

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP
Instituto de Biociências (IB)
Campus de Botucatu**

**“Avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos de
Croton urucurana Baillon”**

LARISSA SHIOZAWA

**Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
Divisão de Farmacologia e Toxicologia – CPQBA - Unicamp**

**Botucatu – SP
-2011-**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Shiozawa, Larissa.

Avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos de *Croton urucurana*
Baillon / Larissa Shiozawa. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Ernesto de Carvalho

Capes: 40302008

1. Croton (Botânica). 2. Câncer. 2. Farmacognosia.

Palavras-chave: Atividade antiproliferativa; Câncer; *Croton urucurana* Baillon.

RESUMO

O termo câncer refere-se a um conjunto de doenças que atingem e matam milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença é caracterizada pela proliferação descontrolada de células que não respondem mais aos estímulos externos e internos que controlam a proliferação, diferenciação e morte celular. O aumento da expectativa de vida da população é um dos fatores que contribuem para a crescente incidência de câncer no mundo já que o desenvolvimento desta doença está relacionado com o envelhecimento do organismo. O câncer é a segunda maior causa de morte na população mundial e diante de tal índice, fica clara a necessidade de desenvolvimento de novos quimioterápicos. Cerca de 60% das drogas anticâncer são derivadas de produtos naturais, demonstrando assim o grande potencial destes produtos no desenvolvimento de novas drogas anticâncer. Este projeto teve como objetivo avaliar a atividade anticâncer dos extratos brutos e frações obtidas da espécie vegetal *Croton urucurana* Bailon. Os extratos brutos diclorometânico (EBD) e etanólico (EBE) foram avaliados em ensaio de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tumorais humanas. Os dois extratos apresentaram atividade *in vitro*, porém somente o EBD foi submetido ao processo cromatográfico de fracionamento, sendo as frações obtidas deste processo submetidas ao teste antiproliferativo *in vitro*. O EBD também foi utilizado para avaliar sua atividade em modelo de tumor sólido de Ehrlich. Neste teste, esse extrato apresentou inibição do crescimento tumoral apenas com a menor dose. Como o EBE também apresentou atividade antiproliferativa *in vitro*, é importante dar continuidade aos estudos com este extrato, com o objetivo de avaliar sua atividade em modelos experimentais *in vivo*.

INTRODUÇÃO

Há mais de cinco milênios, a humanidade faz uso de plantas com fins terapêuticos para o tratamento de inúmeras doenças. Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores, sendo que 1% são utilizadas como fonte de alimento e cerca de 10-15% são usadas com finalidades medicinais (Phillipson, 1994; Wang et al, 2007). O interesse em se estudar o potencial das plantas como fonte de novas drogas é grande e oferece um amplo campo para estudos científicos. As plantas têm sido uma das maiores fontes de novos compostos com atividade farmacológica e têm servido como base para diversas drogas sintéticas (Balunas & Kinghorn, 2005), demonstrando assim a importância da diversidade vegetal para a obtenção de novas moléculas. Os produtos naturais têm sido utilizados para o tratamento de diversas doenças e desenvolvimento de novos fármacos em fase clínica, especialmente nas áreas de oncologia e terapêutica anti-hipertensiva, e têm despertado interesse em se descobrir os mecanismos farmacológicos envolvidos na atividade desses produtos (Schmidt *et al*, 2008; Rishton, 2008; Butler, 2008). Somente uma pequena fração destas plantas tem sido explorada nas pesquisas médicas para verificar suas atividades terapêuticas (Jachak & Saklani, 2007).

Cerca de 63% do total de fármacos anticâncer utilizados são originados de fontes naturais ou compostos sintéticos ou semi-sintéticos baseados em produtos naturais (Newman e Cragg, 2009).

É importante ressaltar a relevância do incentivo à expansão da investigação da natureza como fonte de novos compostos ativos que possivelmente servirão de base para a elaboração de drogas para as enfermidades humanas. Reitera-se o constante desafio de desenvolvimento de terapias que sejam duplamente efetivas e com alta especificidade para as células cancerosas ou tecido tumoral (Newman & Cragg, 2007). Os possíveis compostos e princípios ativos devem, idealmente, ser seletivos para as

células cancerosas, não atuando sobre as células normais, não causar toxicidade, ter efeitos colaterais mínimos ou inexistentes e não interferir em eventuais outras terapias utilizadas no tratamento (Dinaway *et al*, 2004)

O câncer é a segunda causa de morte mais comum no mundo, perdendo somente para as doenças cardiovasculares (Reddy *et al*, 2003). A doença é caracterizada por uma série de alterações que podem originar mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diversas localizações (Brasil, 2010). Inicia-se, na grande maioria, por alterações genéticas, sendo as mutações somáticas a base para a geração de um câncer (Alberts *et al*, 2004). Uma das características mais fundamentais das células cancerosas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação crônica. Os tecidos normais controlam a produção e a liberação de sinais promotores de crescimento que levam ao crescimento das células e progressão do ciclo celular, garantindo assim a homeostasia da quantidade das células e manutenção das funções e arquitetura dos tecidos normais. As células cancerosas desregulam estes sinais e conseguem controlar os sinais de proliferação celular (Hanahan & Weinberg, 2011), além disso, tendem evitar os processos de apoptose e diferenciação, são geralmente instáveis, deficientes no reparo de danos no DNA e na correção de erros de replicação, tendendo a acumular mutações. São invasivas, sobrevivendo e proliferando em novos ambientes, produzindo metástases e angiogênese auto-sustentada. (Alberts *et al*, 2004; Brown & Attardi, 2005; Fadeel & Orrenius, 2005). Outras características do câncer são: desequilíbrio da energética celular, promoção da inflamação tumoral, e evitam a destruição pelo sistema imunológico (Hanahan & Weinberg, 2011).

Cerca de 80-90% dos casos de câncer estão associados a fatores ambientais tais como o tabagismo, exposição excessiva ao sol e alguns tipos de vírus. Além disso, o

envelhecimento acarreta mudanças nas células que aumentam a susceptibilidade à alterações malignas (Brasil, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, o que reforça a magnitude do problema do câncer no país. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (Brasil, 2011).

A pesquisa por novos agentes de origem vegetal tem obtido sucesso, acompanhada de um significativo aumento nos investimentos nessa área. Nos últimos cinqüenta anos a pesquisa de novas drogas anticâncer introduziu na terapêutica cerca de 200 drogas (Kamb *et al*, 2007), com aproximadamente 70 com amplo uso clínico. Alguns exemplos de fármacos anticâncer derivados de plantas obtidos através de triagens clínicas na oncologia nos últimos anos são: vinblastina, vincristina, vinorelbina, etoposida, teniposida, paclitaxel, docetaxel, topotecan, irinotecan, flavopiridol, rohutikine, combretastatin e homoharringtonine (Lee, 1999; Cragg & Newman, 2009).

Para as pesquisas de novas drogas anticâncer, o aprimoramento da metodologia de cultura de células permitiu o cultivo e manutenção de diversas linhagens celulares oriundas de diversos tumores humanos, possibilitando o desenvolvimento de metodologia para a triagem *in vitro*. O *National Cancer Institute* (NCI, Estados Unidos) mantém, com o objetivo de buscar novos compostos que reduzam a proliferação de células tumorais humanas, um painel de células cancerígenas com inúmeras linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário e cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Essa metodologia de

ensaio antiproliferativo *in vitro* permite a avaliação de extratos e princípios ativos em diversas células neoplásicas e não neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Conta ainda com a maior rapidez e eficiência do método, que avalia um número grande de drogas em um curto período de tempo (Rubinstein *et al*, 1990). Além disso, as metodologias utilizadas nestes testes *in vitro* são amplamente estabelecidas, utilizam pequenas quantidades de amostras em cada teste, com custos relativamente baixos, por possibilitarem um elevado número de repetições, além da fácil interpretação dos resultados (Hartung & Daston, 2009).

Células em cultura, entretanto, encontram-se em condições artificiais, não fisiológicas (como por exemplo, não são reproduzidas a temperatura dos animais e a concentração dos eletrólitos sanguíneos das espécies). Além disso, as densidades celulares em culturas são menos que 1% quando comparadas com as densidades do tecido dos animais (Hartung & Daston, 2009). Geralmente, as células em cultura se proliferam de forma bem mais rápida do que o fariam *in situ*, de modo que uma das preocupações deste tipo de ensaio se refere à correlação entre os resultados de ensaios proliferativos com aqueles provenientes de testes *in vivo* e também na habilidade de prever a atividade das drogas em pacientes (Fernando *et al*, 2006). A etapa fundamental no desenvolvimento de uma droga anticâncer é a comprovação de sua atividade em modelos experimentais *in vivo*, e desta forma, associada ao trabalho desenvolvido *in vitro*, é possível prosseguir com eventuais estudos clínicos.

Diante desta perspectiva, foi utilizado neste projeto, o modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, uma neoplasia de camundongos, transplantável, originário de um adenocarcinoma de mama (Ehrlich, 1906). Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica, desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal, com grande acúmulo de fluido no abdome (ascite). O tumor de Ehrlich na

forma sólida, por sua vez, apresenta-se como uma massa palpável e de consistência firme. O modelo de tumor de Ehrlich na forma sólida permite uma análise da atividade anticâncer sistêmica da amostra, o que geralmente não acontece na forma ascítica deste modelo já que a administração da substância teste ocorre quase sempre por via intraperitoneal e as células tumorais encontram-se nesta cavidade (Nascimento *et al*, 2006). Com isso, a triagem de possíveis novas drogas anticâncer torna-se mais eficaz devido à presença de um “sistema de modelos”, que é composto por diferentes modelos tumorais experimentais, com a finalidade de selecionar o maior número possível de drogas com ação anti-neoplásica (Suggitt *et al*, 2005).

Uma das vantagens na utilização do modelo tumoral de Ehrlich é a possibilidade da padronização do número de células a serem inoculadas nos animais, tanto para o crescimento na forma ascítica como sólida, pois as células presentes no fluido ascítico podem ser facilmente quantificadas (Matsuzaki, 2004). Apesar das vantagens e conveniências de estudos *in vitro*, e da relevância dos estudos *in vivo*, ambos não revelam diretamente os possíveis mecanismos de ação de compostos ativos (Harvey & Cree, 2010). Desse modo, faz-se necessário o uso de técnicas adicionais pra prever ou confirmar o alvo de ação das moléculas de interesse.

A partir do conhecimento popular sobre os efeitos terapêuticos de uma planta, é necessário que haja comprovação científica de seus efeitos. Assim, partindo-se da planta *in natura*, busca-se a identificação e isolamento dos princípios ativos existentes na planta, ou seja, os compostos que de fato atribuem à planta os efeitos terapêuticos. É a partir dessa etapa que se destaca a fitoquímica, área intermediária entre química orgânica e bioquímica de plantas, que tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença (Simões *et al*, 2004).

Atualmente, a divisão de Farmacologia e Toxicologia, do CPQBA/Unicamp, coordena um projeto que avalia a atividade anticâncer de diversos extratos e frações obtidos de vegetais. Dentre as espécies incluídas nessa triagem inicial, encontram-se duas espécies do gênero *Croton*, *C. campestris* St. Hill. e *C. urucurana* Baillon, das quais *C. campestris* St. Hill. foi escolhida como objeto de estudo de uma dissertação de mestrado, enquanto *C. urucurana* Baillon foi a espécie estudada no presente projeto.

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae, e abrange cerca de 1300 espécies de ervas, arbustos e árvores distribuídas entre as Américas e a Ásia. Os extratos obtidos de várias espécies do gênero *Croton*, como *C. urucurana* Baillon, *C. draconoides* Müll. Arg. e *C. lechleri* Müll. Arg., são utilizados como remédios por muitos povos indígenas, devido aos seus poderes de cura de diversos males (Simionatto *et al.*, 2007). Quando os troncos da *Croton urucurana* Baillon e de outras espécies do gênero *Croton* são cortados verticalmente, com cortes em forma de “v” (corte “espinha de peixe”), há a liberação de um látex de cor avermelhada e por isso são conhecidos popularmente como “Sangra d’água” ou “Sangre de Grado”. O látex em geral, apresenta baixa toxicidade e sua composição química varia de acordo com as espécies e a localização geográfica (Jones, 2003). O látex da espécie *Croton urucurana* Baillon é utilizado como cicatrizante (Peres *et al.*, 1998), apresenta atividade antifúngica (Gurgel *et al.*, 2005) assim como os extratos metanólicos do tronco e das folhas também possui efeito antibacteriano (Peres *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2008); além destas atividades, alguns efeitos também já foram comprovados tais como antiproliferativo (Sandoval *et al.*, 2002), imunomodulador e antiinflamatório (Risco *et al.*, 2003).

A espécie *Croton urucurana* Baillon (Figura 1) é uma árvore comumente encontrada no Paraguai, no norte da Argentina, sul do Brasil e Uruguai. A espécie possui um amplo uso popular para o tratamento de cicatrização de úlceras e feridas,

tratamento de reumatismo, dor, diarreia e câncer (Hartwell, 1969; Bettolo and Scarpati, 1979; Hartwell, 1982; Itokawa *et al*, 1991; Chen *et al*, 1994; Ubillas *et al*, 1994; Peres *et al*, 1998). Investigações experimentais demonstraram propriedades antivirais, antidiarréicos, antibacterianos, antifúngicos, antioxidante e antinociceptivo do látex da espécie *C. urucurana* Baillon (Peres *et al*, 1998; Gurgel *et al*, 2001; Orlandi-Mattos *et al*, 2002; Dalbo *et al*, 2005; Gurgel *et al*, 2005; Salatino *et al*, 2007).

No estado de Mato Grosso, esta espécie é muito utilizada para o tratamento de problemas do trato genital, tanto feminino (desordens, feridas, inflamação e cistos) quanto masculino (próstata). Além destes usos, a espécie também é utilizada para o tratamento de gastrite, úlcera estomacais, hemorróidas e dores nas pernas (Rieder *et al*, 2011).



