

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DA
Calyptranthes grandifolia O.Berg EM CULTURA CELULAR**

Luciana Knabben de Oliveira Becker Delving

Lajeado, janeiro de 2015

Luciana Knabben de Oliveira Becker Delving

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DA
Calyptranthes grandifolia O.Berg EM CULTURA CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Marcia Ines Goettert

Coorientadora: Prof. Dra. Adriane Pozzobon

Lajeado, janeiro de 2015

“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que fez a tua rosa tão importante”.
(Antoine de Saint-Exupery - Trecho de "O pequeno Príncipe)

Dedico

Ao meu marido Jackson e meus filhos João Vítor e Pedro Henrique, que me apoiam e me amam incondicionalmente, e sempre me guiam por caminhos mais leves, tornando a minha vida muito mais feliz!

À Deus pela vida!

AGRADECIMENTOS

“Felicidade! É inútil buscá-la em qualquer outro lugar que não seja no calor das relações humanas...só um bom amigo pode levar-nos pelas mãos e nos libertar”

(Antoine de Saint-Exupery)

Devo tanto à tantos, que posso me fazer injusta sem querer... mas ainda assim arrisco-me a citar nomes, pois quero que aqui fique registrado a minha mais profunda gratidão!

Inicio lembrando a gênese, pai e mãe, João e Rosalva, que me trouxeram ao mundo e me deram o que há de melhor: amor, carinho, educação e a oportunidade de estudar e realizar um sonho, tornar-me médica. Ainda que com muito sacrifício, nunca nada me faltou! Sempre batalhadores, vocês me inspiraram e me inspiram com seus exemplos e me mostram dia-a-dia o quão infinito pode ser o amor ... Ao meu irmão Gustavo, o Gugu, que é pra lá de especial e me surpreende cada vez mais com sua maturidade, mesmo em seu mundo de menino! Te amo, meu gordo!

Ao meu marido Jackson que me acompanha e me apoia em todas as minhas etapas, obrigada pela paciência e pela compreensão. Te amo muito!!!

Aos meus filhos, João Vítor e Pedro Henrique, jóias raras da minha vida! Tudo é por vocês! Desculpe pelos momentos que não pude estar presente, mas meu coração e meus pensamentos sempre estiveram e sempre estarão com vocês! Amo infinitamente!

Aos meus sogros, Rudi e Sonia , conselheiros e apoiadores, que minimizam a distância do convívio com os meus pais, sempre com uma palavra de otimismo , conforto e uma fé inabalável! Obrigada para sempre!!

Vanessa e Roberto! A família que ganhei quando me casei! Agradeço pelos momentos descontraídos nos finais de semana, que me oxigenavam e me faziam sair da rotina pesada... e pelos afilhados maravilhosos, Julia e Gabriel, que são duas preciosidades em meu caminho, que me remetem ao texto de Artur da Távola que diz: “Ser jovem é amar a simplicidade, o vento, o perfume das flores, o canto dos pássaros. Ter alegria ao dramático, ao solene. E duvidar das palavras... é planejar praias no fim do ano, sonhar com um giro pela Europa e uma esticada pela Disneylândia...algum dia...É acreditar um pouco na imortalidade, em vida ...Ser jovem é ser bêbado de infinitos que terminam logo ali...”

Abençoadas sejam as surpresas da vida! Queridos Henrique, Angela e Bruna...ah vocês...A Patota! Que seria de mim sem esse apoio, essa força, os inúmeros “conta comigo”, “vai dar certo”, “se precisar me chama”...Irmãos que a vida me deu e que vou trancar a sete chaves no meu coração!! Deus guie vocês por caminhos de felicidade sempre!!!

E, como poderia esquecer de quem literalmente me mantém de pé? Cris Giongo, Graci Finatto e Monia Melo, obrigada por deixar o meu corpo saudável e forte o suficiente para carregar todas as loucuras da minha mente!

Às tatas Ju e Fabi, que fizeram rodízio para cuidar com zelo dos meus bens mais preciosos, meus filhos, enquanto eu estudava, escrevia e trabalhava. Sem palavras para agradecer!

Aos meus colegas de mestrado da segunda turma do PPGBiotec, que tornaram minhas noites de sexta e minhas manhãs de sábado muito mais divertidas! E, também, aos novos colegas de mestrado, especialmente Débora e Diorge, que me sustentaram em vários momentos, fosse nos experimentos, fosse nas angústias! Aprendi e devo muito a vocês!!!

À Geórgia Dexheimer que me amparou muitas vezes quando eu não podia ministrar minhas aulas de patologia e citopatologia, cumprindo o papel de professora com toda propriedade!!

Aos meus queridos cordenadores, Luiz Fernando, Jairo e Arlete, sempre muito compreensivos e dispostos a ajudar!

À querida (e linda!) ex-aluna, agora quase doutora, Fernanda Majolo, pelo sua colaboração imediata em meu primeiro artigo! Sempre com um sorriso no rosto e uma fala tranquila...

Às bolsistas do Laboratório Cultura de Células, Sheila e Nathalia, e a agora mestranda Dalana, por cuidarem dos bastidores e trabalharem tanto pelo bem do projeto!!!

À Bruna Caye, ex-bolsista, agora Biomédica se aventurando na patologia, obrigada pela ajuda com o TNF-alfa e os gráficos!!

Agradeço ao Prof. Dr. Ivan Filho, pela ajuda com o Western Blotting e a proteômica, bem como seus pupilos, Nicole e Toni, bolsistas da Biotec...e Fran!! Sempre prontos a ajudar! Se eu sei fazer gel e transferência semi-seca, foi com vocês que aprendi!

Ao grupo da Biomol, juntamente com a Prof. Dra. Adriane Pozzobon, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e colaboração!

Ao meu maravilhoso grupo de colaboradores do Centro de Medicina Diagnóstica - Daiela, Marciele, Talita, Cláudia, Bruna, Liane, Juliana, Márcio e Delva – não sei o que seria de mim sem a organização, a dedicação e a habilidade de todos vocês, mantendo o funcionamento do laboratório da melhor forma possível, com muita responsabilidade, nas minhas infinitas ausências!

Amigos em geral, colegas, meu grupo de corrida, Galgos (e as Ladies Galgas) ... a minha ausência foi só física, pois minha amizade e meu coração acompanha vocês sempre a cada Km! Obrigada por lembrarem de mim!

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Marcia Goettert, por todos os ensinamentos, pelo tempo dedicado! Obrigada por me oferecer as

ferramentas necessárias para que eu pudesse ir em busca de mais esta conquista.

À Prof. Cláucia, coordenadora do programa, por me ouvir com tanta paciência e me apoiar em minha principal decisão!!

À Univates, pela oportunidade e comprometimento com seus alunos e professores.

À todos que se fizeram presentes, direta ou indiretamente, vocês são parte deste projeto, em vários capítulos desta história!

Por fim, e não menos importante, agradeço a mim mesma, que caí, levantei, aprendi, ri, chorei. E me desesperei, incontáveis vezes... pela minha capacidade de superação que eu nem imaginava que existia!

“A busca da felicidade é uma constante... Embora o poder da gente se esbarre no medo. O medo de arriscar nos torna vulneráveis. Nos priva da felicidade, de nossos sonhos. Dê razão a sua existência, tenha desejo... Tenha sonhos e tente realizá-los... Viva, e seja você sempre, afinal, você existe...”

(Antoine de Saint Exupery)

RESUMO

Na medicina tradicional, as plantas tem sido utilizadas para o tratamento de diversas doenças ao longo dos séculos e são consideradas uma das maiores fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Com o objetivo de contribuir com o conhecimento científico no estudo e desenvolvimento de novas drogas procurou-se com este trabalho, identificar os principais constituintes fitoquímicos da *Calyptanthes grandifolia*, avaliar seus potenciais citotóxicos e antioxidantes e também identificar e avaliar o efeito terapêutico, através de vias específicas e já conhecidas por seu envolvimento no processo inflamatório, como o TNF- α . Para todos os experimentos, foram utilizados extratos etanólico e hexânico das folhas da *C. grandifolia*, coletada no entorno do município de Lajeado. Foi realizada a análise fitoquímica de esteroides/terpenoides, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, alcaloides e saponinas, utilizando metodologias descritas na literatura. O potencial citotóxico *in vitro* foi avaliado pelo método de Alamar Blue, utilizando células não metabolizadoras CHO-K1 e a atividade antioxidante foi realizada pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A análise da liberação do TNF- α utilizou células RAW 264.7, tratadas com os extratos vegetais e posterior estimulação com lipopolissacarídeo (LPS). A quantificação de liberação do TNF- α foi feita pelo método de ELISA. Os resultados dos ensaios indicaram a presença de esteroides/terpenoides, taninos e flavonoides no extrato etanólico. O potencial citotóxico, não apresentou citotoxicidade considerável no extrato etanólico e manteve a viabilidade celular aumentada na maioria das concentrações, com uma diminuição não significativa da viabilidade em 200 $\mu\text{g/mL}$, de forma semelhante para o extrato hexânico a redução da viabilidade celular pode ser observada somente na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antioxidante esteve presente apenas no extrato etanólico de maneira dose-dependente, com IC_{50} de $21.3 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$. O extrato etanólico também apresentou melhores resultados em relação à inibição do TNF- α , tendo sido significativa na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, frente ao controle positivo (LPS). O extrato hexânico não apresentou inibição da liberação do TNF- α na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ de forma significativa quando comparada ao LPS. Os resultados deste estudo mostram indícios de atividades anti-inflamatórias nos extratos testados, havendo um melhor desempenho do extrato etanólico. A presença de polifenóis e esteroides/terpenoides encontradas neste extrato podem ser a resposta para uma melhor avaliação das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos futuros podem indicar um potencial anti-inflamatório promissor para esta planta, lembrando ainda que processos inflamatórios fazem parte do processo de carcinogênese, havendo portanto uma porta de entrada para maiores pesquisas avaliando o potencial anticâncer da *C. grandifolia*.

Palavras-chave: Câncer, Produtos Naturais, Anti-inflamatório, TNF- α *C. grandifolia*

ABSTRACT

In traditional medicine, plants have been used in the treatment of several diseases throughout centuries and are considered as one of the largest sources for the development of new drugs. However, the bioactive components and action mechanisms are not entirely known. Aiming to contribute with scientific knowledge towards the study and development of new drugs, this work sought to identify their main phytochemical components, evaluate their cytotoxic and antioxidant potentials, as well as identifying and evaluating the therapeutic effect of *Calyptanthes grandifolia*, through specific and known paths for their involvement in the inflammatory and carcinogenic process, such as TNF- α . Ethanolic and hexanic extracts from *C. grandifolia* leaves, gathered within the Lajeado municipality, were used in all experiments. The phytochemical analysis of steroids/terpenoids, tannins, flavonoids, coumarins, quinones, alkaloids and saponins were characterized using methodologies described in literature. The *in vitro* cytotoxic potential was evaluated through the Alamar Blue method using non drug-metabolizing CHO-K1 cells and the antioxidant activity was performed through the DPPH method. The analysis of TNF- α release used RAW 264.7 cells, treated with vegetal extracts and posterior stimulation with LPS. The quantification of TNF- α release was quantified using ELISA method. The experiment results indicated the presence of steroids/terpenoids, tannins and flavonoids in the ethanolic extract. The cytotoxic potential did not present considerable cytotoxicity in the ethanolic extract and maintained increased cellular viability in most concentrations, only presenting a slight reduction in viability at 200 $\mu\text{g/mL}$. Similarly, cellular viability reduction could only be observed in the hexanic extract at the 200 $\mu\text{g/mL}$ concentration. The antioxidant activity was only present in the ethanolic extract at a dose-dependant manner, with an IC_{50} value of $21.3 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$. The ethanolic extract also presented better results concerning the inhibition of TNF- α , given that it was significant at the 200 $\mu\text{g/mL}$ concentration in comparison with the positive control (LPS). The hexanic extract also presented higher TNF- α inhibition at the 200 $\mu\text{g/mL}$ concentration, however, there was no significant difference in comparison with LPS. The results of this study demonstrate that there are evidences of anti-inflammatory activity in the tested extracts, with better performance in the ethanolic extract. The presence of polyphenols and steroids/terpenoids found in this extract may be the answer for its better evaluation concerning antioxidant and anti-inflammatory activities. Future studies may indicate a promising anti-inflammatory potential for this plant, also reminding that inflammatory processes are part of the carcinogenesis process, therefore, this is an entry path for larger researches evaluating the anticarcinogenic potential in *C. grandifolia* extracts.

Key-words: Cancer, Natural products, anti-inflammatory, TNF- α , *C. grandifolia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de sinalização TNF – α , p38 α MAPK e NF- κ B	29
Figura 2 - <i>Calyptranthes grandifolia</i>	43
Figura 3 – Redução do DPPH	50
Figura 4 – Viabilidade das células CHO- K1 após 72 horas de tratamento ..	55
Figura 5 – Viabilidade das células CHO-K1 após 72h de tratamento com extrato hexânico da <i>C. grandifolia</i> em diferentes concentrações (200, 100, 50, 25 μ g/mL) em comparação com a doxorrubicina (controle positivo) nas concentrações de 58, 5.8, 0.58 e 0.058 μ g/mL	56
Figura 6 - Atividade antioxidante expressa pela porcentagem de sequestro de radicais DPPH (% AA.) das diversas concentrações da solução padrão (ácido ascórbico) e dos extratos etanólicos da CG.....	58
Figura 7 - Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da <i>C. grandifolia</i> . Representação da média de valores independentes do IC ₅₀ do ácido ascórbico (8.75 \pm 0.16 μ g/mL) e do extrato etanólico da <i>C. grandifolia</i> (21.32 \pm 1.67 μ g/mL).....	58
Figura 8 - Avaliação da Inibição da citocina TNF- α após tratamento com extrato etanólico, das células RAW-264.7, estimuladas com LPS. As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (200, 100, 50, e 25 μ g/mL) por 1h e após estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 24h.....	60
Figura 9 - Avaliação da Inibição da citocina TNF- α após tratamento com extrato hexânico, das células RAW-264.7, estimuladas com LPS. As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (200, 100, 50, e 25 μ g/mL) por 1h e após estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 24h.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação Fitoquímica: constituintes fitoquímicos detectados nos extratos etanólico e hexânico da <i>C. grandifolia</i>	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta actina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
COX-2	Ciclooxigenase-2
CG	<i>Calyptanthes grandifolia</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IκB	Inibidores do NF- κ B
JNK	<i>Jun amino-terminal kinase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Marcador de massa molecular
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>

MKK	<i>MAPK kinase</i>
MS	Ministério da Saúde
NF – κβ	Factor Nuclear Kappa Beta
OMS	Organização Mundial da Saúde
p38α MAPK	p38 alfa Mitogen-activated protein kinase
PMNPC	Política Nacional da Medicina Natural e Práticas Complementares
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
ROS	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema único de Saúde
TAM	Tumor-Associated Macrophage (Macrófagos associados a tumor)
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Receptor de Fatore de Necrose Tumoral Alfa)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 JUSTIFICATIVA	23
4 REFERENCIAL TEÓRICO	25
4.1 Câncer.....	25
4.2 Marcadores Moleculares Associados a Inflamação e Câncer	28
4.3 A Medicina Tradicional.....	31
4.4 Produtos Naturais na Descoberta de Novas Drogas.....	33
4.4.1 Metabólitos Secundários e Atividade Biológica.....	35
4.5 Família <i>Myrtaceae</i>	40
4.5.1 <i>Calyptanthes grandifolia</i>	42

5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 Material Vegetal	44
5.1.1 Coleta e Identificação	44
5.1.2Obtenção dos Extratos	44
5.1.2.1 Extrato Hexânico	44
5.1.2.2Extrato Etanólico	45
5.2Linhagens Celulares.....	45
5.3Fitoquímica.....	46
5.3.1 Esteroides/terpenoides	46
5.3.2 Taninos.....	46
5.3.3 Flavonoides	47
5.3.4 Cumarinas	47
5.3.5 Alcalóides	47
5.3.6 Quinonas	48
5.3.7 Saponinas	48
5.4 Avaliação do Potencial Citotóxico <i>in vitro</i> através do método de Alamar Blue	48
5.5 Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH	49
5.6Análise da Inibição da Liberação de Citocina TNF- α em Macrófagos Murinos RAW 264.7	51

5.7 Análise Estatística.....	51
6 RESULTADOS	52
6.1 Fitoquímica	52
6.2 Análise do Potencial Citotóxico <i>in vitro</i> pelo método Alamar Blue	53
6.3 Análise do Potencial Antioxidante dos Extratos Etanólico e Hexânico	56
6.4 Avaliação da liberação do TNF- α em macrófagos RAW26.7 ativados por LPS através de ensaio colorimétrico ELISA	59
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Historicamente o uso popular de produtos naturais para o tratamento de diversas doenças é relatado nos mais variados contextos, desde as práticas ritual-religiosa e cultural até a respeitada medicina tradicional (Rates, 2001). Apesar de toda popularidade, somente 5 a 15% de um total aproximado de 250 mil espécies de plantas foram avaliadas do ponto de vista farmacológico havendo, portanto, um vasto campo a ser explorado e estudado (CRAGG E NEWMAN, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013), cerca de 80% da população recorre ao uso da medicina tradicional na atenção básica à saúde.

