrou efeito sobre as células de câncer de mama.

Todavia, os efeitos constatados para essa espécie demonstram seu potencial para a sua possível aplicação em outros tipos de câncer. Assim, houve a necessidade de testá-la, inicialmente, sobre um tipo de célula de defesa humana para vislumbrar o impacto que causaria sobre o sistema imune.

#### 5.4.3 Citotoxicidade do extrato metanol das folhas da espécie *Inga cordatolata* sobre células do sistema fagocitomononuclear.

O sistema imune humano consiste de dois mecanismos de resposta imunológica. Uma é chamada de resposta inata e a outra, de adaptativa, além do sistema complemento. A resposta inata é celular, enquanto a adaptativa é humoral, envolvendo a participação de anticorpos e os mecanismos de expansão clonal para a resposta imune tardia (PAHAM, 2010).

O macrófago é a primeira célula de defesa humana que tenta destruir o antígeno através de mecanismos conhecidos como fagocitose e pinocitose. O primeiro se refere à internalização de partículas agressivas ou que não sejam próprias do organismo, o segundo, quando se trata de líquidos considerados lesivos à estrutura orgânica (DELVES; ROITT, 2010).

Nos dois casos, o macrófago engloba o antígeno e tenta destruí-lo com suas enzimas digestivas ou através da explosão respiratória com a formação de radicais livres para a destruição do invasor. Quando não consegue elimina-lo, externaliza em sua membrana plasmática uma pequena porção do agressor realizando a apresentação deste epítipo para que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> identifiquem a invasão (PAHAM, 2010).

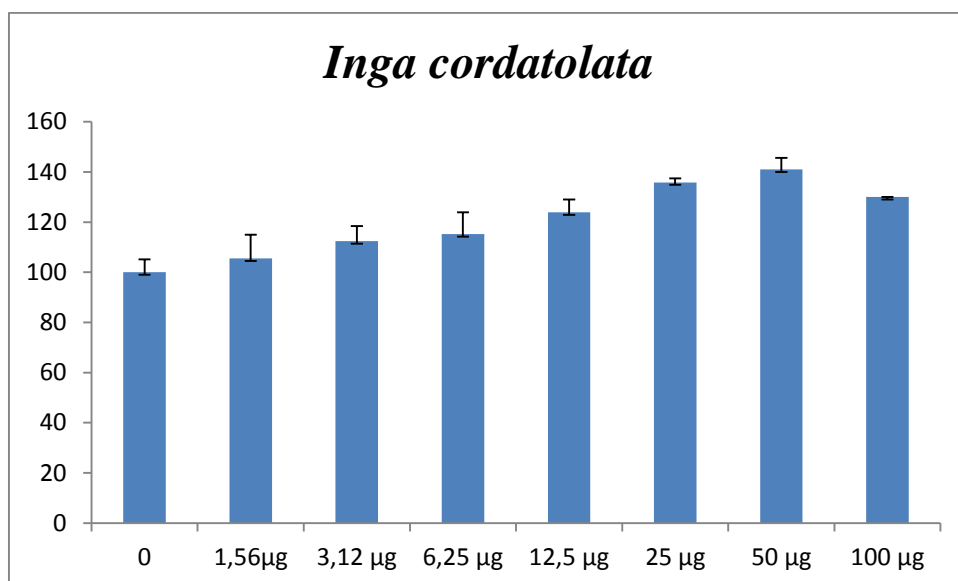
Feito isso, este linfócito ativa os linfócitos B através da apresentação do epítipo a eles, que se diferenciam em plasmócitos e passam a fabricar e a liberar anticorpos que combatem especificamente aquele invasor num processo chamado de opsonização (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012).

Contido pelos anticorpos, o antígeno, então, sofre a ação de enzimas tóxicas que os linfócitos citotóxicos lançam sobre ele para a sua destruição. Neste processo, ocorre a liberação de interleucinas, linfocinas e interferons, que culminam por ativar o sistema complemento que são proteínas que se agrupam para destruir as ligações químicas na estrutura externa do invasor resultando na sua degradação (PAHAM, 2010).

Portanto, o macrófago é uma importante célula de defesa capaz de dar origem a inúmeras respostas imunes do sistema inato e adaptativo. Por esta razão, este estudo privilegiou a sua utilização para rastrear os impactos que poderiam ser causados no sistema imune pela exposição à amostra. Pois, o seu poder citotóxico demonstrou-se expressivo em outras células testadas. Logo, esperava-se que a amostra fosse capaz de induzir a morte dos macrófagos, o que poderia comprometer a sua utilização terapêutica em sistemas biológicos.

Entretanto, foi constatado que a amostra não induziu morte celular sobre essas células. O controle negativo constituiu-se de cultura celular sem adição da amostra, na qual não foi constatada mortalidade. À medida que foi sendo adicionada concentrações crescentes da amostra sobre o cultivo teste, constatou-se, ao contrário de morte celular, o crescimento dessas células até atingir a dose de 50µg/mL.

Por outro lado, a cultura celular que recebeu a amostra na concentração de 100µg/mL demonstrou uma leve inibição proliferativa, sem, contudo, ser citotóxica. Este fenômeno reforça a hipótese de que em baixas concentrações o espécime em estudo apresenta capacidade antioxidante e à medida que a concentração se eleva inicia-se o seu efeito tóxico sobre as células. O efeito tóxico do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* sobre os macrófagos pode ser observado na figura 7:



**Figura 7: Efeito citotóxico do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* contra macrófagos.**

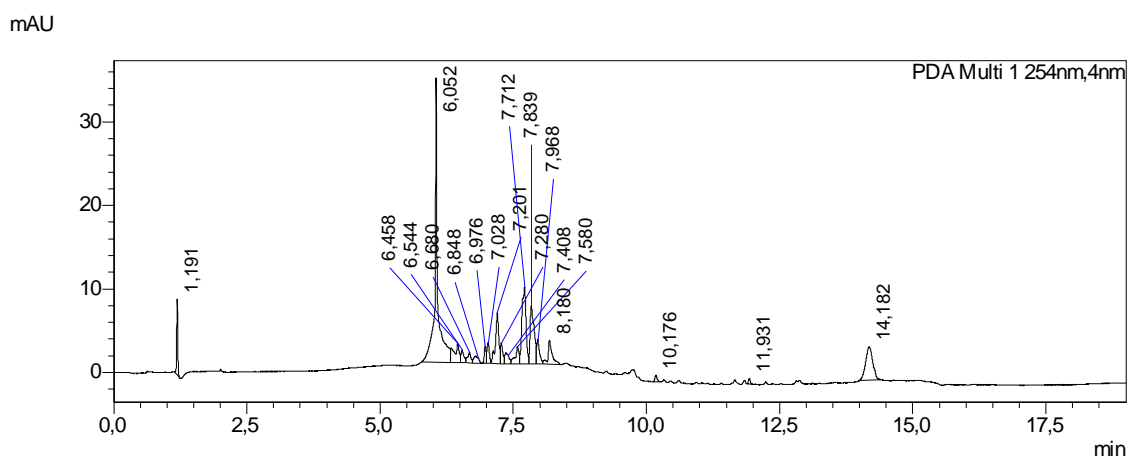
Estes achados demonstram que o extrato metanol das folhas da espécie *Inga cordatolata* possui uma considerável atividade antioxidante em nível celular e, teoricamente, não seria capaz de interferir de forma negativa sobre a resposta imune por não causar a morte dos macrófagos.

Acredita-se que se os efeitos observados neste estudo forem mantidos *in vivo*, haverá citotoxicidade seletiva para as células tumorais e uma ação antioxidante preventiva e reparadora nos tecidos normais, impedindo a formação de novos tumores. Pois, as fenestrações dos vasos sanguíneos dos tecidos saudáveis possuem de 5 a 10nm de tamanho, enquanto os tecidos tumorais apresentam esses orifícios com até 780nm. Além disso, a drenagem linfática tumoral é deficiente e permite a acumulação de drogas até chegar a um nível tóxico para as células tumorais (MALLAPPA; KESARLA; BANAKAR, 2015). Isso permitiria a entrada de uma pequena quantidade das substâncias deste extrato para os tecidos normais e seria desenvolvido, neste ambiente, a ação antioxidante observada nos ensaios anteriores.

Por outro lado, as fenestrações aberrantes dos tecidos tumorais permitiriam a entrada de grandes quantidades dessas substâncias no tumor. Como a drenagem linfática desse tecido é quase inexistente, acredita-se que poderá haver o acúmulo dessas substâncias até atingirem um nível tóxico para essas células, sem agredir ao sistema imune. Isso resultaria numa elevada ação terapêutica anticâncer sem efeitos colaterais, fenômeno este, aqui denominado hipótese da mínima dose.

## 5.5 Análise química dos extratos promissores

Dentre todas as espécies estudadas, três foram consideradas mais promissoras. A análise desse material mostrou a ocorrência diversificada de substâncias detectadas por HPLC. O extrato metanol das folhas da espécie *Theobroma cacao* apresentou 19 picos com diferentes tempo de retenção como pode ser constatado pelo cromatograma exemplificado na figura 8:



**Figura 8:** Cromatograma do extrato metanol das folhas de *Theobroma cacao* obtido por análise em equipamento HPLC.

Embora esta espécie tenha apresentado uma diversidade química interessante, sua atividade não foi considerada expressiva para a finalidade deste estudo. Porém, como contribuição para nortear outros estudos com este material transcreve-se o tempo de retenção observado em cada pico identificado conforme a tabela 10:

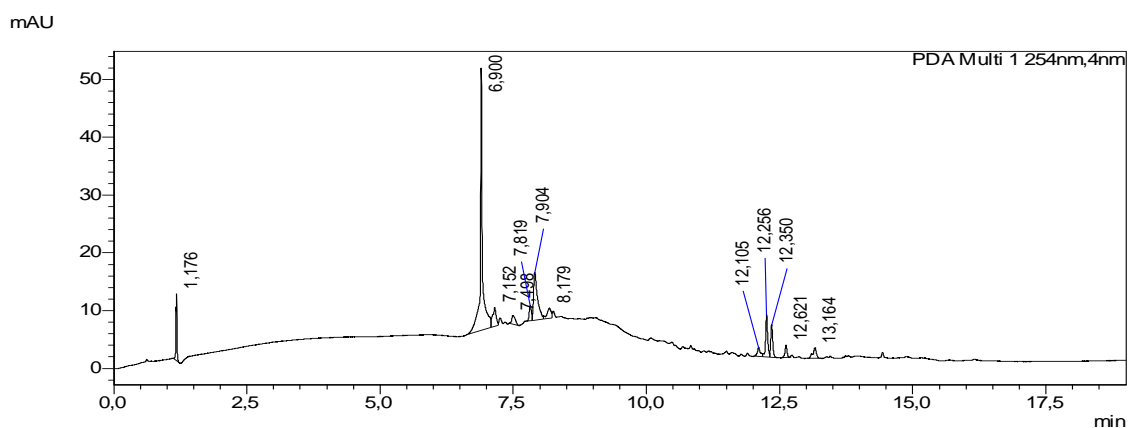
**Tabela 10:** Descrição do tempo de retenção e área das substâncias encontradas no extrato metanol das folhas de *Theobroma cacao*.

Pico	Tempo de Retenção	Área
Pico 1	1,191	12504
Pico 2	6,052	126881
Pico 3	6,458	15725
Pico 4	6,544	5659
Pico 5	6,680	5664
Pico 6	6,848	5222
Pico 7	6,976	5171
Pico 8	7,028	7183

<b>Pico 9</b>	7,201	26135
<b>Pico 10</b>	7,280	7316
<b>Pico 11</b>	7,408	7209
<b>Pico 12</b>	7,580	10419
<b>Pico 13</b>	7,712	48628
<b>Pico 14</b>	7,839	36624
<b>Pico 15</b>	7,968	10603
<b>Pico 16</b>	8,180	15644
<b>Pico 17</b>	10,176	2327
<b>Pico 18</b>	11,931	1668
<b>Pico 19</b>	14,182	36078
<b>Total</b>	-	386660

Como pode ser constatado na tabela acima, a substância majoritária no extrato metanol das folhas de *Theobroma cacao* é aquela relativa ao pico 2, com área de 126881 e tempo de retenção de 6,052 minutos. Esta substância representa 32,8% do total detectado neste extrato. Entretanto, esta amostra não foi considerada uma das mais relevantes para este estudo, motivando a priorização de outras espécies mais ativas.