Figura 1: *Croton urucurana* Baillon. A) Detalhe das folhas e da inflorescência. B) Espécie na CPMA.

Estudos fitoquímicos revelam que os principais constituintes químicos presentes nos extratos metanólicos do tronco da espécie são campesterol, beta-sitosterol (e seus glicosídeos), estigmasterol, ácido acetil-areulítico, proantocianidinas, catequinas e galocatequinas (Peres *et al*, 1997, 1998).

Uma vez que a espécie *Croton urucurana* apresenta diversos usos tradicionais e atividades biológicas importantes reportados para o látex e extratos das cascas do caule, aliado à ausência de estudos da atividade anticâncer dos extratos obtidos a partir das folhas, este projeto teve como finalidade avaliar o potencial antiproliferativo das folhas desta espécie vegetal, em cultura de células tumorais (*in vitro*) e também em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* dos extratos brutos e frações obtidos a partir de folhas de *Croton urucurana*.

Objetivos Específicos

- Coleta do material vegetal (folhas de *C. urucurana*) no Campo de cultivo experimental do CPQBA;
- Obtenção de extratos brutos da espécie *C. urucurana*;
- Avaliação de atividade antiproliferativa dos extratos brutos em cultura de células tumorais;
- Fracionamento do extrato que apresentar melhor atividade anticâncer *in vitro*;
- Avaliação de atividade antiproliferativa das frações em cultura de células tumorais humanas;

- Avaliação da atividade anticâncer do extrato bruto com atividade antiproliferativa *in vitro* mais promissora no modelo *in vivo* de tumor sólido de Ehrlich.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Metodologia Fitoquímica

1.1. Coleta do material vegetal

As folhas de *C. urucurana* foram coletadas no dia 28 de março de 2011, no campo de cultivo experimental do CPQBA, com o auxílio do biólogo Benício Pereira da Divisão de Agrotecnologia. A espécie vegetal está catalogada na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), do CPQBA/Unicamp, sob número CPMA 2243.

As folhas foram secas em estufa ventilada (40°C, por 48 horas) e posteriormente moídas em moinho de facas (MR – Manesco Raniere LTDA, tipo MM R-320).

1.2. Obtenção dos extratos brutos

A obtenção dos extratos brutos (extratos diclorometânico e etanólico) foi realizada na Divisão de Fitoquímica, do CPQBA, sob orientação da Dra. Mary Ann Foglio.

As folhas secas e moídas foram submetidas à extração por maceração dinâmica (método de extração físico a frio) com diclorometano (CH_2Cl_2) na proporção de 1:5 (p/v) de planta:solvente, durante uma hora e meia, por 3-6 vezes consecutivas (Figura 2). Os filtrados foram reunidos e evaporados sob vácuo, no equipamento Rotavapor (R 215 Büchi), Figura 3, a 37°C até a completa eliminação do diclorometano, obtendo-se dessa forma o extrato bruto diclorometânico (EBD).



Figura 2: Macerador dinâmico



Figura 3: Rotaevaporador

O resíduo vegetal deste processo foi retomado em etanol (EtOH) 95% (proporção 1:5 (p/v), planta: solvente) e extraído novamente por 3-6 vezes, de uma hora e meia cada período. O solvente orgânico (etanol) foi evaporado em Rotavapor para sua eliminação completa, e a seguir o resíduo foi liofilizado (BT. 8xL Virtis Sentry TM), fornecendo o extrato bruto etanólico (EBE). Estes procedimentos estão esquematizados na Figura 4.

Os rendimentos das extrações foram calculados [(massa de extrato obtida/massa de planta seca utilizada)x100] e alíquotas de 5-10mg de cada extrato bruto obtido foram separadas para o teste *in vitro*, em cultura de células tumorais humanas. O extrato que apresentou melhor atividade antiproliferativa nos testes *in vitro* foi submetido ao processo de fracionamento.

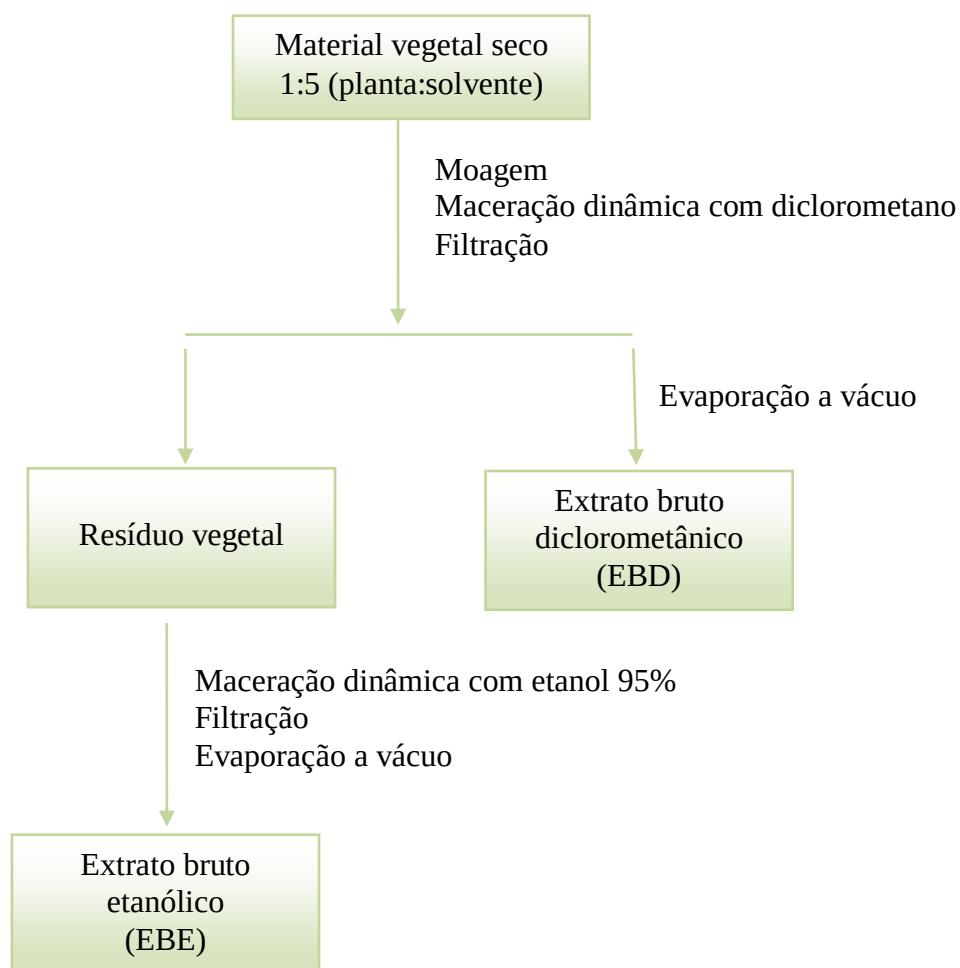


Figura 4: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos diclorometânicos e etanólicos de *C. urucurana*.

Foram realizadas no total, três extrações seguindo o procedimento descrito anteriormente, porém utilizando-se a cada extração quantidades (massas) diferentes da planta. Na tabela 1, estão representadas as massas e os volumes dos solventes utilizados.

Tabela 1: Massas e volumes utilizados em cada extração

	Massa da planta (g)	Volume (mL) solvente (CH ₂ Cl ₂ e EtOH)
Primeira extração	25	125
Segunda extração	20	100
Terceira extração	100	500

1.3. Fracionamento

O extrato bruto diclorometânico (EBD) foi fracionado por cromatografia em coluna filtrante utilizando sílicagel (Silica gel 60- 0,063-0,200mm; Merck KGaA) como fase estacionária, na proporção de 1:10 (p/p, extrato : sílica) empacotada em Funil de Buchner e foram utilizados 50 ml de cada fase móvel, iniciando-se a eluição com Hexano/Diclorometano na proporção 9:1, e aumentando-se gradualmente a polaridade pela adição de diclorometano até 100% e posteriormente de Metanol até 10%.

Através da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), foram verificadas o perfil das frações obtidas para comparar com o perfil do extrato bruto diclorometânico. Na CCD foi utilizada como fase móvel a mistura de Diclorometano/1%Metanol, como fase estacionária foi utilizada a placa de sílica e o revelador utilizado foi o Anisaldeído.

2. Ensaios Farmacológicos *in vitro*

2.1. Ensaio para a determinação da atividade anticâncer *in vitro* em cultura de células tumorais humanas

2.1.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas foram cedidas pelo NCI (National Cancer Institute) ao CPQBA/ Unicamp, para a triagem da atividade anticâncer (Tabela 2), seguindo o protocolo elaborado por essa instituição (Monks *et al* , 1991). Além das linhagens tumorais citadas na Tabela 2, outro tipo de linhagem é utilizada nos testes *in vitro* para verificar a atividade antiproliferativa da amostra: a HaCat representa os queratinócitos humanos que são linhagens de células normais. As células foram cultivadas em 5mL RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco®), a 37°C, em atmosfera úmida com 5% CO₂. Quando a monocamada celular atingiu cerca de 80% de confluência, as linhagens foram repicadas sob condições estéreis. Rotineiramente, dois frascos de cada linhagem celular foram sempre mantidos em cultura.

Tabela 2: Linhagens tumorais humanas utilizadas no teste *in vitro*

Tipo celular	Nome	DI (*10⁴ células/mL)
Leucemia	K562	4,0
Mama	MCF-7	6,0
Ovário resistente	NCI/ADR-RES	5,0
Pulmão	NCI-H460	4,0
Melanoma	UACC 62	5,0
Próstata	PC-3	5,0
Cólon	HT-29	4,0
Glioma	U251	5,0
Rim	786-0	4,5
Ovário	OVCAR-3	7,0

DI: densidade de inoculação das linhagens celulares

2.1.2. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas

No teste da atividade antiproliferativa, as células (linhagens tumorais) foram incubadas em placas de 96 compartimentos (100 µL/compartimento), em meio RPMI/SFB/PEN-STREP (meio RPMI acrescido de soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e streptomicina), nas respectivas densidades de inoculação (Tabela 2), determinadas pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA – Unicamp). Uma placa T₀, contendo as 10 linhagens, foi utilizada como controle da quantidade de células no momento da adição das amostras. Após esta etapa de plaqueamento celular, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e em ambiente úmido, para posterior adição das amostras a serem testadas.

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na proporção 1:10 (1mg amostra: 10 µL DMSO). Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/5%SFB/PEN-STREP, para evitar a toxicidade do DMSO. A placa controle T₀ foi fixada pela adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético 50% (TCA) para determinação da quantidade de proteínas, 24hs após o plaqueamento das células (ou seja, no momento da

adição das amostras). As amostras foram adicionadas (100 µL/compartimento) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ml, em diluição seriada e em triplicata. A seguir, as placas foram incubadas por um período de 48 h.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/ml, 100 µL/compartimento, e em triplicata. Ao final das 48h, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA 50%, e após 1h em geladeira, as placas foram lavadas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após a lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

As células foram então coradas com o corante protéico sulforrodamina B (SRB) (Sigma Chemical Co[®], St. Louis, MO, USA) a 0,4%, em solução 1% de ácido acético, e as placas foram mantidas por 20 min, à temp. ambiente, antes da lavagem com solução de ácido acético 1% (quatro vezes). Este corante se liga aos aminoácidos básicos das proteínas das células viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (Skehan *et al*, 1990). Após secagem, à temperatura ambiente, o corante (SRB) ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução Trizma base (10µM, pH 10,5), para realização da leitura. espectrofotométrica da absorbância em 540 nm, em leitor de microplacas (Molecular Devices[®], modelo Versa Max) (Figura 5) com programa Soft Max Pro 4.0.

A figura 6 representa de forma esquematizada o método empregado para os testes *in vitro* das amostras obtidas a partir das espécies vegetais.

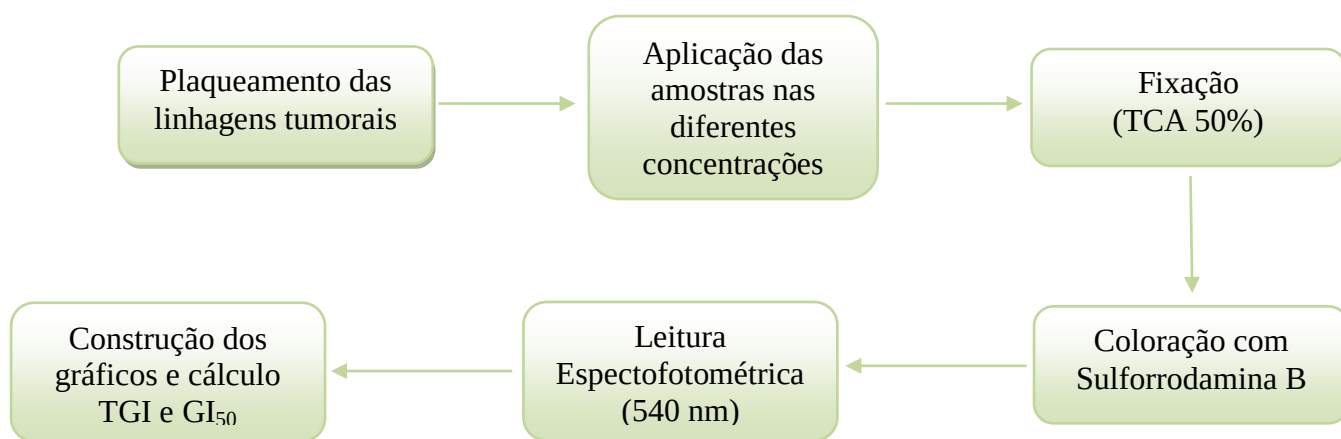


Figura 6: Fluxograma do método utilizado nos testes *in vitro* para avaliação da atividade anticâncer da espécie vegetal selecionada (*Croton urucurana*)



Figura 5: Leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo Versa Max)

3. Ensaios Farmacológicos *in vivo*: Atividade anticâncer em animais de laboratório

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos (fêmeas), da linhagem Swiss (3 meses, 30 gramas em média) para o ensaio de toxicidade dose única, e camundongos (machos), da linhagem Balb C (3 meses, 30 gramas em média) para o ensaio de tumor sólido de Ehrlich. Todos os animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB - Unicamp).