A maioria destes produtos naturais utilizados ao longo dos séculos não tem seus componentes bioativos, nem mesmo sua forma de ação, totalmente conhecidos. Outros, no entanto, foram estudados, reconhecidos e tornaram-se medicamentos que são hoje amplamente utilizados (CRAGG E NEWMAN, 2005). Estima-se que 75% dos medicamentos anticâncer e 69% dos agentes

anti-infecciosos utilizados na atualidade têm origem, direta ou indireta, em produtos naturais (NEWMAN E CRAGG, 2012).

Dentre os produtos naturais destacam-se as espécies vegetais, que historicamente sempre estiveram à frente das descobertas de várias drogas e, no que se refere aos quimioterápicos atualmente utilizados, estão amplamente representadas por medicamentos como vinblastina, vincristina, etoposide, paclitaxel, topotecan e irinotecan (CRAGG et al., 2014). Novas descobertas vem sendo feitas continuamente com produtos derivados das plantas. Entre essas novas descobertas, o Honokiol (HNK), uma molécula promissora, isolada da casca da *Magnolia spp* que tem mostrado atividades antitumorais *in vivo* e *in vitro* em vários tipos de câncer, destacando seu potencial antiinflamatório e quimiopreventivo no câncer de pele, tendo entre seus mecanismos de ação a inibição da indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , Interleucina (IL) -1 β e IL-6, induzidas por UVB (ARORA et al., 2013). Pode-se ainda citar o extrato da planta *Viscum album* (L), usada com propósitos medicinais há séculos, e que se encontra em fase clínica III para o tratamento de câncer pancreático localizado e metastático com efeitos associados à imunomodulação (MONTEIRO et al., 2014; Tröger et al., 2013). O *Syzygium aromaticum* (*Myrtaceae*), usado como tempero na culinária (cravo), também é conhecido na medicina tradicional por sua importante atividade antioxidante e citotoxicidade, apresentando potencial para o desenvolvimento de drogas anticâncer para diferentes tipos celulares, conforme estudo de Dwivedi e colaboradores (2011).

Neste contexto, a escolha da planta *Calyptanthes grandifolia* O. Berg pertencente a família *Myrtaceae*, teve como base sua aplicação etnofarmacológica e vem ao encontro das necessidades científicas, uma vez que seus potenciais farmacológicos são desconhecidos e seus componentes bioativos são pouco conhecidos, não tendo sido encontrados relatos referentes à composição química dos extratos na literatura até o momento, havendo apenas registros da

presença de propriedades farmacológicas associadas a outras espécies desta mesma família(CRUZ E KAPLAN, 2004; CERQUEIRA, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar e avaliar os potenciais citotóxico e anti-inflamatório *in vitro* dos extratos etanólico e hexânico da *Calypttranthes grandifolia* O.Berg.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos etanólico e hexânico das folhas da planta *Calypttranthes grandifolia*;
- Identificação dos principais constituintes fitoquímicos presentes nos extratos etanólico e hexânico;

- Avaliar o potencial citotóxico, *in vitro*, dos extratos, através do método de Alamar Blue em cultura de células da linhagem CHO-K1;
- Avaliar o potencial Antioxidante, *in vitro*, dos extratos, através de ensaio pelo método DPPH;
- Avaliar a liberação do Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo através de ensaio colorimétrico ELISA, nos diferentes extratos.

3 JUSTIFICATIVA

O processo inflamatório crônico tem sido associado com a patogênese de várias doenças como aterosclerose, obesidade, diabetes e até mesmo com a progressão do câncer (GARCÍA-LAFUENTE et al, 2009). Inicialmente pensava-se que o processo inflamatório visto em ambientes tumorais indicava uma tentativa do sistema imunológico em combater o tumor, no entanto, paradoxalmente, sabe-se hoje que ele aparece como um dos fatores envolvidos na carcinogênese, liberando no microambiente tumoral, fatores de crescimento e citocinas que sustentam sinais de proliferação e sobrevivência, além de promover a angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

Conforme Newman e Cragg (2012), cerca de 75% dos quimioterápicos, bem como 69% dos agente anti-infecciosos, descobertos nos últimos 30 anos tem origem direta ou indireta em produtos naturais. Os resultados bem sucedidos de pesquisas com plantas, como por exemplo, o Paclitaxel (Taxol®), obtido da casca da *Taxus brevifolia*, usado no tratamento do câncer de mama e a Aspirina®, um potente anti-inflamatório derivado da casca da *Salix alba*, hoje produzidos sinteticamente (DIAS et al., 2012), são indicativos do caminho promissor e estimulam as buscas constantes por novos produtos naturais

capazes de preencher as lacunas das falhas terapêuticas. As eventuais falhas em tratamentos, bem como a presença de efeitos colaterais indesejados, são em geral ocasionados pela falta de especificidade do medicamento, e direcionam esta procura por biomoléculas mais específicas e acessíveis à população (RATES, 2001; ALMEIDA et al., 2005).

Sabe-se que processo de desenvolvimento de um medicamento envolve basicamente a descoberta de novas entidades químicas (NCEs). O advento da química combinatória trouxe uma maior perspectiva de sucesso no desenvolvimento de NCEs, porém não obteve os resultados promissores esperados, o que motivou a comunidade científica a fazer novas abordagens para a descoberta de novos medicamentos a partir da medicina tradicional e o uso de plantas, sabendo-se que uma das maiores fontes para a descoberta destes novos NCEs são os produtos naturais (KATIYAR et al, 2012).

Com base na literatura e em resultados bem sucedidos com plantas medicinais, procurou-se com este trabalho, identificar e avaliar o potencial efeito terapêutico do extrato das folhas da *C.grandifolia*, através do estudo de uma via específica e já conhecida por seu envolvimento no processo inflamatório e carcinogênico – como o TNF- α - com o intuito de contribuir com o conhecimento científico e para o surgimento de novos tratamentos contra o câncer.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Inflamação

O processo inflamatório é uma resposta natural do organismo, desencadeada por uma série de mecanismos que reconhecem estímulos patogênicos. Esses mecanismos são fundamentais para a nossa proteção, para a manutenção da homeostasia, bem como na função de reparo tecidual, promovendo a reconstrução do tecido na área agredida (BARRETO et al., 2010). Normalmente, estas respostas são bem reguladas e alteram muito pouco a função do tecido, porém uma falha neste mecanismo, ou a persistência do agente desencadeante, pode levar a um dano tecidual mais acentuado e respostas crônicas lesivas (COLEMAN E TSONGALIS, 2009).

Vários indícios apontam que a promoção tumoral está relacionada com um processo inflamatório crônico, através da participação de células imunes que fornecem moléculas bioativas ao microambiente tumoral capazes de sustentar sinais de proliferação e fatores de sobrevivência, entre outros (SZLOSAREK et al., 2006; HANAHAN E WEINBERG, 2011). Em 1863, Virchow já havia associado tumores ao processo inflamatório crônico, identificando leucócitos no tecido tumoral. Muitos estudos vêm reforçando esta associação, incluindo Dvorak, um século depois, apoiando a

hipótese com o artigo de revisão “Tumores: feridas que não curam” (VIRCHOW, 1863; DVORAK APUD BALKWILL E MANTOVANI, 2001; BARRETO et al., 2010).

Em uma via intrínseca, o desenvolvimento do câncer está associado a eventos genéticos, ativando e desativando genes responsáveis pela promoção ou pela supressão tumoral, respectivamente. Neste processo, mediadores inflamatórios, como interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e TNF- α são produzidos por células modificadas promovendo a formação de um microambiente inflamatório, enquanto fatores extrínsecos, infecciosos ou inflamatórios, como a doença inflamatória intestinal, por exemplo, também podem estar relacionados com um aumento do risco para câncer (ZHU et al., 2011).

Tanto o reparo tecidual quanto a carcinogênese envolvem a proliferação e a sobrevivência celular, bem como migração das células, sempre modulados por fatores de crescimento, citocinas e também sinais inflamatórios e de angiogênese (RISS et al., 2006). Um aspecto indispensável é o estudo do microambiente tumoral, envolvendo as citocinas e o efeito que as mesmas exercem entre as células tumorais e o estroma. Estas citocinas, como o TNF- α , por exemplo, apresentam atividades variadas que incluem o envolvimento entre as células no tecido local, sugerindo que as mesmas possam estar envolvidas na regulação do processo de promoção e progressão tumoral (SZLOSAREK et al., 2006). Da mesma forma que as células inflamatórias agem durante o reparo tecidual, as células malignas também produzem fatores que perpetuam a inflamação promovendo um meio favorável para o seu desenvolvimento, gerando as mesmas substâncias presentes no processo inflamatório de reparo, dentre elas citocinas e prostaglandinas, que agem favorecendo a proliferação celular (BARRETO et al., 2011).

O TNF é uma citocina de muitas funções que tem um papel fundamental no processo inflamatório e nos últimos anos tem sido avaliada sua atuação no tecido tumoral. O grande alcance de atividades do TNF deve-se à presença de um receptor TNF (TNF-R) em quase todos os tipos celulares. A ligação do TNF aos receptores promove a fosforilação do complexo NF- κ B/ IKK, levando à dissociação deste complexo

e promovendo a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde atua como fator de transcrição, bem como promove a fosforilação do p38 MAPK, induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios (SALMELA-STJERNBERG, 2010).

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, induzidos pela presença de lipopolissacarídeo (LPS), e após ser liberado liga-se a receptores específicos (TNF-R I e II) para exercer suas funções biológicas, entre elas desencadear as vias apoptóticas, ativar a resposta imune e inflamatória e promover vasodilatação, entre outros (VITALE, RIBEIRO, 2007). Os leucócitos também podem ser encontrados no microambiente tumoral e podem contribuir para o crescimento e a disseminação do tumor (BALKWILL, MANTOVANI, 2001). Durante a progressão tumoral, macrófagos e monócitos são recrutados para a região do tumor e, através da alteração da matriz extracelular, facilitam a invasão e migração do tumor através do estroma (CONDEELIS E POLLARD, 2006).

Os macrófagos expressam na sua superfície, em vacúolos e no citossol, muitos receptores que fazem a mediação de suas diversas funções a partir de estímulos patogênicos extra e intracelulares. Alguns dos receptores têm função inibitória ou ativadora na indução do NF- κ B, que por sua vez regula a produção de mediadores pró-inflamatórios (GORDON, 2007). Macrófagos associados a tumor (TAM) são precursores ativados de monócitos e estão presentes diretamente na região tumoral por atração quimiotática das citocinas, sendo as células inflamatórias mais frequentes na maioria dos tumores (BALKWILL E MANTOVANI, 2001). O fator quimiotático tumor-derivado, atualmente conhecido como CCL2, descrito há 25 anos, foi demonstrado como sendo o responsável pela atração de monócitos do sangue periférico para o sítio tumoral (SICA et al., 2008). Baseadas nestas propriedades promotoras de tumores, algumas drogas foram desenvolvidas com a função de eliminar macrófagos (ex. Yondelis, Clodronate) ou inibir o recrutamento destes ao local do tumor (através de anticorpos anti-CCL2) (PORTA et al., 2009). A presença de TAM no tecido tumoral mostra uma correlação importante entre câncer e inflamação. Esta correlação, na maioria dos tumores está associada a um aumento da angiogênese, invasão tumoral e prognóstico desfavorável (CONDEELIS E POLLARD, 2006).

4.2 Marcadores Moleculares Associados a Inflamação e Câncer

Membro da grande família de TNF, o TNF- α é considerado o mediador central da inflamação, sendo também uma citocina, que age em duas direções, tanto destruindo quanto reparando o dano nos tecidos (BALKWILL, 2002). Inicialmente foi eleita como a citocina que levava os tumores à hemorragia e necrose, mais tarde, no entanto, sua função pró-tumoral foi identificada (ZHU, 2011).

O TNF- α está envolvido não apenas no processo inflamatório, mas também no reparo (remodelamento) tecidual através do estímulo de fibroblastos, angiogênese e produção de proteína quimiotática de monócitos (MCP) que controla a infiltração de macrófagos e linfócitos (ADEFUYE, 2012). A sua expressão já foi confirmada em vários microambientes de tumores malignos, como câncer de ovário, próstata, melanoma, entre outros (SZLOSAREK et al., 2006) tendo sido relatado que, na maioria das vezes, mostrou uma relação com pior prognóstico (BALKWILL, 2002).

O estímulo crônico do TNF- α , associado à produção de outras citocinas (ex. IL1 e IL6) que ocorre no microambiente tumoral, pode ser uma das possíveis causas da relação entre inflamação crônica e o aumento da possibilidade de desenvolver um câncer, sendo detectado tanto nas células tumorais quanto no estroma (BALKWILL, 2002). É produzido por macrófagos ativados, monócitos e linfócitos e, ao ser liberado, faz interação com receptores TNF-R, estimulando a produção da proteína I κ B Kinase, que por sua vez fosforila e dissocia a I κ B ligada ao NF- κ B, tornando o livre para a sua atuação (SALMELA-STJERNBERG, 2010). Tanto o TNF- α , quanto a IL-1 β , presentes em processos inflamatórios crônicos, podem exercer efeito na expressão de alguns genes pró-inflamatórios através de vias intracelulares que envolvem o NF- κ B e a p38 MAPK (KULDO et al., 2005) (FIGURA 1).

A p38 α MAPK faz parte de um conjunto de proteínas sinalizadoras que convertem sinais extracelulares nas mais variadas respostas dentro da célula (WAGNER E NEBREDA, 2009). A via MAPK é reconhecida pela tradução dos estímulos levando a resultados biológicos incluindo o controle da expressão gênica, divisão e sobrevivência celular, apoptose, metabolismo, diferenciação e motilidade

(KOSTENKO et al., 2011). Alguns estudos indicam que quando ativada, a p38 α regula negativamente alguns tumores malignos, modulando a produção de espécies de oxigênio ativo (ROS) provocada por oncogenes, evitando seu acúmulo e prevenindo efeitos carcinogênicos (DOLADO, et al., 2007).

Segundo Koul e colaboradores (2013), adicionalmente, a p38 α tem uma participação na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 e TNF- α , ações angiogênicas e pró-sobrevivência, bem como regula a expressão de citocinas, modulando fatores de transcrição como o NF- κ B. Alvos à jusante da p38 α MAPK, incluem as MAPK *activated kinase 2* (MK2) e MAPK *activated kinase 3* (MK3), que são ativadas em condições de estresse, como radiação UV, choque térmico, hiperosmolaridade e citocinas. A MK2 por sua vez aumenta a produção de TNF- α e IL-6.

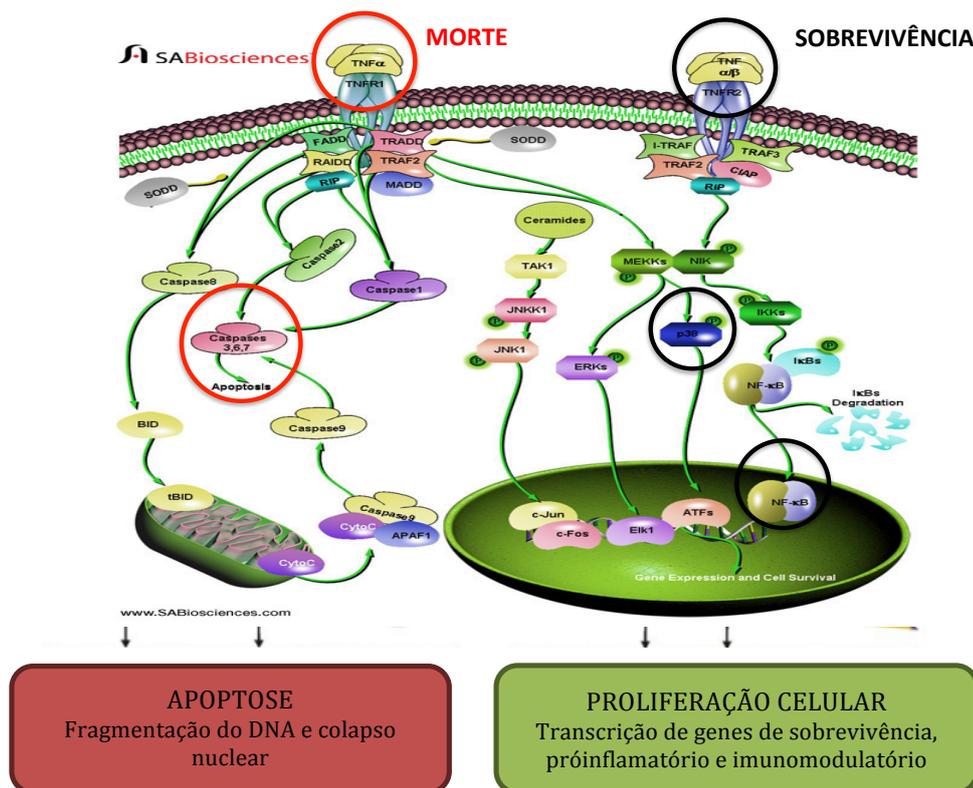


Figura 1 – Via de sinalização TNF – α , p38 α MAPK e NF- κ B

Fonte: <http://saweb2.sabiosciences.com> (modificado de Van Horsen et al, 2006)

O NF- κ B está envolvido no aumento de expressão de vários mediadores pró-inflamatórios que tem papel importante em várias patologias. Tem um papel essencial na carcinogênese, inicialmente por estar relacionado à transformação celular e também por estar presente na maior parte do tecido de muitos tumores (ZHU et al., 2011). Nas células tumorais, sua ativação pode bloquear a apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , por exemplo. Esse bloqueio impede a morte da célula, garante sua sobrevivência e perpetua sua proliferação. A atividade do NF- κ B no câncer está associada à expressão de genes proliferativos, bem como metástases e resistência a quimioterápicos (SU et al., 2013). A resistência terapêutica tem sido relacionada com a ativação do NF- κ B em células tumorais humanas pela própria quimioterapia e radioterapia, impedindo a extinção completa das células cancerosas (BARRETO et al., 2010). Uma vez ativado e fosforilado, o NF- κ B passa a atuar no núcleo, ligando a regiões promotoras e participando da regulação de vários genes, incluindo quatro classes basicamente responsáveis pela imunidade (TNF- α , IL-1), envolvidos no controle da apoptose (Bcl-x, c-IAP 1/2, XIAP), proliferação celular (c-MYC) e de feedback negativo (I κ B α , I κ B β) (KARIN et al., 2002).