A espécie *Couma guianensis*, apesar dos efeitos importantes observados nos ensaios, também não foi importante para a continuidade do estudo por não apresentar associação das atividades citotóxica e antioxidante de forma significativa. Sua análise no HPLC evidenciou a existência de 12 substâncias no extrato metanol de suas cascas, como demonstra a figura 9:



**Figura 9:** Cromatograma do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* obtido por análise em equipamento HPLC.

Muito embora haja a possibilidade de serem encontrados mais componentes químicos neste extrato por outros métodos, as substâncias que foram detectadas neste trabalho são apontadas pelos diferentes tempos de retenção de seus picos conforme revela a tabela 11:

**Tabala 11: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis*.**

Pico	Tempo de Retenção	Área
Pico 1	1,176	15421
Pico 2	6,900	126462
Pico 3	7,152	14719
Pico 4	7,498	7042
Pico 5	7,819	7670
Pico 6	7,904	42114
Pico 7	8,179	9498
Pico 8	12,105	5861
Pico 9	12,256	19313
Pico 10	12,350	14439
Pico 11	12,621	5650
Pico 12	13,164	8515
<b>Total</b>	-	276703

A substância relativa ao pico 2 na análise do extrato metanol das cascas de *Couma guianensis* mostrou-se mais abundante com área definida em 126462 e seu tempo de retenção em 6,9 minutos. Representa 45,7% do total das substâncias da amostra. Todavia a espécie foi retirada do estudo, haja vista não apresentar os requisitos necessários para o alcance dos objetivos propostos.

Ainda no grupo das espécies que apresentaram boa atividade, sem contudo ser considerada importante para os fins deste trabalho, pode-se classificar o extrato metanol das folhas de *Mezillaurus duckei*. Foram identificados 17 picos neste extrato bruto que correspondem às espécies detectadas por esta análise. Para contribuir com futuros estudos, seus picos de retenção estão expressos no cromatograma da figura 10:

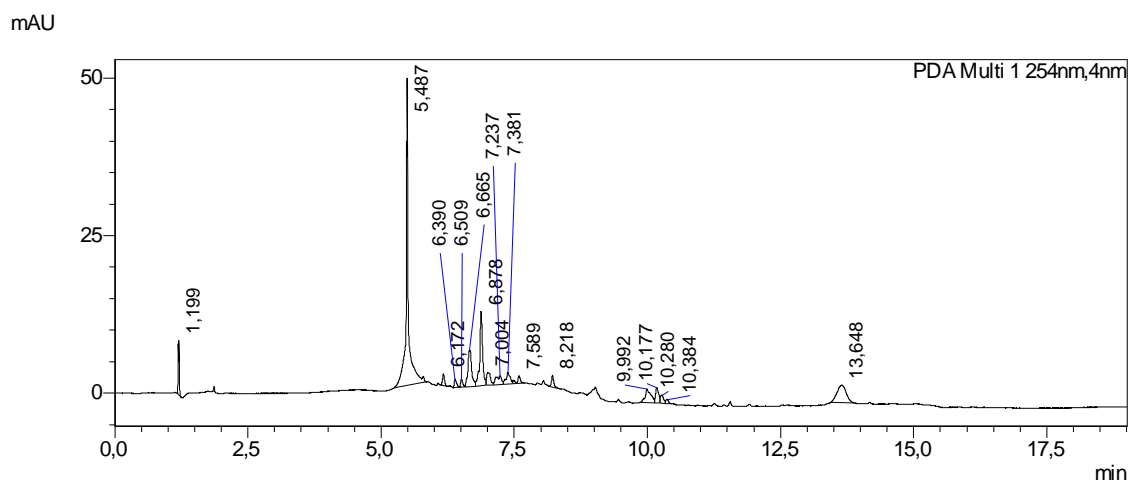


Figura 10: Cromatograma do extrato metanol das folhas de *Mezilaurus duckei* obtido por análise em equipamento HPLC.

Resumidamente, são apresentadas a sequência desses picos, bem como seus respectivos tempo de retenção e área relativa a cada um na tabela 12:

Tabala 12: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das folhas de *Mezilaurus duckei*.

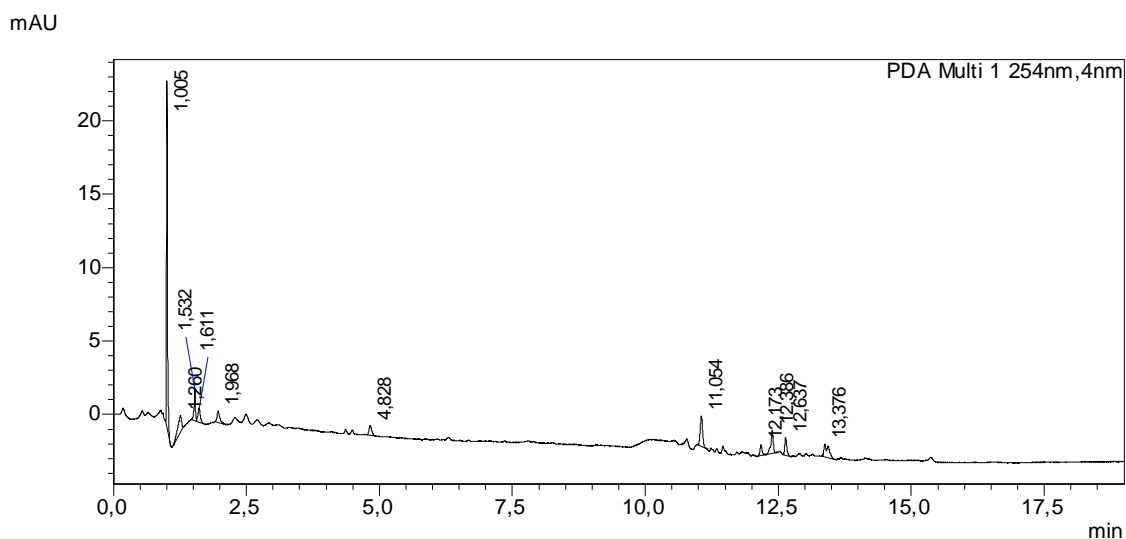
Pico	Tempo de Retenção	Área
Pico 1	1,199	11496
Pico 2	5,487	146494
Pico 3	6,172	4998
Pico 4	6,390	3784
Pico 5	6,509	3385
Pico 6	6,665	28516
Pico 7	6,878	43616
Pico 8	7,004	10307
Pico 9	7,237	10052
Pico 10	7,381	9378
Pico 11	7,589	4914
Pico 12	8,218	5489
Pico 13	9,992	16628
Pico 14	10,177	10118
Pico 15	10,280	5199



<b>Pico 16</b>	10,348	2075
<b>Pico 17</b>	13,648	33464
<b>Total</b>	-	349914

O pico 2 corresponde à substância majoritária do extrato metanol das folhas de *Mezilaurus duckei*, representando 41,8% do quantitativo total das substâncias presentes neste material botânico analisado. Contudo, não sendo considerada essencial para este trabalho, esta amostra também foi eliminada para privilegiar as que apresentaram associação significativa da citotoxicidade com a atividade antioxidante.

Apenas 11 picos foram detectados pela análise do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma*. Talvez este fato se deva não à inexistência de outras substâncias componentes deste extrato. Existe a possibilidade de que o tratamento prévio para a análise tenha retido parte dessas substâncias. Seguindo este raciocínio, pode-se afirmar que as limitações referentes à diluição do referido extrato certamente contribuíram para essa pequena detecção de substâncias presentes neste material. O cromatograma obtido nesta análise pode ser observado na figura 11:



**Figura 11: Cromatograma do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* obtido por análise em equipamento HPLC.**

O pico mais representativo foi o primeiro a ser detectado. O tempo de retenção e a área de cada pico apontado nesta análise podem ser observados conforme relaciona a tabela 13:

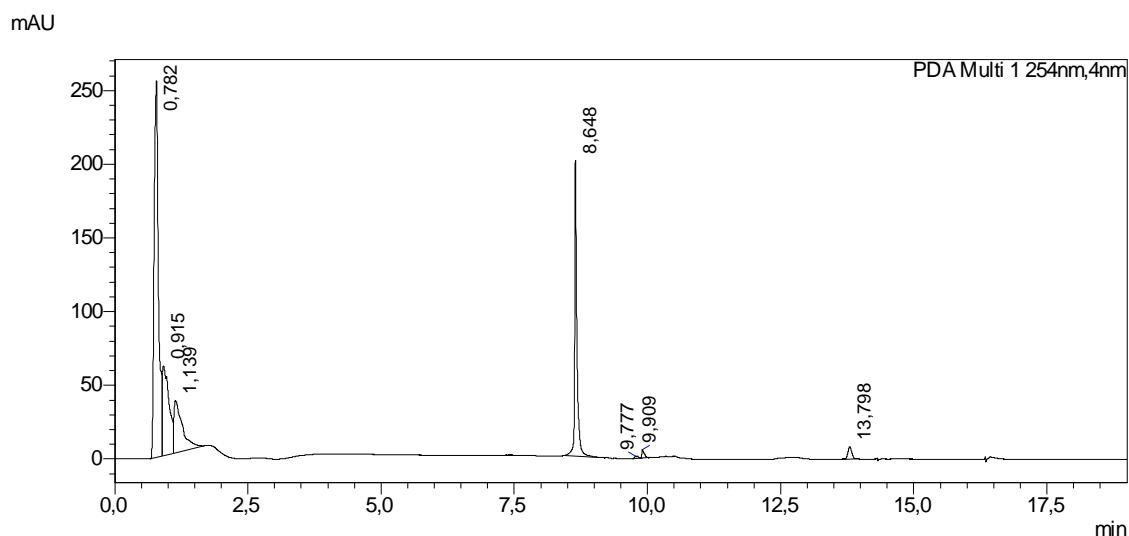
**Tabala 13: Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma*.**

<b>Pico</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>
<b>Pico 1</b>	1,005	29319
<b>Pico 2</b>	1,260	5805
<b>Pico 3</b>	1,532	3693
<b>Pico 4</b>	1,611	2950
<b>Pico 5</b>	1,968	2736
<b>Pico 6</b>	4,828	2525
<b>Pico 7</b>	11,054	6332
<b>Pico 8</b>	12,173	2098
<b>Pico 9</b>	12,386	4958
<b>Pico 10</b>	12,637	3143
<b>Pico 11</b>	13,376	5278
<b>Total</b>	-	68836

A substância majoritária do extrato metanol das cascas de *Bellucia dichotoma* representa 42,5% de todas encontradas nessa amostra. Sua área ficou determinada em 29319 e o tempo de tetenção observado foi de 1,005 minutos correspondendo ao pico 1.

Já a espécie *Geissospermum argenteum* apresentou sete picos correspondente às substâncias encontradas no extrato metanol de suas cascas. Todavia, ressalta-se novamente a possibilidade de que haja maior diversidade de substâncias no extrato que podem ter sido eliminadas no processo de preparo para a injeção da amostra no equipamento de HPLC.