Os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas individuais, com ração e água fornecidos *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados

pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), da Unicamp, protocolos (nº 2393-1 e nº 2394-1).

3.2. Teste de Toxicidade Dose Única

Os camundongos (Swiss, n = 3 animais por grupo) foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes (30, 100 e 300 mg/kg) do extrato bruto diclorometano ou com solução de NaCl 0,9% acrescida de 1 gota de Tween 80, (veículo para diluição das amostras, 10mL/Kg). Após a administração, os animais foram observados continuamente por um período de 4h, para verificação de sinais de toxicidade (alteração da locomoção, piloereção, diarreia, produção exagerada de muco, alteração do tônus muscular, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais) e número de animais mortos. Ao final deste período, os animais foram mantidos em observação diária, durante 14 dias. O peso corporal dos animais foi avaliado imediatamente antes da administração das amostras (dia 1) e nos 7º e 14º de experimento.

3.3. Avaliação da Atividade Anticâncer em Modelo de Tumor Sólido de Ehrlich

Os animais (camundongos Balb C, machos, peso médio, n = 8 animais) foram pesados e o volume basal da pata traseira direita de cada um foi mensurado em aparelho pletismômetro (Ugo Basile, 7140 Plethysmometer) (Figura 7).



Figura 7: Pletismômetro

Fonte: Biogen

O tumor de Ehrlich foi mantido na forma ascítica, através de repiques semanais em camundongos doadores. Semanalmente, o fluído ascítico era retirado de animais portadores desse tumor e imediatamente inoculado na cavidade peritoneal de animais receptores, que posteriormente foram utilizados como animais doadores das células de Ehrlich para o modelo de tumor sólido (Figura x). As células de Ehrlich foram diluídas em tampão fosfato-salina (PBS, pH XX) e inoculadas subcutâneamente, no coxim plantar da pata direita traseira dos animais, na densidade de $2,5 \times 10^6$ células/60 μL /animal. O número de células tumorais para inoculação na forma sólida foi obtido através de contagem direta das células em Câmara de Neubauer obtidas a partir do líquido ascítico.

Após 24 horas da inoculação, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, sendo grupo controle negativo (sol. salina 0,9% - G5), o controle positivo (5-Fluoracil, 10mg/Kg – G3) e três grupos experimentais (20, 10 e 5mg/kg- G4, G2 e G1, respectivamente). Os tratamentos foram feitos a cada três dias (D3, D6, D9, D12 e D15), por via intraperitoneal, a partir do 3º dia após a inoculação das células (Figura X). A avaliação da variação do volume das patas traseiras direitas e do peso corporal dos

animais também foi mensurada a cada três dias (nos mesmos dias de tratamento). No 16º dia de teste (D16), os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos foram coletados (baço, rins, fígado e testículos), para pesagem e avaliação macroscópica de sinais de toxicidade. Também foram coletadas ambas as patas traseiras (com e sem tumor) para avaliação de peso. Dessa forma, foram avaliados três parâmetros:

- a) Variação do volume da pata direita traseira, tendo como controle o volume basal antes da indução do tumor;
- b) Peso relativo do tumor, descontando-se o peso da pata sadia e dividindo-se pelo peso corporal;
- c) Variação do peso corporal dos animais.

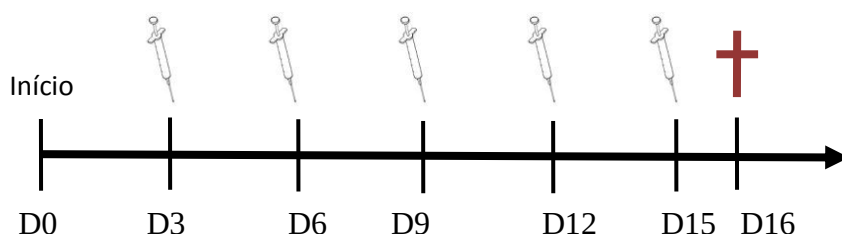


Figura 8: Esquema do modelo experimental *in vivo* utilizado no tumor sólido de Ehrlich

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Obtenção dos extratos

Foram coletados 2,4 kg de folhas frescas que foram secas por um período de 48 horas, em estufa ventilada (40°C). Após o processo de moagem, foram obtidas 463,3 gramas de folhas secas e moídas.

As massas de extrato obtidas após cada processo de extração, bem como seus rendimentos, calculado como $[(m_{\text{ext. obtida}} / m_{\text{planta fresca}}) \times 100]$, estão expostos nas Tabelas 3 (EBD) e 4 (EBE).

Tabela 3: Massas obtidas e rendimentos dos extratos brutos diclorometânicos de *C. urucurana*

EBD	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
1ª Extração	1,72	6,88
2ª Extração	1,59	7,95
3ª Extração	7,37	7,37

Tabela 4: Massas obtidas (após liofilização) e rendimentos dos extratos brutos etanólicos de *C. urucurana*

EBE	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
1ª Extração	3,02	12,8
2ª Extração	1,50	7,5
3ª Extração	8,83	8,83

Após a análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Figura 8a) dos extratos obtidos no primeiro processo de extração, observou-se que ambos os extratos apresentavam várias bandas em comum, o que sugeriu que apenas três repetições da extração com diclorometano não haviam sido suficientes para esgotar a extração dos componentes solúveis nesse solvente e conseqüentemente uma prévia separação dos constituintes químicos presentes nas folhas de *C. urucurana* Baillon. Foi a partir desta análise que se decidiu fazer as outras duas extrações aumentando-se o número de vezes em que se repetiu o processo de maceração de três para seis vezes, para que os compostos de polaridades diferentes fossem separados completamente.

Na segunda extração, utilizou-se uma massa pequena com a finalidade de verificar se essa alteração no procedimento de extração resultaria em melhor separação dos compostos de polaridades diferentes, o que foi evidenciado pela análise por CCD (Figura 8 – b/c). Desta forma, repetiu-se a extração, com maior número de etapas de maceração, de uma maior quantidade de material vegetal visando à obtenção de quantidade de extrato suficiente para realização de testes na cultura de células e os ensaios *in vivo* (teste de toxicidade aguda e ensaio de tumor sólido de Ehrlich).

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. É uma técnica de fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, grande repetitividade e baixo custo. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. O adsorvente que foi utilizado neste caso foi a sílica (SiO_2), que é um dos adsorventes mais utilizados em cromatografia por adsorção e é altamente poroso (Lopes, 2006).

Apesar do maior rendimento do EBE, sua obtenção é favorecida pela extração prévia com diclorometano (extrato EBD), uma vez que o EBD remove primeiramente os compostos de baixa e média polaridade enquanto o EBE remove os compostos de maior polaridade.

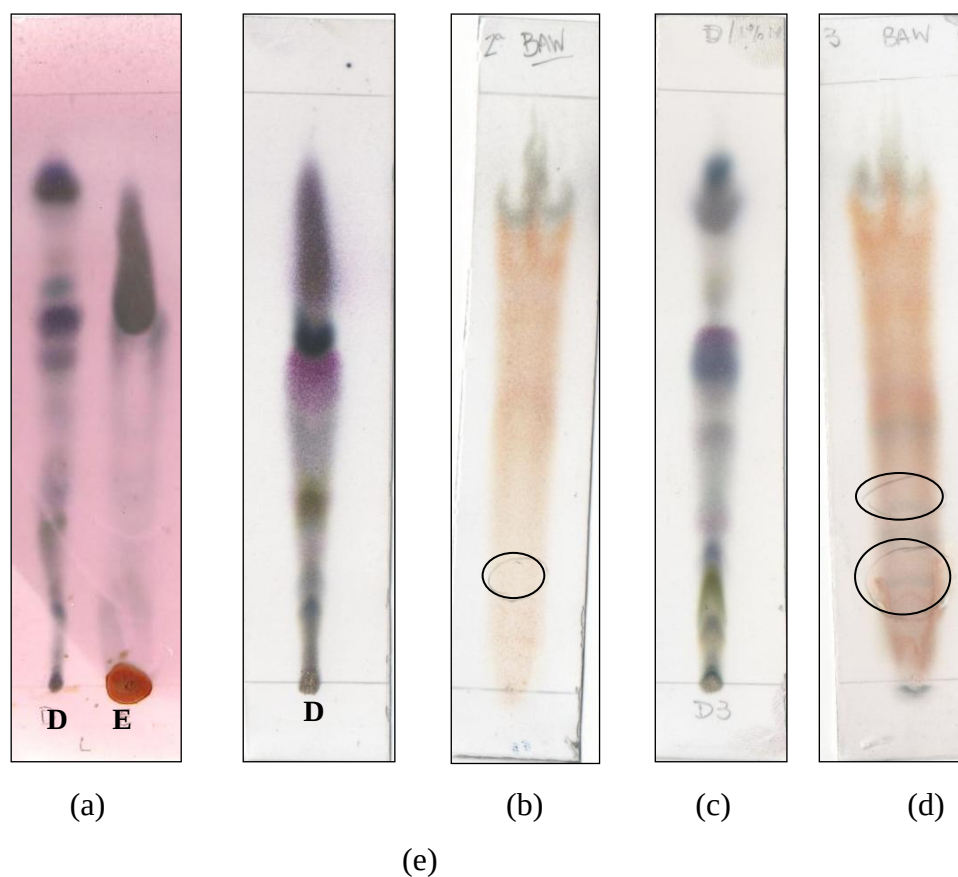


Figura 8: (a) CCD dos extratos brutos diclorometânico (EBD) e etanólico (EBE) da primeira extração – Fase móvel utilizada: Diclorometano/1%Metanol; (b) CCD do extrato bruto diclorometânico (EBD) esgotado (2ª extração)- Fase móvel utilizada: Diclorometano/1%

Metanol; **(c)** CCD do extrato bruto etanólico (EBE) esgotado (2ª extração)- Fase móvel utilizada: BAW (4:5:1); **(d)** CCD do extrato bruto diclorometânico (EBD) esgotado (3ª extração)- Fase móvel: Diclorometano/1%Metanol; **(e)** CCD extrato bruto etanólico (EBE) esgotado (3ª extração)- Fase móvel utilizada: BAW (proporção 4:5:1).

Na figura 8 (a), o EBE não foi separado (os componentes do extrato ficaram retidos no ponto de origem) devido à fase móvel utilizada (diclorometano/1%metanol) já que os componentes do EBE são bem polares; a banda que aparece no EBE na parte superior provavelmente é clorofila. Os componentes dos outros EBEs das demais extrações (2ª e 3ª) foram melhor separados em CCD, pois foi utilizado como fase móvel uma mistura de solventes de caráter mais polar (mistura de butanol, água e ácido acético conhecida como BAW, na proporção 4:5:1). Os círculos representados nas figuras (c) e (e), nos EBEs, são bandas observadas no UV visível (254 ou 360 nm).

Os EBDs, de todas as extrações, foram separados utilizando como fase móvel a mistura de diclorometano/metanol 1%. Para o fracionamento em coluna cromatográfica, porém, este tipo de eluente não seria o mais adequado, pois os componentes sairiam muito próximos uns dos outros e de forma muito rápida. O ideal para o fracionamento em coluna de sílica é o uso de fases móveis mais apolares no início da eluição, com aumento lento e gradativo da polaridade para que os componentes saiam de forma mais espaçada e dessa forma, bem separados. Em todas as CCDs foi utilizado como revelador a solução de anisaldeído.

2. Ensaios anticâncer *in vitro* dos extratos brutos obtidos da planta em estudo e do quimioterápico Doxorrubicina

A sobrevivência das células tumorais foi avaliada pela porcentagem de absorbância destas comparada à porcentagem de sobrevivência da placa controle (placa T0, não tratada). A Sulforrodamina B (SRB) é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da

fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (Skehan et al., 1990).

Foram separadas alíquotas (entre 5-10 mg) dos extratos brutos diclorometânico e etanólico para o teste em cultura de células tumorais humanas. Com as porcentagens de crescimento calculadas, foram elaborados gráficos de crescimento celular em função da concentração da amostra (figuras 9-13). O quimioterápico Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo no teste. Os valores abaixo de 50 e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática), sendo que os valores que atingem o zero representam inibição total de crescimento (TGI = *total growth inhibition*). Os valores negativos (abaixo de zero) representam morte celular (atividade citotóxica), pois a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento), é menor do que aquela que iniciou o experimento (absorbância do T₀).

Assim, a partir dos gráficos de crescimento celular em função da concentração da amostra, foi possível calcular uma concentração efetiva denominada GI₅₀ (*growth inhibition 50*) que corresponde à concentração necessária para inibir em 50% o crescimento de cada linhagem. Este cálculo foi feito por regressão não-linear, tipo sigmoidal, utilizando-se o programa Origin 7.5.

O quimioterápico Doxorrubicina, controle positivo foi utilizado nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/ml, e em triplicata.