4.3 A Medicina Tradicional

O uso de produtos naturais no tratamento de doenças e diversos males percorrem a história desde o surgimento da humanidade. Os primeiros relatos vêm da Mesopotâmia, no ano de 2600 a.C. onde faziam uso de óleos de cipreste, cedro e mirra, entre outros, que são usados até hoje no tratamento da tosse e febre proveniente de infecções e inflamações (CRAG E NEWMAN, 2005).

Outros registros encontrados nos papiros egípcios, o “*Ebers Papyrus*” (1500 a.C.), descrevem mais de 700 drogas baseadas em plantas, enquanto Hipócrates (460-377 a.C.), o “Pai da Medicina”, sintetizou em sua obra, *Corpus Hippocraticum*, conhecimentos médicos da época, associando um remédio vegetal e o tratamento adequado, para cada enfermidade observada (TOMAZZONI et al., 2006). Chineses e gregos também contribuíram com descrições e informações importantes baseadas no uso de plantas com finalidade terapêutica, na alta idade média, listando drogas e prescrições originadas de produtos naturais e de ervas medicinais (DIAS et al., 2012).

Em 2002 a OMS reconhece a importância da medicina tradicional no contexto atual e publica seu primeiro documento de estratégia global dada a diversidade regional, a uma amplitude crescente na utilização desta prática, incluindo a medicina complementar e alternativa, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Este aumento na procura pela medicina tradicional baseada em produtos naturais, observada pela OMS, foi considerada preocupante em alguns aspectos, porque em muitos casos verificou-se a total falta de controle sobre o uso dos mesmos ou sobre as maneiras como esses produtos são utilizados pela população. Observou-se que a utilização de produtos naturais pressupunha “segurança”, trazendo uma impressão equivocada a respeito da utilização dos mesmos. Diante deste cenário, viram a necessidade de elaborar as diretrizes do documento, visando

segurança, eficácia e qualidade, bem como facilitar o acesso e promover o uso racional destes produtos (OMS, 2004).

Por definição da própria OMS, a medicina tradicional engloba conhecimento, capacidades e práticas sustentadas nos saberes da população e das diversas culturas, comprovadas ou não, e que sejam utilizadas para a manutenção da saúde, na prevenção, no diagnóstico e no tratamento dos diversos tipos de doenças. (OMS, 2013). No Brasil, a principal forma de atenção à saúde aplicada à população baseia-se na medicina convencional e o uso da medicina tradicional é classificado como alternativo ou complementar. Entretanto, em muitas ocasiões a medicina convencional, a alopatia, pode falhar, ou ainda trazer efeitos colaterais indesejados e não ser acessível a todos (RATES, 2001). Alguns estados e municípios brasileiros sofrem pela falta de uma política com assistência farmacêutica adequada, pois o que se observa em muitos casos é uma incapacidade de fornecer medicação essencial à sua população. Neste contexto e amparados pela autonomia adquirida nos últimos anos, através da gestão plena, muitos deles recorrem a programas de assistência à saúde, baseadas na fitoterapia com a intenção de suprir estas lacunas na atenção primária à saúde (SILVA et al., 2006).

Com o objetivo de conhecer, apoiar e incorporar experiências que já vinham sendo desenvolvidas na rede pública de alguns municípios envolvendo a medicina tradicional, entre elas a homeopatia e a fitoterapia, o Ministério da Saúde (MS) implantou a Política Nacional da Medicina Natural e Práticas Complementares (PMNPC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Reforçando a prática da medicina tradicional como forma acessível de tratamento para doenças simples entre a população assistida na rede pública, o MS publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS, 2009) visando estimular a pesquisa de novos fármacos a partir das plantas relacionadas, para garantir o uso das mesmas de forma segura e eficaz.

Das 71 espécies indicadas, doze já foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para serem usadas como fitoterápicos e estão sendo distribuídas em 14 estados. Entre elas estão a *Aloe vera* (Babosa) usada no tratamento de psoríase e queimaduras, a *Mikania glomerata* (Guaco) com ação expectorante e broncodilatadora e a *Uncaria tomentosa* (Unha-de-gato), indicada como anti-inflamatório e imunomodulador (PORTAL BRASIL, 2012). De alguma forma, este tipo de prática médica motiva pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, para que juntos possam agregar os conhecimentos sobre esta ampla fonte de produtos médicos naturais, a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

4.4 Produtos Naturais na Descoberta de Novas Drogas

O uso popular de plantas medicinais tem sido descrito para as mais variadas aplicações, de fins terapêuticos a rituais religiosos (RATES, 2001). No Brasil, tem sua origem principal na cultura e tradição de índios brasileiros, de africanos e europeus (SILVA et al., 2001), muitas vezes representando a única forma de terapia conhecida para determinadas comunidades (MACIEL et al., 2002).

A comprovação do potencial terapêutico de muitas destas plantas vem ao encontro da sabedoria popular, pois através de pesquisas e estudos de produtos de origem vegetal, utilizados com fins medicinais pela população, pode-se validar o uso dos mesmos como medicamentos. No entanto, estima-se que menos de 15% da biodiversidade mundial tenha sido avaliada em seu potencial bioativo (NEWMAN, CRAGG, 2005) reforçando a necessidade da pesquisa de mais extratos de vegetais, pois existe um número considerável de produtos naturais que permanecem disponíveis para investigação (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Estima-se que três quartos desta biodiversidade está concentrada em 17 países, sendo o Brasil o primeiro da lista, com cerca de 22% de todas as espécies biológicas do mundo tendo, só na Floresta Amazônica, 55 mil espécies de plantas (MARQUES, 2000).

As plantas, do ponto de vista terapêutico, podem ser utilizadas das mais variadas formas incluindo chás, extratos, tinturas, pós, ou mesmo passar por processos de purificação para o isolamento de compostos de interesse. Estes compostos podem ser ativos e utilizados como fármacos, ou ainda precursores de semi-sintéticos ou sintetizados de forma a tornarem-se medicações com atividade farmacológica bem definida como, por exemplo, a morfina (RATES, 2001), derivada da *Papaver somniferum*.

Segundo dados da OMS, cerca de 80% da população, de países em desenvolvimento, recorrem ao uso da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa na atenção primária. Somado a isto, um levantamento dos últimos 30 anos, mostrou que aproximadamente 75% das novas drogas anticâncer reconhecidas entre pequenas moléculas não-biológicas, são derivadas, direta ou indiretamente, de produtos naturais (NEWMAN E CRAGG, 2012).

Muitos destes produtos são metabólitos secundários de plantas, cujas pesquisas revelaram a presença de agentes anticâncer, como por exemplo, *Cantharanthus roseus* (vinblastina e vincristina utilizadas no tratamento de leucemias, linfomas, câncer de testículo e mama), *Podophyllum* sp (etoposide e teniposide efetivos no tratamento de linfomas, câncer de testículo e brônquico), *Camptotheca acuminata* (topotecan usado no tratamento do câncer de ovário, e carcinoma pulmonar de pequenas células), entre outras. Os compostos obtidos destas plantas pertencem a classes reconhecidamente antitumorais, com ações que englobam a inibição da proliferação celular ou a inibição da DNA topoisomerase I, envolvida nas funções de replicação e transcrição (NIRMALA et al., 2011).

A escolha da planta a ser estudada pode ser feita de muitas formas, incluindo uso tradicional, composição química e seleção aleatória ou pode ainda ser uma combinação de critérios. Porém uma escolha minuciosa baseada na observação do uso popular, a etnofarmacologia, é uma das maneiras mais

utilizadas (RATES, 2001). Segundo este mesmo autor, obter informações de como a planta é utilizada dentro de um grupo étnico é fundamental, pois pode-se identificar a melhor maneira de extração bem como as informações das atividades farmacológicas e doses a serem testadas.

4.4.1 Metabólitos secundários e atividade biológica

De maneira indireta, a utilização de plantas na medicina popular, através dos séculos, trouxe à comunidade científica um grande interesse em ampliar, de forma multidisciplinar— através da etnobotânica, fitoquímica e farmacologia - os conhecimentos sobre a flora mundial, sempre à procura de subsídios que possam determinar ou não a sua utilização como “medicamento”(MACIEL et al. 2002).

Observando o vasto percentual de plantas que ainda não foram cientificamente investigadas, ou são desconhecidas, existe um importante reservatório de compostos a serem descobertos e que podem exercer atividade farmacológica, inclusive podendo apresentar propriedades anticarcinogênicas. O Brasil por deter quase um terço do total da flora mundial com grande biodiversidade, dispõe de uma variedade de compostos fitoquímicos a serem explorados(GRANATO et al. 2012), visto que até o momento apenas 0,4% desta flora foi estudada do ponto de vista científico(GURIB-FAKIM 2006).

A análise fitoquímica, especificamente, promove a identificação e avaliação dos constituintes químicos e, não havendo prévio conhecimento químico sobre a espécie em estudo, esta análise torna-se importante para o reconhecimento de classes de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES et al. 2001), fundamentando-se no princípio de que qualquer substância encontrada na planta pode ser um princípio ativo em potencial, independente de sua concentração (CECHINEL FILHO E YUNES, 1998).

A prospecção fitoquímica pode estabelecer ligações importantes entre a composição do extrato e suas possíveis atividades farmacológicas. Entre as

classes de metabólitos secundários presentes nas plantas pode-se citar flavonoides e taninos (pertencentes à classe dos polifenóis), cumarinas, alcaloides, quinonas, saponinas, terpenoides, entre outros.

Os polifenóis são muito estudados e relacionados à várias propriedades biológicas já descritas, entre elas atividades antioxidante, cardioprotetora, anticarcinogênica, podendo estar associados a efeitos preventivos do estresse oxidativo em diversas patologias (DAI & MUMPER, 2010; A.-N. Li et al., 2014). São citados por apresentar propriedades anti-inflamatórias tanto através da inibição de fatores de transcrição associados à inflamação, como o NF- κ B, quanto pelo bloqueio de vias mediadas por MAPK (DAI & MUMPER, 2010; KARLSEN et al., 2007).

Creditam-se aos flavonoides, ações antioxidantes potentes e um papel de destaque na prevenção de doenças, ações anti-inflamatória e citotóxica (HARBONE E WILLIAMS, 2000; GOETTERT, 2010). Um estudo realizado por Gafrikova et col. (2014) documentou um potente mecanismo quimiopreventivo dos dois principais flavonóides isolados de extratos da planta *Armoracia rusticana* (*Cruciferae*), cujo efeito evitou danos, induzidos por agentes oxidativos, ao DNA de linfócitos humanos.

Ainda no grupo dos polifenóis, os taninos são compostos com capacidade de formar precipitados com as proteínas, ligando-se por pontes de hidrogênio, dando importante estabilidade a elas. Devido a esta propriedade, exercem uma efeito antimicrobiana e antifúngica (MONTEIRO et al., 2005). Aos taninos também é associado um efeito antisséptico, quando administrado via oral, e “impermeabilizante”, protetor da pele, quando em uso tópico. Estudos realizados por Piwowarski e Kiss (2015), identificaram na *Lythrum salicaria* L. (*Lythraceae*) a presença predominante de um tanino, o elagitanino, e confirmaram seu potencial anti-inflamatório, protetor, em certas lesões de pele e mucosa, com fundo neutrofílico, através da inibição da hialuronidase, aumentando consequentemente a permeabilidade vascular, favorecendo a cicatrização e

justificando o uso desta planta de forma tópica pela medicina tradicional. Um trabalho de Afaq et al. (2005) identificou a inibição da tumorigênese de cancer de pele em modelos de ratos CD-1, através da modulação de vias MAPK e NF- κ B por extrato de romã rico em tanino e antocianidina. Estudos mais recentes com a mesma fruta, em cultura de células e em modelos murinos, mostraram a relação de seus componentes com efeitos antimetastáticos e efeitos de inibição de crescimento e de angiogênese em tumores de próstata (WANG et al., 2012; WANG & MARTINS-GREEN, 2014), bem como um efeito protetor contra o câncer de cólon (JAGANATHAN et al., 2014).

As cumarinas são citadas na literatura, principalmente relacionadas a efeitos anti-trombóticos, anti-inflamatórios e expectorante, tendo a Varfarina (estrutura modificada da cumarina) sendo comercializada como um anti-coagulante oral, inibidor da vitamina K, cujo papel é essencial na síntese de fatores da cascata de coagulação (CZELUSNIAK et al., 2012; GURIB-FAKIM, 2006; SIQUEIRA et al., 2010). Além disso, outros estudos têm mostrado o efeito anticarcinogênico das cumarinas, como relatado por Rufatto e colaboradores (2013), com resultados evidenciando citotoxicidade seletiva em ensaios com extratos etanólico e hexânico da *Mikania laevigata* contra células de linhagens tumorais. Ou ainda a demonstração do efeito antiproliferativo da xantoxyletina, um composto cumarínico isolado da *Erythrina variegata*, com efeitos inibitórios (anticarcinogênicos) contra células do cancer gástrico, possivelmente associados ao dano de DNA, apoptose e interrupção do ciclo celular na fase S (RASUL, et al., 2011).

Associam-se ainda às cumarinas e derivados cumarínicos atividades inibitórias do crescimento de várias linhagens de tumores de mama, em modelos *in vivo* (MUSA et al., 2008; MUSA et al., 2009; PANNO & GIORDANO, 2014). He e colaboradores encontraram um novo composto cumarínico, isolado da *Gerbera anandria*, o 8-methoxysmyrindiol, que demonstrou potencial anticâncer, observando citotoxicidade contra várias linhagens celulares tumorais, humanas, especialmente contra HepG2, de carcinoma hepático (HE et al., 2014).

O grupo dos alcalóides tem como exemplo notório os quimioterápicos, vinblastina e vincristina, derivados da *Cantharantus roseus*, que age sobre a inibição dos fusos mitóticos interrompendo a divisão celular e o taxol, éster-alcalóide derivado da *Taxus brevifolia*, cuja ação se dá pela inibição da tubulina, impedindo a ação dos micotúbulos na divisão mitótica (CRAGG; NEWMANN, 2005; ALMEIDA et al., 2005). O Pervilleine A, alcalóide isolado da raiz do *Erythroxylum pervillei* Baill, apresentou citotoxicidade seletiva contra uma linhagem de carcinoma epidermoide (KB-V1) resistente à várias drogas (MDR), na presença de vinblastina e em outras linhagens resistentes (BALUNAS; KINGHORN, 2005; MI et al., 2001). Estudos avaliando os potenciais biológicos de outros alcalóides como berberine, evodiamine, matrine, piperine, sanguinarine, tetrandrine, entre outros, foram bem relatados no artigo de revisão de Lu e colaboradores (2012) indicando evidências de modulação de múltiplas vias de sinalização, incluindo apoptose, quimioprevenção, antimetástase, autofagia e outros e mostrando a necessidade mais pesquisas com estes alcalóides, pois há um grande caminho a ser explorado.

Outros metabólitos secundários que apresentam atividade biológica diversa são as quinonas, tendo sido atribuídas a elas, atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-tumoral. Koyama e colaboradores (2002), examinaram duas quinonas isoladas da *Cassia siamea*, o emodin e a cassiamin B, identificando efeitos inibidores da carcinogênese, em modelos de ratos. Outro estudo realizado com emodin, componente ativo isolado da *Rheum palmatum L.*, mostrou a atuação antiproliferativa desta quinona em linhagem celular humana CH27, de carcinoma de células escamosas do pulmão, associadas a indução de apoptose via ativação de caspases 3, 8, e 9 (LEE, 2001). Em um artigo mais recente, emodin parece exercer efeito sensibilizador de células cancerosas aos quimioterápicos, através do bloqueio de vias Her2/neu-PI3-AKT e através da inibição de fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B.