Verificou-se também que essas substâncias possuem grande área total e que o pico 1 sozinho representa quase a metade das substâncias presentes no extrato. O seu tempo de retenção foi de 0,782 minutos e sua área ficou determinada em 1452974. O cromatograma obtido nesta análise pode ser observado na figura 12:



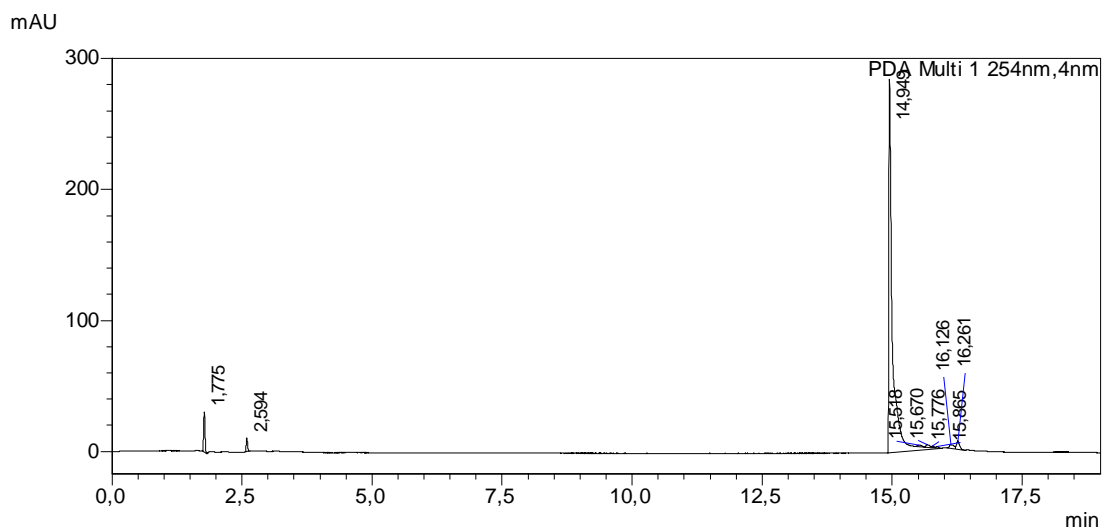
**Figura 12:** Cromatograma do extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum* obtido por análise em equipamento HPLC.

Esta espécie foi considerada promissora quanto à sua citotoxicidade celular. Já na atividade antioxidante não apresentou efeito muito significativo. Os picos detectados nesta amostra estão relacionados na tabela 14 com seus respectivos tempo de retenção:

**Tabala 14:** Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de *Geissospermum argenteum*.

Pico	Tempo de Retenção	Área
Pico 1	0,782	1452974
Pico 2	0,915	543484
Pico 3	1,139	379867
Pico 4	8,648	573946
Pico 5	9,777	7620
Pico 6	9,909	18312
Pico 7	13,789	41999
<b>Total</b>	-	3018204

Por outro lado, o extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* apresentou importante atividade citotóxica e antioxidante. Esta última, através de métodos químicos e biológicos em nível celular. Foram detectados nove picos correspondentes às substâncias presentes neste extrato, conforme pode ser observado na figura 13:



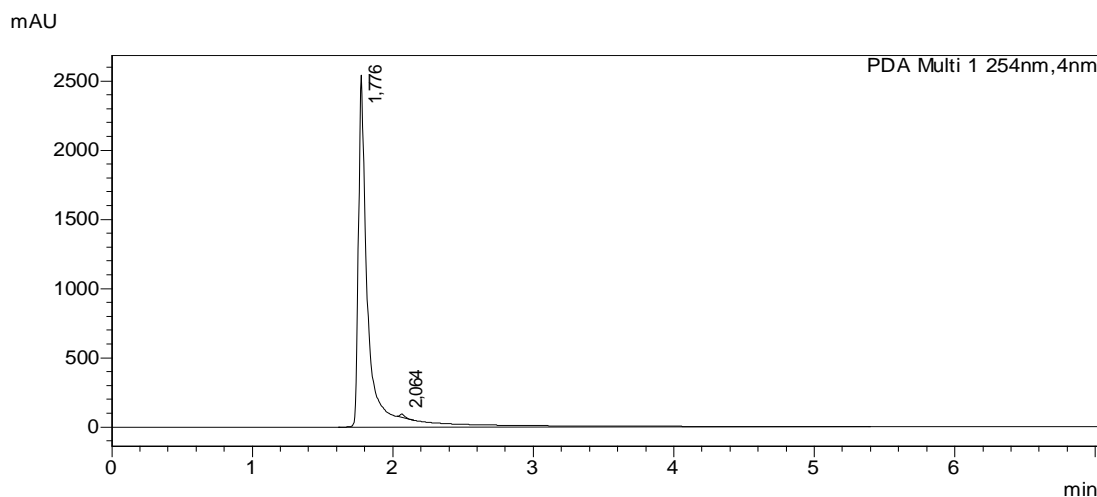
**Figura 13:** Cromatograma do extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* obtido por análise em equipamento HPLC.

Os picos encontrados nesta análise revelam que o extrato é composto predominantemente pela substância do pico 3, que saiu com tempo de retenção de 14,94 minutos. Essa afirmação se baseia no fato de sua área corresponder a 1359754 enquanto os demais picos possuem área menor, como pode ser observado na tabela 15:

**Tabala 15:** Descrição do tempo de retenção e área das substâncias detectadas por análise de HPLC fast do extrato metanol das cascas de *Inga cordatolata*.

Pico	Tempo de Retenção	Área
Pico 1	1,775	56079
Pico 2	2,594	18904
Pico 3	14,949	1359754
Pico 4	15,518	7412
Pico 5	15,670	8858
Pico 6	15,776	2732
Pico 7	15,865	3908
Pico 8	16,126	16234
Pico 9	16,161	24307
<b>Total</b>	-	1498187

O pico 1 apresenta tempo de retenção indicativo de que a substância em questão seja a quercetina, uma vez que ela também apresentou esta retenção sob as mesmas condições. Isso pode ser constatado pela análise da figura 14:

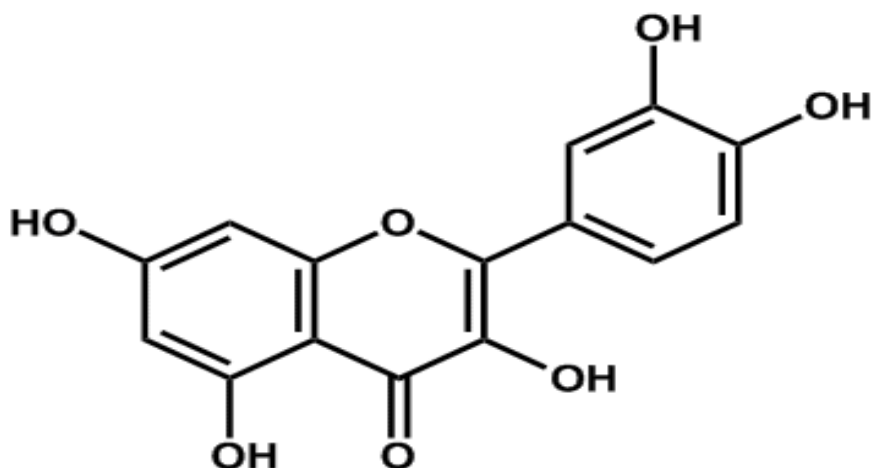


**Figura 14:** Cromatograma da substância padrão quercetina obtido por análise em equipamento HPLC.

Tais evidências coadunam com os dados da literatura sobre o gênero *Inga*, pois já foram identificadas neste gênero substâncias fenólicas como ácido gálico, catequina, epicatequina e o flavonoide quercetina (DIAS; SOUSA; ROGEZ, 2010). A elevada atividade antioxidante encontrada no gênero é justificada pela presença dessas substâncias, reconhecidamente antioxidantes (SILVA, 2012).

Além de ter apresentado excelente efeito antioxidante e citotóxico, o extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata*, apresenta características químicas que permitem supor que pelo menos uma das substâncias, possivelmente responsáveis por estas atividades seja a quercetina.

Pois, os flavonoides, como a quercetina, são eficientes antioxidantes pela sua capacidade em sequestrar radicais livres. Este efeito é direcionado sobre o radical hidroxila e anion superóxido, espécies altamente reativas envolvidas na peroxidação lipídica. Os múltiplos grupos hidroxilas presentes na quercetina, como pode ser observado na figura 15, também podem atuar como pró-oxidantes e pró-apoptóticos, induzindo efeitos citotóxicos diferenciados em cada tecido.

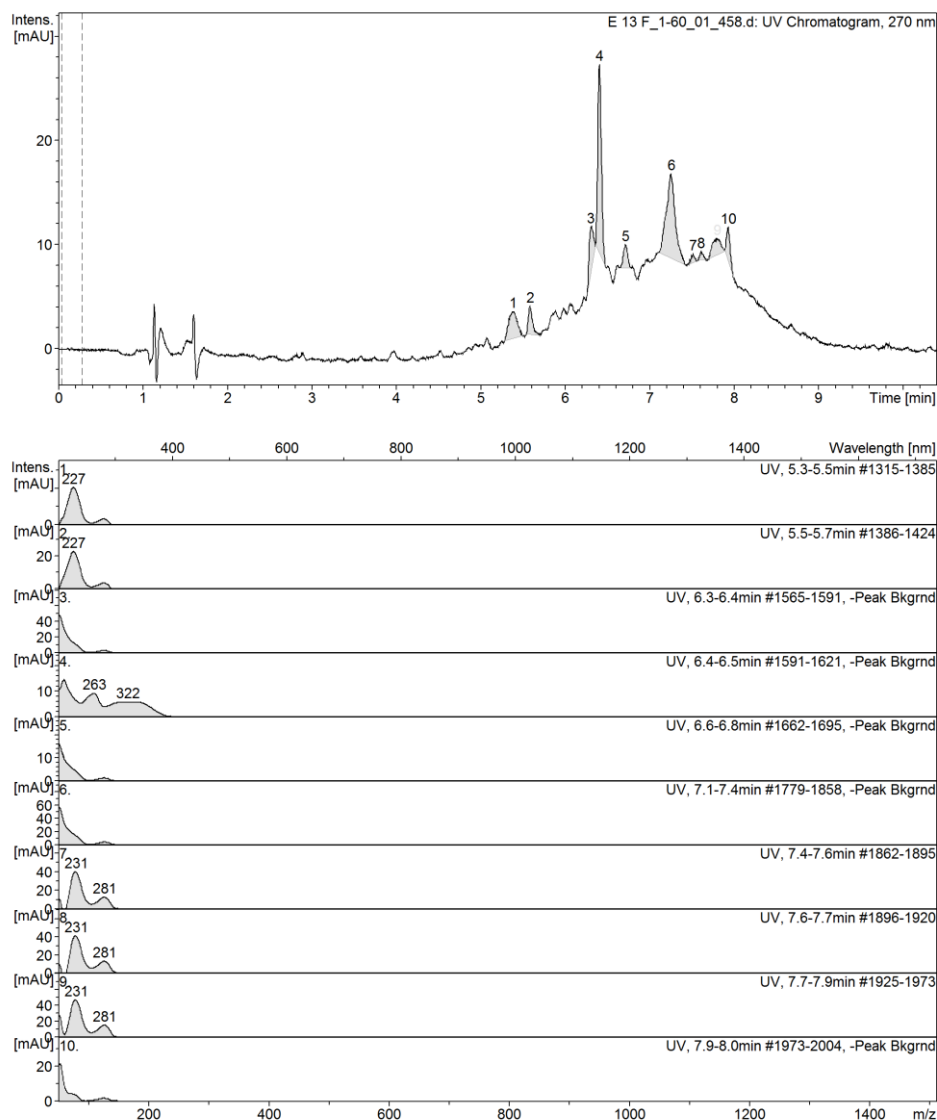


**Figura 15:** Estrutura química do flavonoide quercetina.

Portanto, a quercetina pode promover riscos oxidativos em alguns tecidos e os benefícios antioxidantes em outros (VERMELHO et al, 2014). Como em todos os ensaios realizados neste estudo houve uma comprovação contundente das atividades citotóxica e antioxidante, bem como o indicativo da presença dessa substância obtido na análise de HPLC, sugere-se que a quercetina seja uma das substâncias promotoras destes efeitos.