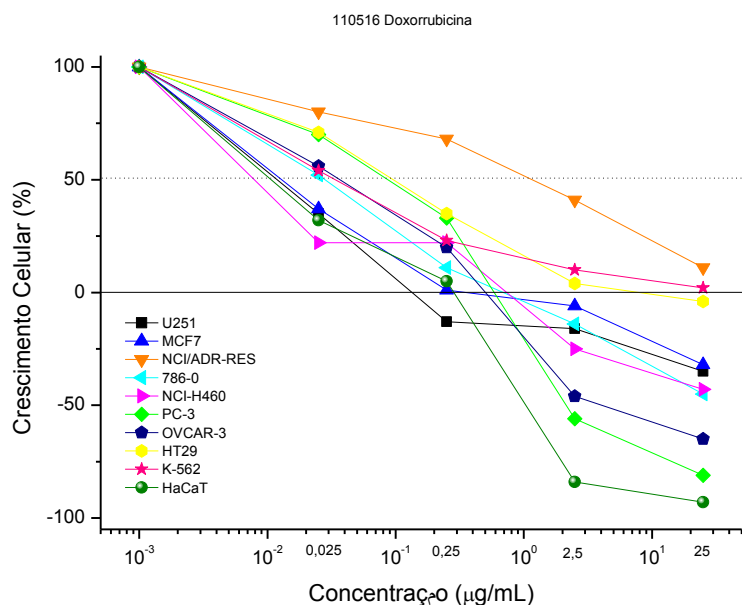


Figura 9: Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico Doxorubicina utilizado como controle positivo. U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

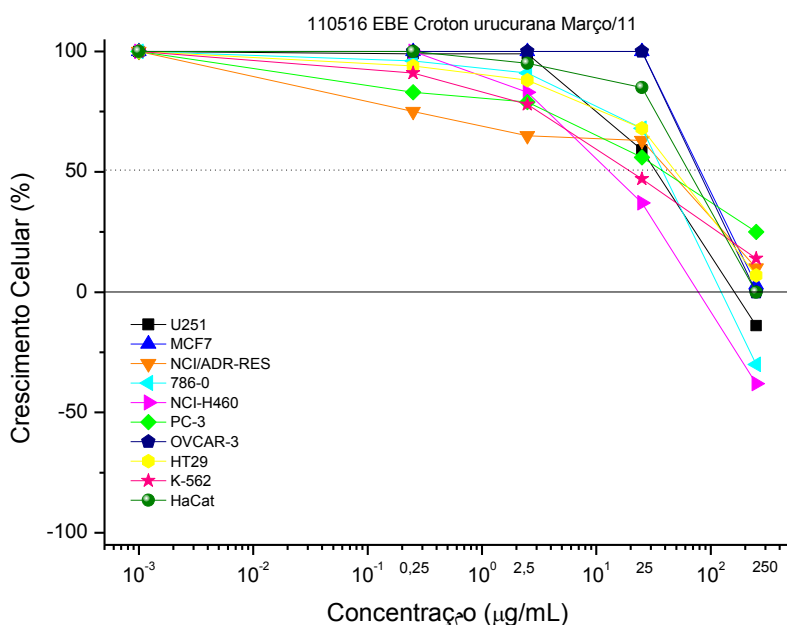


Figura 10: Gráfico de crescimento celular em função da concentração do extrato bruto etanólico (EBE), Primeira extração. U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

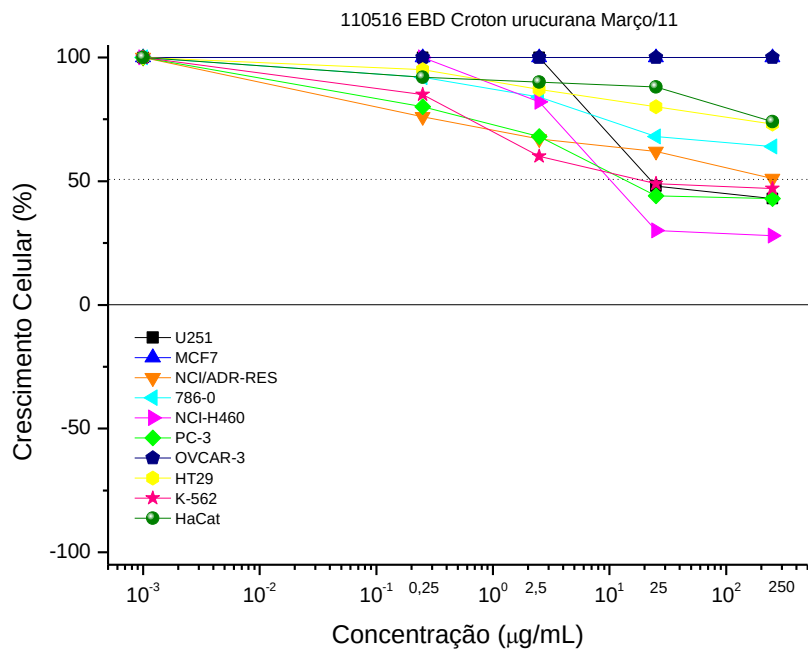


Figura 11: Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometano (EBD). Primeira extração. U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

Tanto o EBD quanto o EBE, da primeira extração, apresentaram um efeito citostático para a maioria das linhagens, sendo o EBE mais ativo do que o EBD. O EBE foi citotóxico na maior concentração (250µg/mL) para as linhagens de glioma (U251), rim (786-0) e ovário resistente a múltipla drogas (NCI/ADR-RES).

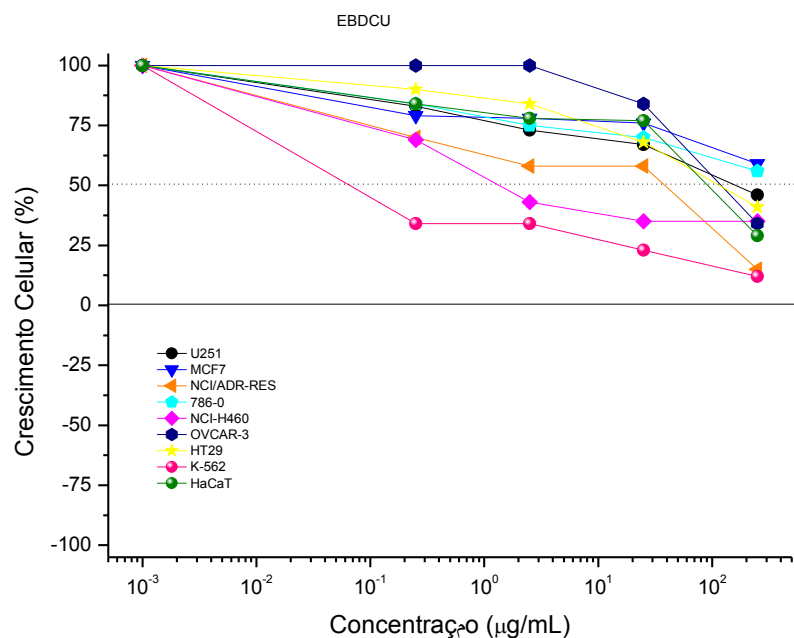


Figura 12: Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometano (EBD). Segunda extração. U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

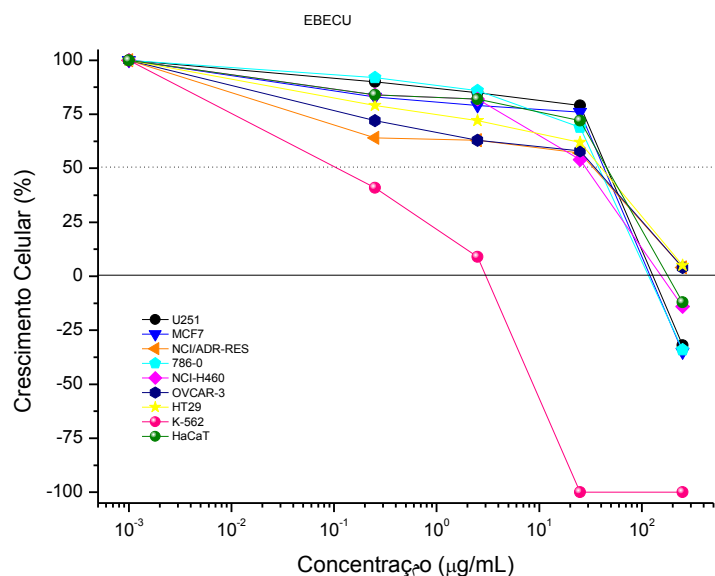


Figura 13: Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico (EBE). Segunda extração. U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

O EBD obtido na segunda extração não apresentou atividade promissora para a maioria das linhagens tumorais, exceto para as linhagens de leucemia (K562), ovário resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES) e pulmão (NCI-H460) que apresentaram atividade citostática. O EBE também não apresentou atividade promissora, porém na maior concentração, apresentou atividade citotóxica para todas as linhagens, exceto para a linhagem de cólon (HT29) e ovário (OVCAR-3).

Os valores de GI_{50} dos extratos brutos e da doxorrubicina foram calculados e apresentados na Tabela 5. Nota-se que o extrato bruto etanólico (EBE) é mais potente. Fouche e colaboradores descreveram, em 2008, os critérios do Instituto Nacional do Câncer (NCI/EUA) para classificação dos extratos calculando-se a média dos valores de GI_{50} de uma amostra frente várias linhagens celulares, expressa em log. Assim, a amostra pode ser classificada em inativa ($media\ logGI_{50} > 1.5$), fracamente ativa ($1.1 < media\ logGI_{50} < 1.5$), moderadamente ativa ($0 < media\ logGI_{50} < 1.1$) ou fortemente ativa ($media\ logGI_{50} < 0$) (Fouche et al., 2008).

Por este critério, ambos os extratos diclorometânicos são inativos ($media\ logGI_{50} > 1,5$), enquanto o extrato etanólico passou de inativo ($media\ logGI_{50} = 1,6$, primeira extração) para fracamente ativo ($media\ logGI_{50} = 1,2$, segunda extração), corroborando com a necessidade de mais etapas de maceração a fim de se obter extratos com melhor atividade antiproliferativa.

Tabela 5: GI_{50} - Growth Inhibition – concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento
GI ($\mu\text{g/mL}$)

	2	m	a	7	4	p	o	h	k	H	mean GI_{50}
EBD (1ª)	74,9	>250	>250	>250	>250	35,1	>250	>250	53,4	>250	2,3
EBE (1ª)	26,1	187,4	15,2	27,4	14,1	32,3	39,5	42,2	18,4	40,7	1,6
EBD (2ª)	174,5	>250	9,9	>250	3,8	-	130,2	119,9	0,2	80,2	2,0
EBE (2ª)	29,3	28,7	6,8	27,5	25,6	-	9,4	18,8	0,2	28,0	1,2

2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas

células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia); H = HaCat

Apesar do extrato EBE apresentar-se mais ativo, optou-se pelo fracionamento do extrato EBD por conta da disponibilidade de técnicas de fracionamento mais adequadas para o estudo de extratos de baixa e média polaridade.

3. Fracionamento do extrato bruto ativo (EBD)

Uma vez analisados os gráficos da atividade anticâncer, decidiu-se prosseguir com o processo de fracionamento a partir do EBD, como descrito no final do item anterior.

O fracionamento fitoquímico através de coluna cromatográfica compreende um método físico-químico de separação, no qual os compostos presentes em uma amostra são distribuídos entre uma fase estacionária (coluna recheada com um sólido) e uma fase móvel (líquida). A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. Portanto, a separação ocorre porque os compostos têm diferentes afinidades com a fase estacionária e com a fase móvel, de acordo com a sua polaridade e, portanto, deslocam-se com diferentes velocidades na coluna. Esse tipo de técnica é relativamente simples, não exige instrumentação esmerada e pode ser monitorada por cromatografia em camada delgada (Vichenewski, 2006).

Para esta etapa, um grama de extrato foi submetido ao fracionamento em coluna filtrante, utilizando-se uma proporção de extrato:sílica de 1:10.

São empregados solventes puros ou misturas de solventes como fase móvel a fim de se obter a melhor separação das substâncias presentes na amostra.

As frações foram coletadas em frascos numerados, resultando num total de 36 frações, as quais foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD, Figuras

14 e 15), com fase móvel diclorometano/metanol 99:1, e agrupadas por semelhança do perfil qualitativo em cinco grupos denominados FA (frações 1 a 6), FB (frações 7 a 12), FC (frações 13 a 18), FD (frações 19 a 24) e FE (frações 25 a 36) (Figura Z).