Outras quinonas derivadas de plantas aparecem como agentes anticâncer, entre elas a juglone, β -lapachol, plumbagin, shikonin e thymoquine,

todas em processo de investigação, porém com várias atividades biológicas e efeitos anti-câncer identificados, incluindo danos ao DNA, interrupção do ciclo celular, indução da apoptose, supressão da migração de células cancerosas, efeitos antimetastáticos, entre outros. O β -lapachol encontra-se em estudos de fase clínica II para seu uso em monoterapia ou terapia combinada com outras drogas (LU et al., 2013).

De ocorrência constitutiva em muitas espécies de plantas, as saponinas apresentam propriedade biológicas importantes tanto em humanos, quanto em outros animais, tendo sido relatados efeitos estimulantes do sistema imunológico, efeitos no metabolismo do colesterol, atividade hipoglicêmica, efeitos neuroprotetores, antioxidantes e antifúngicos, bem como propriedades anticarcinogênicas, entre outros (FRANCIS, et al., 2002).

Na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), o extrato conhecido como *Rhizoma paridis total saponin (RPTS)* ou *chong-lou*, extraído de uma planta chamada *Paris polyphylla*, é prescrito e utilizado há séculos como “medicamento” para uma série de doenças que incluem amigdalite, tuberculose, convulsão, meningite, até tumores de diversas origens como cérebro, trato respiratório, digestivo e urinário, pâncreas e leucemia (CHENG et al., 2008). Alguns estudos demonstraram os efeitos antitumorais do RPTS relatando aumento da citotoxicidade de outros agentes terapêuticos possivelmente atuando na inibição da expressão gênica de agentes relacionados à resistência terapêutica (ex. *Excision repair cross-complementing – ERCC1*; *Tymidylatesynthase- TS*; *class III β -tubulin* e *Tau*) em células do câncer gástrico, *in vitro*, efeito anti-proliferativo por indução da apoptose em adenocarcinoma pulmonar em murinos (*in vivo*) e supressão, *in vitro*, do crescimento de células HeLa, do cancer cervical humano (LIU et al., 2011; MAN et al., 2009; ZHANG et al., 2014).

Os terpenoides constituem o maior grupo dentre os metabólitos secundários vegetais (PASSOS, et al., 2009) e apresentam uma vasta relação com atividades medicinais. O ácido betulínico, por exemplo, é um terpeno

isolado de vários gêneros de plantas, tendo a *Betula spp* como maior fonte. Essa substância apresenta citotoxicidade contra várias linhagens celulares tumorais, importante atividade *in vivo* (modelo xenográfico) em melanoma humano, também mostrando evidência da redução de crescimento *in vitro* em modelos animais, do câncer pancreático, ou mesmo induzindo a apoptose em células HeLa do câncer de colo uterino (CRAGG et al., 2014; L. LI et al., 2013; XU et al., 2014).

Recentemente manifestou-se um interesse da comunidade científica por novos compostos provenientes da *Cannabis sativa*, os fitocanabinoides, particularmente o fitocanabinoide-terpenoide e suas interações sinérgicas no tratamento de diversos males, de epilepsia à câncer, passando por infecções fúngicas e bacterianas, inflamação e dor (RUSSO, 2011). Vários estudos trazem à luz da ciência resultados promissores com canabinoides no combate ao câncer, entre os quais ação antimetastática através do aumento da expressão de inibidores da matriz metaloproteinase, efeitos inibidores da angiogênese em gliomas pela inibição do fator de crescimento vascular endotelial e evidência da ação de endocanabinoides em células tumorais do câncer colorretal (BLÁZQUEZ et al., 2004; LIGRESTI et al., 2003; RAMER & HINZ, 2008). Todos, no entanto, como qualquer candidato a medicamento, antitumoral ou não, devem ser amplamente pesquisados e muitos detalhes precisam ser esclarecidos, assim como as vias de sinalização envolvidas.

4.5 Família *Myrtaceae*

Os espécimes da família *Myrtaceae* são plantas que variam de lenhosas a arbustivas, com folhas inteiras e flores brancas ou vermelhas, que possuem distribuição tropical (Américas) e em clima temperado (Austrália) (SILVA, 2007). Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2014, texto digital), a família apresenta mais de 4000 espécies, uma das maiores da flora brasileira, muitas delas apresentando propriedades medicinais e aproveitamento alimentar.

Quimicamente a família *Myrtaceae* é bastante diversa, caracterizando-se pela produção de taninos, sesquiterpenos, estilbenos e de flavonóides, apresentando propriedades medicinais, sendo algumas atribuídas ao gênero *Calypthranthes* (CERQUEIRA, 2002). Dois compêndios botânicos brasileiros apresentaram um levantamento de cerca de 245 plantas, pertencentes a 98 famílias diferentes, utilizadas com finalidade cosmética e farmacêutica no Brasil, tendo 11 espécies da família *Myrtaceae* entre as mais citadas e relacionadas, em geral, à propriedades adstringentes e anti-ulcerativas (BIAVATTI ET AL., 2007).

Segundo Cruz e Kaplan (2004), as propriedades adstringentes da *Myrtaceae* geralmente são usadas em afecções gastrointestinais, hemorragia e doenças infecciosas, sendo que as partes mais utilizadas são as folhas, cascas e os frutos. No gênero *Eucalyptus* suas folhas são utilizadas para chás no tratamento de asma, bronquite, cistite, diabetes, entre outras. Como loções, seu uso é destinado à assepsia, com efeito desinfetante (CERQUEIRA, 2002).

A família *Myrtaceae* apresenta cerca de 129 gêneros, muitos apresentam propriedades biológicas diversas já relatadas, incluindo a *Eugenia spp* (anti-pirético, anti-inflamatório, diurético, hipoglicemiante, antioxidante, anti-tumorais, anti-diarreicos e antimicrobianas), a *Myrciaria spp*, como por exemplo a Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), rica em compostos fenólicos e com atividades farmacológicas antioxidantes e anti-tumorais associadas a inibição da expressão do gene *surviving* (BIRC5), um membro da família de proteínas inibidoras de apoptose, ou ainda o gênero *Syzygium*, com propriedades antioxidantes e anti-tumorais mostrando inibição do crescimento de células malignas da linhagem Hep2 de cancer hepático (ANNADURAI et al., 2012; AURICCHIO et al., 2007; COLE, et al. 2007; SHAD et al., 2014; TALIB, 2011; VIANA, et al., 2012; W. WANG et.al, 2014).

Soma-se a estes, o gênero *Psidium*, com relatos de atividades anti-tumorais exibindo citotoxicidade contra células leucêmicas Kasumi-1 e de cancer de ovário, OV2008, e indução de atividade anticâncer suprimindo a via de

sinalização AKT/mTOR/S6K1 relacionada a tumorigênese, angiogênese e metástase, em células do câncer prostático humano (LNCaP e PC3) (LEVY & CARLEY, 2012; RYU ET AL., 2012).

4.5.1 *Calyptanthes grandifolia*

A *C. grandifolia* é uma planta da família *Myrtaceae*, nativa do Rio Grande do Sul, originária da Mata Atlântica tendo como nomes populares caingá-branca e guamirim (UFRGS, texto digital) (FIGURA 2). O gênero *Calyptanthes* apresenta cerca de 100 espécies diferentes, sendo 6 delas nativas aqui no Rio Grande do Sul: a *C. concinna* DC., *C. grandifolia* O.Berg, *C. lucida* Martius ex DC, *C. pileata* D.Legrand, *C. rubella* O.Berg e *C. tricona* D.Legrand (Limberger et al., 2002).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Calyptanthes* com propriedades biológicas citadas na literatura, a *C. pallens*, que apresenta predominância de compostos terpenoides, mostrou citotoxicidade seletiva contra células tumorais do câncer prostático humano (LNCap) e moderada citotoxicidade contra outras linhagens tumorais de pulmão, mama e mucosa oral, conforme o estudo feito por Echeverri-Lobo e colaboradores (2005). A *C. tricona*, apresenta compostos isolados que possuem um importante componente estrutural de interesse nos atuais modelos de estudos do desenvolvimento de novas drogas anti-tumorais e anti-inflamatórias, o cromene, que mostra facilidade de interação com receptores, várias atividades biológicas (anti-tumorais, antimicrobianas, antioxidantes, inibidoras de TNF- α) com baixa toxicidade relatada (MENUT et al., 2000; THOMAS & ZACHARIAH, 2013).

Sabe-se apenas informalmente sobre o uso popular da *C. grandifolia* em forma de chás ou infusões, principalmente para afecções gastrointestinais e inflamatórias. Apesar de não terem sido encontrados registros na literatura científica especificamente associados à espécie *C. grandifolia* e suas propriedades farmacológicas, outros gêneros da família *Myrtaceae* já foram

relatados com diversas aplicações ou potenciais terapêuticos, como descrito no subtítulo acima, indicando um caminho a ser explorado dentro desta família.



Figura 2 - *Calyptranthes grandifolia* O.Berg

Fonte: Flora Digital RS (2010).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

5.1.1 Coleta e Identificação

O material botânico (folhas) da *C. grandifolia* foi coletado do espécime no entorno do município de Lajeado (RS). A exsicata do material, contendo caule, folhas, flores e frutos, foi depositada no herbário do Centro Universitário UNIVATES (local de armazenamento da exsicata), sendo que o mesmo foi identificado pela botânica Profa. Dra. Elisete Maria de Freitas (UNIVATES, Lajeado, RS).

5.1.2 Obtenção dos Extratos

Os extratos etanólico e hexânico da *C. grandifolia* foram preparados nos Laboratórios de Química, do Centro Universitário Univates.

5.1.2.1 Extrato Hexânico

As folhas do espécime vegetal foram desidratadas, em estufa com ar circulante, a 38°C por 24 horas. Utilizaram-se 100g de folhas secas para cada 1 L de extrato. As folhas foram submersas no hexano (Química Moderna), 99%, em um frasco âmbar em temperatura ambiente durante o período de 72 horas. Após, realizou-se a filtração a vácuo e o armazenamento do filtrado em frasco âmbar, que foi mantido em temperatura ambiente até o momento da remoção do solvente. A adição do hexano às folhas da *C. grandifolia* e a filtração a vácuo foram repetidas três vezes, mantendo-se sempre as mesmas condições de temperatura e período de extração.

Decorrido o período de nove dias de extração, realizou-se a filtração a vácuo e a remoção do solvente com o auxílio de um evaporador rotativo a 40°C e 50 rpm. Ao final, o extrato obtido foi armazenado em frasco âmbar devidamente identificado e mantido sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento da realização dos ensaios (VOGEL et al., 2011). Rendimento médio: 5,7 g.

5.1.2.2 Extrato Etanólico

As folhas da *C. grandifolia* (CG) foram desidratadas, em estufa com ar circulante, a 38°C por 24 horas. Após este período, foi realizada a maceração estática (a frio) de 100g dos fragmentos das folhas em 1L de álcool etílico 90%, sendo estes acondicionados em um frasco âmbar e mantidos em temperatura ambiente durante sete dias. Decorrido o período de extração, realizou-se a filtração à vácuo e a remoção do solvente com o auxílio de um evaporador rotativo a 40°C e 50 rpm. O extrato obtido foi envasado em frasco âmbar devidamente rotulado e mantido sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento dos ensaios (VOGEL et al., 2011). Rendimento médio: 20,0 g.

5.2 Linhagens Celulares

Foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 e células epiteliais de ovário de hamster chinês (CHO-K1) adquiridos do Banco de células do Rio de Janeiro - BCRJ. Após descongelamento as células foram mantidas em

meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma), com adição de 0,006% de penicilina e 0,01% estreptomicina suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37° C em atmosfera de 5% CO₂ e 90% umidade. As células foram avaliadas diariamente através do auxílio de microscópio invertido (Labmed, Alemanha) e sub-cultivadas a cada dois dias.

5.3 Fitoquímica

A metodologia empregada para a realização desta avaliação fitoquímica foi adaptada a Simões et al. (2004) e Silva et. al (2010).

5.3.1 Esteroides/Triterpenoides

Os testes foram realizados pela reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado) onde extraiu-se 0,02 g do extrato em 2 mL de água e misturou-se a 2 mL de clorofórmio. Em seguida, filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em funil com papel filtro (com papel coberto com uma fina camada de Na₂SO₄ anidro). Em tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, agitou-se suavemente e acrescentou-se cuidadosamente três gotas de ácido sulfúrico, novamente agitando, suavemente. A coloração azul seguida de verde indica a presença de esteroides e triterpenoides respectivamente.

5.3.2 Taninos

Em um tubo de ensaio contendo 0,02 g do extrato em 2 mL de água adicionou-se 3 gotas da solução alcoólica de FeCl₃, agitando fortemente, observou-se a variação de cor. Um precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e um precipitado de cor verde indica a presença de taninos condensados.

5.3.3 Flavonóides

Para este ensaio extraiu-se cerca de 0,04 g de cada extrato em aproximadamente 10 mL de água em banho-maria fervente por 30 minutos. Esfriou-se, filtrou-se e extraiu-se duas vezes em funil de separação utilizando 2 mL de n-butanol. Foi realizada a evaporação da fração butanólica à secura em cápsula de porcelana e retornou-se o extrato em metanol (cerca de 2 mL). Transferiu-se para um tubo de ensaio. Adicionou-se 100µL de ácido clorídrico concentrado ao tubo e após 0,02 g de magnésio metálico. O desenvolvimento da coloração amarelada indica a presença de flavonoides.

5.3.4 Cumarinas

Aqueceu-se em tubo de ensaio ou becker cerca de 0,02 g dos extratos em banho-maria fervente. O tubo ou becker foi tampado com papel filtro previamente impregnado e seco com uma solução metanólica de hidróxido de potássio 5%. Após 10 minutos os papéis foram expostos à luz ultravioleta (UV) de 365 nm. O desenvolvimento da fluorescência azul e amarela indica a presença de cumarinas voláteis.

5.3.5 Alcaloides

Diluiu-se 0,2 g dos extratos vegetais em 4 mL de metanol em um becker. Na sequência, adicionou-se em cada tudo 1 mL de ácido clorídrico 10%. Os mesmos foram aquecidos em banho-maria (40°C) durante 30 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se e transferiu-se o conteúdo para 4 tubos de ensaio, onde foram adicionados, gota a gota, os reagentes de detecção: Mayer (Iodo mercurato de potássio), Dragendorff (Iodo bismutato de potássio), Wagner (Iodo lodeto de potássio) e reagente de Bertrand (Ácido sílico-tungstico). O aparecimento de um precipitado indica a presença de alcalóides.

5.3.6 Quinonas

Extraiu-se em banho-maria fervente durante 10 minutos 0,04 g do extrato vegetal com 1 mL de hidróxido de potássio 5%. Após resfriamento, filtrou-se o extrato e acidificou-se com ácido acético. Em seguida, extraiu-se com 1 mL de tolueno em funil de separação. Separou-se em um becker a fase orgânica e adicionou-se 500µL de solução de hidróxido de potássio 3%. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas, a coloração violácea indica a presença de naftoquinóides e o surgimento de coloração azul indica a presença de benzoquinóides.

5.3.7 Saponinas

Esta análise é baseada na propriedade das saponinas de formação de espuma após agitação enérgica. Cerca de 0,1 g dos extratos vegetais foram diluídos em 20 mL de água destilada e levados à banho-maria fervente por 15 minutos. Em seguida a solução foi filtrada e transferida para um tubo de ensaio. O tubo foi agitado vigorosamente durante 15 segundos e a altura da coluna de espuma formada foi medida com o auxílio de uma régua. O desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico a 10 % indica a presença de saponinas.

5.4 Avaliação do Potencial Citotóxico *in vitro* Através do Método de Alamar Blue

O azul de Alamar ou resazurina (Invitrogen) é um indicador de óxido redução e da função mitocondrial. Células viáveis reduzem a resazurina (azul e não fluorescente) à resorufina (róseo e altamente fluorescente).

Para este ensaio, foram utilizadas células não metabolizadoras CHO, da linhagem CHO-K1 (NAKAYAMA et al., 1997). Estas células foram plaqueadas em densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços contendo 200 μ L de meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich) + Nutrient Mixture F-10 Ham (Ham's F-10), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), Adquirido da cultilab, 0,006% penicilina e 0,01% de sulfato de estreptomicina e foram incubadas durante 5 horas (37°C, 5% CO₂). Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações da doxorubicina (58, 5.8, 0.58 e 0.058 μ g/mL), utilizadas como controle positivo e com diferentes concentrações de ambos os extratos vegetais (200, 100, 50 e 25 μ g/mL). Após incubação de 72h a 37°C, 5% de CO₂, os tratamentos foram desprezados e adicionou-se 200 μ L de solução 10% de azul de Alamar em cada poço. Após 5 h procedeu-se a leitura de absorbância em 540 nm (estado oxidado) e 630 nm (estado reduzido) em leitor de microplaca. Células em meio de cultura foram usadas como controle negativo. O ensaio quantifica essa redução, resultando em percentual de viabilidade celular (RISS et al., 2003), conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ Redução} = \text{Abs } 540 - (\text{Abs } 630 \times \text{Abs RO}) \times 100$$

onde:

$$\text{Abs RO} = \text{AOO} / \text{ARO}$$

AOO = Abs do meio sozinho subtraído do meio com azul de Alamar em 540 nm.