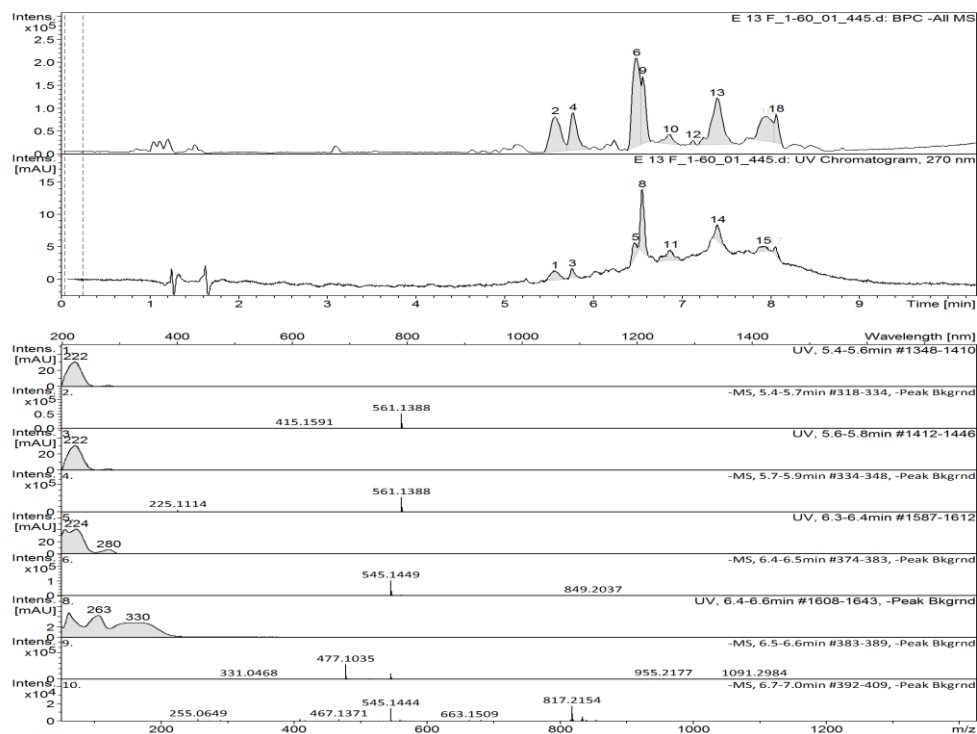
Por outro lado, as análises realizadas no CG-MS basearam-se na extração de uma fração diclorometano a partir do extrato metanol ativo. Entretanto, não detectaram a presença de possíveis substâncias de polaridade intermediária, reforçando a hipótese de constituintes de elevada polaridade do extrato ativo.

Devido aos resultados promissores obtidos nos ensaios antioxidantes e citotóxicos o extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* foi analisado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada com detector de arranjos de diodo e espectrômetro de massas (CLUE/DAD/EM). Nesta análise, apresentou características de um extrato complexo com 31 picos detectados e características de substâncias fenólicas ou flavonoides (FINGOLO; SOARES; KAPLAN, 2010). O cromatograma monitorado a 270 nm e os espectros na região do ultravioleta dos sinais de 4 a 10 indicaram a presença de substâncias fenólicas (figura 16). Esses constituintes foram caracterizados devido à banda de absorção característica do núcleo aromático em 280 nm. O sinal 4 apresentou espectro na região do ultravioleta característico de substância da classe química dos flavonoides.



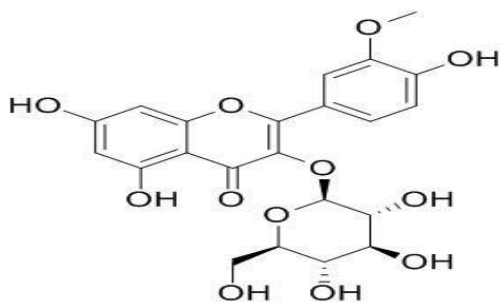
**Figura 16: Cromatograma de CLAE/DAD em 270 nm e os respectivos espectros UV de cada sinal**

No cromatograma obtido por espectrometria de massa (figura 17) o espectro de massas associado ao sinal 4 (espectro 9) pôde ser associado a um flavonoide descrito na literatura devido aos dados de massa de alta resolução (ROSSO et al, 2015). O valor massa/carga ( $m/z$ ) de 477.1035 (M-H) observado relacionado à fórmula molecular  $C_{22}H_{21}O_{12}$  foi semelhante ao flavonoide isorhamnetina 3-O-glucosideo ( $m/z$  calculado 477.1038). Estudos mostraram que esse flavonoide tem atividade imunoestimulante e que ele pode ser responsável pelo uso popular de *Urtica dioica* como anticancer (AKBAY et al, 2003).



**Figura 17:** Cromatogramas de massas e UV com os respectivos espectros de cada sinal

Os resultados apresentados nas análises por CLUE/DAD/EM são promissores e provavelmente poderão ser associados às atividades biológicas realizadas nesse trabalho após o isolamento dos constituintes dos extratos. A figura 18 ilustra a estrutura química do isorhamnetina 3-O-glucosídeo:



**Figura 18:** Estrutura química do flavonoide isorhamnetina 3-O-glucosídeo.

Por outro lado, a análise dos óleos essenciais das espécies *Myrciaria floribunda* e *Myrciaria cauliflora*, demonstrou um perfil químico complexo com a identificação de substâncias antimicrobianas, anti-inflamatórias e inseticidas, presentes em outras espécies do gênero (SCHNEIDER et al, 2008) e que justificam a atividade constatada contra *Artemia salina* neste estudo. A figura 19 apresenta o cromatograma de *Myrciaria floribunda* obtido em CG-MS:



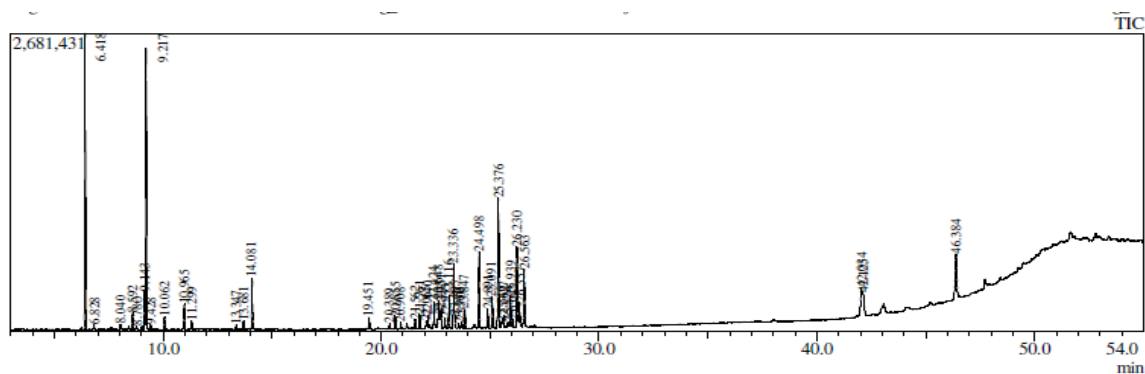


Figura 19: Cromatograma do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* analisado em CG-MS.

A substância majoritária identificada foi o 1,8-cineol representando 14 % da constituição química deste material e o  $\alpha$ -pineno representou 13,2% da sua constituição química. O óleo essencial de *Myrciaria cauliflora* apresentou menor complexidade quando comparado ao óleo essencial de *Myrciaria floribunda*. O cromatograma obtido pela análise em CG-MS pode ser observado na figura 20:

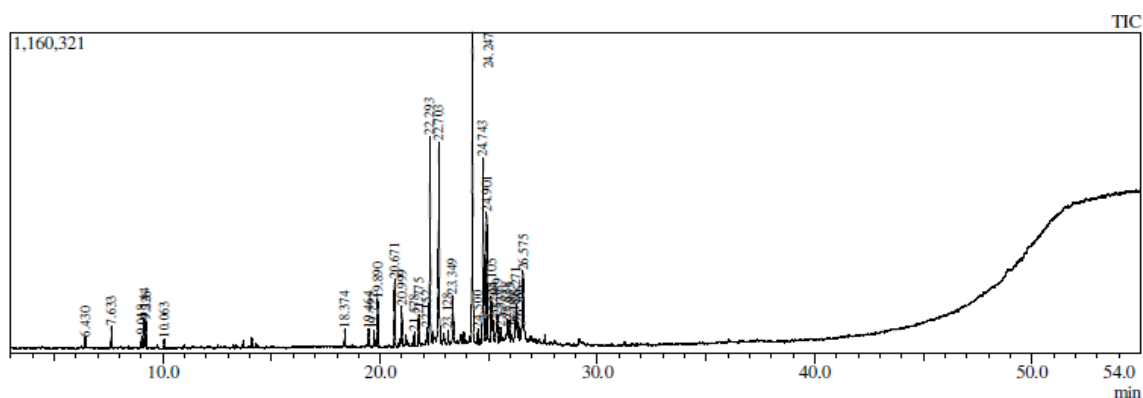


Figura 20: Cromatograma do óleo essencial de *Myrciaria cauliflora* analisado em CG-MS.

O perfil químico desta amostra contém variadas formas de germacreno, o que justifica sua ação contra o microrganismo teste neste estudo (SANTOS; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015), como mostra a tabela 16:

Tabela 16: Substâncias majoritárias do óleo essencial de *Myrciaria cauliflora* identificadas por análise em CG-MS:

Tempo de retenção	Área	% área	Substância
24.247	3015832	16.78	Germacreno B (CAS)
22.703	2296855	12.78	Biciclogermacreno
22.293	1995911	11.11	Germacreno-D

## 6 CONCLUSÃO

A presente dissertação partiu de um total de 43 amostras botânicas, envolvendo 21 espécies vegetais da Amazônia distribuídas entre as famílias: Annonaceae; Apocynaceae; Astraceae; Fabaceae; Lauraceae; Malvaceae; Melastomaceae e Myrtaceae. As mais ativas foram *Geissospermum argenteum*, da família Apocynaceae; *Bellucia dichotoma* da família Melastomaceae e *Inga cordatolata* pertencente à família Fabaceae, a qual revelou atividades citotóxica e antioxidante mais pronunciadas.

Foi demonstrada a relação entre mortalidade de *Artemia salina* com citotoxicidade em células de câncer de boca e atividade antioxidante por método químico e biológico para o extrato metanol das folhas da espécie *Inga cordatolata*. Na maioria dos ensaios, essa espécie demonstrou atividade superior ao controle positivo utilizado, à exceção da citotoxicidade em células MCF-7, para as quais se mostrou inócua, bem como suas frações. Existe a possibilidade de que a substância responsável pela atividade citotóxica tenha se perdido durante o fracionamento ou que tenha se eluído em concentrações muito pequenas pelas frações reduzindo seu poder citotóxico. Contudo, o seu efeito antioxidante foi preservado.

Os achados obtidos neste estudo permitem inferir que o extrato metanol das folhas de *Inga cordatolata* detém, de forma associada, as propriedades biológicas investigadas por este trabalho. Vale ressaltar que os extratos utilizados são constituídos de várias substâncias e que o poder citotóxico da substância ativa pode apresentar-se muito superior do que ora observado, uma vez que a doxorrubicina é uma substância pura e por essa razão sua concentração é superior quando comparada com a do extrato bruto. Dentre todas as amostras analisadas, *Inga cordatolata* apresenta maiores probabilidades de vir a se tornar uma fonte de medicamentos antineoplásicos.

Portanto, baseado nas análises químicas, biológicas e nos dados da literatura disponível, sugere-se que as substâncias responsáveis pelos efeitos observados sejam os flavonoides isorhamnetina 3-O-glucosídeo e a quercetina. De forma especial, acredita-se que seja apropriada a elaboração de nanocápsulas para testes *in vivo* com a finalidade de constatar se haveria distribuição seletiva do princípio ativo entre os tecidos normais e cancerosos, e se a atividade desta amostra seria, de fato, diferenciada em antioxidante nos tecidos normais e citotóxica nos tecidos cancerígenos, pela diferença de tamanho da porta de entrada nestes tecidos.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2012.