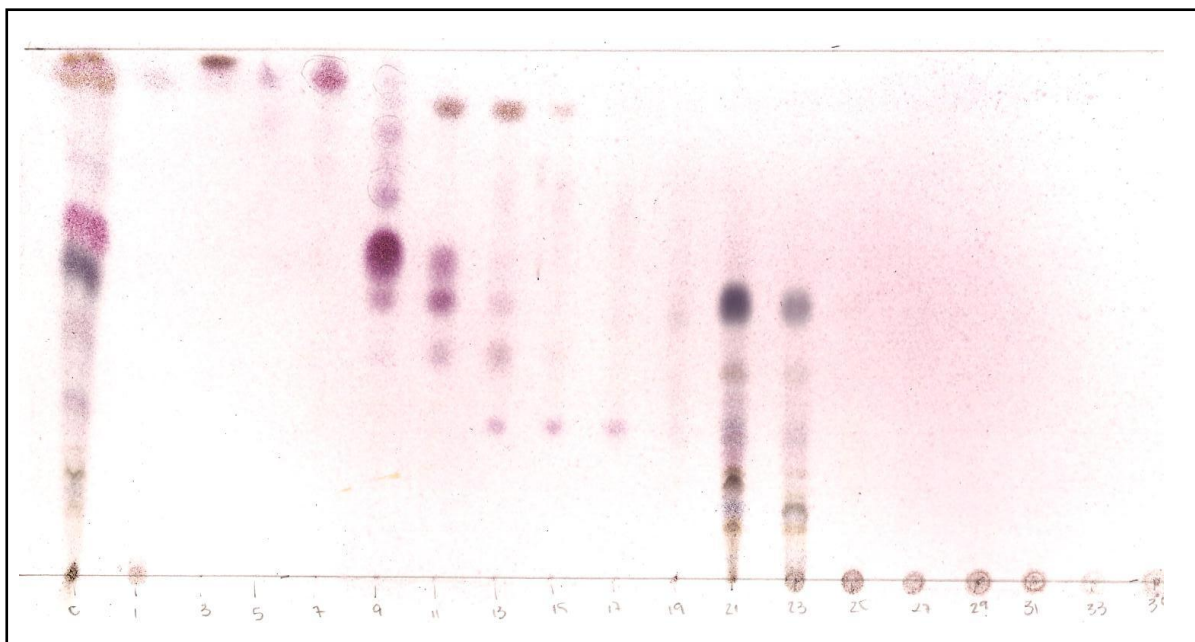


Figura 14: CCD das frações ímpares. Fase móvel: Diclorometano/1% Metanol; Revelador: Anisaldeído

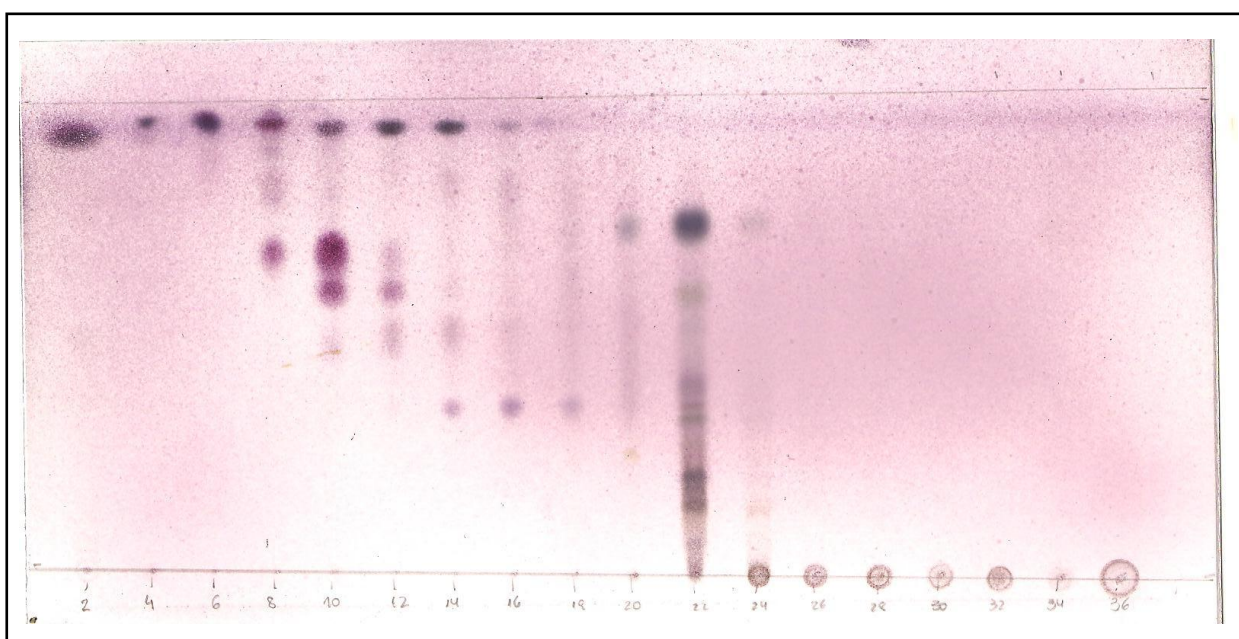


Figura 15: CCD das frações pares. Fase móvel: Diclorometano/1% Metanol; Revelador: Anisaldeído

Os grupos de frações foram avaliados por CCD (figura 16) com duas fases móveis diferentes, para comparação o extrato bruto diclorometânico e entre elas. Além disso, todas foram testadas *in vitro* para avaliação do perfil antiproliferativo. .

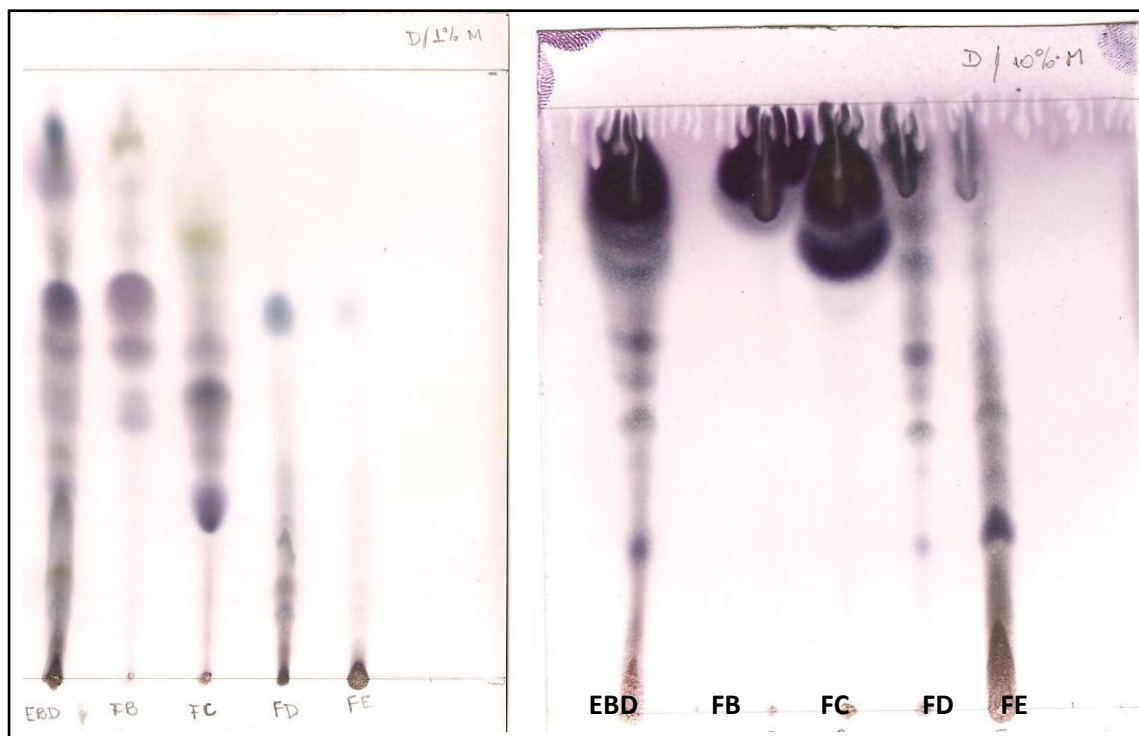


Figura 16: A figura à esquerda, CCD do EBD e das frações testadas na cultura de células. Fase móvel: Diclorometano/Metanol 99:1; revelador: Anisaldeído. A figura da direita, CCD do EBD e frações utilizadas na cultura. Fase móvel: Diclorometano/Metanol 9:1; revelador: Anisaldeído.

A CCD dos grupos, empregando-se diclorometano/metanol 99:1 (Figura 16 à esquerda), como fase móvel, revelou uma boa separação das substâncias presentes nos grupos de frações de baixa a média polaridade (FB e FC) enquanto os grupos de frações de média a alta polaridade (FD e FE) apresentaram uma predominância de manchas no terço inicial da placa cromatográfica. Diante disso, foi feita uma segunda CCD (figura 1 à direita, 1B) com a fase móvel mais polar, diclorometano/metanol 9:1, na tentativa de separar melhor as substâncias presentes principalmente nesses dois grupos (FD e FE). Como se pode observar na Figura 1B, essa estratégia permitiu a separação das substâncias presentes em FD e FE. O perfil químico obtido na análise desta CCD

confirma que o fracionamento do EBD foi adequado, pois separou-se compostos com polaridade distintas, segundo o gradiente de solventes empregado na eluição da coluna.

4. Ensaio anticâncer *in vitro* das frações obtidas no processo de purificação (fracionamento)

Separaram-se alíquotas de 5-10mg das frações obtidas, porém somente as frações FB, FC, FD e FE foram testadas no teste antiproliferativo *in vitro*. Este teste objetivava comparar a potencial atividade anticâncer de cada fração e determinar as frações ativas responsáveis pela atividade observada no teste antiproliferativo utilizando o EBD.

Foram obtidos os gráficos de crescimento em função da concentração para cada fração testada (figuras 17-20) proveniente do fracionamento em coluna filtrante. O quimioterápico Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo frente às linhagens tumorais. De todas as frações avaliadas, a FD e FE foram as que apresentaram resultados mais promissores *in vitro*.

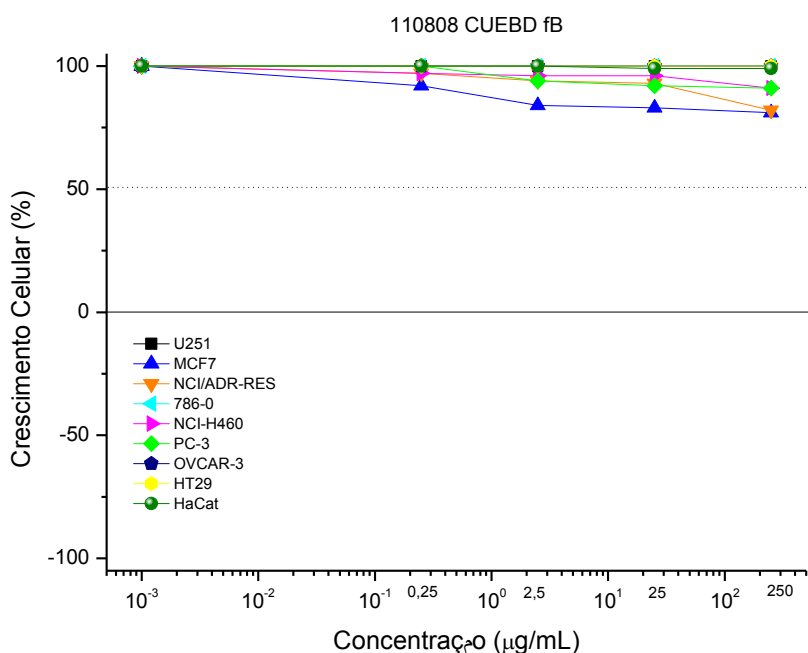


Figura 17: Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração B obtida a partir do EBD (2ª extração). U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

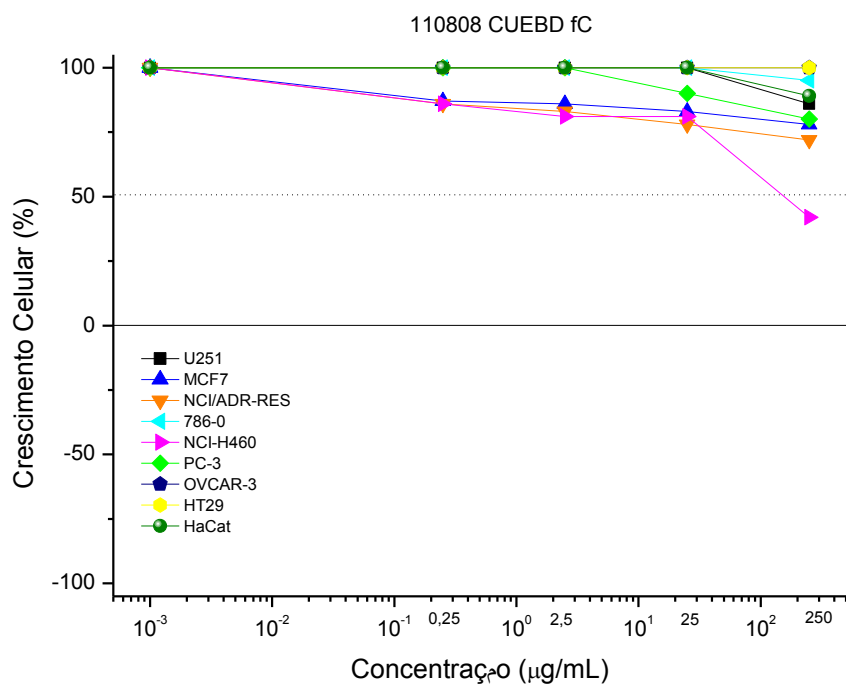


Figura 18: Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração C obtida a partir do EBD (2^a extração). U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

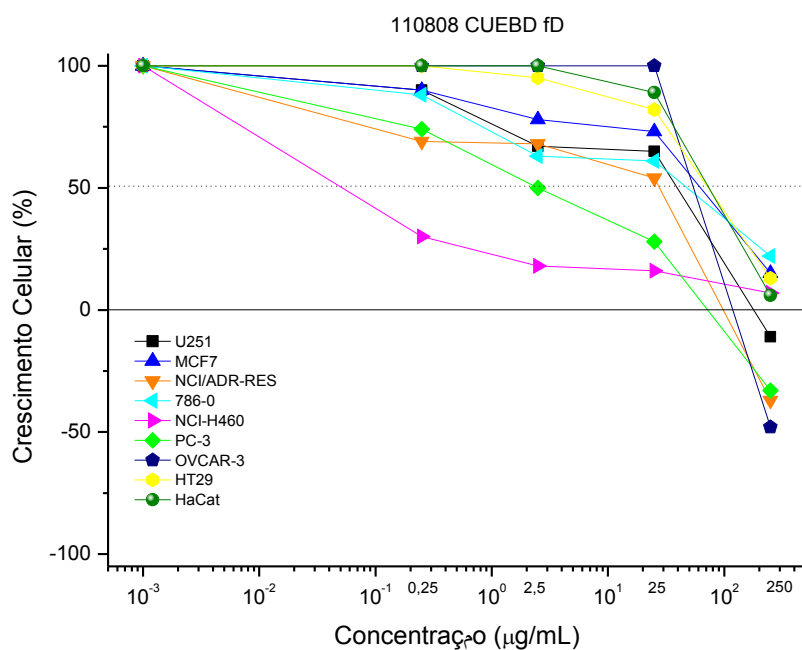


Figura 19: Gráfico da atividade antiproliferativa da Fração D obtida a partir do EBD (2^a extração). U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