ARO = Abs do meio sozinho subtraído do meio com azul de Alamar em 630 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.5 Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólico e hexânico da *C. grandifolia* foi realizada conforme o método descrito por Mensor et al. (2001), com modificações. O método DPPH baseia-se na captura do radical

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes diminuindo a absorbância (FIGURA 3).

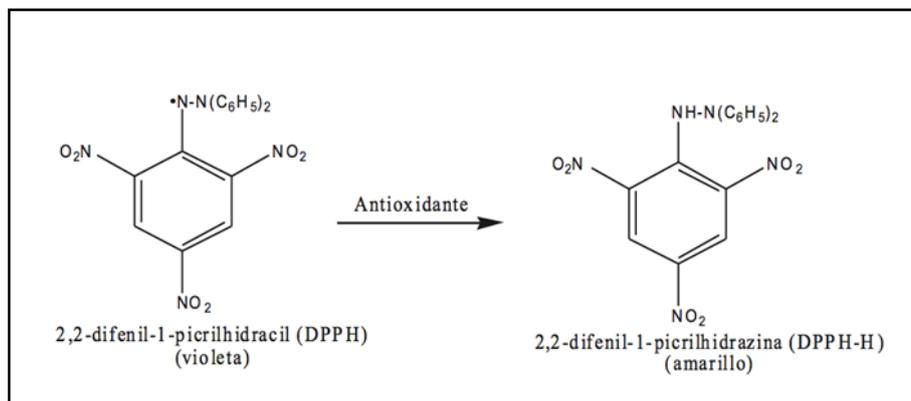


Figura 3 – Redução do DPPH.

Fonte – G. Toro et al (2011).

Para o ensaio, foram preparadas, a partir da solução estoque da *C. grandifolia* (1mg/mL), alíquotas dos extratos diluídos em álcool metílico até a obtenção de concentrações finais de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 µg/mL, além de 1,0 mL de solução de DPPH (Sigma-Aldrich) a 0,004% em álcool metílico. O ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão, nas mesmas concentrações dos extratos. Em temperatura ambiente, foi adicionado 1,0 mL da solução do DPPH para cada 0,5 mL de amostra. O controle negativo foi preparado com DPPH e metanol, nas quantidades de 1,0 mL e 0,5 mL, respectivamente. Após 30 minutos de incubação, protegidas da luz, realizou-se a leitura das amostras em comprimento de onda de 517 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. O percentual de atividade antioxidante (AA%) de cada concentração foi calculado através da seguinte fórmula:

$$AA\% = \frac{(\text{Abs DPPH} - \text{Abs Amostra})}{\text{Abs DPPH}} \times 100$$

Abs DPPH

5.6 Análise da Liberação da Citocina TNF- α em Macrófagos Murinos RAW 264.7

Para esse ensaio, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. As células foram cultivadas em estufa (37°C, 5% CO₂) e posteriormente foram tratadas com os extratos vegetais etanólico e hexânico em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25 µg/mL) e incubadas por 1 hora, a 37°C, na presença de 5% de CO₂. Após incubação, as mesmas foram estimuladas com LPS (1 µg/ml) (MORI et al., 2000) e novamente incubadas, por 24h. Passadas 24 h de incubação, 0,4 mL do sobrenadante dessas células foi coletado e estocado à - 80°C e utilizado para a quantificação da liberação de citocinas inflamatórias TNF- α por kit de ELISA (e-Bioscience, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise utilizando-se o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA), seguido por pós-teste (Dunnnett ou Tuckey) e teste t não pareado, executadas com software GraphPad Prism 6 (versão 6.0 GraphPad Software, Inc.), sendo adotados níveis de significância de 95% (p < 0,05).

6 RESULTADOS

6.1 Fitoquímica

No extrato etanólico foram detectados, pela mudança de coloração, a presença de flavonoides e triterpenoides, e por formação de precipitado identificou-se a presença de taninos. Ainda, foram avaliadas a presença de alcalóides, cumarinas, quinonas e saponinas para o extrato etanólico, os quais não foram encontrados. Não identificou-se a presença de nenhum dos constituintes fitoquímicos avaliados no extrato hexânico (TABELA 1).

Tabela 1 – Avaliação Fitoquímica: constituintes fitoquímicos detectados nos extratos etanólico e hexânico da *C. grandifolia*.

Compostos	ExtratoEtanólico	Extratohexânico
Flavonoides	+	-
Taninos	+	-
Esteroides/Terpenoides	+	-
Alcaloides	-	-
Cumarinas	-	-
Quinonas	-	-
Saponinas	-	-

6.2Potencial Citotóxico *in vitro* através do Método de Alamar Blue

A linhagem CHO-K1 foi utilizada para determinar a citotoxicidade dos extratos das folhas da *C. grandifolia*, através do método de Alamar Blue, utilizando o quimioterápico doxorrubicina como controle positivo. O controle negativo (CN) foi representado apenas por células e meio. As respostas da CHO-K1 frente as diferentes concentrações de doxorrubicina e dos extratos testados estão apresentados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Observa-se um aumento na viabilidade celular, de modo dose-dependente, para doxorrubicina, mantendo na concentração de 58 µg/mL uma viabilidade celular de 36.0 ± 0.57 % quando comparada à concentração de 0.0058 µg/mL, onde esta aumenta para 68.5 ± 10.3 %.

O extrato etanólico não apresentou citotoxicidade considerável e manteve a viabilidade celular significativamente aumentada nas concentrações de 100 µg/mL (68.0 ± 9.24 %), 50 µg/mL (68.4 ± 9.51 %) e 25 µg/mL (68.9 ± 10.7 %), com pequena redução observada apenas no extrato de 200 µg/mL (63.3 ± 5.83 %), em relação à doxorrubicina na concentração de 58 µg/mL (FIGURA 4). De forma semelhante, para o extrato hexânico, a redução da viabilidade celular, pode

ser apenas observada na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mantendo $47.8 \pm 0.69\%$ de viabilidade celular frente à doxorubicina na concentração de 58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($36.0 \pm 0.57\%$). Nas concentrações de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($57.1 \pm 0.81\%$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($59.3 \pm 0.54\%$) e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($59.5 \pm 0.64\%$) não se observou importante alteração na viabilidade celular, sendo que esta mantém-se aumentada de modo significativo ($p < 0.05$) em relação ao controle positivo na maior concentração (FIGURA 5). De modo geral, observa-se uma redução na viabilidade quando comparado ao padrão em sua menor concentração testada. Ainda pode-se verificar uma pequena diminuição da viabilidade celular do extrato hexânico quando comparado ao extrato etanólico frente as concentrações de 0.058, 0.0058 e 0.00058 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A viabilidade das células que não receberam nenhum tratamento (CN) foi de $87.7 \pm 3.13\%$.

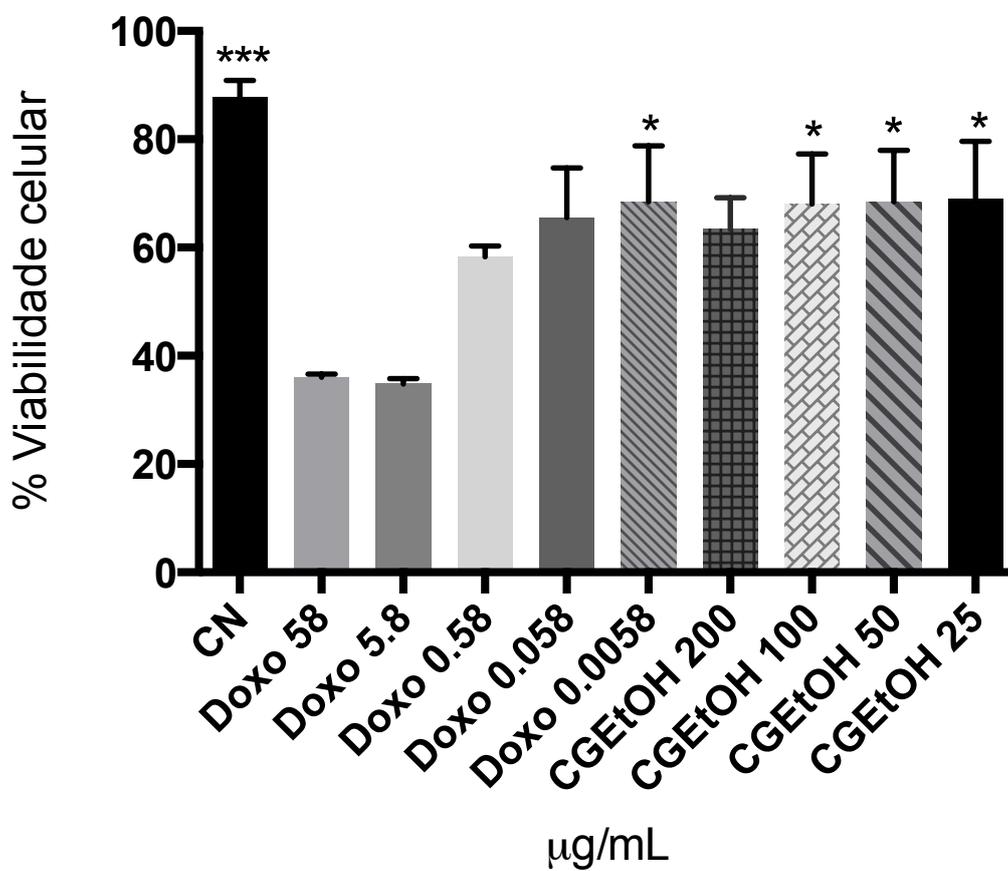


Figura 4 - Viabilidade das células CHO-K1 após 72h de tratamento com extrato etanólico da *C. grandifolia* em diferentes concentrações (200, 100, 50,25 µg/mL) em comparação com a doxorubicina (controle positivo) nas concentrações de 58, 5.8, 0.58 e 0.058 µg/mL. Valores constituídos das médias três experimentos independentes (\pm E.P.M). ANOVA one-way, com pós-teste de Dunnett (* $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$) – Significativamente diferente do controle positivo na concentração de 58 µg/mL

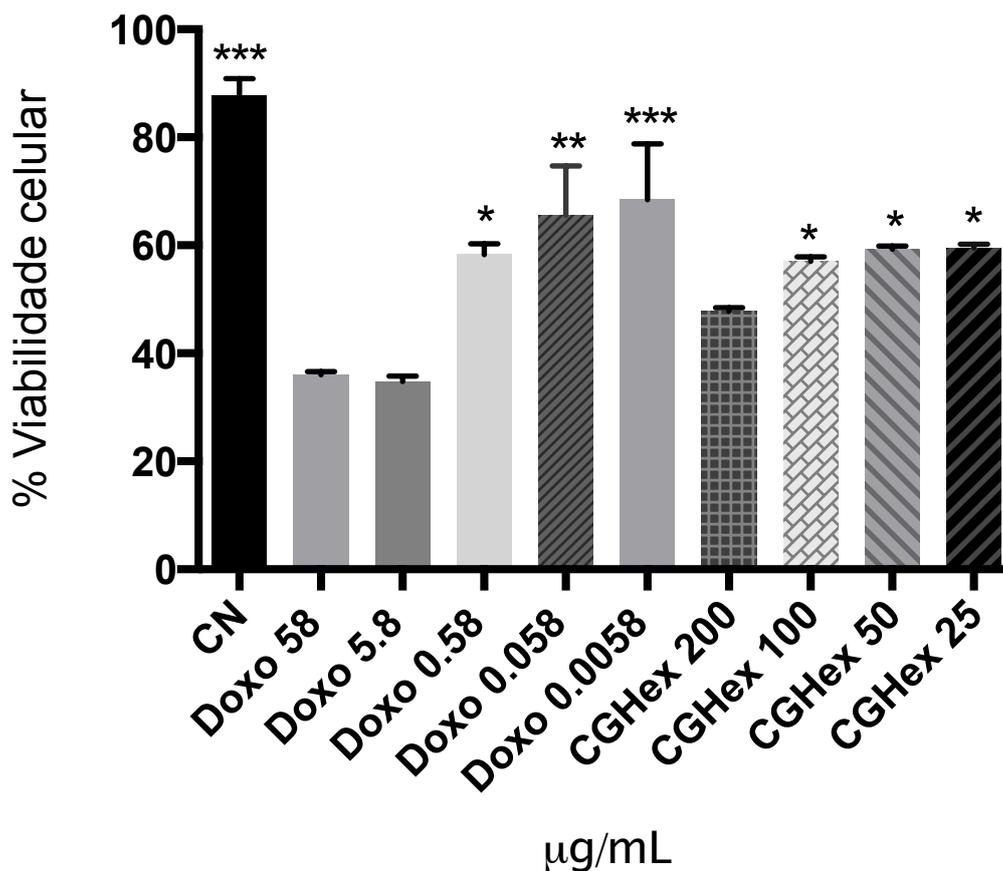


Figura 5 - Viabilidade das células CHO-K1 após 72h de tratamento com extrato hexânico da *C. grandifolia* em diferentes concentrações (200, 100, 50, 25 µg/mL) em comparação com a doxorubicina (controle positivo) nas concentrações de 58, 5.8, 0.58 e 0.058 µg/mL. Valores constituídos das médias três experimentos independentes (\pm E.P.M). ANOVA one-way, com pós-teste de Dunnett. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) – Significativamente diferente do controle positivo na concentração de 58 µg/mL.

6.3 Potencial Antioxidante dos Extratos Etanólico e Hexânico

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade das substâncias antioxidantes presentes nos extratos vegetais em capturar o radical estável DPPH, levando-o ao estado reduzido, conseqüentemente diminuindo a sua absorvância. Nesta reação, a solução metanólica do DPPH, inicialmente violeta, torna-se amarela. De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que as amostras testadas apresentam, ou não, potencial antioxidante. O extrato

Hexânico não apresentou atividade antioxidante na maior concentração testada (100 µg/mL). Dados não apresentados. A figura 6 mostra os resultados do potencial antioxidante do extrato etanólico, em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL), comparados ao controle positivo, o ácido ascórbico (100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL).

O extrato, como o ác. Ascórbico (AA), apresenta atividade antioxidante dose dependente. Nas concentrações de 100µg/mL e 50 µg/mL do AA e do extrato etanólico não se observa perda no potencial antioxidante, somente na concentração de 25 µg/mL pode-se observar a diminuição deste potencial para o extrato etanólico, sendo que a atividade reduz para $52.4 \pm 3.73 \%$, quando comparado ao AA na mesma concentração 25 µg/mL ($96.1 \pm 0.94 \%$). O potencial antioxidante do AA ($IC_{50} 8.75 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$) quando comparado com o do extrato ($IC_{50} 21.32 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$) apresenta considerável maior atividade, porém deve-se considerar o AA como substância química de alta pureza, sendo o extrato um composto com vários constituintes presentes (FIGURA 9). Deste modo, considerando a concentração 6.25 µg/mL, próxima ao IC_{50} , observa-se que em relação a este, as concentrações de 100µg/mL ($93.8 \pm 0.58 \%$), 50µg/mL ($90.6 \pm 2.94 \%$), 25µg/mL ($52.4 \pm 3.73 \%$)µg/mL e 12.5µg/mL ($26.8 \pm 1.36 \%$) do extrato etanólico, possuem significativa atividade antioxidante. As concentrações de 6.25 µg/mL ($14.3 \pm 2.43 \%$) e 3.12 µg/mL ($6.5 \pm 1.63 \%$), apresentam diferença significativa quando comparados à concentração de AA de 6.25 µg/mL ($38.2 \pm 2.99 \%$).