ABDO, Evandro Neves; GARROCHO, Arnaldo de Almeida; AGUIAR, Maria Cássia Ferreira de. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermoide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mario Penna em Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 357-362, out./dez., 2002.

ADAMS, R.P. Identification of Essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Alluredbooks – Illinois/USA, 4 ed., 2009. 804p.

AFOAKWA, Emmanuel Ohene; KONGOR, John Edem; TAKRAMA, Jemmy Felix; BUDU, Agnes Simpsons. Effects of pulp preconditioning on total polyphenols, O-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation and drying of cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. **Journal of Science and Engineering**, Ghana, n. 3, v. 3, mai. 2013.

AGGARWAL, Bharat; PRASAD, Sahdeo; SUNG, Bokyoung; KRISHNAN, Sunil; GUHA, Sushovan. Prevention and treatment of colorectal cancer by natural agents from mother nature. **Springer Science**, New York, v. 9, p. 37-56, 2013. DOI: 10.1007/s11888-012-0154-1.

AKBAY, Pinar; BASARAN, A. Ahmet Basaran; UNDEGER, Ulku; BASARAN, Nursen Basaran. In vitro Immunomodulatory Activity of Flavonoid Glycosides from *Urtica dioica* L. **Phytotherapy Research**, n. 17, p. 34–37, 2003. DOI: 10.1002/ptr.1068.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Biologia Molecular da Célula**, Porto Alegre, Artmed, 5ª ed., 2010.

ALCÂNTARA, Joelma M.; YAMAGUCHI, Klenice de K. L.; VEIGA JUNIOR, Valdir F. Composição de óleos essenciais de *Dicypellium manausense*, *Mezilaurus duckei*, *Mezilaurus itauba* e *pleurothyrium vasquezii*, quatro espécies da família Lauraceae. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 5, p. 469-475, set., 2013.

ALVES, Flávio Macedo; BATISTELLO, João Batista. Uma nova espécie de *Mezilaurus* Taubert (Lauraceae) para a flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 2, abr./jun., 2008.

ALVES, Flavio Macedo; FRISON, Sergianne; LEHN, Carlos Rodrigo. *Endlicheria ilhotzkyi* (Nees) Mez (Magnoliophita: Laurales: Lauracea): First record for the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Check List**, n. 8, v. 6, dez. 2012.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.66, n. 1, 2007.

ARAÚJO, Rosalia de Aguiar; COSTA, Reginaldo Brito da; FELFILI, Jeanine Maria; KUNTZ, Ivani; SOUSA, Roberto Antonio de Melo e; DORVAL, Alberto. ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J. M.; GUILTINAN, M.; DROC, G.; GOUZY, J.; ALLEGRE, M.; CHAPARRO, C.; LEGAVRE, T.; MAXIMOVA, N.. S.; ABROUK, M.; MURAT,

F.; FOUET, O.; POULAIN, J.; RUIZ, M.; ROGUET, Y.; RODIER-GOUD, M.; BARBOSA-NETO, J. F.; SABOT, F.; KUDRNA, D.; AMMIRAJU, J. S. S.; SCHUSTER, S. C.; CARLSON, J. E.; SALLET, E.; SCHIEX, T.; DIEVRAT, A.; KRAMER, M.; GELLEY, L.; SHI, Z.; BÉRARD, A.; VIOT, C.; BOCCARA, M.; RISTERUCCI, A. M.; GUIGNON, V.; SABU, X.; AXTELL, M. J.; MA, ZHAORONG; ZHANG, Y.; BROWN, S.; BOURGE, M.; GOSLER, W.; SONG, X.; CLEMENT, D.; RIVALLAN, R.; TAHI, M.; AKAZA, J. M.; PITOLAT, B.; GRAMACHO, K.; D'HONT, A.; BRUNEL, D.; INFANTE, D.; KEBE, I.; COSTET, P.; WING, R.; McCOMBIE, W. R.; GUIDERDONI, E.; QUETIER, F.; PANAUD, O.; WINCKER, P.; BOCS, S.; LANAUD, C. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, San Francisco, n. 2, v. 43, fev. 2011.

ARÉVALO, Juan Carlos Serratos; AMAYA, Javier Carreón; VÁZQUEZ, Hugo Castañeda; MORA, Pedro Garzón de la; ESTRADA, Joaquín García. Composição químico-nutricional y de factores antinutricionales em sementes de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). **Interciencia**, v. 33, n. 11, 2008.

ATANASOV, A.; FAKHRUDIN, N.; WALTENBERG, B.; CABARAVDIC, M.; HEISS, E. H.; NOHA, S. M.; GRZYWACZ, A. M.; MIHALY-BISON, J.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; ROLLINGER, J. M.; BOCHKOV, V.; STUPPENER H.; DIRSCH, V. M. Plumerincin isolated from *Himatanthus sucuuba* is a novel potente NF-kB inhibitor directly targeting IKK- $\beta$ . **EMBO Conference on Cellular Signaling & Molecular Medicine**, Cavtat-Dubrovnik-Croácia, mai., 2012.

ATES, Mehmet; DEMIR, Veysel; ARSLAN, Zikri; DANIELS, James; FARAH, Ibrahim O.; BOGATU, Corneliu. Evaluation of Alpha and Gamma Aluminum Oxide Nanoparticle Accumulation, Toxicity, and Depuration in *Artemia salina* Larvae. **Environmental Toxicology**, n. 30, out., 2015. DOI 10.1002/tox.

BALBINO, Eveling E; DIAS, Murilo F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 20, n. 6, dez. 2010.

BALDASQUIN, Cáceres Beatriz; ORTEGA, Vicente; DÍAZ, Martínez Vicente; GARCÍA, Francisco José Gomes. Efecto de los compuestos fenólicos apigenina, catequinas del cacao, ácido rosmarínico y eriocitrina sobre la carcinogénesis oral por DMBA em hamsters. [Tese de Doutorado]. **Depósito Digital Institucional de la Universidad de Murcia**, jan. 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10201/29539>> . Acesso em: 10 mar. 2015.

BARBOSA, A. P.; PALMEIRA, R. C. F.; NASCIMENTO, C. S.; FEITOZA, D. S.; CUNHA, M. S. C. Leguminosas Florestais da Amazônia Central. I. Prospecção das Classes de Compostos Presentes na Casca de Espécies Arbóreas. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3 mar., 2006.

BARRETO, Alaide de Sá; AMARAL, Ana Cláudia F. SILVA, Jefferson Rocha de A.; SCHRIPSEMA, Jan; REZENDE, Cláudia M.; PINTO, Angelo C. Ácido 15-desmetilisolplumierídeo, um novo iridoide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus sucuuba*. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, 1133-1135, 2007.

BEHRENS, M. D.; TAPPIN, M. R. R.; FAVORETO, R.; SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; BARBOSA, A. P.; SOUSA, L. A.; SIANI, A. C. Estudo prospectivo de

leguminosas da Amazônia Central. II. Composição química dos óleos das sementes. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, mar. 2006.

BLANCO, Ernesto; ALFARO, Johnny. Chemical modification of *Calophyllum brasiliense* Cambess. And *Enterolobium cyclocarpum* (jacq.) Griseb. **Colombia Florestal**, v. 17, n. 1, Bogotá, jan./jun., 2014.

BOLZÁN, Alejandro D.; BIANCHI, Martha S. Genotoxicity of streptonigrin: a review. **Mutation Research**, 488, p. 25-37, jan. 2001.

BONA, Eliana Almeida Mira de; PINTO, Fabiana Gisele da Silva; FRUET, Thomas Kehrwald; JORGE, Tereza Cristina Marinho; MOURA, Alexandre Carvalho de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014. DOI: 10.1590/1808-1657001192012.

BONADEU, Francismeire; SANTOS, João Ubiratan Moreira dos. Contribuição ao conhecimento dos gêneros da tribo Ingeae ocorrentes em uma floresta nacional da Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, abr./jun., 2013.

BORGES, Leandro Luiz; CONCEIÇÃO, Edemilson Cardoso; SILVEIRA, Dâmaris. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.064.

BRANDÃO, Hugo N.; DAVID, Juceni P.; COUTO, D. Ricardo; NASCIMENTO, Jorge A. P.; DAVID, Jorge M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, nov./dez., 2010.

BRASIL. Controladoria Geral da União, Transferência de recursos, 2014. Disponível em: <<http://www.transparencia.gov.br>>. Acesso em: 10 março 2014.

BRENER, Sylvie; JEUNON, Franca Arenare; BARBOSA, Alvimar Afonso; GRANDINETTI, Helenice de Andrade Marigo. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, 63-69, jan./mar., 2007.

BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, jan./fev., 2010.

CALDERON, Leonardo A.; ALMEIDA FILHO, Humberto A.; TELES, Roseli C. L.; MEDRANO, Francisco J.; BLOCH JUNIOR, Carlos; SANTORO, Marcelo M.; FREITAS, Sonia M. Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from amazona *Inga cylindrica* [vell.] Mart. seeds. **Brazilian Journal of Physiology**, São Paulo, v. 22, n. 2, abr./jun., 2010.

CAMARGO, M. R. M.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; CARNEIRO, A. L. B.; VITAL, M. J. S.; POHIT, A. M. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, abr./jun., 2013. DOI: 10.5935/1808-9569.20130002.

CARRAD, Vinícios Coelho; PIRES, Aline Segatto; PAIVA, Ricardo Losekann; CHAVES, Anna Cecília Moraes; SANT'ANA FILHO, Manoel. Alcool e câncer bucal:

Considerações sobre os mecanismos relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 1, p. 45-56, jan./fev., 2008.

CASTRO, Clemencia de; RIVEROS, Murcia Tulia Riveros de; JAIMES, Gustavo; TELLEZ, Afonso Alba N. Indução de apoptose pelo principio ativo de *Espeletia killipii* Cuatr. Sobre linhagens de células humanas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 4, out./dez., 2007.

CAVALLERO, S. R. A.; GOES, H. F. O.; SILVA, C. A.; NASCIMENTO, E. R.; COSTA F. N. F.; MOTA, N. R.; ARNAUD, M. V. C. Rabdomiossarcoma botrioide de próstata em adulto jovem: Relato de caso e revisão de literatura. **Revista brasileira de Oncologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 35, jan./mar., 2014.

CHANG, C; ZHAO, W.; XIE, B; DENG, Y.; HAN, T.; CUI, Y.; DAI, T.; ZHANG, Z.; GAO, J.; GUO, H.; YAN, J. Extrato Pao Pereira suprime o cancro da prostate resistente à castração crescimento celular, sobrevivência e invasão através da inibição da sinalização NFkB. **Cancer Integr. Ther.**, v. 13. N. 3, p. 249-258, Nanjing-China, mai., 2014. DOI: 10,1177/A1534735413510557.

CHAVASCO, Juliana Moscardine; FELIPE, Barbara Helena Muniz Prado e; CERDEIRA, Claudio Daniel; LEANDRO, Fabricio Damasceno; LEOMIL, Luiz Felipe Coelho; SILVA, Jéferson Júnior da; CHAVASCO, Jorge Kleber; DIAS, A. LATERCIA Tranches. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos vegetais do sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 1, jan./fev., 2014. DOI: 10.1590/s0036-46652014000100002.

CORTES, Diego; MORENO, Laura; PÁRRAGA, Javier; GALÁN, Abraham; CABEDO, Nuria. New medicines inspired in Annonaceas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n. 0,spe.1. Jaboticabal, fev., 2014. DOI: 10.1590/S0100-29452014000500003.

CRISP, Michael; ARROYO, Mary T. K.; COZINHE, Lyn G.; GANDOLFO, Maria A.; JORDAN, Gregory J.; MCGLONE, Matt S.; WETSON, Peter H.; WESTOBY, Mark; WILF, Peter; LINDER, H. Peter. Phylogenetic Biom Conservatism in global scale. **Nature**, San Francisco, v. 458, n. 7764, fev., 2009.

DASTMALCHI, Keyvan; FLORES, Gema; WU, Shi-Biao; MA, Chunhui; DABO, Abdoulaye J.; WHALEN, Kathleen; REYNERTSONS, Kurt A.; FORONJY, Robert F.; DÁRMIENTO, Jeanine M. Edible *Myrciaria vexator* fruits: bioactive phenolics for potential COPD therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, mai., 2012. DOI: 10.1016/bmc.2012.05013.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. Fundamentos de Imunologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª edição, 2010.

DIAS, Aécio Luiz de Sousa; SOUZA, Jesus Nazareno Silva de; ROGEZ, Hervé. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: Quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 38-42, jan./fev., 2010.

DOLABELA, Maria Fani; OLIVEIRA, Salma G.; PERES, José M.; NASCIMENTO, José MS Nascimento; PÓVOA, Marinete M.; OLIVEIRA, Alaíde B. In vitro atividade

antimalárica de seis Aspidosperma espécies do estado de Minas Gerais (Brasil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n.4; Rio de Janeiro, dez., 2012.

DUTRA, Rafael C.; PITTELLA, Frederico; DITZ, Dalton; MARCON, Rodrigo; PIMENTA, Daniel S.; LOPES, Mirian T. P.; RAPOSO, Nadia R. B. Composição química e atividade citotóxica do óleo essencial de *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 22, n. 5, set./out., 2012.

DUTRA, Saulo Moreira; SALIMENTA, Fátima Regina Gonçalves; MENINI NETO, Luiz. Annonaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 4, p. 785-793, jul./ago., 2012

ELEAZU, C. O.; ELEAZU, K. C.; IROAGANACHI, M. A. Effect of cocoyam (*Colocasia esculenta*), unripe plantain (*Musa paradisiaca*) or their combination on glycated hemoglobina, lipogenic enzymes, and lipid metabolism of streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, Chennai- India, abr. 2015. PMID: 25880140.

FAUSTIN, M.; MACIUK, A.; SALVIN, P.; ROOS, C.; LEBRINI, M. Steel corrosion inhibition for C38 *Geissospermum* alkaloids extract laeve 1M hydrochloric acid: Electrochemical studies and phytochemicals. **Corrosion Science**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 287-300, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.corsci.2014.12.005.

FAWOLE, O. A.; AMOO, S. O.; NDHLALA, A. R.; LIGHT, M. E.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. Van. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in south Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, 2010, p. 235-241. DOI: 10.1016/j.jep.2009.11.015.

FERNANDES, Andreia V.; RAMOS, Marcio V.; GONÇALVES, José Francisco c.; MARANHÃO, Paulo A. C.; CHEVREUIL, Larissa R.; SOUZA, Luiz Augusto G. Seeds of amazonian Fabaceae as a source of new lectins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 23, n. 3, jul./set., 2011.

FERREIRA, Cristiane da Silva; PIEDADE, Maria Teresa Fernandez; TINÉ, Marco Aurélio Silva; ROSSATTO, Rodrigo Davi; PAROLIN, Pia; BUCKERIDGE, Marcos Silveira. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. **Annals of Botany**, 104, p. 1111-1119, 2009. DOI: 10.1093/aob/mep212.

FERREIRA, Cristiana S.; PIEDADE, Maria Teresa Fernandez; JUNK, Wolfgang J. PAROLIN, Pia. Floodplain and upland populations of Amazonian *himatanthus sucuuba*: Effects of flooding on germination, seedling growth and mortality. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, jul. 2007.

FERREIRA, Fernanda G.; REGASINI, Luis O.; OLIVEIRA, Aline M. de; CAMPOS, Juliana A. D. B.; SILVA, Dulce H. S.; CAVALHEIRO, Alberto J.; SANTOS, Raquel A. dos; BASSI, Carmen L.; BOLZANI, Vanderlan da S.; SOARES, Christiane P. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 61-67, Jan./Mar. 2009.

FERREIRA, Yuri R. S.; AMARAL, Ana Cláudia F.; SILVA, Jefferson Rocha de A. Análise do óleo essencial de *Endlicheria*. **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Natal-RN, mai., 2014.

FINGOLO, C. E.; SOARES, R. C. O.; KAPLAN, M. A. C. Estudo Químico de *Musa acuminata* Colla (Musaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 5; n. 2; jun., 2010.

FONSECA, Jeandro Paes; MELO, Anderson Souza de; ABREU, Alcicley da Silva; PEREIRA, Daniel Tarciso Martins; SANTOS, Ilia Gilmara Carvalho dos; SANTOS, Evanir Correa dos. Perfil fitoquímico e avaliação citotóxica do extrato de resíduo madeira da espécie *Enterolobium schomburgkii* (Sucupira Amarela). **I Encontro de Química do Norte- SBQNORTE**, Manaus, out., 2014.

FOREZI, Luana da Silva Magalhães. Busca por novos complexos ditópicos com potencial atividade citotóxica. **Revista Virtual de Química**, Niterói-RJ, v. 2, n. 4, fev., 2011.

GALLEGO, Julieta; GANDOLFO, María A.; CÚNEO, N. Rruben; ZAMALOA, Maria C. Fossil Araceae from the Upper Cretaceous of Patagonia, Argentina, with implications on the origino of free- floating aquatic aroids. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 211, p. 78-86, set., 2014. DOI: 10.1016/j.revpalbo.2014.08017.

GANDRA, Eliezer A.; NOGUEIRA, Michelle B.; CHIM, Josiane F.; MACHADO, Míriam R. G.; RODRIGUES, Rosane S.; ZAMBIASI, Rui C.; VOLOSKI, Flavia L. S.; SCHNEID, Isabela; FREITAS, Priscila F. Potencial antimicrobiano y antioxidante de extractos vegetales de romero, hinojo, estragón y orégano. **Revista de Ciencia y Tecnología**, Posadas, n. 20 dez., 2013.

GARCES, Álvaro Henrique Ingles; MORA, Paulo Alexandre Ribeiro; ALVES, Flavia Vieira Guerra; CARMO, Claudio Calazan do; GRAZZIOTIN, Rachele; FERNANDES, Anna Cristina Ferrão Mangia; NOGUEIRA-RODRIGUES, Angélica; MELO, Andreia Cristina de. Carboplatina e Placitaxel em primeira linha paliativa no tratamento de câncer de colo uterino avançado ou persistente/recorrente: análise de uma série de casos do Instituto Nacional do Câncer do Brasil. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 31, jan./mar., 2013.

GOMES, Regina Ferreira; SANTOS, Hélcio Silva dos Santos; ALBUQUERQUE, Maria Rose Jane R.; PESSOA, Oflia Deusdênia L.; LOTUFO, Letícia V. Costa; PESSOA, Cláudia do Ó; MORAES, Manoel Odorico de; RODRIGUES, Felipe A. R. *Blainviellea rhomboidea*: Constituintes químicos e atividade citotóxica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5., mai., 2010.

GRIMALDI, Natália; SARMENTO, Viviane; PROVEDEL, Leonardo; ALMEIDA, Darcy de; CUNHA, Samantha da. Conduta do cirurgião-dentista na prevenção e tratamento da osteorradionecrose: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 4, p. 319-324, out./dez., 2005.

GUERRA, Eliete Neves da Silva; PAULA, Ébio C.; OLIVEIRA, José Carlos de; PINTO JUNIOR, Décio S. ARAUJO, Vera C.; ARAUJO, Ney S. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do P16 em carcinoma epidermoide de boca: correlação com sistema TNM e localização. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, p. 31-37, jan./mar., 2005.



- GUERRA, Maximiliano Ribeiro; GALLO, Claudia Vitoria de Moura; MENDONÇA, Gulnar Azevedo e Silva. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p227-234, jul./set., 2005.
- HENRIQUE, Marycleuma Campos; NUNOMURA, Sergio Massayoshi; POHLIT, Adrian Martin. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* E A. *desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, jan., 2010.
- KETTELHUT, Juliana do Carmo; MODENA, Marco Antonia Bittencourt. Câncer de mama e gestação. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, Sorocaba, v. 10, n. 4, out./dez., 2008.
- KRINSKI, Diones; MASSAROLI, Angélica; MACHADO, Marilza. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 36, edição especial, p. 225-242, fev., 2014.
- KUMAR, Dinesh; SINGH, Jitender; BAGHOTIA, Anupama; KUMAR, Sunil. Efeito anticonvulsivante do extrato etanólico das folhas de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 20, n. 5, ago. 2010.
- LANÇAS, Fernando M.; **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas-SP, editora Átomo, 2009.
- LEITE, A.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. S.; GOMES JUNIOR, A. L.; LIMA, S. G.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C.; LOPES, J. A. D. Evaluation of Toxic, Cytotoxic, Mutagenic, and Antimutagenic Activities of Natural and Technical Cashew Nut Shell Liquids Using the *Allium cepa* and *Artemia salina* Bioassays. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 626835, 16 pages, DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/626835>.
- LIMA, Consuelo Medeiros; BORGHETTI, Fabian; SOUSA, Marcelo Valle de. Temperature and germination of the Leguminosae *Enterolobium contortisiliquum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 9, n. 2, ago., 1997.
- LIMA FILHO, Amaro Bezerra de; SILVA, Joelmir Marques da; SANTANA, Michele dos Anjos de; MELO, Eliude Maria de; SILVA, Dominique Lima. Atividade anticarcinogênica de espécies arbóreas cultivadas ao longo do canal Derby-Tacaruna, Recife, Pernambuco. **XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE [Anais]**, Recife, 2013.
- LIMA, J. A.; COSTA, R. S.; EPIFANIO, R. A.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; PINTO, A. C. *geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 92, n. 3, mai., 2009. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.01.024.
- LIMA, Melissa Pires de; HILST, Luciana Farhat; MATTANA, Fernanda Vanessa Rechinbach; SANTOS, Cid Aimiré de Moraes; WEFFORT-SANTOS, Almeriane Maria. Lkalooid-rich fraction of *Himanathus lancifolius* contains anti-tumoral agents against leukemic cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, abr./jun., 2010.

LINGÁN, Joege. Araceae endémicas del Perú. **Revista Peruana de Biología**, Lima-Perú, v. 13, n. 2, dez., 2006.

LOPES, Luciane Cruz; BARBERATO-FILHO, Silvio; COSTA, Augusto Chad; OSORIO-DE-CASTRO, Cláudia Garcia Serpa. Uso racional de medicamentos antineoplásicos e ações judiciais no estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 4, ago., 2010.

LOPEZ-ALARCON, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidante capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, jan., 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.051.

LUCETTI, Daniel L.; LUCETTI, Elaine C. P.; BANDEIRA, Mary Anne M.; VERAS, Helenicy N. H.; SILVA, Aline H.; LEAL, Luzia Kalyne A. M.; LOPES, Amanda A.; ALVES, Victor C. C.; SILVA, Gabriela S. Silva; BRITO, Gerly Anne; VIANA, Glauce B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus sucuuba* (Mart.) plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, dez., 2010.

MACEDO-COSTA, M. R.; DINIZ, D. N.; CARVALHO, C. M.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 2B, p. 565-571, abr./jun., 2009.

MACHADO, Fernanda L. da S.; KAISER, Carlos R.; COSTA, Sônia S.; GESTINARI, Lísia M.; SOARES, Angélica R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, jun./jul., 2010.

MACHADO, Luciano Gandin; SCHEEL-YBERT, Rita; BOLZON, Robson Tadeu; CARVALHO, Marcelo de Araujo; CARVALHO, Ismar de Souza. Lenhos fósseis do Neógeno da Bacia do Acre, Formação Solimões: contexto paleoambiental. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 42, n. 1, mar., 2012.

MALLAPPA, Manjanna Kolammanahalli; KESARLA, Rajesh; BANAKAR, Shivakumar. Calcium Alginate-Neusilin US2 Nanocomposite Microbeads for Oral Sustained Drug Delivery of Poor Water Soluble Drug Aceclofenac Sodium. **Journal of Drug Delivery**, v. 2015, jan., 2015. DOI: 10.1155/2015/826981.

MARTINS, Sandro José; YAMAMOTO, Cristina Aoki. Aspectos clínico-econômicos da quimioterapia adjuvante no câncer de mama HER-2 positivo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 54, n. 6, nov./dez., 2008.

MARTINS, Tatielle Dias; GERON, Vera Lucia Matias Gomes. Plantas ornamentais tóxicas: conhecer para prevenir acidentes domésticos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, Ariquemes-RO, v. 5, n. 1, p. 79-98, jan./jun., 2014.

MESARIČ, Tina; GAMBARDELLAB, Chiara; MILIVOJEVIĆA, Tamara; FAIMALIB, Marco; DROBNEA, Damjana; FALUGIE, Carla; MAKOVECF, Darko; JEMECA, Anita; SEPČIĆA, Kristina. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 163, Jun., 2015, p. 121–129.

MEYER, B. N.; FERRING, N. R.; PUTNAM, J. E; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of medicinal*, vol. 45, p. 31-34, 1982.

MIRANDA, Aryádine Alline Machado de; NASCIMENTO, Alice Carvalho; PEIXOTO, Isy Lima; SCRIGNOLI, Juliana Alves; CARDOSO, Maria do Socorro de Lucena; RIBEIRO, Sandra Lúcia Elzébio. Síndrome de Erasmus – silicose e esclerose sistêmica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 53, n. 3, mai./jun., 2013.

MONTEIRO, Denise Leite Maia; TRAJANO, Alexandre José Batista; MENEZES, Daniela Contage Siccardi; SILVEIRA, Norma Luiza Machado; MAGALHÃES, Alessandra Caputo; MIRANDA, Fátima Regina Dias de; CALDAS, Barbara. Câncer de mama na gravidez e quimioterapia: revisão sistemática. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 59, n. 2, mar./abr., 2013a.

MONTEIRO, Hyara de Andrade Vieira; GOULART-CITRANGULO, Maria Torres; LEITE, Marcelo Sobral; GIACOMIN, Leticia Carlos; VIANNA-JORGE, Rosane. Influência de variáveis clinicopatológicas sobre a eficácia da quimioterapia neoadjuvante do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 3, jul./set., 2013b.

MONTELES, Ricardo; PINHEIRO, Claudio Urbano B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. V. 7, n. 2, jul./dez., 2007.

MORAGAS, Carla Junqueira; SAMPAIO, Thalia Rocha; SILVEIRA, Carine Ferreira da; KUSTER, Ricardo Machado; AMARAL, Ana Cláudia Fernandes. Contribuição ao estudo químico do gênero de espécies *Himatanthus*. **56º Congresso Nacional de Botânica** [Resumos], Curitiba, 2005.

MORAIS, Levy Silva; SIMÕES, Evelyne Rolim Braun; PESSOA, Cláudia d'Ó. Estudo Prospectivo do potencial anticâncer do monastrol. **Cadernos de Prospecção**, Salvador-BA, v. 5, n. 4, out./dez., 2012.

MOREIRA, T. M. S.; MOREIRA, R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. R. L. Rastreamento histoquímico, fitoquímico, e biológico de folhas de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel. Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1, jan./mar., 2010. DOI:10.1590/s0102-695x010000100011.

MASS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T. H.; VERMER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). **Blumea**, v. 52, p. 413-554, dez. 2007. DOI: 10.3767/000651907x608909.

MOURA, Valeria Mourão de; BEZERRA, Adrielle N. Serra; MOURÃO, Rosa Helena Veras; LAMEIRAS, Juliana L. Varjão; RAPOSO, Juliana D. Almeida; SOUZA, Rafael Luckwu de; BOECHAT, Antonio Luiz; OLIVEIRA, Ricardo Bezerra de; CHALKIDIS, Hipócrates de Menezes; DOS-SANTOS, Maria Cristina. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cong. (Melastomaceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubate and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, mai., 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.04.009.

MUÑOZ, V.; SAUVIAN, M.; BOURDY G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A

search for natural bioactive compounds in bolivia through a multidisciplinary approach par. I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, Cambridge, v. 69, p. 127-137, 2000. PII: s0378-8741(99)00148-8.

NAZARÉ, Clycia A. N. de; GONÇALVES, Regiane; AYRES, Vanessa F. dos S.; CASTRO, Adriana O.; SOUZA, Rodrigo O. S.; LIMA, Emerson S.; GUIMARÃES, Anderson C.; TAKEARA, Renata. Fenóis totais e atividade antioxidante de *Struthanthus* sp. parasita da munguba e *Phthirusa* sp. parasita do ingá – Loranthaceae. **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química [anais]**, Natal, mai., 2014.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Maryland, v. 75, p. 311-335, fev., 2012. DOI: 10.1021/np200906s.

OLIVEIRA, Aimêe A. de; AMARAL, Ana Cláudia F; SILVA, Jefferson R. de A. Caracterização de iridoides em espécies do gênero *Himatanthus*. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química [Anais]**, Florianópolis-SC, mai., 2011.

OLIVEIRA, J.; CASTELUCCI, A. C. L.; SILVA, P. P. M.; SILVA, G. M.; SPOTO, M. H. F. Polpa de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) submetida à radiação gama. **Acta Agronômica**, Palmira, v. 62, n. 1, jan./mar., 2013.

OLIVEIRA, Kamile Denise de; OSELAME, Gleidson Brandão; NEVES, Eduarda Borba. Infertilidade após o tratamento oncológico. **Revista de Medicina e saúde de Brasília**, Brasília, v. 3, n. 1, jan./abr., 2014.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da unidade oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 1, jan./mar., 2014.

ORLANDO, F. B.; SILVA, A. F. G.; PARREIRA, M. W. F. Screening fitoquímico de espécies de Lauracea que ocorrem na região sul do estado de Mato Grosso do Sul. **58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência [Anais]**, Florianópolis-SC, jul., 2006.

OSORIO, Maria Izabel Correia; SILVA, Kissinara Alessandra Marques Moreira da; SANTOS, Francislani Nascimento dos; NUNEZ, Cecília Veronica. Avaliação das atividades antioxidante e tóxica sobre *Artemia salina* dos extratos de *Inga alba* (SW.) Willd. (Fabaceae). **64ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência [anais]**, São Luís, jul., 2012.

PAHAM, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: ArtMed, 3ª edição, 2011.

PAPA, A. M.; PIRFO, C. B. L.; MURAD, A. M.; RIBEIRO, G. M. Q.; FAGUNDES, T. C. Impacto da obesidade no prognóstico do câncer de mama. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 31, jan./mar., 2013.

PARREIRA, M. V. F.; SANTOS, N. M. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVA, A. F. G.; MINGUZZI, S. estudo químico das folhas de uma espécie de Lauraceae que ocorre no município de Japorã-Mato Grosso do Sul. **XLVI Congresso Brasileiro de Química [Anais]**, Salvador, set., 2006.

PASTANA, Ana Raiza as Silva; XAVIER JUNIOR, Sebastião Ribeiro. Levantamento preliminar do gênero *Macrolobium* Schreb. (Leguminosae-caesalpinioideae) no estado do Pará. **16º Seminário de Iniciação científica da EMBRAPA**, Belém-Pa, 16 e 17 de agosto, 2012.

PAULA, José Elias de. Caracterização anatômica de madeira de sete espécies da Amazônia com vistas à produção de energia e papel. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 2, abr./jun., 2003.

PEDRALLI, Gilberto; CARMO, Carlos A. Simões do; CEREDA, Marney; PUIATTI, Mário. Uso de nomes populares para espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 530-532, dez., 2002.

PEREIRA-CARO, Gema; BORGES, Gina; NAGAI, Chifumi; JAKCSON, Mel C.; YOKOTA, Takao; CROZIER, Alan; ASHIHARA, Hiroshi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 427-434, jan., 2013. DOI: 101021/jf304397m.

PERON, Ana Paula; CAMILLOTO, Fabiano Gaspar; VICENTINI, Veronica Elisa Pimenta. Citotoxicidade do peróxido de carbamida em células meristemáticas de raiz de *allium cepa* L. potencial citotóxico de substâncias químicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 1, n. 3, set./dez., 2008.

PINTO, Antonio Moçambique; MORELLATO, L. P. C.; BARBOSA, Antenor Pereira. Fenologia reprodutiva de *Dipteryx* (Aubl.) Willd (Fabaceae) em duas áreas de floresta na Amazonia central. **Acta amazônica**, Manaus, v. 38, n.4, dez. 2008.

POMPEU, Darly R.; ROGEZ, Hervé; MONTEIRO, Karin M.; TINTI, Sirlene V.; CARVALHO, João E. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhos de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 42, n. 1, mar., 2012.

POMPILHO, Wendel Mattos; BORGES, Franz Viana; MIGUEL, Emílio de Castro. Biotecnologia e biodiversidade: as florestas brasileiras como fonte de novos fármacos com propriedades antitumorais. **Acta Scientiae & Technicae, Alegre-ES**, v. 1, n. 1, fev., 2013.

PORFIRIO, M. C. P.; SANTANA, R. O.; BARROS, H. E. A.; GONÇALVES, M. S. SANTOS, I. A.; SANTANA, G. A.; CAPELA, A. P.; OLIVEIRA, J. B.; SILVIA, M. V. Capacidade antioxidante e teor de fenóis totais em casca de *Myrciaria cauliflora* ssp. **54º Congresso Brasileiro de Química[anais]**, Rio Grande do Norte, nov., 2014.

POSSETTE, Rafael Fernando da Silva; RODRIGUES, William Antonio. O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 2, abr./jun., 2010.

PRIANTE, Antonio Vitor Martins; ALVES, Fabíola Vasconcelos; TARODA, Marcelo Falótico; OLIVEIRA, Maria Fernanda de. Carcinoma de células de Merkel em pele de face. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 28, abr./jun., 2012.

RABELO, Daniel Mansur; HENRIQUES, Bárbara oliveira; CASTILHO, Rachel Oliveira; LABANCA, Renata Adriana Labanca. Atividade antioxidante in vitro de

bebidas de café: influência da Forma de preparo. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Salvador , 25-28, nov., 2013.

RAFAEL, A.; JOSE, P.; JOSE, G.; JUAN, F.; SHIGA, B. Efecto citoprotector del camu-camu *Myrciaria dúbia* em três líneas celulares de ratón expuestos *in vivo* a bromato de potássio. **Revista Peruana de Biología**, Lima-Perú, v. 17, n. 3, dez. 2010.

RAJABI, Somayeh; RAMAZANI, Ali; HAMIDI, Mehrdad; NAJI, Tahereh. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Tehran, v. 23, n. 20, 2015. DOI:10.1186/s40199-015-0105-x.

RAMOS, Diovany Doffinger; CARDOSO, Claudia Andréa Lima; YAMAMOTO, Natanael Takeo. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambss.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, sup. 2, p. 774-776, jul., 2008.

RAMOS, M. B. P.; FERRAZ, I. D. K. Morphological studies of *Enterolobium schomburgkii* Benth. (Leguminosae-Mimosideae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, abr./jun., 2008. DOI: 10.1590/s0100-84042008000200005.

REINA, M.; RUIZ-MESIA, W.; LÓPEZ-RODRIGUEZ, M.; RUIZ-MESIA, L.; GONZÁLES-COLOMA, A.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. Indole alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. **Journal of natural Products**, Maryland, v. 75, p. 928-934, mai., 2012. DOI: 10.1021/np300067m.

RODRIGUES, Eliana; DUARTE-ALMEIDA, Joaquim M.; PIRES, Júlia Movilla. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) com potenciais analgésicos. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 6, nov./dez., 2010.

RODRIGUES, Rodrigo Schutz; FEITOZA, Gildo Vieira; FLORES, Andréia Silva. Relevância taxonômica da morfologia de sementes e plântulas em duas espécies amazônicas de *Entada* (Leguminosae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 44, n. 1, jan./mar., 2014.

ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES, G. C. M. T.; CASTRO, H. C.; LIONE, V. O. F. Incidência do Câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química**, Niterói-RJ, v. 5, n. 2, abr., 2013.

SÁ, Ivone Manzali de. “Fito-hormônios”: ciência e natureza no tratamento do climatério. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, out./dez., 2012.

SANTANA, Jeferson S.; SARTORELI, Patrícia; LAGO, João Henrique G.; MATSUO, Alisson L. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, set., 2012.

SANTOS, F. R.; BRAZ-FILHO, Raimundo; CASTRO, Rosane N. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* na composição química do óleo essencial. **Química Nova**, São Paulo, v. XY; n. 00, abr., 2015.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 3, p. 303-308, jul./set., 2001.

SANTOS, Kamila Monteiro dos; NUNES, Damiana Antonia de Fátima; GOMES, Izabela Natália Faria; RIBEIRO, Rosy Iara Maciel de Azambuja. Caracterização e atividade de extratos de uma espécie de Bauhinia sobre a ação de metaloproteínases. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 2, abr./jun., 2013.

SANTOS, L. C. O.; CANGUSSU, M. C. T.; BATISTA, O. M. SANTOS, J. P. Oral cancer: population sample of the state of Alagoas at a reference hospital. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 4, jul./ago., 2009.

SANTOS, Marília Harumi Higuchi dos. Detecção de cardiotoxicidade subclínica induzida por Trastuzumabe em portadoras de câncer de mama. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, jan./fev., 2013.

SARMADI, Bahareh; AMINIDDIN, Farhana; HAMID, Muharijr; SAARI, Nazamid; ABDUL-HAMID, Azizah. Hipoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. **Food Chemistry**, 134, p. 905-911, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.202.

SCHINEIDER, Naira F. Z.; MOURA, Neusa F.; COLPO, Tiara Colpo; MARTINS, Katiuska; MARANGONI, Cristiane; FLACH, Adriana. Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (cambu). **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v. 89; n. 2, p. 131-133, ago., 2008.

SCHELIGA, Adriana Alves de Souza; REINERT, Tomás; SANTOS, Alexsandra Lima Siqueira dos; STEFANOFF, Claudio Gustavo. Linfoma primário de mama: apresentação clínica e características histopatológicas e moleculares. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 28, abr./jun., 2012.

SCHULZ, Deisnara Giane; ORO, Priscilla; VOLKWEIS, Catia; MALAVASI, Marlene de Matos; MALAVASI, Ubirajara Contro. Maturidade fisiológica e morfometria de *Inga laurina* (Sw) Willd. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 21, n. 1, jan./mar., 2014.

SILVA, Carlos E. M.; GONÇALVES, José Francisco de C.; FELDPAUSCH, Ted R.; LUIZÃO, Flávio J.; MORAIS, Ronaldo R.; RIBEIRO, Glaudecy O. Eficiência do uso de nutrientes por espécies pioneiras crescidas em pastagens degradadas na Amazônia central. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 4, dez., 2006.

SILVA, Eudivânea Ferreira da; GARCIA, Maria del Pilar Diaz Bardales de. Morfologia dos frutos de algumas espécies de *Inga* Mill. (Leguminosae: Mimosoideae) ocorrentes na comunidade de Umariacú – Município de Tabatinga-AM. **61ª Reuniao Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência [anais]**, Manaus, 2009.

SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA FILHO, F. A.; CORRÊA, W. R.; SALVADOR, M. J.; SOUZA, A. Q. L. policarpol em *Unonopsis*, *Bocageopsis* e *Onychopetalum* especies da Amazonia: implicações química e

- sistemática e avaliação antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 11-15, jan./fev., 2015. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.01.003.
- SILVA, J. O.; PASTORE, T. C. M.; PASTORE JUNIOR, F. Resistance to artificial weathering of five tropical woods and of two finish products. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 17-23, jan., 2007.
- SILVA, Jefferson Rocha A.; REZENDE, Claudia M.; PINTO, Angelo C.; AMARAL, Ana Claudia F. Citotoxicity and antibacterial studies of iridoids and phenolic compounds isolated from the latex of *Himatanthus sucuuba*. **African Journal of Biotechnology**, África, v. 9, n. 43, p. 7357-7366, out., 2010. DOI: 10.5897/AJB10.345.
- SILVA, Jefferson Rocha A.; REZENDE, Claudia M.; PINTO, Angelo C.; PINHEIRO, Maria L. B.; CORDEIRO, Milade C.; TAMBORINI, Everaldo; YONG, Cláudia M.; BOLZANI, Vanderlan da S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, nov./dez., 1998.
- SILVA, Renata Alves Lara; SOARES, Joyce Doria Rodrigues; RODRIGUES, Felipe Almedagna; PASQUAL, Moacir; PEREIRA, Fabrício José; CHAGAS, Edvan Alvas. Análise histoquímica em sementes de ingá (*Inga sissamomea* Spruce ex Benth). **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura [anais]**, Bento Gonçalves-RS, out., 2012.
- SILVA, Sandra Tavares da; MARTINS, Mariana Campos; FARIA, Franciane Rocha de; COTTA, Rosângela Minardi Mitre. Combate ao tabagismo no Brasil: a importância estratégica das ações governamentais. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, fev., 2014.
- SILVA, Silas Arandas Monteiro e; VALARINI, Michele Fernanda Costa; CHORILI, Marlus; VENTARINI, Anna; LEONARDI, Gislane Ricci. Atividade antioxidante do extrato seco de cacau orgânico (*Thebroma cacao*) – estudo de estabilidade e teste de aceitação de cremes acrescidos deste extrato. **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, 2013.
- SILVA, Wanderson Luiz da Silva e; COSTA NETO, Salustiano Vilar; SOARES, Marcos Vinicius Batista. Diversidade de Leguminosas em savanas do Amapá. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 5, n. 1, fev. 2015.
- SILVEIRA, Augusta; GONÇALVES, Joaquim; SEQUEIRA, Teresa; RIBEIRO, Cláudia; LOPES, Carlos; MONTEIRO, Eurico; PIMENTEL, Francisco Luís. Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives. **Brazilian Journal of Epidemiology**, São Paulo, v. 15, n. 1, mar., 2014.
- SOARES, E. R.; SILVA, F. M.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; KOOLEN, H. H.; LOURENÇO, C. C.; SSLVADOR, M. J.; FLACH, A, COSTA, L. A.; SOUZA, A. Q.; PINHEIRO, M. L.; SOUZA, A. D. composição química e avaliação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Bocageopsis pleiosperma* Maas. **Nat. Prod. Res.**, jan., 2015.
- SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.;



ARAÚJO, P. B. M.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, vol.30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, L. R. M. B.; FERRAZ, K. D.; PEREIRA, N. S.; MARTINS, M. V. Conhecimento acerca do câncer bucal e atitudes frente à sua etiologia e prevenção em grupo de horticultores de Teresina (PI). **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 1, p. 31-39, jan./mar., 2012.

SOUZA, Vinícius Nora de. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtubulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, mar./abr., 2004.

SPADACIO, Cristiane; BARROS, Nelson Filice de. Terapêuticas convencionais e não convencionais no tratamento do câncer: ao sentidos das práticas religiosas. **Interface – Comunicação, Saúde, Educação, Botucatu**, v. 13, n. 30, jul./set., 2009.

STADTLER, Eva Warren Coraciara; RODRIGUES, Robson; ROSA, Sejana Artiaga; ROSA OSMAN, Sônia Maciel da; PRATA, Rossiliane Ribeiro; SCHONGART, Jochen. Análise dendroclimática de *Maclobium acaciifolium* (Benth) Benth. (fabaceae) na várzea da ilha da Marchantaria- Amazônia Central. **57º Congresso Nacional de Botânica [Anais]**, Gramado-RS, nov., 2006.

STEVENS, Jason M.; MACMILAN, David W. C. Enantioselective  $\alpha$ -alkenylatio of aldehydes with bromic acids via the synergistic combination of copper (II) and amine catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, New Jersey, United State, v. 135, p. 11756-11759, july, 2013.

SUAREZ, Luiz Henrique Cuca. Contribucion al studio químico de las Lauraceas en Colombia. **Revista Colombiana de Quimica**, v. 8, n. 1, jan., 1978.

TANAKA, Pedro Paulo; TORRES, Maria Fernanda; TENÓRIO, Sérgio Bernardo. Análise do potencial citotóxico agudo de bupivacaína e bupivacaina em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) incorporadas a microesferas sobre o nervo ciático de ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 2, mar./abr. 2012.

TANGERINA, Marcelo Marucci Pereira; SANNOMIYA, Miriam; VILEGAS, Wagner. Flavonóides isolados das folhas de *Machaerium hirtum* (Fabaceae). **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química [anais]**, Florianópolis-SC, mai., 2011.

TIAN, Xin; SCHAICH, K.M. Effects of molecular structure on kinetics and dynamics of the trolox equivalente antioxidante capacity assay with ABTS+. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 61, may., 2013. DOI: dx.doi.org/10.1021/jf4010725.

VERMELHO, Alane Beatriz; SUPURAN, Claudiu T. Supuran; CARDOSO, Verônica; MENEZES, Dayanne Menezes; SILVA, Jefferson Rocha de Andrade; FERREIRA, Jose Luiz Pinto; AMARAL, Ana Claudia Fernandes; RODRIGUES, Igor A. **Leishmaniasis: Possible New Strategies for Treatment**. Mar., 2014. DOI: 10.5772/57388.

VILELA, R. C. F.; ASSIS, J. G. A.; NÓBREGA FILHO, L.; VIANA, B. F. Sistema reprodutivo e diversidade genética da quatro especies de *Myrciaria* (Myrtaceae, jaboticabeiras). **Acta Botânica Brasileira**, v. 26, n. 4, out./dez., 2012.

WALTENBERG, B.; FRAKHRUDIN, N.; CABARAVDIC, M.; ATANASOV, A. G.; HEISS, E. H.; BREUSS, J. M.; ROLLINGER, J. M.; BOCHKOV, V.; STUPPER H. DIRSCH, V. Identification of plumericin from *Himatanthus sukuuba* as a novel potent inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway directly targeting IKK- $\beta$ . **Planta Med.** V. 78, n.13, 2012.

WEN, W. M. A.; KOZLOWSKI, J. F.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive neolignans from *Endlicheria dysodantha*. **Journal of Natural Products**, Maryland, v. 54, n.4, jul./ago., 1991.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, set., 2007, p. 8896–8907. DOI: 10.1021/jf0715166.  
WOOD, Cristina A.; LEE, Kit; VAISBERG, Abraham J; KINGSTONS, David G. I.; C. NETO, Catherine; HAMMOND, Gerald B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sukuuba*. **Chem. Pharm. Bull.** Japão, v. 49, n. 11, nov., 2011.

World Health Organization. **Relatório Mundial de Câncer**, ficha 297, 2014.

WU, S.; DASTAMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolic profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, New York, v. 60, p. 7513-7525, jul., 2012. DOI: 10.1021/jf301888y.

WU, S.; WU, J.; YIN, Z.; ZHANG, J.; LONG, C.; KENNELLY, E. J.; ZHENG, S. Bioactive and marker compounds from two edible dark-colored *Myrciaria* fruits and the synthesis of jaboticabin. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, New York, v. 61, p. 4035-4043, abr., 2013. DOI: 10.1021/jf400487g.

YAMAGUCHI, K.; LEANDRO, L. M.; ALCANTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Inibição de Acetilcolinesterase, atividade antioxidante e composição dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Lindóia-SP, 2008.

YANG, J. Y.; MOTIAL, LAMBERT A.; DEMPEWOLF, Hannes; MAHARAJ, Kamaldeo; CRONK, Q. C. B. Chloroplast microsatellite primers for cacao (*Theobroma cacao*) and other Malvaceae. **American Journal of Botany**, 2011. DOI: 10.3732/ajb.1100306.

ZHU, Shijun; WU, Yikang. Syntesis of the anti-melanogenic glycerol fatty acid ester isolated from the tuber-barks of *Colocasia antiquorum* var. *esculeta*. **SYNLETT**, New York, v. 25, nov., 2014. DOI: 10.1055/s-0033-1340078; Art ID: ST-2013-w0861-L.