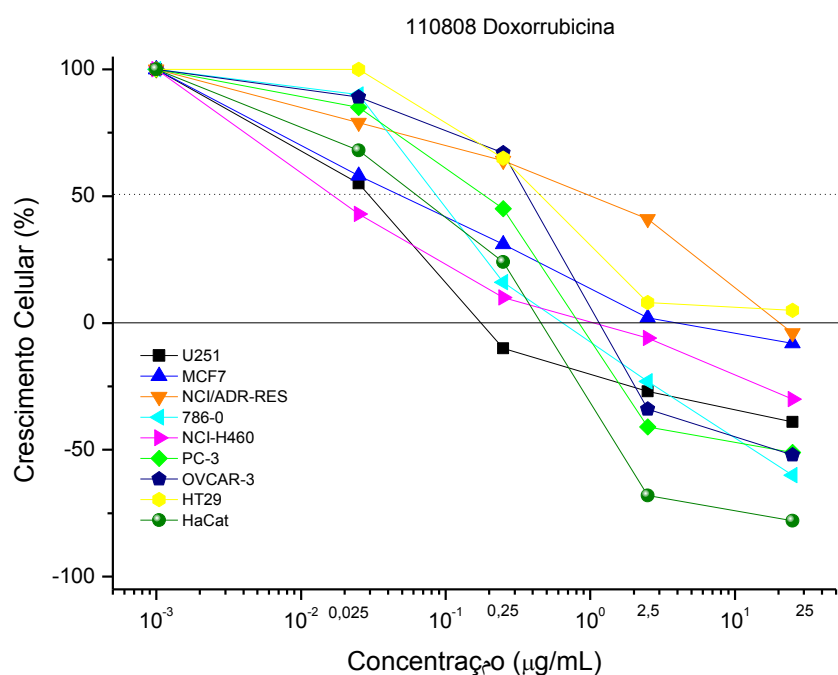


Figura 20: Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico Doxorubicina utilizado como controle positivo no teste. U251: Glioma; MCF7: Mama; NCI/ADR-RES: Ovário resistente; 786-0: Rim; NCI-H460: Pulmão; PC-3: Próstata; OVCAR-3: Ovário; HT-29: Cólon; K-562: Leucemia; HaCat: Queratinócito humano

Tabela 6: GI₅₀- *Growth Inhibition* – concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento

	GI (µg/mL)								
	2	m	a	7	4	p	o	h	Media log GI ₅₀
FB	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	2,4
FC	>250	>250	>250	>250	199,5	>250	>250	>250	2,4
FD	18,5	48,1	7,1	24,6	5,6	2,1	48,8	69,2	1,2
FE	27,5	30,1	25,6	29,0	4,8	26,8	38,2	36,8	1,3
Doxo	0,02	0,05	0,63	0,09	0,02	0,24	0,27	0,4	-1

2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (colorretal)

A partir da análise da Tabela6, pode-se afirmar que o processo de fracionamento resultou em uma melhora na atividade do extrato original, pois as médias log GI₅₀ das

frações B e C (frações de caráter mais apolar) de valor 2,4 foram reduzidas para os valores de 1,2 e 1,3 para as frações de caráter mais polar (frações D e E, respectivamente).

Portanto, tanto a fração B quanto a C não apresentaram atividade promissora para nenhuma das linhagens utilizadas no experimento. Já a fração D apresentou atividade citostática principalmente para as linhagens de próstata (PC-3) e pulmão (NCI- H460); na maior concentração apresentou atividade citotóxica nas linhagens de ovário (OVCAR-3), ovário resistente (NCI/ADR-RES), próstata (PC-3) e glioma (U251). A fração E apresentou atividade citotóxica na maior concentração em todas as linhagens.

O quimioterápico doxorrubicina apresentou boa atividade e seletividade, com morte celular em todas as linhagens na concentração de 2,5µg/mL (Figura 15) exceto nas linhagens de mama (MCF-7), cólon (HT-29) e ovário resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES).

5. Resultados Farmacológicos *in vivo*

5.1. Teste de Toxicidade aguda

Este teste teve como finalidade avaliar, após a exposição a uma dose única da amostra, os sinais de toxicidade decorrentes desta amostra (neste caso, o extrato EBD das folhas de *C. urucurana* Baillon), durante um período de observação de 14 dias. Neste teste, é importante que se observe o comportamento (sinais de toxicidade) de cada indivíduo frente aos efeitos que a amostra testada produz, por este motivo a linhagem Swiss foi utilizada por ser uma linhagem não isogênica.

A partir deste teste, é possível identificar o potencial tóxico em órgãos específicos (como por exemplo, os efeitos sobre os rins, baço e fígado) e identificar a relação dose-resposta. (Evans, 2009).

Este ensaio também permite estabelecer as doses para estudos adicionais de toxicidade (neste projeto, foi a partir do teste de toxicidade que as doses administradas no Ehrlich foram estabelecidas). Para tanto, determinou-se a dose máxima tolerada, isto é, aquela que resultou no menor incidência de sinais de toxicidade (perda de peso, piloereção, etc.); a partir dessa dose, calcula-se a maior dose que será empregada nos modelos *in vivo* nos quais a administração da amostra é feita de forma repetida. Geralmente, a dose máxima nos ensaios de dose repetida corresponde a 40% da dose máxima tolerada após administração única (Mi *et al*, 2009).

Assim, os sinais de toxicidade, incluindo o tempo de aparecimento destes sinais, progressão e reversibilidade destes sintomas, foram observados durante o teste. Além da observação diária, os animais foram pesados a cada três dias a fim de que fosse possível verificar a variação de peso dos animais (se houve perda ou ganho, Figura 21) após o tratamento com uma administração única de EBD, em três doses diferentes (30, 100 e 300 mg/Kg).

Ao fim do período de observação todos os animais foram eutanaziados e seus órgãos (fígado, rins, baço, pulmão, coração, útero e ovários) foram retirados para pesagem e análise macroscópica.

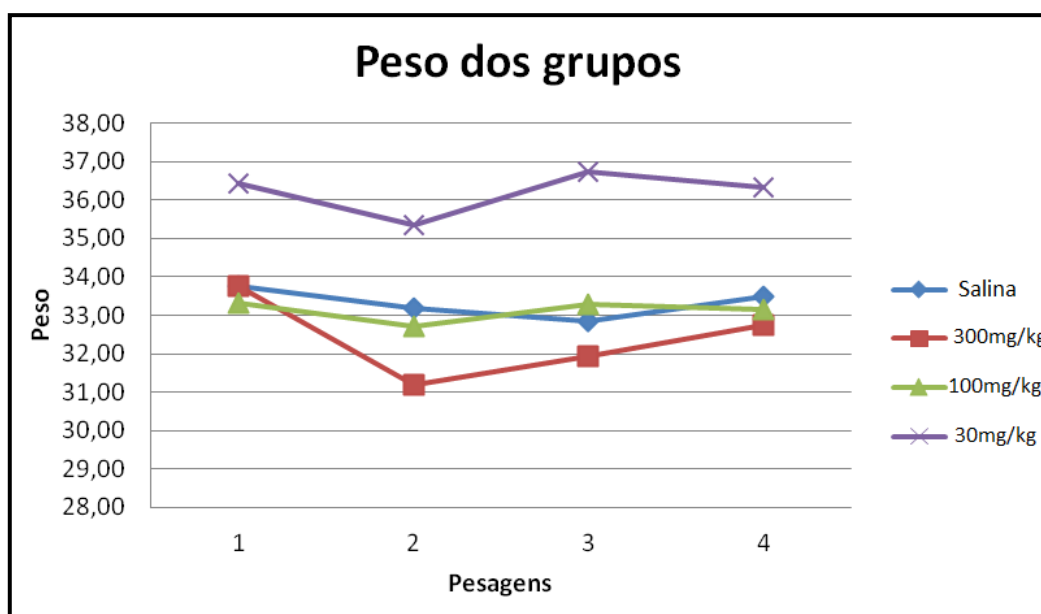


Figura 21: Gráfico da variação do peso dos animais durante o teste de Toxicidade aguda

O grupo que recebeu a maior dose de EBD (300mg/kg) apresentou uma tendência de perda do peso (Figura 21), porém esta não foi estatisticamente significativa quando comparada com os valores do grupo salina. Além disso, os animais do grupo EBD 300mg/kg apresentaram sinais bem evidentes de toxicidade tais como contorção abdominal, piloereção, grande produção de muco e pouca mobilidade (durante as primeiras 4h após a administração).

Por outro lado, a menor dose (30mg/kg) de EBD foi a que apresentou menos sinais de toxicidade (comparada às outras duas doses). Os animais apresentaram piloereção e letargia nas primeiras 4h (sinais de toxicidade), porém em menor intensidade e com recuperação mais rápida do que a observada nos dois outros grupos.

As possíveis explicações para a perda de peso (Figura 21) dos grupos são 1. Um primeiro tratamento com a droga, sobretudo se esta for tóxica, leva a um desconforto por parte dos animais avaliados, que às vezes deixam de comer por alguns dias, acarretando em perda de peso. Após alguns dias, o peso retorna ao normal com a retomada da alimentação por parte dos animais; 2. O estresse sofrido pelos animais durante a manipulação e a administração de injeção via intraperitoneal pode provocar a perda de peso nos primeiros dias; 3. Os animais tratados com as maiores doses (300 e 100mg/kg) apresentaram sinais mais evidentes de toxicidade, o que sugeriu uma relação dose-efeito de EBD.

Nos dias subsequentes à administração da amostra, os camundongos de todos os grupos apresentaram recuperação com relação aos sinais de toxicidade observados nas primeiras 4h. Durante o período de observação de 14 dias, não houve óbito de nenhum dos grupos.

Os pesos relativo dos órgãos coletados (baço, rins, fígado, útero, coração, pulmão, adrenal e ovário) dos animais dos grupos tratados com EBD (30, 100 e 300 mg/Kg) não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparado com aqueles dos animais salina (controle negativo) . Portanto, não foi possível evidenciar nenhuma toxicidade órgão-específica nesse experimento.

5.2. Tumor Sólido de Ehrlich

Para avaliação da atividade farmacológica, neste caso atividade anticâncer, foram escolhidos camundongos da linhagem Balb C. Estes animais são isogênicos (genótipos e fenótipos semelhantes) e desta forma as respostas observadas durante o teste tendem a ser idênticas em todos os animais. Essa homogeneidade de resposta possibilita uma melhor compreensão dos resultados obtidos (das variáveis experimentais/ambientais, sem a interferência de variáveis genéticas) além de permitir a redução do número de animais necessários para o experimento.

O modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, escolhido como modelo experimental *in vivo*, seguiu o esquema de tratamento da Figura 8. As células tumorais retiradas de um animal doador foram inoculadas, após a contagem das células, na pata posterior direita dos animais em D₀, e durante todo o período do experimento, o crescimento do tumor foi acompanhado através da medição do volume da pata, assim como se monitorou o peso dos animais (D3, D6, D9, D12 e D15).

As doses utilizadas neste ensaio foram calculadas a partir do ensaio de toxicidade de dose única. Foi estabelecida como maior dose a de 20mg/kg, que corresponde a 66% da maior dose tolerada (30mg/kg) no ensaio de toxicidade dose única. A partir dessa maior dose, foram propostas mais duas doses, as de 5 e 10 mg/Kg, a fim de avaliar a possível relação entre a dose e a atividade anticâncer.

Ao final do experimento, foram feitas as avaliações de progressão do volume do tumor (Figura 22), variação do peso dos animais (figura 23) e peso relativo do tumor (figura 24). A análise estatística de cada um desses parâmetros foi realizada através do teste ANOVA, seguido do teste de Duncan.

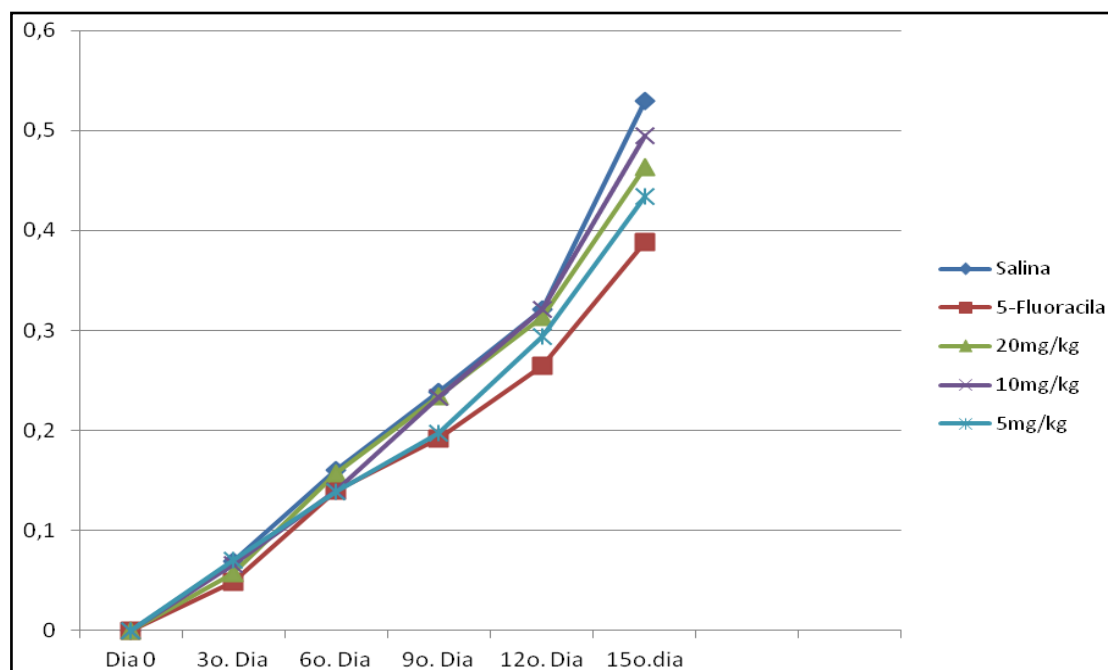


Figura 22: Variação do volume do tumor sólido de Ehrlich para os grupos controle negativo (salina), positivo (5-Fluoracil) e tratados com o extrato EBD de *C. urucurana*, nas doses 5,10 e 20 mg/kg.