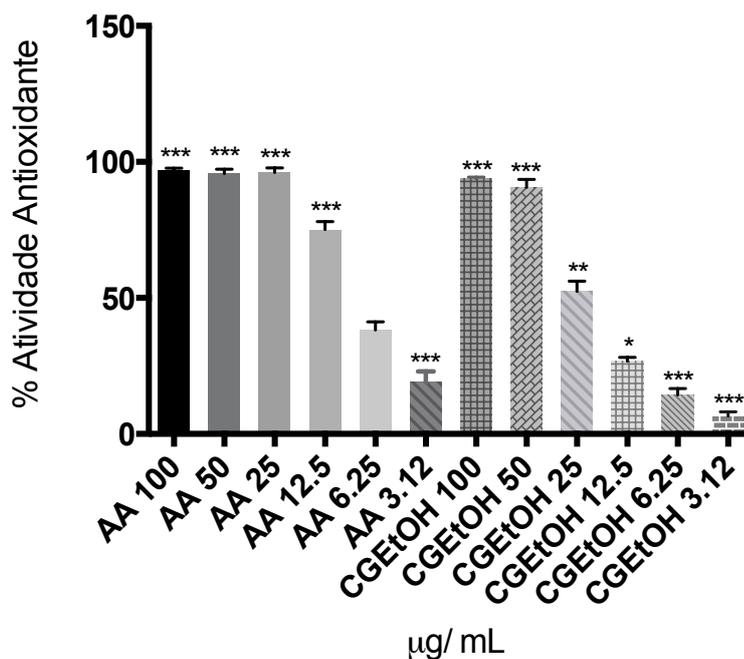


Figura 6 - Atividade antioxidante expressa pela porcentagem de sequestro de radicais DPPH (% AA.) das diversas concentrações da solução padrão (ácido ascórbico) e dos extratos etanólicos da CG. Valores constituídos das médias três experimentos independentes (\pm E.P.M). ANOVA one-way, com pós-teste de Dunnett (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) – Significativamente diferentes do controle positivo na concentração de $6.25 \mu\text{g/mL}$

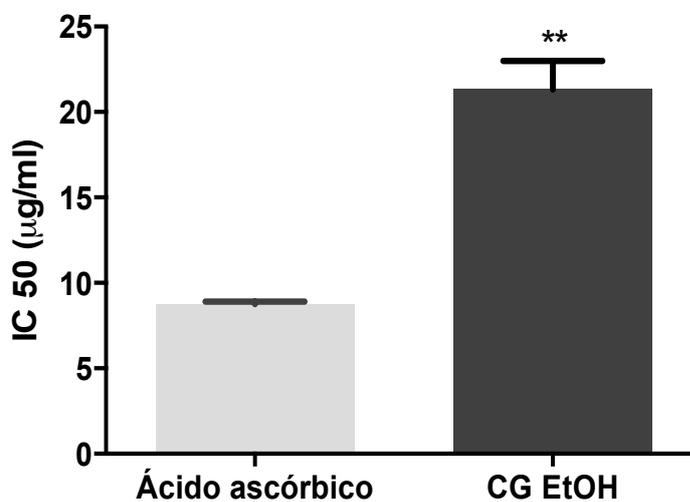


Figura 7 -Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da *C. grandifolia*. Representação da média de valores independentes do IC₅₀ do ácido ascórbico ($8.75 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$) e do extrato etanólico da *C. grandifolia* ($21.32 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$). Valores constituídos das médias três experimentos independentes (\pm E.P.M). ANOVA one-way, teste t não pareado (** $p < 0.01$)

6.4 Avaliação da liberação do TNF- α em macrófagos RAW26.7 ativados por LPS através de ensaio colorimétrico ELISA

A citocina TNF- α foi quantificada no sobrenadante obtido da cultura celular, após tratamento com extratos etanólico e hexânico e estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 24 horas. A inibição da liberação do TNF- α foi significativa ($p < 0.05$) no extrato etanólico na concentração de 200 μ g/mL (464.0 ± 36.7 pg/mL) quando comparada ao controle positivo (CP) LPS 1 μ g/mL (1143.0 ± 118.0 pg/mL) e também quando comparada à concentração de 25 μ g/mL (1272 ± 293 pg/mL). As concentrações de 100 μ g/mL (1185 ± 312 pg/mL), 50 μ g/mL (1179 ± 261 pg/mL) e 25 μ g/mL (1272 ± 293 pg/mL) não apresentaram diferença significativa em relação ao CP e nem entre si. O controle negativo (CN) (53.6 ± 36.8 pg/mL) apresentou diferença significativa quando comparado ao CP ($p < 0.0001$) e quando comparado às concentrações de 100 μ g/mL, 50 μ g/mL e 25 μ g/mL ($p < 0.001$) (FIGURA 8).

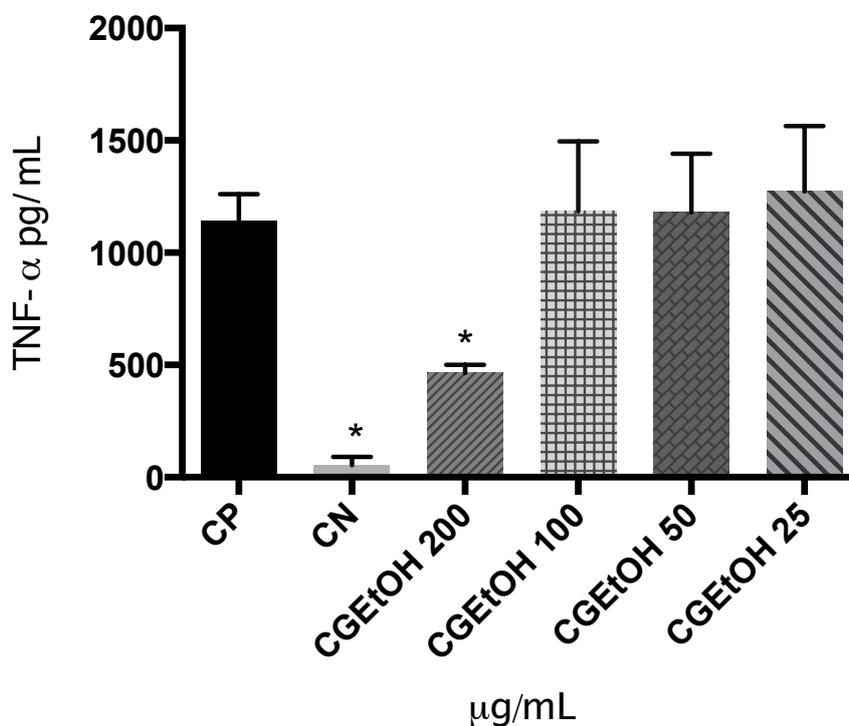


Figura 8 – Avaliação da Inibição da citocina TNF- α após tratamento com extrato etanólico, das células RAW-264.7, estimuladas com LPS. As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (200, 100, 50, e 25 μ g/mL) por 1h e após estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 24h. O CP representa as células estimuladas apenas com LPS e sem tratamento e oCN representa a produção basal de citocina da célula, sem estímulo e sem tratamento. Valores constituídos das médias experimentos independentes (\pm E.P.M). ANOVA one way seguida de pós-teste Tuckey. (* $p < 0.05$).

O extrato hexânico, na concentração de 200 μ g/mL (774.0 \pm 50.4 pg/mL) apresentou uma maior inibição frente à liberação do TNF- α quando comparada ao CP (1143 \pm 118 pg/mL) e às demais concentrações deste extrato, 100 μ g/mL (1385 \pm 365 pg/mL), 50 μ g/mL (1392 \pm 352 pg/mL) e 25 μ g/mL (1353 \pm 286 pg/mL) porém esta inibição não apresentou significância estatística, como observado para o extrato etanólico. Também não houve diferença significativa

entre as concentrações dos extratos hexânicos. O controle negativo (CN) (53.6 ± 36.8 pg/mL) apresentou diferença significativa quando comparado ao CP ($p < 0.0001$) e quando comparado às concentrações de 200 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.005$), 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$) (FIGURA 9).

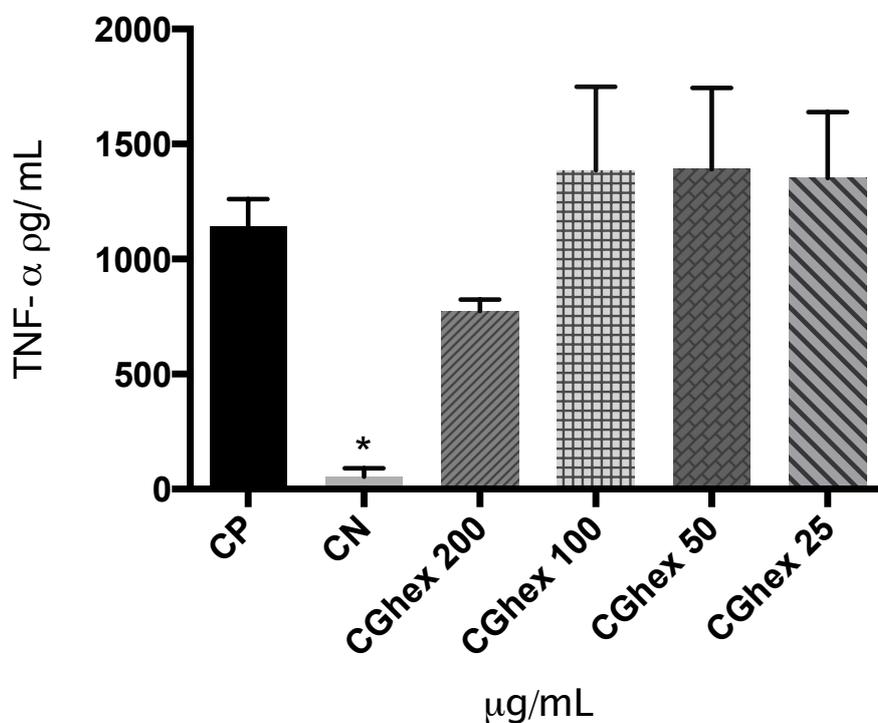


Figura 9 – Avaliação da Inibição da citocina TNF- α após tratamento com extrato hexânico, das células RAW-264.7, estimuladas com LPS. As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (200, 100, 50, e 25 $\mu\text{g/mL}$) por 1h e após estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 24h. O CP representa as células estimuladas apenas com LPS e sem tratamento e o CN representa a produção basal de citocina da célula, sem estímulo e sem tratamento. Valores constituídos das médias experimentos independentes (\pm E.P.M). ANOVA one way seguida de pós-teste Tuckey. (* $p < 0.05$).

7 DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento de uma nova droga, um longo caminho é percorrido, em média o tempo necessário chega a 10 anos, com custos milionários e trabalho árduo para que os candidatos a drogas tenham qualidade e quantidade suficientes para chegar à fase clínica (BALUNAS, KINGHORN, 2005). Estudos *in vitro* com produtos naturais, como os de origem vegetal, guiam as etapas futuras do processo, por fornecerem dados importantes sobre seus componentes bioativos e suas formas de ação. Passos iniciais, fundamentais, durante o processo, para a identificação de substâncias ativas são imprescindíveis, e alguns estão mencionados no presente estudo. A pesquisa fitoquímica teve por objetivo conhecer e avaliar a presença dos principais constituintes químicos da planta estudada, por não haver até o momento, nenhum conhecimento farmacológico sobre os extratos da espécie *C. grandifolia*, apenas dados de literatura relacionados a composição de óleos essenciais, a outras espécies ou à família a qual pertence. Este estudo contribuiu para indicar grupos de metabólitos secundários relevantes presentes nos extratos analisados.

Grande parte das prospecções fitoquímicas feitas com o gênero *Calyptranthes*, descritos na literatura, deu-se pela análise de óleos essenciais, porém entre outros gêneros desta família, há relatos de estudos com folhas, galhos, frutos e raízes (CRUZ & KAPLAN, 2006; FIUZA et al., 2008; MULLER, et al., 2012; MULYANINGSIH et al., 2010; VIEIRA & MARTINS, 2000).

A presença de esteroides/terpenoides, no extrato etanólico da *C. grandifolia*, identificada nesta pesquisa está de acordo com o perfil químico de outras espécies de *Calyptranthes* e de membros da família *Myrtaceae*, como já citados em outros trabalhos, incluindo *C. pallens*, *C. tricona*, *C. spruceana*, *Eucalyptus globuluse* outras espécies de *Eucalyptus* (LOBO-ECHEVERRI et al., 2005; MENUT et al., 2000; DA SILVA et al., 1984; MULYANINGSIH et al. 2010; ELAISSI et al., 2012). Estes achados na composição fitoquímica da *C. grandifolia* podem indicar um potencial farmacológico importante para esta planta, uma vez que os terpenoides tem apresentado atividades farmacológicas relatadas na literatura. O Linalool, por exemplo, é um monoterpene encontrado frequentemente em óleos essenciais e que pode ser extraído de várias plantas aromáticas, o qual apresenta além de propriedades antimicrobianas, atividades antitumorais associadas a efeitos citotóxicos indutores de apoptose e de supressão do crescimento celular e atividades anti-inflamatórias em estudos *in vitro* (CHANG ; SHEN, 2014; MAEDA et al., 2013). Maeda e colaboradores (2013) testaram, em células RAW 264.7, os efeitos inibitórios do óleo essencial Kuramoji (*Lindera umbellata*) e seu principal composto, o monoterpene linalool, na produção de óxido nítrico (NO) LPS-induzido e verificaram uma diminuição da produção do NO de maneira dose-dependente. Neste mesmo estudo, verificaram também efeitos inibitórios de IL-6 induzido por LPS e da expressão de TNF- α , demonstrando efeitos anti-inflamatórios do óleo, nesta linhagem celular. O ácido betulínico, citado anteriormente, no tópico dos terpenoides, apresenta evidências de atividades anticâncer demonstradas em alguns estudos, como a supressão da laminina B1, uma proteína envolvida na progressão de tumor pancreático ou através da indução da apoptose em células

HeLa do câncer cervical (LI et al., 2013; XU et al., 2014). Frutos da CamuCamu (*Myrciaria dubia*), pertencente a família das *Myrtaceae*, apresentam 98% de terpenos em sua composição, mostrando além de atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e potencial anti-obesidade (LANGLEY et al., 2014).

Ainda no extrato etanólico, foram identificados flavonóides e taninos, cuja presença está igualmente caracterizada em outras plantas da mesma família. O *Psidium guajava* (guava) é uma planta da família das *Myrtaceae* que apresenta grande valor na medicina tradicional, mostrando em sua composição química, flavonoides e taninos em grande quantidade (CHEN et al. 2009), associados a efeitos terapêuticos, incluindo atividade anti-inflamatória e analgésica (DENNY, 2013). Um estudo de Ryu e colaboradores (2012) com a fração hexânica das folhas desta planta, identificou atividade anticâncer associada não só à atividade apoptótica, mas também de supressão de alvos como AKT e MAPK, em células de câncer de próstata humano (PC3). A avaliação fitoquímica dos extratos das folhas das espécies *Eugenia uniflora* e *Eugenia dysenterica*, ambas pertencentes à esta família, também mostrou polifenóis, flavonoides e taninos, sendo igualmente associados à ações terapêuticas anti-inflamatórias e gastroprotetivas, com inibição da liberação de HCl, que são coerentes com o uso na medicina tradicional, justificando sua utilização para esta finalidade (PRADO et al., 2014; VIANA et al., 2012). Saponinas e alcalóides não foram identificados nestes extratos, no entanto, há referência da presença de saponinas em extratos dos galhos de *Psidium guajava* e das folhas de *Eugenia uniflora*, bem como da presença de alcalóides em extratos brutos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, *Myrciastes pungens* *Psidium cattleianum* (FIUZA et al., 2008; MALDANER & COELHO, 2011; SEKHAR et al., 2014). A presença de saponinas quando identificada na composição química das plantas também mostra atividades anticarcinogênicas como indução de apoptose e ação antimetastática (FRANCIS et al., 2002; MAN et al., 2009), assim como os alcaloides (LU et al., 2012; SAFARZADEH et al., 2014; Y.-H. WANG et al., 2014).

Os demais compostos, quinonas e cumarinas, não foram identificados nestes ensaios e este resultado mostra-se compatível com outros perfis fitoquímicos citados na literatura. A presença de quinonas e cumarinas, podem estar relacionados a atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, ou ainda atividade anticarcinogênica (LU et al., 2013; RASUL et al., 2011; VITORINO et al., 2013). O extrato hexânico não apresentou nenhum dos constituintes fitoquímicos analisados, ao contrário de outros estudos na literatura que identificam alguns dos compostos em extratos em outras plantas da família *Myrtaceae*, como a *Psidium guajava*, com evidências de atuação de polifenóis na supressão de genes anti-apoptóticos, e MAPK, ou mostrando potencial citotóxico contra duas linhagens celulares de câncer de ovário (LEVY & CARLEY, 2012; RYU et al., 2012). Segundo Souza e col. (2009) a qualidade das plantas medicinais depende de muitas variáveis, que incluem diferenças entre as espécies, clima, coleta, armazenamento e, também, processamento, o que poderia justificar os resultados obtidos.

As análises fitoquímicas realizadas indicaram que a espécie vegetal estudada possui classes de compostos que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos, mas ainda é necessário mais estudos para melhor caracterização dos compostos encontrados, sendo importante isolar os constituintes fitoquímicos para identificar qual deles é o responsável por determinada atividade biológica.

A citotoxicidade, em geral, é avaliada com a finalidade de verificar o quão seguras as diferentes substâncias podem ser, e em quais concentrações essa segurança e citotoxicidade são observadas, para que permaneçam na triagem como candidatos a novas drogas. Ambos os extratos foram avaliados frente à linhagem de célula epitelial CHO-K1, através do método de Alamar Blue, utilizando como controle positivo o antineoplásico doxorrubicina, o qual interfere no mecanismo de sobrevivência celular, especificamente durante a fase S da divisão celular, inibindo a síntese de DNA e RNA. Os resultados dos testes efetuados nas células submetidas ao extrato hexânico, apresentaram redução

da viabilidade celular, com valores mais próximos às concentrações de doxorubicina de 58µg/mL e 0.58µg/mL, apenas na concentração de 200 µg/mL (IC_{50} 170.0 ± 8.57 µg/mL). Provavelmente outros compostos, ou mesmo alguns dos compostos avaliados neste estudo, podem estar presentes no extrato Hexânico, entretanto podem não ser detectáveis devido à baixa concentração.

Um estudo publicado por Levy e colaboradores (2012), mostrou efeitos citotóxicos dose-dependentes do extrato hexânico da *Psidium guajava* em células leucêmicas Kasumi-1, com IC_{50} determinado em 200 µg/mL, sendo este um valor semelhante ao encontrado neste estudo. Apesar do autor ter considerado que seu extrato apresentou atividade citotóxica significativa, para o INC, valores de IC_{50} iguais ou maiores que 30 µg/mL não são considerados potenciais candidatos ao desenvolvimento de drogas anticarcinogênicas.

Nenhuma das concentrações do extrato etanólico testadas mostrou redução significativa da viabilidade celular, quando comparada ao controle positivo. No entanto outras linhagens celulares podem ser testadas futuramente na tentativa de identificar uma possível citotoxicidade seletiva. Saleh e colaboradores (2014), demonstraram que em baixa dosagem o óleo essencial da *Artemisia vulgaris* apresentou importante diminuição da viabilidade celular em linhagens de células cancerosas (leucemia mielóide e linfóide, hepatocarcinoma, adenocarcinoma cervical, adenocarcinoma mamário e próstata) porém com baixa citotoxicidade em células normais.

A atividade antioxidante expressa a capacidade dos compostos presentes na planta em eliminar radicais livres, evitando o estresse oxidativo, causador de danos celulares. Com a finalidade de avaliar a capacidade antioxidante dos constituintes dos extratos da *C. grandifolia* foram feitas análises das soluções destes extratos com DPPH, cujos resultados indicaram atividade antioxidante significativa no extrato etanólico da planta. Este resultado é compatível com achados da literatura no que se refere ao potencial antioxidante encontrado nas espécies da família *Myrtaceae*, como é o caso dos gêneros *Eugenia*, *Myrciaria*,

Syzygium e *Psidium*, a maioria com resultados apresentados a partir de avaliações com extratos alcoólicos ou aquosos (ANNADURAI et al., 2012; FIGUEIRÔA et al., 2013; LATINA, 2013; STEWART et al., 2013; W. WANG et al., 2014). Alguns estudos mostram que vários fatores podem interferir nos resultados da avaliação da atividade antioxidante, o tipo de extração é um dos fatores elencados (NANTITANON et al., 2010; TACHAKITTIRUNGROD et al., 2007). Outra relação importante que é feita com a atividade antioxidante trata-se da presença de compostos fenólicos em sua composição fitoquímica. Como citado anteriormente, o extrato etanólico da *C. grandifolia* indicou a presença de flavonoides e taninos, ambos relacionados à ações protetivas, incluindo atividade antioxidante, gastro, cardio e neuroprotetora, anti-inflamatória e anticarcinogênica (GARCÍA-LAFUENTE, et al. 2009; GRABACKA et al., 2014; PRADO et al., 2014; SAEDI et al., 2014).

Muitos efeitos relacionados ao estresse oxidativo estão envolvidos no processo inflamatório, incluindo a produção de radicais livres por células imunológicas. Os polifenóis, presentes nas plantas, representam uma categoria de compostos fitoquímicos muito importante, pela sua capacidade antioxidante. No entanto, Li (2014) e colaboradores, em um artigo de revisão, demonstraram que nos últimos anos, o efeito protetivo dos polifenóis vai além de seu potencial antioxidante, mostrando atividade citotóxica, efeitos anti-idade, atividade antimicrobiana, bem como indícios de interação com receptores celulares e vias de sinalização relacionadas à transdução. Serra e colaboradores (2014), apresentaram um estudo indicando a modulação, *in vitro*, do Resveratrol limitando respostas inflamatórias através da inibição da via JAK-STAT.

O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória cuja ação nos tecidos tumorais vem sendo muito estudada. Existem evidências de sua participação na regulação de processos de promoção e progressão tumoral e essa associação, cancer-inflamação é bastante atrativa no processo de pesquisa de novos alvos terapêuticos (GERMANO et al., 2008; SZLOSAREK et al., 2006). O nosso trabalho apresentou diminuição da liberação de TNF- α na concentração de 200

µg/mL em ambos os extratos, havendo diferença significativa ($p < 0.05$) apenas no extrato etanólico, quando comparado ao controle positivo (LPS). Como mencionado, não há trabalhos na literatura científica que referenciem às possíveis atividades farmacológicas atribuídas a espécie *C. grandifolia*. No que se refere à sua família, também foi infrutífera a pesquisa envolvendo gêneros de *Myrtaceae* e sua relação com a citocina TNF- α , inflamação e o câncer, à exceção de um trabalho de Denny e colaboradores, que identifica atividade anti-inflamatória e analgésica em bagaço (provenientes de restos industriais) da goiaba (*Psidium guajava*), associando esses achados aos componentes fenólicos principais presentes na planta, entre eles flavonoides. Entretanto vários outros estudos mostram que outras espécies de plantas já estão sendo testadas frente à citocinas, entre elas o TNF- α , com resultados promissores, havendo evidências da supressão da inflamação e do estresse oxidativo, com vias envolvendo o TNF- α e a MAPK, ou de inibição da expressão de receptores de citocinas (ex. TNF-R) potencialmente envolvidos em migração celular e metástase (KIM, et al., 2012; TAN et al., 2011).

8 CONCLUSÃO

Esta pesquisa demonstra o potencial antioxidante, indícios de atividade anti-inflamatória da *Calyptanthes grandifolia*, bem como as principais classes fitoquímicas presentes e responsáveis pelas atividades biológicas descritas. A pesquisa fitoquímica dos extrato indicou a presença de polifenóis, flavonoides e taninos, bem como de esteroides/terpenoides, apenas no extrato etanólico. Quanto à avaliação de citotoxicidade, ambos apresentaram baixa toxicidade, não sendo, segundo a literatura, candidatos promissores para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais, nessas condições, no entanto podem ser candidatos para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias. O extrato etanólico possui considerável atividade antioxidante. A avaliação da inibição do TNF- α apresentou melhor desempenho nos testes realizados com o extrato etanólico, mostrando uma inibição significativa da secreção desta citocina frente ao controle positivo. A baixa toxicidade evidenciada, associada à presença de flavonoides, taninos e esteroides/terpenoides, bem como a inibição do TNF- α podem justificar o uso etnofarmacológico desta planta, para o alívio de sintomas inflamatórios. Há que se considerar que mais estudos, com diversificação de linhagens celulares e novas formas de extração, bem como pesquisas envolvendo outras partes da planta, como frutos, casca e raiz, podem mudar esse contexto. Novos alvos, novas biomoléculas, novas hipóteses poderão surgir a partir de pesquisas como esta.

REFERÊNCIAS

- ADEFUYE, A.; SALES, K. Regulation of Inflammatory Pathways in Cancer and infectious Disease of the Cervix. **Scientifica**, 2012.
- AFAQ, F.; SALEEM, M.; KRUEGER, C.G.; REED, J.D.; MUKHTAR, H. Anthocyanin- and Hydrolyzable Tannin-Rich Pomegranate Fruit Extract Modulates MAPK and NF- κ B Pathways and Inhibits Skin Tumorigenesis in CD-1 Mice. **Int. J. Cancer**, v. 113, p. 423–433, 2005.
- ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A.; BARRETT, C.; ALBERTO, C.; LUIS, C. Cancer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, 2008.
- ANNADURAI, G.; ROSE, B.; MASILLA, P.; JOTHIRAMSHEKAR, S.; PALANISAMI, E.; PUTHIYAPURAYIL, S.; PARIDA, A. K. Antimicrobial , antioxidant , anticancer activities of *Syzygium caryophyllatum* (L .) Alston Full Text Introduction. **Int J of Green Pharm**, v. 4, p. 4–5, 2012.
- ARAVINDARAM, K.; YANG, N.S. Anti-Inflammatory Plant Natural Products for Cancer Therapy. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1103-1117, 2010.
- ARORA, S.; SINGH, S.; PIAZZA, G. A.; CONTRERAS, C. M.; PANYAM, J.; SINGH, A. P. Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 10, p. 1244–1252, 2013.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA (AMB), ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÉUTICA DE PESQUISA, INTERFARMA. **Medicamentos Biológicos na Prática Médica**. São Paulo, v. 1, 2013.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76–81, 2007.
- BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 2, p. 135–41, 2002.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet**, v.357, p. 539–45, 2001.

BALKWILL, F. R. Tumour necrosis factor and cancer. **Progress in Growth Factor Research**, v. 4, n. 2, p. 121–137, 2009.

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

BARRETO, R.C.; PEREIRA, G.A.S.; COSTA, L.J. O duplo papel da Inflamação no surgimento das Lesões Cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p.107-114, 2010.

BIAVATTI, M. W.; MARENSI, V.; LEITE, S. N.; REIS, A., Químico-farmacêuticas, N. D. I., & Farmácia, C. De. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 640–653, 2007.

BLÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-FERIA, L.; ÁLVAREZ, L.; HARO, A.; CASANOVA, M. L.; GUZMA, M.; LUIS, A. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas. **Cancer Research**, v. 64, p. 5617–5623, 2004.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares: PMNC** – Brasília, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicos** - Departamento de Assistência Farmacêutica. – 60 p. Brasília, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. **Cadernos de Atenção Básica, Práticas Integrativas e Complementares, Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**, 2012.

BRAY, F.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMANN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790- 801, 2012.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias Para A Obtenção De Compostos Farmacologicamente Ativos A Partir De Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização Da Atividade. **Quimica Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CERQUEIRA, M.D. **Estudo Fitoquímico de *Myrciarotundifolia*(Berg.) Legrand. (*Myrtaceae*)**. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

CHEN, K.-C.; HSIEH, C.-L.; HUANG, K.-D.; KER, Y.-B.; CHYAU, C.-C.; PENG, R. Y. Anticancer activity of rhamnoallosan against DU-145 cells is kinetically complementary to coexisting Polyphenolics in *Psidium guajava* budding leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6114–6122, 2009.

CHEN, K.-C.; HSIEH, C.-L.; HUANG, K.-D.; KER, Y.-B.; CHYAU, C. -C.; PENG, R. Anticancer Activity of Rhamnoallosan against DU-145 Cells Is Kinetically Complementary to Coexisting Polyphenolics in *Psidium guajava* Budding Leaves. [Journal of Agricultural and Food Chemistry](#), v. 57, n. 14, p. 6114- 6122, 2009.

CHENG, Z.-X.; LIU, B.-R.; QIAN, X.-P.; DING, Y.-T.; HU, W.-J.; SUN, J.; YU, L.-X. Proteomic analysis of anti-tumor effects by *Rhizoma Paridis* total saponin treatment in HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 129–37, 2002.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.

COLEMAN, W.; TSONGALIS, G. **The molecular basis of human disease**. London, Elsevier, 2009.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n.2, p. 263-266, 2006.

COSTA-LOTUFO, L.V.; RAQUEL, C.; MONTENEGRO, A. P. N. N.; ALVES, S.; VANESCA, F.; MADEIRA, C. P.; MORAES, M.A.; MANOEL, O. M. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, v. 2, n. 1, p. 127-135, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–23, 2014.

CRAGG, G.; NEWMAN D.J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 2005.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso Medicinal de Espécies das Famílias *Myrtaceae* e *Melastomataceae* no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v.11, n.1, p. 47-52, 2004.

CRUZ, A. V. DE M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomaceae no Brasil. **Floresta E Ambiente**, p. 47–52, 2006.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica , fitoquímica e farmacologia do Guaco : revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulyz Bip . ex Baker. **Rev Bras PI Medicinai**s, v. 14, n. 2, p. 400–409, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 10, p. 7313–52, 2010.

DENNY, C. Guavapomace: a new source of anti-inflammatory and analgesicbioactives. **BMC complementary and alternative medicine**, v.13, n.1, 2013.

DIAS D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. "A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery." **Metabolites**,v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DJAKIEW, D. The p38 MAPK Pathway in Prostate Cancer.**Prostate cancer: Biochemistry, Molecular Biology and Genetics, Protein Reviews**, n.16, Mayo Clinic, 2013.

DOLADO, I.; SWAT, A.; AJENJO, N.; VITA, G de.; CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. p38 MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. **Cancer Cell**, v.11, p.191-205, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Árvore do conhecimento**: espécies arbóreas brasileiras. Brasília/DF. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/ CONT000fu1i7dcc02wyiv807nyi6ssr5gflc.html >acesso em: 16 dez, 2013.

FIGUEIRÔA, E. D. O.; CLÁUDIO, L.; MOUTINHO, C.; MELO, L. D, KELLE, J.; LEMOINE, D. A.; TEREZA, M. Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory and Cytotoxic Action of Fractions from Eugenia uniflora L . and Eugenia malaccensis L .: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; MORAIS-SABOIA, S. M.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. de. Caracterização farmacognóstica das folhas de Eugenia Uniflora L (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 1–11, 2008.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **The British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587–605, 2002.

GAFRIKOVA, M.; GALOVA, E.; SEVCOVICOVA, A.; IMREOVA, P.; MUCAJI, P.; MIADOKOVA, E. Extract from *Armoracia rusticana* and Its Flavonoid Components Protect Human Lymphocytes against Oxidative Damage Induced by Hydrogen Peroxide. **Molecules**, v. 2, n. 19, p. 3160–3172, 2014.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society**, v. 58, n. 9, p. 537–52, 2009.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 374–379, 2009.

GOETTERT, M.; SCHATTEL, V.; KOCH, P.; MERFORT, I.; LAUFER, S. Biological Evaluation and Structural Determinants of p38-alpha Mitogen-Activated-protein Kinase and c-Jun-N-Terminal Kinase 3 Inhibition by Flavonoids. **ChemBioChem**, v. 11, p. 2579-2588, 2010.

GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. **Eur. J. Immunol.** n.37, s9- 17, 2007.

GRABACKA, M. M.; GAWIN, M.; PIERZCHALSKA, M. Phytochemical modulators of mitochondria: the search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 9, p. 913–42, 2014.

GRANATO, E. M.; GRANATO, M. M.; GERENUTTI, M.; SILVA, M. G.; FERRAZ, H. O.; MARIA, M.; CARVALHO, D. Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 130–135, 2013.

GUO, X.; NANNAN M.A.; JIN, W.; SONG, J.; XINXIN, B.; YUE, C.; KAI, S.; HAIYAN, X.; GUOCHENG, J.; BAIHE, Z.; MENGCHAO, W.; LIXIN, W. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. **BMC Cancer**, v. 8, p. 375- 381, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, [S.l.], v. 27, p. 1-93, 2006.

- HAMID, R.; ROTCHTEIN, Y.; RABADI, L.; PARICK, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, n.18, p. 703-710, 2004.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 2011.
- HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p. 481-504, 2000.
- HOLLY, J.M.P.; ZENG, L.; PERKS, C.M. Epithelial cancers in the post-genomic era: should we reconsider our lifestyle? **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 3, p. 673- 705, 2013.
- HE, F., WANG, M., GAO, M., ZHAO, M., BAI, Y., & ZHAO, C. Chemical composition and biological activities of *Gerbera anandria*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 4, p. 4046–57, 2014.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa de Câncer para 2014**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro/RJ. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> e <www.slideshare.net/MinSaude/estimativa-cancer2014> Acessos em: 16/12/2013.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC/ WHO. Most types of cancer not due to “bad luck” IARC responds to scientific article claiming that environmental and lifestyle factors account for less than one third of cancers. **Press Release** n.231, disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr231_E.pdf> Acessado em 19/01/2015.
- ITHARAY, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **J. of Ethnopharmac.**, v. 90, p. 33-38, 2004.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, p. 69–90, 2011.
- JAGANATHAN, S. K.; VELLAYAPPAN, M. V.; NARASIMHAN, G.; SUPRIYANTO, E. Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. **World Journal of Gastroenterology:WJG**, v. 20, n. 16, p. 4618–25, 2014.
- JIN-JIAN, LU.; JIAO-LIN, B.; XIU-PING, C.; MIN, H.; YI-TAO WANG, Y. “Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents,” Evidence-

Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, Article ID 485042, 12 pages, 2012.

KARIN, M.; CAO, Y.; GRETEN, F. R.; ZHI-WEI, L. NF- κ B In Cancer: From Innocent Bystander to Major Culprit. **NatureRev.**, v.2, 2002.

KARLSEN, A.; RETTERSTOL, L.; LAKE, P. ; PAUR, I.; KJOLSRUD-BOHN, S.; SANDVIK, L.; BLOMHOFF, R. Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor- κ B Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults 1 – 3. **The Journal of Nutrition**, v. 137,n. 8, p. 1951–1954, 2007.

KATIYAR, C. etal. “DRUG DISCOVERY FROM PLANT SOURCES: AN INTEGRATED APPROACH.” **AYU** , v. 33, n.1, 2012.

KIM, K.J.; YOON, K.Y.; LEE, B.Y. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. **Fitoterapia**, v. 83. n. 8, p. 1628–1635, 2012.

KARIN, M. NF- κ B As a Critical Link Between Inflammation and Cancer.**Cold SpringHarbPerspectBiol**, 2009.

KOSTENKO, S.; LAEGREID, K.J.; MOENS, U. Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase.**World J BiolChem**, n.2, p.73-89, 2011.

KOUL, H.K.; PAL, M.; KOUL, S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction In Solid Tumors.**Genes and Cancer**, v.4, n.9-10, 2013.

KULDO, J. M.; WESTRA, J.; ÁSGEIRSDÓTTIR, S.A.; KOK, R. J.; OSTERHUIS, K.; ROTS, M.G.; SCHOUTEN, J.P.; LIMBURG, P.C; MOLEMA, G. Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 289, n.5, 2005.

LANDIS-PIWOWAR, K.; MILACIC, V.; DOU, Q.P. Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. **J Cell Biochem**, v. 105, n.2, p. 514-523, 2008.

LANGLEY, P.; PERGOLIZZI, J.V.; RIDGWAY, T.R.C. Antioxidant and Associated Capacities of CamuCamu (*Myrciaria dubia*): A Systematic Review.

The Journal of Alternative and Complementary Medicine, v. 21, n. 1, p. 8-14, 2014.

LATINA, A. Análise fitoquímica e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Psidium guajava* L. (Goiabeira), 76–78, 2013.

LEE, S. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- κ B pathways. **Journal of Inflammation**, v.16, p.1-9, 2011.

LEE, H. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. **British Journal of Pharmacology**, p. 11–20, 2011.

LEVY, A. S.; CARLEY, S. Cytotoxic Activity of Hexane Extracts of *Psidium Guajava* L (Myrtaceae) and *Cassia Alata* L (Caesalpineaceae) in Kasumi-1 and OV2008 Cancer Cell Lines. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 201–207, 2012.

LI, A.-N.; LI, S.; ZHANG, Y.-J.; XU, X.-R.; CHEN, Y.-M.; LI, H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020–6047, 2014.

LI, L.; DU, Y.; KONG, X.; LI, Z.; JIA, Z.; CUI, J.; XIE, K. Lamin B1 Is a Novel Therapeutic Target of Betulinic Acid in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.*, v. 19, n. 17, p. 4651–4661, 2013.

LI FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

LIGRESTI, A.; BISOGNO, T.; MATIAS, I.; PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; COSENZA, V.; DI MARZO, V. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. **Gastroenterology**, v. 125. n. 3, p. 677–687, 2003.

LIMBERGER, R. P.; SIMÕES-PIRES, C. A.; SOBRAL, M. ; MENUT, C.; BESSIERE, J.; HENRIQUES, A. T. Essential oils from *Calyptanthes concinna*, *C. lucida* and *C. rubella* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 355–360, 2002.

LIU, Y.; LING, Y.; HU, W.; XIE, L.; YU, L.; QIAN, X.; LIU, B. The herb medicine formula “chong lou fu fang” increases the cytotoxicity of chemotherapeutic agents and down-regulates the expression of chemotherapeutic agent resistance-related genes in human gastric cancer cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2011.

LOBO-ECHEVERRI, T.; RIVERO-CRUZ, J. F.; SU, B.; CHAI, H.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Constituents of the Leaves and Twigs of *Calyptanthes pallens* Collected from an Experimental Plot in Southern **Florida**, v. 22, p. 577–580, 2005.

LU, J.J.; BAO, J.L.; CHEN, X.P.; HUANG, M.; WANG, Y.T. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** : eCAM, 2012.

LU, J.J.; BAO, J.L.; WU, G.S.; XU, W.S.; HUANG, M.Q.; CHEN, X.P.; WANG, Y.T. Quinones Derived from Plant Secondary Metabolites as Anti-cancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 456–463, 2013.

MACIEL, M.A.; PINTO, J.C.; VEIGA, V.F. jr. Plantas Medicinais: A necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, 2002.

MALDANER, C. L.; COELHO, M. S. Triagem Fitoquímica E Avaliação Das Atividades Antimicrobiana E Citotóxica De Plantas Medicinais Nativas Da Região Oeste Do Estado Do Paraná. **Arq.Ciênc.Saúde UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 3–13, 2011.

MAEDA, H.; YAMAZAKI, M.; KATAGATA, H. Kuromoji (*Lindera umbellata*) Essential Oil Inhibits LPS-Induced Inflammation in RAW 264.7 Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 77, n. 3, p. 482–486, 2013

MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; YAN, L.; MA, C.; LIU, C.; HUANG, L. Antitumor and antimetastatic activities of Rhizoma Paridis saponins. **Steroids**, v. 74, n. 13-14, p. 1051–1056, 2009.

MARQUES, M. B. Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, Rio de Janeiro , v. 7, n. 1, Junho 2000 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702000000200001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 06 Janeiro de 2014. 2014.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.dos; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res.**, v.15, p. 127-130, 2001.

MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; NTALANI, H.; VERIN, P.; HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. Two chromene derivatives from *Calyptanthes tricona*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 975–979, 2000.

MI, Q.; CUI, B.; SILVA, G. L.; LANTVIT, D.; LIM, E.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M. Pervilleine A , a Novel Tropane Alkaloid that Reverses the Multidrug-resistance Phenotype. **Cancer Research**, v. 61, p. 4030–4037, 2001.

MONTEIRO, J. M.; PAULINO, U.; ALBUQUERQUE, D.; LIMA, E. Taninos: Uma abordagem da química à Ecologia. **Quimica Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MONTEIRO, L. D. S.; BASTOS, K. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; FÁTIMA, M.; DINIZ, F. M.; SOBRAL, M. V. Medicinal Plants and Other Living Organisms with Antitumor Potential against Lung Cancer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

MORI, H.; ARAI, T.; HIROTA, K.; ISCHII, H.; ENDO, N.; KEISUKE, M.; FUKUDA, K. Effects of 6-formylpterin, a xanthine oxidase inhibitor and a superoxide scavenger, on production of nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. **BiochimBiophysActa**, v. 1474, n. 1, p.93-9, 2000.

MULLER, N. T. G.; FASOLO, D.; BERTÊ, R.; ELY, C. V.; HOLZ, D. T. Análise fitoquímica das folhas de myrtaceae: Psidium cattleianum SABINE E Campomanesia guazumaefolia (camb.) Berg. Vivências: **Revista Eletrônica Da Extensão Da URI**, v. 8, n. 14, p. 65–71, 2012.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of Eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, v. 17, n. 13, p.1061–1066, 2010.

MUSA, M. A.; COOPERWOOD, J. S.; KHAN, M. O. F. A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer. **Curr Med Chem.**, v. 15, n. 26, p. 2664–2679, 2008.

MUSA, M. A.; KHAN, M. O. F.; COOPERWOOD, J. S. Synthesis and antiproliferative activity of coumarin-estrogen conjugates against breast cancer cell lines. **Lett Drug Des Discov.**, v. 6, n. 2, p. 133–138, 2009.

NANTITANON, W.; YOTSAWIMONWAT, S.; OKONOGLI, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. **LWT. Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 1095–1103, 2010.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p.205–208, 1997.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 311-355, 2012.

NIRMALA, M.J.; SAMUNDEESWARI, A.; SANKAR, P.D. Natural Plant Resources in anti-cancer therapy – a review. **Research in Plant Biology**, v. 6, n. 1, p. 836-842, 2011.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005**. Ginebra: OMS, 2002.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, p.487-498, 2012.

PANNO, M. L.; GIORDANO, F. Effects of psoralens as anti-tumoral agents in breast cancer cells. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 348–58, 2014.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M.K.; VON-POSER, G.L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140–149, 2009.

PIWOWARSKI, J.P.; KISS A. K. Contribution of C-glucosidic ellagitannins to *Lythrum salicaria* L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. **J Nat Med**, v.69, p.100–110, 2015.

PORTA, C.; LARGI, P.; RIMOLDO, P.; TOTARO, M.G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, v.214, p. 761-777, 2009.

PORTAL DO BRASIL. **SUS tem fitoterápicos para doenças simples**. 2012. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>> Acesso em 27 de dezembro de 2013.

PRADO, L. C. S.; SILVA, D. B.; OLIVEIRA-SILVA, G. L.; RENATA, K. N. H.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. The Gastroprotective Effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) Leaf Extract : The Possible Role of Condensed Tannins. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 37, n. 5, p. 722–730, 2014.

RAMER, R.; HINZ, B. Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 1, p. 59–69, 2008.

RASUL, A.; KHAN, M.; YU, B., MA, T.; YANG, H. Xanthoxyletin , a Coumarin Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Human Gastric Adenocarcinoma SGC-

7901 Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 1219–1223, 2011.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603–613, 2011.

RENISUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009**. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS/pdf> Acesso em 27 de novembro de 2013.

RISS, J. Cancers as wounds that do not heal: differences and similarities between renal regeneration/repair and renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 66, n. 7216, p. 1916- 1930, 2006.

RISS, T.L. Assay Guidance Manual. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> Acessado em: 02 jan. 2015

RYU, N. H.; PARK, K.-R.; KIM, S.-M.; YUN, H.M.; NAM, D.; LEE, S.G.; AHN, K. S. A hexane fraction of guava Leaves (*Psidium guajava* L.) induces anticancer activity by suppressing AKT/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 3, p. 231–41, 2012.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p.317–320, 2003.

RUFATTO, L.C; FINIMUNDY, M.; ELY, R.; MOURA, S. Mikania laevigata: chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 20, n. 10, p. 883- 889, 2013.

RUSSO, E. B; TAMING, T.H.C. Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344–64, 2011.

SAEDI, T. A.; NOOR, S.; ISMAIL, P.; OTHMAN, F. The Effects of Herbs and Fruits on Leukaemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 1–8, 2014.

SAFARZADEH, E.; SANDOGHCHIAN, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 421–7, 2014.

SALMELA-STJERNBERG, S.; RANKI, A.; KARENKO, L.; SIITONEN, S.; MUSTONEN, H.; PUOLAKKAINEN, P.; SARNA, S.; PETTERSON, T.; REPO,

H. Low TNF-induced NF- κ B and p38 phosphorylation levels in leucocytes in tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. **Reumatology**, v.49, p. 382-390, 2010.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. **Taninos. Livro: Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Capítulo 24. 6a Edição. UFRGS Editora. 1999. 615 p.

SEKHAR, N. C.; JAYASREE, T.; UBEDULLA, S.; DIXIT, R.; MANOHAR,V.S.; SHANKAR, J. Evaluation of antinociceptive activity of aqueous extract of bark of psidium guajava in albino rats and albino mice. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 8, n. 9, 2014.

SERRA, D.; RUFINO, A.T.; MENDES, A.F.; ALMEIDA, L.M.; DINIS, T.C.P. Resveratrol Modulates Cytokine-Induced JAK / STAT Activation More Efficiently than 5-Aminosalicylic Acid : An In Vitro Approach. **Plos one**, v. 9, n. 10, 2014.

SHAD, A. A.; AHMAD, S.; ULLAH, R.; ABDEL-SALAM, N. M.; FOUAD, H.; UR REHMAN, N.; SAEED, W. Phytochemical and biological activities of four wild medicinal plants. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, 2014.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. **Cancer Letters**, v.268, p. 204-215, 2008.

SILVA S.R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M.V. M. Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos Gerais Sobre Legislação e Comércio. **TRAFFIC**, America do Sul, 2001.

SILVA, M.I.G.; GONDIN, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUZA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira deFarmacognosia**, v.16, n.4, 2006.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS Editora/ Editora da UFSC. p. 230-239, 2004.

SILVA, M.; LUZ, A. I.R.; ZOGHBI, M.G.B.; RAMOS, L.S.; MAIA, J. G.S. Essential oil variation in calyptanthesspruceana. **Phytochemistry**, vol. 23, n.11, p 2515-2516, 1984.

SILVA, P.D. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos flavonóides isolados de *Myrciahiemalis*(Myrtaceae)**,

93 f. Dissertação (mestrado) - Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, 2004.

SIQUEIRA, D.; CHAVES, D. A.; COSTA, S.; ALMEIDA, A. P. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 172–180, 2010.

STEWART, P.; BOONSIRI, P.; PUTHONG, S.; ROJPIBULSTIT, P. Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 60, 2013.

SU, J.; ZHAO, P.; KONG, L.; LI, X.; YAN, J.; ZENG, Y.; LI, Y.; Trichothecin Induces Cell Death in NF- κ B Constitutively Activated human Cancer Cells via Inhibition of IKK β Phosphorylation. **Plos one**, v.8, n.8, 2013.

SZLOSAREK, P.; CHARLES, K. A; BALKWILL, F. R. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 745–50, 2006.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 381–388, 2007.

TALIB, W. H. Anticancer and Antimicrobial Potential of Plant-Derived Natural Products. Phytochemicals . **Bioactives and Impact on Health**, p. 141–158, 2011.

TAN, W.; LU, J.; HUANG, M.; LI, Y.; CHEN, M.; WU, G.; WANG, Y. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. **Chinese Medicine**, v. 6 n. 1, p. 27- 36. 2011.

TARABICHI, M.; ANTONIOU, A.; SAISELET, M.; PITA, J.M.; ANDRY, G.; DUMONT, J.E.; DETOURS, V.; MAENHAUT, C. Systems biology of cancer: entropy, disorder, and selection- driven evolution to independence, invasion and “swarm intelligence”. **Cancer Metastasis Ver**, v. 32, p. 403- 421, 2013.

THOMAS, N.; ZACHARIAH, S. M. PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF CHROMENE DERIVATIVES: AN OVERVIEW. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, p. 2–6, 2013.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science**, v.347, n.6217, 2015.

TORO G.; A. L.R.; LÓPEZ, F.V.; TAÍPE, G.M. Evaluación de la actividad antioxidante del pisco peruano mediante voltametría cíclica. **Rev Soc Quím Perú**. v. 77 n. 2, 2011.

TRÖGER, W.; GALUN, D.; SCHUMANN, A.; STANKOVIĆ, N.; MILICIVIĆ, M. Viscum album [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a randomised clinical trial on overall survival. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 18, p. 3788–97, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (URGS). **Flora digital do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=3391> acesso em: 16/12/2013.

VAN HORSSSEN, R.; TEN HAGEN, T. L. M.; EGGERMONT, A. M. M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The Oncologist**, v. 11, n. 4, p. 397–408, 2006.

VIANA, F. C.; SANTANA, A. C. M.; MOURA, R. M. X. Identificação fitoquímica de flavonóides e taninos em folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) utilizadas tradicionalmente na região Sul da Bahia. **InterPHacis - Informação Farmacêutica**, v. 1, p. 28–37, 2012.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: Uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n.1 2000.

VIRCHOW, R. L.K. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. Philadelphia: J. B. Lippincott, 2ed. 1863. This book has an editable web page on Open Library.

VITALE, R.F.; RIBEIRO, F.A.Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Rev. Bras Otorrinolaringologia**, v.1, n. 73, p.123 – 127, 2007.

VITORINO, R.; FERNANDES, O.; LIMA, L.R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C.; PARENTE, D.M.; CAVALCANTE, A. A. M. C., CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade anti-edematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (*Imburana-de-cheiro*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 415–422, 2013.

VOGEL, N.W.; TASCHETTO, A.P.D.; DALL'AGNOL, R.; WEIDLICH, L.; ETHUR, E.M. Assessment of the antimicrobial effect of three plants used for therapy of community-acquired urinary tract infection in Rio Grande do Sul (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, p.1334–1336, 2011.

WAGNER, E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p. 537-549, 2009.

WANG, L.; HO, J.; GLACKIN, C.; MARTINS-GREEN, M. Specific Pomegranate Juice Components as Potential Inhibitors of Prostate Cancer Metastasis. **Translational Oncology**, v. 5, n. 5, p. 344–345, 2014.

WANG, L.; MARTINS-GREEN, M. Pomegranate and its components as alternative treatment for prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 14949–66, 2014.

WANG, W.; TYAN, Y.; CHEN, Z.; LIN, C.; YANG, M.; YUAN, S.; TSAI, W. Evaluation of the Antioxidant Activity and Antiproliferative Effect of the Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seed Extracts in Oral Carcinoma Cells. **BioMed Research International**, v. 7, p. 1–7, 2014.

WANG, Y.-H.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; YANG, J.; NIU, H.-M.; LONG, C.-L.; LEE, K.-H. Anticancer principles from medicinal piper (hú jiāo) plants. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 8–16, 2014.

WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems, 2004. Disponível em:
<<http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s7148e/s7148e.pdf> > acessado em: 11 de dezembro de 2013

YONG, H.Y.; KOH, M.S.; MOON, A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 18, n. 12, p. 1893- 1905, 2009.

XU, T.; PANG, Q.; ZHOU, D.; ZHANG, A.; LUO, S.; WANG, Y.; YAN, X. Proteomic investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. **PloS One**, v.9, n. 8, 2014.

ZAKI, M. A.; BALACHANDRAN, P.; KHAN, S.; WANG, M.; MOHAMMED, R.; HETTA, M. H.; MUHAMMAD, I. Cytotoxicity and Modulation of Cancer-Related Signaling by (Z)- and (E) - 3,4,3',5' -Tetramethoxystilbene Isolated from *Eugenia rigida*, v. 12, p. 1–6, 2006.

ZHANG, W.; ZHANG, D.; MA, X.; LIU, Z.; LI, F.; WU, D Paris saponin VII suppressed the growth of human cervical cancer Hela cells. **European Journal of Medical Research**, v. 19, n. 1, p. 41- 56, 2014.

ZHU, Z.; ZHONG, S.; SHEN, Z. Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer. **Cancer Biology&Therapy**, v. 12, n.2, p. 95- 105, 2011.