De acordo com os resultados obtidos, apresentados no gráfico de progressão do volume tumoral em função do tempo, foi possível observar uma pequena inibição de crescimento tumoral no grupo que tratado com a dose de 5mg/kg, assim como no grupo tratado com o quimioterápico 5-Fluoracil (controle positivo), quando comparados ao grupo tratado com salina (controle negativo).

O tumor mostrou-se bastante agressivo no seu crescimento, com o aumento rápido do tamanho a partir do terceiro dia pós-inoculação. Mesmo o quimioterápico 5-Fluoracil não foi capaz de reduzir em pelo menos 50% o crescimento da neoplasia.

A partir do nono dia de tratamento (D9), os grupos tratados com a dose de 5mg/kg e com o quimioterápico 5-Fluoracil apresentaram uma redução de crescimento

significativa ($p < 0,05$) do tumor (20% de redução com o 5-Fluoracil e redução de 17% com a dose de 5mg/kg) quando comparados com o grupo salina. Porém, no 12º dia de tratamento (D12), somente o quimioterápico apresentou este comportamento ($p < 0,05$) enquanto que a dose de 5mg/kg não apresentou redução significativa. No 15º dia de tratamento (D15), os dois grupos (5mg/kg e 5-Fluoracil) conseguiram conter de forma significativa (19% de redução com a dose de 5mg/kg e 27% de redução com o 5-Fluoracil) o aumento do tumor quando comparados ao grupo salina.

Assim, das três doses avaliadas, a dose de 5mg/kg foi a que apresentou um comportamento próximo ao quimioterápico 5-Fluoracil, podendo sugerir a hipótese de que nesta dosagem, a amostra atue como um agonista parcial, já que o efeito (atividade antiproliferativa) foi inversamente proporcional à dose utilizada.

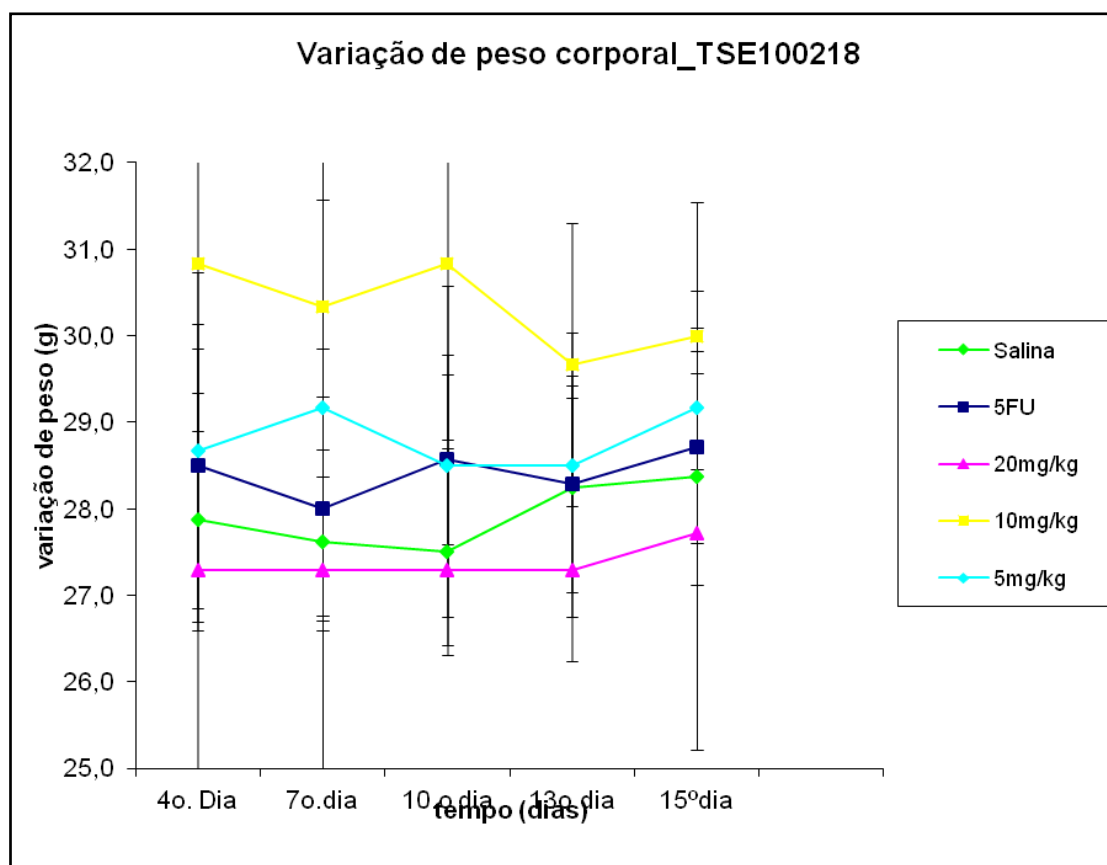


Figura 23: Variação do peso corporal nos diferentes grupos de camundongos com tumor sólido de Ehrlich, durante os 16 dias de experimento.

A figura 23 apresenta a evolução da variação de peso nos animais durante o experimento. De maneira geral, houve variação de peso, mas não de forma considerável. Nos últimos dias de tratamento (13º dia), houve a tendência de ganho gradual de peso em todos os grupos. Uma possível explicação para a variação de peso dos animais seria algum desconforto gerado pelas substâncias administradas nos animais que às vezes deixam de se alimentar por causa disso, além do estresse de passar pelos tratamentos e manipulações.

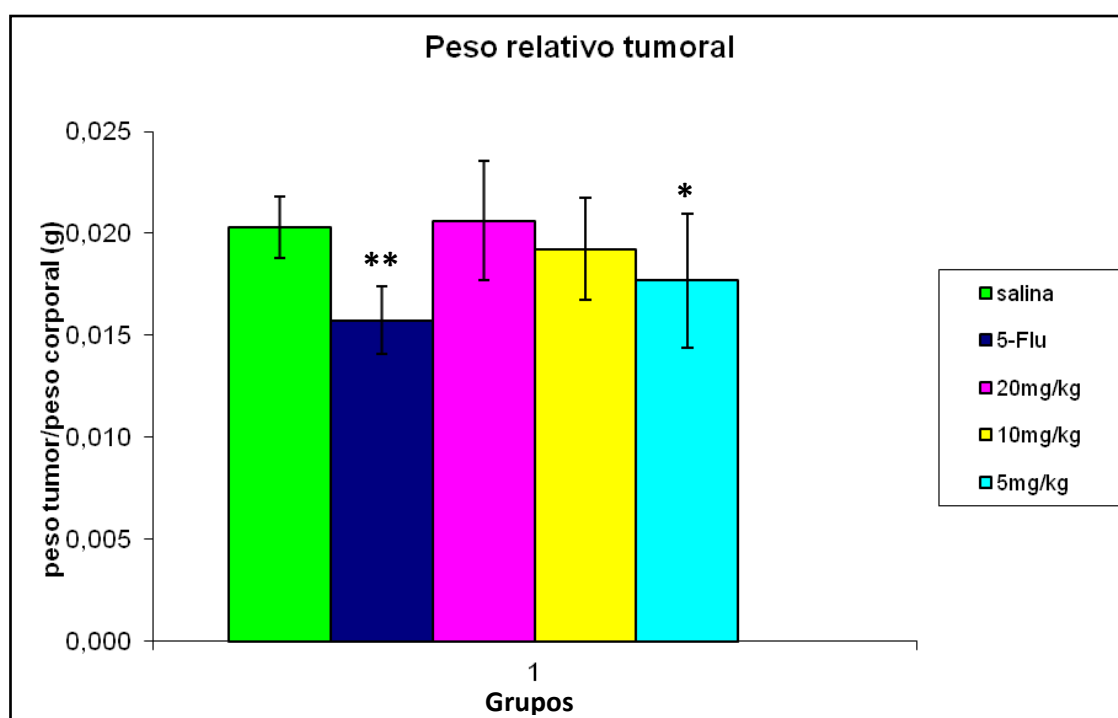


Figura 24: Análises do peso relativo do tumor sólido de Ehrlich, avaliado ao final do experimento (D16) pela diferença entre o peso da pata com tumor (posterior direita) e a pata contralateral (posterior esquerda). * = Teste de Duncan, $p < 0,05$ (ANOVA), ** = Teste de Duncan, $p < 0,01$ (ANOVA).

A análise do peso do tumor, avaliado no 16º dia (D16) pela diferença entre a pata com tumor e a pata sem tumor, indica que o grupo tratado com o quimioterápico foi 22% menor que o grupo salina. O esperado neste teste, é que a diferença entre estes grupos seja de aproximadamente 35%. As possíveis explicações para este dado seriam:

a agressividade das células tumorais, as células podem estar se duplicando muito rapidamente ou elas podem ter adquirido resistência, explicando assim por que o esquema de tratamento não funcionou e o quimioterápico não apresentou resultados melhores. As figuras 25 e 26 mostram a diferença de tamanho entre as patas traseiras com tumor e sem tumor. Este resultado corrobora com a avaliação feita da variação do volume do tumor em função do tempo.



Figura 25: Pata traseira esquerda sem o tumor.



Figura 26: Pata traseira direita com o tumor sólido de Ehrlich.

Os grupos tratados com o quimioterápico e com a dose de 5mg/kg apresentaram inibição do crescimento tumoral significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) do volume tumoral quando comparados com o grupo salina, confirmando desta forma, que a dosagem de 5mg/kg possa possivelmente ter um efeito inversamente proporcional à dose, já que as doses maiores não conseguiram conter o crescimento tumoral.

Diante disso, como não houve diferença estatística entre as maiores doses e a menor dose apresentou diferença significativa com relação ao grupo salina, a melhor escolha para utilizar nos tratamentos seria a menor dose já que apresentou resultados

melhores com relação às demais doses e representaria uma economia de amostra, além de apresentar menor toxicidade.

Dos órgãos coletados ao final do experimento (baço, rins, fígado e testículos), nenhum deles apresentou alterações macroscópicas ou alterações de peso relativo dos órgãos quando comparados ao grupo salina.

O fígado e os rins são importantes parâmetros de avaliação toxicológica de novas potenciais drogas, uma vez que são responsáveis pela metabolização e filtração, respectivamente, no organismo. Como foi verificado, não houve evidências de toxicidade hepática e renal em nenhum dos grupos tratados.

Além da coleta dos órgãos, foram coletadas pequenas quantidades de sangue dos animais para realização de hemograma com a finalidade de verificar se houve alguma alteração nas quantidades dos constituintes do sangue (glóbulos vermelhos, brancos, plaquetas entre outros). A partir destes dados, foi possível identificar sinais de toxicidade e algum tipo de ação da amostra EBD nos constituintes do sangue.

A partir da análise dos hemogramas, quando comparamos o grupo salina com os valores padrões estabelecidos na literatura para camundongos, não foi verificado nenhuma alteração significativa de todos os componentes celulares do sangue (glóbulos vermelhos, leucócitos, plaquetas). Porém quando comparamos o grupo salina (controle negativo) com os demais grupos, dois componentes celulares estão relativamente alterados: os leucócitos e as plaquetas (figuras 27 e 28).

A quantidade de leucócitos (WBC) dos grupos tratados com a dose de 20mg/kg e de 5mg/kg foi significativamente maior ($p < 0,001$) (leucocitose) quando comparado com o grupo salina.

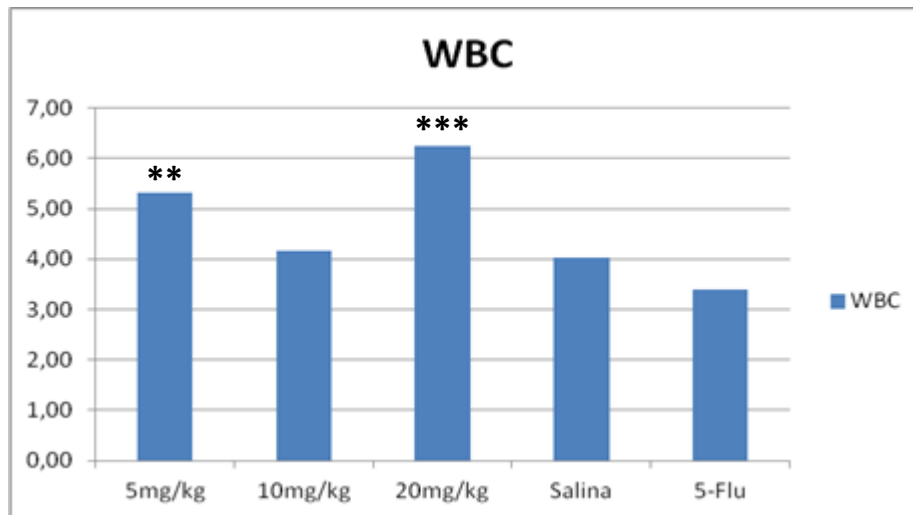


Figura 27: Comparação entre as quantidades de glóbulos brancos (WBC) nos diferentes grupos. ** = Teste de Duncan, $p < 0,01$ (ANOVA), *** = Teste de Duncan, $p < 0,001$ (ANOVA).

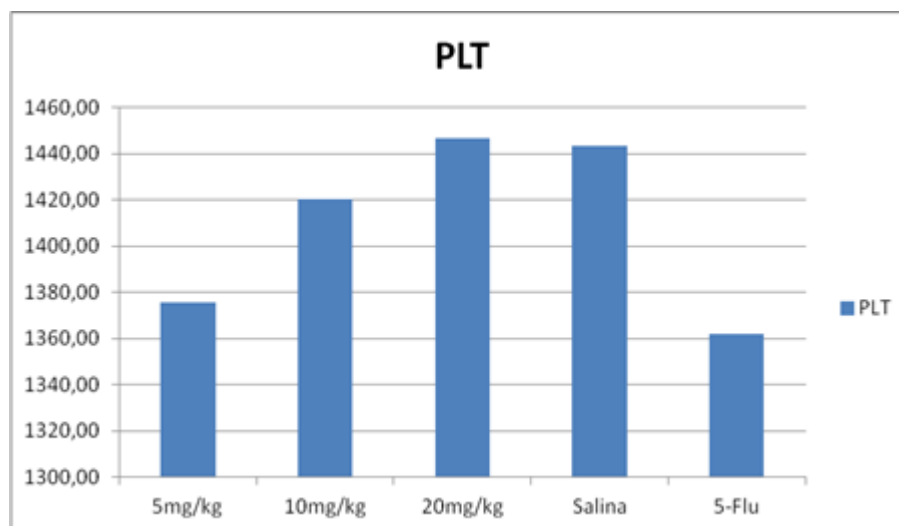


Figura 28: Comparação da quantidade de plaquetas (PLT) nos diferentes grupos

Os xenobióticos (como por exemplo, os quimioterápicos) - compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico- podem exercer seus efeitos sobre as populações de leucócitos pela supressão ou destruição das células tronco hematopoiéticas, nas células precursoras de proliferação, no ambiente hematopoiético ou por alterações inflamatórias e no ambiente microvascular. Em animais com

neoplasias, a contagem total de leucócitos pode estar aumentada ou diminuída e aparecer muito reduzidas devido à hemodiluição. (Evans, 2009).

No grupo tratado com o quimioterápico (5-Fluoracil) e o grupo tratado com a dose de 5mg/kg, a quantidade de plaquetas foi menor (trombocitopenia) em relação ao grupo salina, porém estatisticamente esta redução não foi significativa. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas quando comparadas ao grupo salina.

Hemostasia é o termo usado para descrever as respostas fisiológicas normais para a prevenção e detenção de hemorragia. Os processos são dependentes das interações entre as paredes dos vasos sanguíneos, plaquetas e fatores de coagulação que atuam para tentar controlar a coagulação sanguínea nos locais das lesões (Evans, 2009).

Alguns compostos químicos são capazes de alterar os mecanismos hemostáticos e os xenobióticos estão incluídos neste grupo, podendo inibir ou estimular os mecanismos homeostáticos. A trombocitopenia é a mais comum das discrasias sanguíneas relatadas causadas por xenobióticos, e é resultado de um aumento da destruição ou aumento da utilização (devido a injúrias no sistema vascular), redução da produção de plaquetas (relacionadas com o câncer e alteração na medula óssea) e queda de sobrevivência das plaquetas (Evans, 2009).

CONCLUSÕES

- A partir da análise da média $\log GI_{50}$, conclui-se que o extrato bruto diclorometânico é inativo, enquanto o extrato etanólico é mais ativo frente ao painel de linhagens tumorais humanas. Isso justifica a importância de dar continuidade ao estudo com o extrato EBE já que neste projeto foi avaliado apenas a atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* do EBD.

- Das frações obtidas a partir do processo de purificação do EBD, as que apresentaram melhor atividade *in vitro* foi a FD e FE.
- A atividade anticâncer do extrato bruto diclorometânico também foi constatada *in vivo*, em animais inoculados com o tumor sólido de Ehrlich, que apresentou redução no crescimento do tumor no grupo tratado com a dose de 5mg/kg quando comparado ao grupo salina.
- As maiores doses da amostra não apresentaram diferenças estatísticas significativas com relação à capacidade de conter o crescimento do tumor, porém há uma tendência de que a menor dose (5mg/kg) tenha uma relativa atividade e que atue com um agonista parcial.
- O modelo murino de tumor sólido de Ehrlich mostrou-se um modelo experimental indicado apenas para avaliar o potencial antiproliferativo e com potencial para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer. Porém não esclarece os mecanismos envolvidos no controle da progressão tumoral da amostra testada. Para isso, são indicados maiores testes *in vitro* e outras técnicas.

Diante dos elevados índices de incidência de câncer no mundo, estudos relacionados ao desenvolvimento de novas drogas anticâncer e estudos sobre a biologia do câncer devem ser estimulados e promovidos para que se possa atender às necessidades existentes e disponibilizar novos fármacos eficientes no tratamento do câncer.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B. *et al* (2004). **Biologia Molecular da célula**. 4º ed. Porto Alegre: Artmed.

- Balunas M.J., Kinghorn A.D. (2005). Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sciences**, 78: 431-441.
- Bettolo, R.M. and Scarpatti, M.L. (1979). Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**, 18: 520.
- Brasil, **Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer**. (2011). Disponível na Internet: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>; consultado em 26/11/2011.
- Brown, J.M. and Attardi, L.D. (2005). The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. **Nature Reviews Cancer**, 5: 231.
- Butler, M.S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, 25: 245-516.
- Chen, Z.P., Cai, Y., Phillipson, J.D. (1994). Studies on the anti-tumor, anti-bacterial, and wound-healing properties of Dragon's blood. **Planta Medica**, 60: 541-545.
- Cragg, G.M. & Newman, D.J. 2009. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. **Phytochemistry reviews**, 8: 313-331.
- Dalbo, S., Jurgensen, S., Horst, H., Ruzza, A.A., Soethe, D.N., Santos, A.R., Pizzolatti, M.G., Ribeiro-do-Valle, R.M. (2005). Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 57, 765-771.
- Dinaway, S., Chitre, D., Patwardhan, B. (2004). Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. **Journal Ethnopharmacology**, 90: 49-55.
- Ehrlich, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. **Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt**, v.1, p. 78-80, 1906.

- Fadeel, B. & Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. **Journal of Internal Medicine**, 258: 479.
- Fernando, A., Glaysher, S., Conroy, M., Pekalski, M., Smith, J., Knigh, L.A., Di Nicolantonio, F., Cree, I.A. (2006). Effect of culture conditions on the chemosensitivity of ovarian cancer cell lines. **Anticancer Drugs**, 17: 913-919.
- Figueiredo I.M., Santos L.V., Costa W.F., Carvalho J.E., Silva C.C., Sacoman J.L., Kohn L.K., Sarragiotto M.H. (2006). Synthesis and Antiproliferative Activity of Novel Limonene Derivates with a Substituted Thiourea Moiety. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 5:954-960.
- Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, Senabe J 2008. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 119: 455-461.
- Gurgel, L. A., Silva, R. M., Santos, F. A., Martins, D. T., Matos, P. O., Rao, V. S. (2001). Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Research**, 15, 319-322.
- Gurgel, L. A., Sidrim, J. J. C., Martins, D. T., Filho, V., Rao, V. S. (2005). In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, 409-412.
- Hartung, T. and Daston, G. (2009). Are *In Vitro* Tests Suitable for Regulatory Use? **Toxicological Sciences**, 111(2): 233-237
- Hartwell, J.L. (1969). Plants used against cancer. **A survey. Lloydia** 32: 153-205.
- Hartwell, J.L. (1982). Plants used against cancer. **A survey. Quarterman Publications Inc.: Lawrence, Massachusetts**; 194.

- Harvey, A.L., Cree, I.A. (2010). High-throughput screening of natural products for cancer therapy. **Plant Medicine**, 76: 1080:1086.
- Itokawa, H., Ichiara Y., Mochizuki, M. *et al*, (1991). A cytotoxic substance from Sangre de Grado. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 39: 1041-1042.
- Jachak SM, Saklani A. (2007). Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**, 92(9):7.
- Jones, K. (2003). Review of sangre de dragón (*Croton lecheri*) – a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. **Journal of Alternative and Complementary Medicine** 9, 877-896.
- Kamb, A., Wee, S., Lengauer, C. (2007). Why is cancer drug discovery so difficult? **Nature Reviews Drug Discovery**, 6: 115-120.
- Lee, K.H. (1999). Anticancer Drug Design Based on Plant-Derived Natural Products. **Journal of Biomedical Science**, 6: 236.
- Lopes, J.L.C.. Cromatografia de Camada Delgada. In: organizadores: Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. Fundamentos da Cromatografia. Campinas, SP: **Editora da Unicamp**; 2006. 67-85.
- Matsuzaki, P. (2004). Avaliação dos extratos etanólicos, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do Tumor sólido de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. **Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP)**, Brasil.
- Mesquita M.L., de Paula J.E., Pessoa C., Moraes M.O., Costa-Lotufo L.V., Grougnet R., Michel S., Tillequin F., Espindola L.S. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, 123:439-445.

- Mi Q., Pezzuto J. M., Farnsworth N. R., Wani M. C., Kinghorn A. D., Swanson S. M. (2009). Use of the in Vivo Hollow Fiber Assay in Natural Products Anticancer Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, 72, 573–580.
- Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. (1991). Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, 83: 757.
- Nascimento F.R.F., Cruz G.V.B., Pereira P.V.S., Maciel M.C.G., Silva L.A., Azevedo A.P.S., Barroqueiro S.B., Guerra R.N.M. (2006). Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, 78: 2650-2653.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, 70, 461-477.
- Oliveira I.S., Lima J.C. S., Silva R.M., Martins D.T. O. (2008). Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18(4): 587.
- Orlandi-Mattos, P. E., Geremias, R., Cordova, C. A. S., Creczynski-Pasa, T. B., Rebello, J. M., Wilhem Filho, D., Martins, D. T. O., Llesuy, S., Pedrosa, R. C. (2002). Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Free Radical Biology & Medicine**, 33, 645.
- Peres, M. T. L. P.; Delle Monache, F.; Pizzolatti, M. G.. Yunes, R.A. (1997). Chemical composition and Microbial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology Research**, 12: 209-2011.

- Peres, M. T. L. P., Delle Monache, F., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. S., Beirith, A., Calixto, J. B., Yunes, R. A. (1998). Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, 12, 209.
- Phillipson JD (1994). Natural products as drugs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 88 Suppl 1:S17-9.
- Reddy, L., Odhav, B., Boola, K.D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 99:1-13.
- Rieder A., Figueiredo, G.C., Pereira, E.S. (2011). Plant known as “Sangra d’água” (*Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) and its medicinal use in southwestern of Mato Grosso state, Brazil. **Plant Medicine**, 77.
- Risco E.; Ghia F.; Vila R.; Iglesias J.; Álvarez E.; Canigueral S. (2003). Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon’s blood) from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, 69: 785.
- Rishton, G.M. (2008). Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **The American Journal of Cardiology**, 101 (suppl. 1): 43D.
- Rubinstein L.V., Shoemaker R.H., Paull K.D., Simon R.M., Tosini S., Skehan P., Scudiero D.A., Monks A., Boyd M.R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, 82: 1113-1118, 1990.

- Sandoval M., Okuhama N. N., Clark M., Angeles F.M., Lao J., Bustamante S., Miller M.J. (2002). Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 80 (suppl. 2-3): 121.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, 18, 11-33.
- Schmidt B., Ribnicky D.M., Poulev A., Logendra S., Cefalu W.T., Raskin I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, 57 (Suppl 1): S3–S9.
- Simionatto E., Bonani V. F. L, Morel A.F., Poppi N.R., Raposo Jr J.L., Stuker C. Z., Peruzzo G.M., Peres M. T. L. P., Hessa S.C. (2007). Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. **Journal of the Brazillian Chemical Society**, 18 (suppl. 5): 879.
- Simões, C. M. O. *et al* (2004) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: **Editora da UFRGS/Editora da UFSC**.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990). New colorimetric citotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute** 82 (13): 1107.
- Suggitt, M., Bibby, M.C. (2005). 50 years of Preclinical Anticancer Drug Screening: Empirical to Target-Driven Approaches. **Clinical Cancer Research** 1(11): 971.
- Ubillas, R. (1994). SP 303, an antiviral oligomeric proantocyanidin from the sap of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). **Phytomedicine** 1,77–106.

- Vichenewski, W. Cromatografia por Adsorção. Organizadores: Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. Fundamentos da Cromatografia. Campinas, SP: **Editora da Unicamp**; 2006. 87-100.
- Wang MW, Hao X, Chen K. (2007). Biological screening of natural products and drug innovation in China. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, 362(1482):1093-105.



CEUA/Unicamp

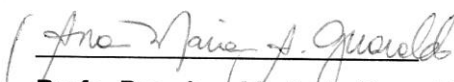
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

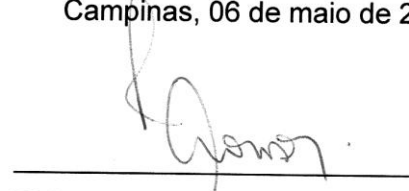
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**Avaliação da atividade de extratos da espécie *Croton urucurana* sobre o modelo de tumor sólido de Ehrlich**" (protocolo nº **2393-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz / Larissa Shiozawa**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **06 de maio de 2011**.

Campinas, 06 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



CEUA/Unicamp

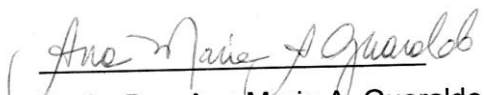
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

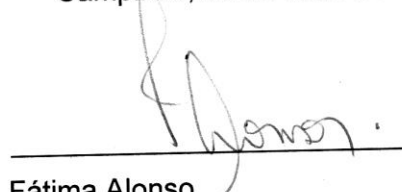
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Teste de Toxicidade aguda de extratos e frações da espécie *Croton urucurana*" (protocolo nº 2394-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz / Larissa Shiozawa, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de maio de 2011.

Campinas, 06 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva