

LAURA ALVES VERÃO MARTINS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE ESPÉCIES VEGETAIS
DE MATO GROSSO DO SUL

CAMPO GRANDE

2014

LAURA ALVES VERÃO MARTINS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE ESPÉCIES VEGETAIS
DE MATO GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fatima Cepa Matos

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Rodrigues Garcez

CAMPO GRANDE

2014

Dedicatória...

Dedico este trabalho a Deus, que sempre me proporcionou o melhor, iluminando meus pensamentos e abençoando cada dia de minha vida;

Aos meus protetores e ao meu anjo guardião que me guia a cada passo, me amparando e dando forças para o que for preciso;

Aos meus pais Clayton e Daizire, minha irmã Marina, meus avós Anízio e Maria de Lourdes e meu Tio Itamar, vocês são o meu maior exemplo, o meu sustentáculo, a base de tudo. Agradeço a Deus todos os dias por tê-los colocado em minha vida, sem vocês, eu não seria o que sou e nada faria sentido.

Ao meu namorado Jayson por ser o melhor companheiro e amigo que alguém pode ter. Obrigada por me dar força e me ajudar nos momentos mais difíceis desta etapa, por acreditar tanto em mim e me apoiar incondicionalmente sempre. Que durante toda esta caminhada foi meu recanto de paz, confiança, segurança e fé, que me fez acreditar e segurou a minha mão até chegar aqui.

E mesmo aos meus amigos, que alguns chamam de cachorros... Billy Ganho e Meg Maria que sempre me recebem em casa no final de cada dia com tanto amor e carinho, alegrando mesmo os dias mais difíceis.

Eu os amo demais, sem vocês jamais teria concluído mais esta etapa e chegado até este ponto de minha vida. Muito obrigada por tudo!

E ainda aos que conheceram esta doença de perto, ou ainda sofrem com o câncer, que Deus em sua infinita sabedoria um dia permita em fim a descoberta da cura...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos coordenador do Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e docentes deste programa. E ainda às secretárias Vera Nascimento Silva e Áurea Soares Gobi que sempre foram tão prestativas e solícitas.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fatima Cepa Matos, que me abriu as portas do seu laboratório e confiou em mim para esta tarefa, dividindo seus conhecimentos e me guiando. Estes anos de convívio me proporcionaram um enorme crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos, não só científico, mas também aprendizados que levarei para a vida toda.

A Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Rodrigues Garcez, por ter aceitado ser minha co-orientadora e ter sido tão atenciosa em todos os nossos encontros e ainda juntamente ao Prof. Dr. Walmir Garcez por fornecer todas as amostras avaliadas neste estudo e também por toda presteza e gentil colaboração de vocês e de seus alunos que atenciosamente esclareceram todas as dúvidas que tive, sempre se colocando a disposição; especialmente ao aluno Danilo Tofóli, o qual tive maior contato e me ajudou muito na compreensão química das espécies pelas quais é o responsável.

As minhas amigas de laboratório Danielle, Renata, Júlia, Marillin, Priscila, Mariah e Camila que fizeram com os dias de trabalho fossem mais divertidos e felizes, sempre dispostas a ajudar, compartilhando os aprendizados e também as dificuldades do caminho.

A Prof^ª. Dr^ª Danielle Bogo que me passou tudo que pode do seu conhecimento sobre cultura e manutenção de células desde os primeiros dias de estágio e a Prof^ª. Dr^ª Renata Trentin Perdomo que também me ensinou muito a respeito de tudo que sabia sobre cultura, linhagens não-aderentes, ensaio de topoisomerase e que ainda hoje continua a nos auxiliar no laboratório quando preciso. Ambas foram queridas amigas de laboratório com as quais aprendi muito e agradeço por todo carinho que vocês sempre tiveram comigo.

Aos colegas da Biomol: Manoel e Andressa, as funcionárias Kelly e Fernanda (Biomol) e também Regina, Liliane e Rita (LAC), por todos os serviços prestados, pedidos atendidos prontamente e atenção que sempre me dispensaram.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para o adiantamento e conclusão deste trabalho... Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Só se vê bem com o coração. O que é essencial é invisível aos olhos... Os homens esqueceram esta verdade. Mas você não deve esquecê-la.”

Antoine de Saint-Exupéry - O Pequeno Príncipe.

RESUMO

Produtos naturais são utilizados no tratamento de diversas doenças, inclusive no combate a vários tipos de câncer. O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta uma flora rica e diversificada, fonte de inúmeras espécies exploradas na busca de novas substâncias com atividade biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anticâncer *in vitro* de oito espécies vegetais de Mato Grosso do Sul. A atividade antiproliferativa foi avaliada através do teste de citotoxicidade com o corante sulforodamina B (SRB). Na triagem inicial de 12 extratos foi utilizada a linhagem B16-F10 (melanoma murino). Os oito extratos ativos tiveram suas fases e compostos originados destes extratos avaliados adicionalmente, em seis linhagens de células neoplásicas humanas: MCF-7 (mama), PC-3 (próstata), 786-0 (rim), HT-29 (cólon), UACC-62 (melanoma humano), NCI/ADR-RES (ovário resistente a múltiplas drogas) e uma linhagem de células não neoplásicas - NIH/3T3 (fibroblasto murino) para determinação do Índice de Seletividade. Dentre os resultados obtidos, destaca-se o de uma γ -lactona di-hidroxilada isolada da fração diclorometânica das folhas de *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae), substância da classe dos butanolídeos, que foi ativa em PC-3, HT-29, MCF-7 e UACC-62, com valores de GI_{50} de $9,95 \pm 2,05$; $5,11 \pm 1,98$; $3,74 \pm 0,85$ e $3,35 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também foram ativos os extratos etanólico e hexânico das raízes de *Annona dioica* (Annonaceae) que demonstraram alta seletividade para a linhagem MCF-7. O extrato diclorometânico desta espécie foi ativo contra todas as linhagens neoplásicas avaliadas, destacando-se a GI_{50} de $0,24 \pm 0,005$ $\mu\text{g/mL}$ na linhagem de ovário resistente a múltiplas drogas, em comparação ao valor para doxorrubicina ($2,99 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$), além da alta seletividade para esta mesma linhagem tumoral em relação à linhagem de células normais. Os resultados expressivos obtidos para *A. dioica* provavelmente estão relacionados à presença de compostos da classe das acetogeninas nos extratos. Os extratos de *Aniba heringerii* (Lauraceae), *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae) e *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae), de maneira geral, apresentaram moderada atividade. As espécies investigadas se mostraram promissoras como fontes de novos quimioterápicos, tendo-se em vista os resultados relevantes apresentados contra células originárias de vários tipos de câncer.

Palavras-chave: produtos naturais, citotoxicidade, câncer, sulforodamina B.

ABSTRACT

Natural products are used in the treatment of many diseases, including several types of cancer. Mato Grosso do Sul's rich, diverse flora has been explored for new substances with biological activity. The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the anticancer potential of eight plant species from this Brazilian state. The cytotoxicity test with sulforhodamine B (SRB) was employed to evaluate their antiproliferative activities. Twelve extracts were initially screened against B16-F10 (murine melanoma) cells. The fractions and compounds obtained from the eight active extracts were further evaluated against six human neoplastic cell lines—namely, MCF-7 (breast), PC-3 (prostate), 786-0 (kidney), HT-29 (colon), UACC-62 (melanoma), NCI/ADR-RES (ovarian, multidrug-resistant)—and non-neoplastic NIH/3T3 cells (murine fibroblasts) to determine selectivity index values. Noteworthy results were obtained for a dihydroxylated γ -lactone (a butanolide) isolated from the dichloromethane fraction of the leaf extract of *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae), which proved active against PC-3, HT-29, MCF-7, and UACC-62 cells, with GI_{50} values of 9.95 ± 2.05 , 5.11 ± 1.98 , 3.74 ± 0.85 , and 3.35 ± 1.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The ethanol and hexane extracts of *Annona dioica* roots (Annonaceae) were highly selective against the MCF-7 line. The dichloromethane extract of this species was active against all neoplastic lines tested, with a GI_{50} value of 0.24 ± 0.005 $\mu\text{g/mL}$ against the multidrug-resistant NCI/ADR-RES line, compared with 2.99 ± 0.4 $\mu\text{g/mL}$ for doxorubicin (the positive control), in addition to demonstrating high selectivity against this tumoral cell line, relative to normal cells. The relevant results obtained with *A. dioica* were probably related to the presence of acetogenins in its extracts. Overall, the extracts of *Aniba heringerii* (Lauraceae), *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae), and *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae) exhibited moderate activity. The species investigated are promising sources of new chemotherapeutic agents, as demonstrated by the results obtained using different cancer cell lines.

Keywords: natural products, cytotoxicity, cancer, sulforhodamine B.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Relação das amostras testadas de cada família e espécie avaliada 33
- Tabela 2 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ para a linhagem neoplásica B16-F10 (melanoma murino) na triagem dos extratos de cada da espécie avaliada e do controle positivo Doxorrubicina 38
- Tabela 3 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares..... 40
- Tabela 4 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Aniba heringerii* (Lauraceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares..... 45
- Tabela 5 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Annona dioica* (Annonaceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares..... 50
- Tabela 6 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares..... 55
- Tabela 7 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares 58
- Tabela 8 - Valores de GI₅₀ (µg/mL) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste das espécies *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* (Erythroxylaceae) e *Diplokeleba floribunda* (Sapindaceae), além e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares 63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Inflamação e as etapas da tumorigênese. Adaptado de Grivennikov; Greten; Karin, 2010..... 17
- Figura 2 - Etapas do experimento no decorrer do tempo. Adaptado de Cândido-Bacani *et al.*, 2013 36
- Figura 3 - Células da linhagem neoplásica humana de próstata - PC-3. Controle negativo (células não tratadas) e Controle positivo (células tratadas com Doxorrubicina na concentração de 25 µg/mL), após 48 horas de incubação 37
- Figura 4 - Estruturas químicas das γ -lactonas 1, 2 e 3 isoladas da fase diclorometânica do extrato bruto das folhas de *Mezilaurus crassiramea*..... 41
- Figura 5 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas as quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) dos compostos γ -lactônicos **1, 2 e 3** de *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae) 42
- Figura 6 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas a quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) da fase hexânica das folhas e do espatulenol oriundo desta fase de *Aniba heringerii* (Lauraceae) 46
- Figura 7 - Estrutura química dos compostos espatulenol, benzoato de benzila e salicilato de benzila, isolados da fase hexânica das folhas..... 47
- Figura 8 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas às quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) dos extratos de *Annona dioica* (Annonaceae). 51
- Figura 9 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas às quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) da Fase acetato de etila de *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae)..... 56

Figura 10 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas às concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) das amostras de *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae)..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

786-0	Linhagem de células neoplásicas humana de rim
B16-F10	Linhagem de células neoplásicas murina de melanoma
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo - Doxorrubicina (Eurofarma)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium - meio de cultura
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
HT-29	Linhagem de células neoplásicas humana de cólon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
MCF-7	Linhagem de células neoplásicas humana de mama
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCI	National Cancer Institute
NCI/ADR-RES	Linhagem de células neoplásicas humana de ovário expressando resistência a múltiplas drogas
NIH/3T3	Linhagem de células normais murina - fibroblasto

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PC-3	Linhagem de células neoplásicas humana de próstata
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute - meio de cultura
SD	Desvio padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforodamina B
T	Placa-teste - medida da absorbância das células tratadas
T0	Tempo zero - Controle do crescimento celular no dia da adição das amostras
TCA	Ácido tricloroacético
UACC-62	Linhagem de células neoplásicas humana de melanoma
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo
XTT	Hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-fenilamina)carbonil]- 2H-tetrazólio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Câncer	15
2.2 Cultura de células e ensaios celulares	18
2.3 Compostos naturais.....	20
2.4 Família Lauraceae	21
2.5 Família Annonaceae	24
2.6 Família Apocynaceae	26
2.7 Família Asteraceae	27
2.8 Família Erythroxylaceae	29
2.9 Família Sapindaceae	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Obtenção das amostras	33
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anticâncer dos compostos	34
4.2.1 Cultura de células	34
4.2.2 Preparo das amostras-teste	35
4.2.3 Teste de citotoxicidade	35
4.2.4 Índice de seletividade.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Família Lauraceae.....	40
5.1.1 <i>Mezilaurus crassiramea</i>	40
5.1.2 <i>Aniba heringerii</i>	45
5.2 Família Annonaceae	50
5.2.1 <i>Annona dioica</i>	50
5.3 Família Apocynaceae	55
5.3.1 <i>Macrosiphonia petraea</i>	55
5.4 Família Asteraceae	58
5.4.1 <i>Vernonia rubricaulis</i>	58
5.5 Família Erythroxylaceae e Família Sapindaceae	63
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados no tratamento de diversas doenças agudas e crônicas, inclusive no combate a vários tipos de câncer (ISSA *et al.*, 2006). As indústrias farmacêuticas apresentam grande interesse em utilizar plantas medicinais, visando explorar seu potencial terapêutico e econômico (MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007).

Dentre os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, cerca de 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semi-sintéticos; aproximadamente 24% são sintéticos, contudo, com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de substâncias naturais. Deste modo, a maioria dos medicamentos lançados neste período é derivada de produtos naturais, mostrando que essa fonte é de grande relevância nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos (BRANDÃO *et al.*, 2010; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Newman e colaboradores (2003) expõem que medicamentos derivados de substâncias naturais são capazes de tratar por volta de 87% das enfermidades humanas categorizadas, incluindo as indicadas como antibacterianas, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressoras e anticancerígenas.

Inúmeros fármacos empregados no tratamento do câncer são de origem vegetal e consistiram em protótipos para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer, tais como, vimblastina, vincristina, taxol, camptotecina (MANTLE *et al.*, 2000).

Brandão e colaboradores (2010) expõem que a cada cinco mil estruturas químicas testadas, apenas uma vem a se tornar um medicamento de fato. Se menos de 10% das espécies de plantas foram avaliadas de alguma forma, seja fitoquimicamente ou com relação a suas atividades biológicas, muitos fármacos de origem vegetal ainda estariam por serem descobertos, especialmente os anticâncer.

A necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de doenças como o câncer, o HIV, doenças infecciosas e uma série de outras doenças é urgente e demanda uma vasta investigação e exploração das possibilidades, sendo a natureza parte fundamental neste processo de busca, no qual os produtos naturais são fonte importante de novos agentes farmacêuticos e moléculas bioativas (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O Brasil é portador de uma das floras mais ricas do mundo, fonte substancial de produtos naturais com finalidades terapêuticas, sendo a fitoterapia difundida no país principalmente pelo povo indígena (MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007; SOUZA *et al.*, 2008).

O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta uma flora rica e diversificada, fonte de inúmeras espécies exploradas na busca de novas substâncias com atividade biológica. Diversas plantas ocorrentes no Cerrado e Pantanal do Estado vêm sendo estudadas por pesquisadores da UFMS, com destaque para algumas espécies pertencentes às famílias Lauraceae, Annonaceae, Apocynaceae e Asteraceae, que através de estudos biomonitorados são avaliadas na busca de novas substâncias bioativas, especialmente contra o câncer. O estudo de compostos com atividade anticâncer com substâncias oriundas de plantas da região têm sido fonte expressiva de publicações (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 2005; GARCEZ *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; SIMIONATTO *et al.*, 2010).

Deste modo, no presente estudo foi avaliada a atividade anticâncer *in vitro* dos extratos etanólicos, fases resultantes da partição dos extratos, substâncias puras e óleos essenciais de espécies vegetais de Mato Grosso do Sul, pertencentes às quatro famílias referidas, no intuito de esclarecer suas atividades biológicas, de modo a possibilitar o surgimento de novos agentes terapêuticos.

O modelo de cultura de células foi utilizado para avaliar a citotoxicidade frente às linhagens células de neoplásicas, o qual permite observar os padrões de crescimento celular em condições controladas, evidenciando a atividade antiproliferativa dos compostos, ampliando o conhecimento sobre plantas com potencial atividade anticâncer em Mato Grosso do Sul e contribuindo para o desenvolvimento científico-regional do Estado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Definido de inúmeras maneiras, a palavra câncer em si faz referência aos grossos vasos sanguíneos que alimentam o tumor, lembrando as garras de um caranguejo; visualização da angiogênese, a partir da observação de Hipócrates (FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006). Portanto, derivado do latim *caranguejo*, representa “aquele que se agarra a qualquer parte daquilo que se apodera” (KUMAR *et al.*, 2005).

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças. Dividindo-se desordenadamente, as células do câncer invadem tecidos e órgãos, formando tumores malignos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011)

O câncer é caracterizado pelo comportamento inadequado da célula, que surge da quebra do equilíbrio celular, após uma sequência de alterações genéticas nas células, causadas por fatores tóxicos ambientais, ou mesmo fatores internos da própria célula, levando após sucessivas mutações a uma perda do controle de seus mecanismos, fazendo que de forma autônoma prolifere desordenadamente e migre, resultando em invasão tecidual e possível metástase (ALBERTS *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2005).

No final do século XIX e início do século XX, David Von Hansemann e Theodor Boveri observando a divisão de células cancerígenas, notaram a presença de aberrações cromossômicas. A partir disto, foi proposto que os tumores seriam clones de células anormais, caracterizadas por anormalidades no material genético, o que foi apoiado posteriormente pela demonstração de que agentes que danificam o DNA e geram mutação também causam o câncer, após a descoberta do DNA como material molecular de herança e determinação de sua estrutura (STRATTON *et al.*, 2009).

De acordo com o tipo de célula normal que o originou, independente dos tecidos que tenha migrado, o câncer recebe uma classificação primária. O sufixo “oma” denota tumor, sendo que quase todos se enquadram em um dos seguintes grupos, conforme relatam Almeida e colaboradores (2005):

- Carcinomas, Sarcomas, Linfomas, Leucemias, Mielomas, Melanomas, Gliomas, Neuroblastomas, Tumores das células germinativas.

As alterações que ocasionam as neoplasias podem ocorrer em genes especiais, a princípio inativos em células normais, denominados proto-oncogenes, que quando ativados, transformam-se em oncogenes, responsáveis pela transformação das células normais em células tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer é o resultado de um processo de evolução darwiniana ocorrendo entre populações de células dentro de microambientes, fornecidos pelos tecidos de um organismo multicelular, baseado em dois processos constituintes: a aquisição contínua de variação genética hereditária em células individuais e por mutações aleatórias e/ou seleção natural atuando sobre a diversidade fenotípica resultante. A seleção pode eliminar as células que adquiriram mutações deletérias ou pode promovê-las carregando alterações que lhe conferem a capacidade de proliferar e sobreviver de forma mais eficaz do que as demais (STRATTON *et al.*, 2009).

O processo de formação do câncer, a carcinogênese, ocorre lentamente na maioria dos casos. Uma célula cancerosa pode levar anos para originar um tumor detectável, passando por vários estágios. O estágio de **iniciação** é o primeiro do processo de carcinogênese, onde o agente carcinogênico (oncoiniciador) atua sobre as células provocando alterações genéticas. Segue-se então o estágio de **promoção**, passando a atuar os agentes carcinogênicos oncopromotores, que após longo e contínuo período de contato com as células já geneticamente modificadas, as transformam gradualmente em células malignas. Por fim, dá-se o estágio de **progressão**, processo irreversível, onde a multiplicação das células já esta descontrolada, evoluindo até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os tumores não são capazes de crescer além de um tamanho crítico ou fazer metástase para outro órgão sem a presença de vasos sanguíneos e dependem da angiogênese local para se proliferar. Da mesma forma, sem um fornecimento eficiente de sangue, não é possível distribuir drogas anticâncer para todas as regiões de um tumor em quantidades eficazes (CALUX *et al.*, 2001; CARMELIET; RAKESH, 2000).

A angiogênese consiste na criação de novos capilares a partir de vasos preexistentes, processo que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, sendo a proliferação de células endoteliais baixa em adultos. Porém, a angiogênese pode voltar a se intensificar devido a processos patológicos como crescimento tumoral. A indução da angiogênese, portanto,

constitui etapa importante no processo de carcinogênese (CALUX *et al.*, 2001; PLATE *et al.*, 1993).

A inflamação também atua em diferentes pontos ao longo do percurso de progressão tumoral (tumorigênese) e pode contribuir para a iniciação do tumor por meio de mutações, instabilidade genômica e modificações epigenéticas; proliferação de células pré-malignas e aumento da sobrevivência; estímulo da angiogênese e eventualmente também podem promover a propagação metastática (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010) - Figura 1.

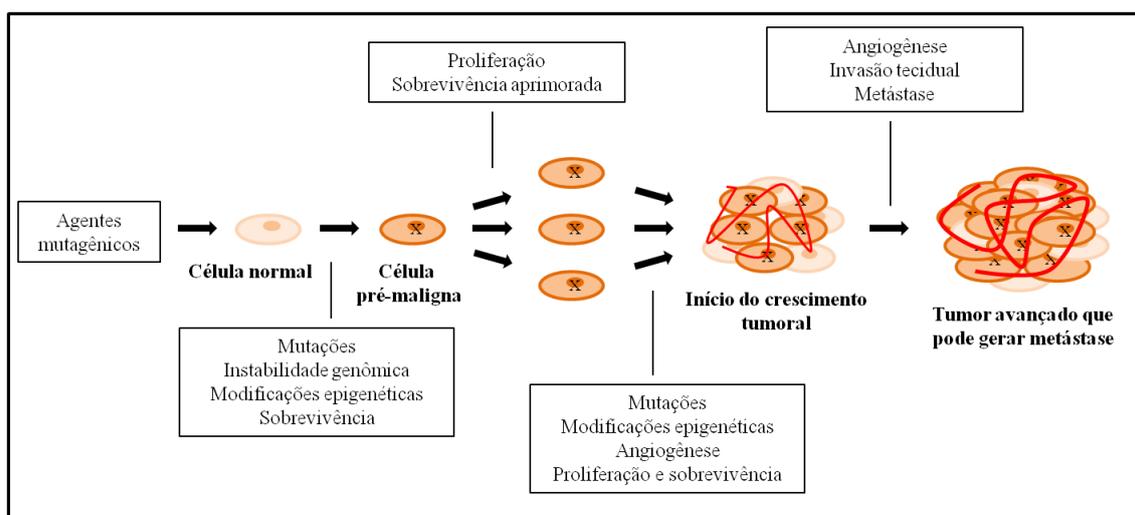


Figura 1. Inflamação e as etapas da tumorigênese. Adaptado de Grivennikov; Greten; Karin, 2010.

Superado apenas por doenças cardiovasculares, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, na população da maioria dos países desenvolvidos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em nível global, o câncer foi responsável por cerca de 8,2 milhões de mortes em 2012. Estima-se a ocorrência de 27 milhões de casos incidentes de câncer até 2030, dos quais 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com a doença (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

As estimativas para o Brasil no ano de 2012, válidas também para 2013, apontaram a previsão de mais de 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a dimensão do problema do câncer no país (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

Para 2014, as estimativas do INCA e do Ministério da Saúde são de mais de 576 mil novos casos no Brasil, mostrando um aumento no número de casos previstos quando

comparado aos anos anteriores, apontado como consequência de um processo de envelhecimento da população brasileira. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, as taxas de morte por câncer crescem devido à maior exposição dos indivíduos a agentes cancerígenos, a partir do processo de industrialização global, que modificou os padrões de vida, refletindo diretamente no perfil epidemiológico das populações, em muitas, diminuindo doenças infecciosas concomitantemente ao aumento de doenças crônico-degenerativas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011). O aumento da expectativa de vida da população influencia o aumento da incidência do câncer, que é favorecido pelo envelhecimento do organismo (CAIRNS, 1981).

2.2 Cultura de células e Ensaios celulares

Através de metodologias de isolamento e identificação de compostos de fontes naturais recentes e cada vez mais modernas, foi possível o aumento no número de novas substâncias bioativas, com inúmeras indicações terapêuticas. Paralelo a esse progresso, desenvolveram-se métodos de *screening* biológicos, que permitem testar *in vitro* milhares de substâncias frente a alvos biológicos específicos em curto espaço de tempo (BRANDÃO *et al.*, 2010).

O cultivo celular permitiu até hoje grande avanço nas descobertas científicas, proporcionando maior compreensão de mecanismos moleculares da célula, o que contribuiu especialmente para exploração da biologia de células tumorais (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Inicialmente, as células eram cultivadas apenas em monocamada; sendo esta técnica aperfeiçoada, originou-se a cultura de células em 3 dimensões (3D), através dos trabalhos iniciais de Johannes Holtfreter, Aron Arthur Moscona e Joseph Leighton. (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Na pesquisa de agentes antineoplásicos, os testes *in vitro* são amplamente utilizados. Os métodos mais empregados na investigação antitumoral são os ensaios de citotoxicidade em cultura de células, para avaliação da atividade anticâncer dos compostos testados (HOUGHTON *et al.*, 2007). A citotoxicidade dos compostos é avaliada por parâmetros que incluem, desde morte, até alteração de metabolismo celular (FRESHNEY, 2005).

Uma das vantagens dos testes de citotoxicidade *in vitro* é restringir os ensaios *in vivo*, reduzindo o uso de animais ao menos na fase de triagem das pesquisas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Além disso, também apresentam boa reprodutibilidade, fácil execução e baixo custo relativo à sua relevância científica (SKEHAN *et al.*, 1990).

O rastreamento de produtos naturais biologicamente ativos requer o uso de um bioensaio adequado, pois a detecção de compostos com a atividade desejada em um complexo de extratos de plantas depende da confiabilidade e da sensibilidade dos sistemas de ensaio utilizados (HOSTETTMANN, 1998).

Diversas metodologias são empregadas para desenvolvimento dos ensaios de citotoxicidade, algumas inovadoras, pois evitam o uso de materiais radioativos, como a contagem celular e os processos colorimétricos (HENRIKSSON *et al.*, 2006).

Ensaio colorimétricos de viabilidade celular são ferramentas importantes no estudo de atividade das células eucarióticas. Alguns dos testes colorimétricos mais utilizados são o MTT que envolve técnicas utilizando o sal de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, descrito por Mosmann (1983) e com corante sulforodamina B (SRB) conforme Skehan *et al.*, (1990), amplamente utilizados pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) em sua rotina de triagem de drogas anticâncer (HOUGHTON *et al.*, 2007). Mas há outros diferentes tipos de ensaios colorimétricos como: XTT, alamarBlue, vermelho neutro e cristal violeta (HENRIKSSON *et al.*, 2006).

O teste MTT é usado para análise quantitativa de proliferação e sobrevivência de células de mamíferos (MOSMANN, 1983). Este método mede indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática, avaliando o número e a atividade das células vivas, através da transformação do sal de tetrazólio de coloração amarelo claro em um produto denominado formazan, de coloração azul escuro, através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (LIMA *et al.*, 2006; MOSMANN, 1983).

O ensaio com sulforodamina B (SRB) é utilizado para determinação da densidade celular, baseado na captação da carga negativa (aminoxantina rosa). O SRB é um corante com habilidade de se ligar a componentes protéicos celular e especificamente se liga aos resíduos de aminoácidos das proteínas dentro das células fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA) e, portanto, diferentemente do MTT, o método independe da atividade metabólica celular. Quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e maior é o valor da

absorbância. Este ensaio permite que as placas sejam estocadas, sendo assim, a leitura pode ser realizada posteriormente (HOUGHTON *et al.*, 2007; SKEHAN *et al.*, 1990).

A citotoxicidade também pode ser determinada através de métodos que avaliam as variações da morfologia celular, por observação direta em microscopia óptica dos danos causados às células, decorrentes do efeito das drogas; a viabilidade é medida utilizando-se corantes como o azul de tripan e a eosina (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

2.3 Compostos Naturais

A natureza tem sido recurso para atender às necessidades básicas do homem ao longo do tempo, formando a base de sofisticados sistemas tradicionais de medicina. Particularmente as plantas têm registros de uso medicinal que datam de 2600 a.C. na Mesopotâmia, documentando o uso de mais de 1000 produtos derivados de plantas. Mais tarde a civilização Greco-Romana também contribuiu substancialmente para a utilização de medicamentos desenvolvidos à base de plantas no mundo Ocidental antigo, através dos relatos de Dioscórides (100 d.C.) na Grécia e Galeno (130-200 d.C.) em Roma (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Nas últimas décadas, grande parte das pesquisas para descoberta de novas drogas está voltada a procura de agentes potenciais para prevenção ou tratamento do câncer (HOUGHTON *et al.*, 2007) e os compostos naturais têm sido fonte importante destes agentes, visto que muitas plantas apresentam propriedades anticâncer admiráveis (LIMA *et al.*, 2006).

A partir de uma análise de trabalhos etnobotânicos publicados entre 1980 e 2008, Melo *et al.*, (2011) descrevem plantas medicinais que têm sido relatadas como anticâncer, onde 84 espécies são citadas como sendo utilizadas para o tratamento e prevenção do câncer seja de um modo geral ou contra algum tipo de tumor específico.

A triagem de produtos naturais tem guiado inúmeras pesquisas na busca de substâncias promissoras para obtenção de novas drogas antineoplásicas (MAGALHÃES, 2005). Nesta área de pesquisa anticâncer, 74% das substâncias introduzidas como fármacos até 2003 derivaram de produtos naturais (ROUHI, WASHINGTON, 2003).

As mortes por câncer estão projetadas para continuar a subir, sendo que mais de 70% ocorrem em países de baixa e média renda, que não possuem recursos suficientes para diagnóstico, tratamento e prevenção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). A

completa eliminação dos tumores é um dos grandes desafios da medicina e resultados promissores têm sido obtidos com várias espécies vegetais no Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, foi possível a vários pesquisadores identificar e/ou isolar compostos bioativos que exibem atividade anticâncer, explorando o fracionamento de extratos por meio de atividades biomonitoradas, através de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, podendo levar a avaliações *in vivo* quando há interesse, revelando centenas de compostos com atividade anticâncer (MANGAL *et al.*, 2013).

No que diz respeito a espécies ocorrentes em Mato Grosso do Sul, várias apresentaram substâncias com potencial atividade anticâncer (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 2005; GARCEZ *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; SIMIONATTO *et al.*, 2010).

2.4 Família Lauraceae

Composta em sua maioria por árvores e arbustos, a família Lauraceae está distribuída em regiões tropicais e subtropicais do planeta, predominante nas Américas, Ásia, Austrália e Madagascar, além de algumas espécies no sul da África. Ecológica e economicamente importante, possui 52 gêneros e cerca de 2750 a 3000 espécies, muitas de alto rendimento, produtoras de óleos essenciais, com madeiras de qualidade, estando também presentes na medicina tradicional e na culinária (ALCÂNTARA *et al.*, 2010; BROTTTO *et al.*, 2009; VAN DER WERFF; RITCHER, 1996). No Brasil ocorrem cerca de 400 espécies representantes de 22 gêneros (LORENZI; SOUZA, 2008).

Um expressivo número de espécies de Lauraceae apresenta grande diversidade de uso, muito mencionadas na literatura em levantamentos etnobotânicos, por serem amplamente utilizadas, sobretudo na medicina e cozinha popular, como exemplo: *Cinnamomum zeylanicum*, *Laurus nobili* e *Persea americana*, respectivamente a canela, o louro e o abacate (BARATA-SILVA; MACEDO; GOMES, 2005; MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007; MARQUES, 2001; PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2004).

Padrón Márquez (2010) demonstra que os componentes bioativos da canela possuem marcada atividade antimicrobiana frente a várias cepas bacterianas e efeito citotóxico sobre a linhagem de células neoplásicas de mama (MCF-7). A família Lauraceae é destacada ainda,

por outras espécies citadas por atividades biológicas como antimicrobiana (CATÃO *et al.*, 2005), inseticida (PRIETO *et al.*, 2010), antifúngica e antioxidante (DE OLIVEIRA LIMA *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2009), de atuação no sistema de reparo de DNA (CARBONEZI *et al.*, 2004), larvicida, promissora no controle e prevenção de *Aedes aegypti* (ARAÚJO, 2012), dentre outras.

Esta família é considerada muito rica em metabólitos secundários pertencentes às classes das lignanas e neolignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos, e pironas (GARCEZ *et al.*, 2011).

Compostos da classe dos butanolídeos também são muito citados na família Lauraceae. Butanolídeos extraídos das raízes de *Aiouea trinervis* (Lauraceae), o epilitsenolídeo C₁ e a isoobtusilactona A, demonstraram atividade antiproliferativa frente a uma linhagem de células tumorais - Hep2 (laringe) importante efeito genotóxico (GARCEZ *et al.*, 2005).

Em estudo da espécie *Cinnamomum kotoense*, o butanolídeo isokotomolídeo A, isolado a partir das folhas, apresentou atividade antiproliferativa em células neoplásicas de pulmão (A549), inibindo sua proliferação por bloquear a progressão do ciclo celular e induzir apoptose (CHEN *et al.*, 2007).

O butanolídeo extraído do caule de *Cinnamomum subavenium*, o isolinderanolídeo B, apresentou potencial para o tratamento de câncer, avaliado pelo ensaio do XTT contra uma linhagem de células de câncer de bexiga humana T24. Foi observado um efeito inibidor de proliferação dose-dependente, que demonstrou claramente a atividade citotóxica do composto sobre as células T24, indicando ainda que possa desempenhar papel importante no processo de apoptose destas células (SHEN *et al.*, 2011).

E ainda outro butanolídeo, linderanolídeo E, isolado a partir do tronco da espécie *Machilus obovatifolia*, apresentou citotoxicidade contra várias linhagens de células tumorais como P-388 (leucemia), KB16 (carcinoma epidermóide de boca), A549 (pulmão) e HT-29 (cólon) (TSAI *et al.*, 2001).

Distribuído na região tropical sul-americana (MORAES, 2005), especialmente na Amazônia e região das Guianas, o gênero *Aniba* está entre os que apresentam maior número de espécies de importância econômica dentro da família Lauraceae, particularmente na indústria de perfumes. No Brasil ocorrem 41 espécies deste gênero, que se destacam não só

por seu alto valor econômico, mas por serem constituídas de grande quantidade de óleos essenciais em sua casca e lenho (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000; MARQUES, 2001).

Os óleos essenciais, no geral, possuem propriedades: não só antioxidantes, mas também pró-oxidantes, base da capacidade citotóxica, sendo eficientes na redução da proliferação de células tumorais, que ainda os tornam excelentes anti-sépticos e antimicrobianos, conhecidos por diversas atividades biológicas como antifúngica, antiviral e antimutagênica que pode ser relacionada também com a atividade anticâncer (BAKKALI *et al.*, 2008).

Um dos compostos presentes nos óleos essenciais, com atividade citotóxica, é o monoterpeneo linalool, encontrado na espécie *Aniba rosaeodora*, o qual demonstrou efeito citotóxico em células tumorais (SAMPAIO *et al.*, 2012; SIMIĆ *et al.*, 2004; SCER *et al.*, 2011).

O gênero *Aniba* também tem suas espécies evidenciadas por serem empregadas como medicinais, apresentando, por exemplo, atividade antibiótica, bloqueadora do desenvolvimento de ancilostomídeo humano, antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos experimentais de dor e inflamação; bem como efeitos ansiolítico, anticonvulsivante e ainda antimicrobiano, tóxico contra cepas de *Candida albicans* (CARVALHO, 2011; KLAUSMEYER *et al.*, 2004; MARQUES, 2001; MELO, 2006).

Investigada em nosso estudo, *Aniba heringerii* ocorre em matas de galeria, no cerrado e na caatinga do Brasil, sendo conhecida popularmente como canela ou pau-louro, a espécie é caracterizada por suas flores grandes (MORAES, 2005)

O gênero *Mezilaurus* compreende 18 espécies com distribuição neotropical, espalhadas da Costa Rica ao sudeste do Brasil, a maioria encontrada na área de drenagem do Rio Amazonas e Guiana. Espécies do gênero são exploradas principalmente por conta de sua madeira rígida, utilizada na fabricação de barcos e construções (MORAES, 2005; VAN DER WERFF, 1987).

Um dos gêneros que possuem as menores flores dentro da família Lauraceae, *Mezilaurus* é pouco coletado e a maioria das coleções botânicas possui poucos espécimes (ALVES; BAITELLO, 2008; VAN DER WERFF, 1987). *Mezilaurus crassiramea*, popularmente conhecida como canela-branca, canela-de-goiás, cumbuquinha, itaúba-abacate, é dominante nos Cerrados do Planalto Central brasileiro, é uma espécie bem definida, embora conhecida de poucas coleções procedentes de cerrado (MORAES, 2005).

2.5 Família Annonaceae

Com distribuição pantropical, a família Annonaceae compreende cerca de 120 gêneros, dos quais 34 podem ser encontrados na América do Sul, e entre 2000- 2200 espécies, constituída de árvores e arbustos. Muitos membros desta família são utilizados na medicina popular para diversos fins, além de ser produtora de vários frutos, óleos comestíveis derivados de algumas sementes e ainda as flores que são usadas na perfumaria, fazendo da família Annonaceae um grupo de grande importância (FECHINE *et al.*, 2002; PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004; VEGA *et al.*, 2007).

No Brasil, encontram-se 26 gêneros representantes desta família, os quais desempenham papel importante na sua composição vegetal, a maioria ocorrendo em florestas, sendo poucos os indivíduos em áreas abertas (MAAS *et al.*, 2001).

As partes aéreas e raízes destas plantas são muito úteis na nutrição e na medicina tradicional. No que se refere ao uso medicinal, estudos relatam diferentes atividades biológicas para espécies de anonáceas, observando atividade antileishmania (RAYNAUD-LE GRANDIC *et al.*, 2004), antioxidante e citoprotetora (BARRECA *et al.*, 2011), citotóxica, apresentando potencial antitumoral (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999; FORMAGIO *et al.*, 2013b; SILVA *et al.*, 2007), anti-inflamatória (FORMAGIO *et al.*, 2013a; FORMAGIO *et al.*, 2013b), antiviral (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999) e ainda um estudo expõe sobre a eliminação de radicais livres, atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e hipoglicemiante, atribuindo estes efeitos à presença de flavonoides no extrato e frações avaliados (FORMAGIO *et al.*, 2013a).

A família Annonaceae é caracterizada pela presença de terpenoides, alcaloides e óleos essenciais (DA SILVA *et al.*, 2009); mas polifenóis e outros compostos aromáticos também são normalmente encontrados nestas plantas. No passado os estudos químicos e farmacológicos de plantas da família Annonaceae estavam envolvidos na busca de alcaloides, porém na última década o interesse tem se voltado para o estudo das acetogeninas (VEGA *et al.*, 2007).

Encontrados em diferentes espécies de anonáceas, os alcaloides aporfínicos e oxaporfínicos apresentam inúmeras atividades biológicas e farmacológicas. (SILVA *et al.*, 2007).

Acetogeninas também são amplamente descritas em espécies da família e do gênero *Annona*. Quimicamente, são derivados de ácidos graxos de cadeia longa (C32 ou C34),

destacadas por uma infinidade de aplicações, especialmente como pesticida, mas também por apresentarem alta citotoxicidade em linhagens neoplásicas *in vitro* e ainda atividade antitumoral *in vivo*, consideradas um dos mais potentes inibidores mitocondriais (MCLAUGHLIN *et al.*, 2008; NAKANISHI *et al.*, 2003).

Estão sendo feitas pesquisas com substâncias híbridas de acetogeninas e inseticidas visando o complexo I mitocondrial e os resultados são promissores na área anticâncer. Estes compostos híbridos foram avaliados contra 39 linhagens de células tumorais de diferentes origens, dentre elas, células de câncer de mama, sistema nervoso central, cólon, pulmão, ovário, rim, estômago, próstata e melanoma, revelando excelente atividade antitumoral (KOJIMA *et al.*, 2013).

A atividade citotóxica é amplamente descrita em espécies do gênero. Em avaliação do óleo essencial das folhas de *Annona silvatica* a atividade antiproliferativa é apresentada frente a nove linhagens de células tumorais, sendo elas: U-251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário resistente), 786-0 (rim), NCI-460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário) e HT-29 (cólon) (FORMAGIO *et al.*, 2013b).

Amplamente distribuída na América do Sul, estendendo-se desde a Bolívia até o Paraguai, *Annona dioica* é uma espécie arbustiva que possui frutos muito apreciáveis, conhecida popularmente como "ceraticum", "arixicum" e "ariticum". No Brasil suas folhas e frutos são utilizados contra reumatismo e suas sementes no combate a diarreia, enquanto no Paraguai, as folhas são utilizadas para fazer chás ou gargarejos com efeito anti-catarral; os frutos, além de comestíveis, possuem propriedades sedativas e as sementes são empregadas no tratamento de infecções de pele por parasitas e ainda como inseticidas (FORMAGIO *et al.*, 2013a; VEGA *et al.*, 2007).

Annona dioica, através dos extratos e frações *n-hexano*, *clorofórmio*, *metanólica* e *aguosa* de diferentes partes da planta como: cerne, casca do caule, cerne subterrâneo, casca do caule subterrâneo e folhas, foi avaliada no estudo de Mahmoud e colaboradores (2011). Por meio do ensaio colorimétrico MTT as frações foram testadas contra as linhagens HCT-8 (carcinoma de cólon humano), MDA-MB-435 (melanoma) e SF-295 (glioblastoma) e apresentaram elevada atividade citotóxica com mais de 75% de inibição do crescimento celular.

Flavonoides e frações isoladas das folhas de *A. dioica* foram testadas quanto a sua ação sobre as topoisomerasas I e II- α humanas, mostrando efeito inibitório do relaxamento do

DNA. Foi avaliado o efeito citotóxico destes compostos contra células do carcinoma de Ehrlich e os resultados revelaram importante atividade antiproliferativa quando comparados a quercetina, o controle positivo utilizado (VEGA *et al.*, 2007).

Em 2003, alguns alcaloides já conhecidos foram isolados do extrato etanólico da madeira de *Annona dioica* (SANTOS; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2003). Posteriormente, Vega e colaboradores (2007) relatam a ocorrência de quatro flavonoides nos constituintes foliares, derivados dos extratos metanólico e hexânico também de *Annona dioica* e mais tarde, outros autores também identificaram flavonoides encontrados nas folhas da mesma espécie a partir do extrato metanólico bruto e suas frações (FORMAGIO *et al.*, 2013a).

2.6 Família Apocynaceae

Apresenta-se com 355 gêneros e mais de 3700 espécies, encontradas principalmente nos trópicos. No Brasil são conhecidas cerca de 400 espécies em 41 gêneros, onde 32 destes são encontrados apenas na Amazônia, (MORALES, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007).

Marcada normalmente pela presença de látex (PEREIRA *et al.*, 2007), a família Apocynaceae é caracterizada por espécies que apresentam inúmeros compostos importantes como os glicosídeos cardiotônicos e os alcaloides indólicos (BARATTO, 2010). É considerada uma importante fonte vegetal de constituintes químicos com propriedades terapêuticas, como os alcaloides da Vinca: vimblastina e vincristina, reconhecidos anticancerígenos isolados das folhas de *Catharanthus roseus*, antigamente conhecida como *Vinca rosea* e popularmente chamada de Vinca (BARATTO, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2010).

Outro gênero importante de Apocynaceae com qualidades medicinais é *Tabernaemontana*. Suas espécies são ricas em alcaloides indólicos monoterpênicos, utilizados como marcadores químicos do gênero, os quais apresentam inúmeras propriedades biológicas, como a atividade antileucêmica *in vitro* relatada de alguns alcaloides isolados de *T. salzmanni*, capazes de induzir morte celular por apoptose em células leucêmicas humanas THP-1 (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Santos e colaboradores (2013) apresentaram um estudo baseado no levantamento bibliográfico referente a 112 trabalhos publicados nos últimos 15 anos (1995-2010) sobre os estudos etnobotânicos, químicos e farmacológicos das espécies de Apocynaceae nas diversas regiões do Brasil. Dentre inúmeras espécies da família referidas como utilizadas

popularmente com fins medicinais, o gênero *Macrosiphonia* aparece relatado através de duas espécies: *M. petraea*, citada como anti-inflamatória e *M. velame*, utilizada para tratamentos de úlceras, gripes, febre, hemorragia, como cicatrizante, entre outros. (CAMPOS; GUARIM-NETO, 2010).

O uso medicinal de espécies do gênero *Macrosiphonia* também é exposto em estudo com *M. velame*, onde efeitos biológicos do extrato hidroetanólico foram avaliados em modelo animal. Os resultados sugeriram atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica, quando avaliados os testes de edema de pata, mostrando atividade tanto na dor de origem inflamatória como neurogênica nos experimentos de nocicepção, atuando ainda como bloqueador da hipertermia induzida por levedura de cerveja, demonstrando ação antipirética (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Macrosiphonia petraea, avaliada no presente estudo e de nome popular velame (JESUS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013) ou velame-branco (GUARIM NETO; MORAES, 2003), também é designada pelas sinonímias *Macrosiphonia verticillata* var. *petrea* e *Mandevilla petrea*. Endêmica no Estado de Mato Grosso do Sul, é comercializada por raizeiros e indicada para tratamento de inflamações, através da ingestão do chá de suas raízes tuberosas (DE ASSIS JUNIOR; GARCEZ; GARCEZ, 2013).

A mesma indicação - utilização no tratamento de inflamações - também é citada em outros estudos: um levantamento etnobotânico na comunidade de Pirizal, MT (JESUS *et al.*, 2009), além de um levantamento bibliográfico referido em parágrafo anterior (SANTOS *et al.*, 2013). A espécie foi também avaliada com relação ao seu efeito fotoprotetor, para verificar a absorção nas regiões ultravioleta A e B - UVA e UVB, embora não tenha apresentado o efeito desejado (VIOLANTE *et al.*, 2009).

2.7 Família Asteraceae

Encontrada em todos os tipos de habitat, mas principalmente nas regiões tropicais da América do Sul, a família Asteraceae possui cerca de 1.600 gêneros compreendendo 25.000 espécies, sendo um dos grupos mais numerosos dentro das Angiospermas (HATTORI; NAKAJIMA *et al.*, 2008; VERDI *et al.*, 2005).

Em levantamento etnobotânico realizado por Maioli-Azevedo e Fonseca-Kruel (2007) em feiras livres do Rio de Janeiro – RJ, dentre 49 famílias citadas, Asteraceae obteve o maior número de espécies utilizadas na medicina tradicional.

As espécies de Asteraceae têm seus constituintes químicos e atividades biológicas largamente estudadas. Inúmeras possuem uma variedade de metabólitos secundários, destacando-se os flavonoides (VERDI *et al.*, 2005).

O gênero *Vernonia* é um dos maiores da família Asteraceae, caracterizado pela alta produção de lactonas sesquiterpênicas (BUSKUHL *et al.*, 2009). No Brasil este gênero é constituído por aproximadamente 200 espécies (PAGNO *et al.*, 2006), das quais há diversos estudos citando variadas atividades biológicas e efeitos terapêuticos como: anti-malária (ABOSI; RASEROKA, 2003), anticâncer (HOWARD *et al.*, 2003; IZEVBIGIE, 2003) e anti-inflamatória (MAZUMDER *et al.*, 2003).

Além das lactonas sesquiterpênicas, também foram encontrados compostos polares solúveis em água em extratos de espécies de *Vernonia*, que demonstraram atividade citotóxica e imunomoduladora (BUSKUHL *et al.*, 2009).

O extrato benzênico de *Vernonia cinerea* mostrou um amplo espectro de atividade antibacteriana (GUPTA *et al.*, 2003). Em outro estudo com a mesma espécie mostrou-se que o extrato metanólico da planta inteira apresentou significativa atividade anti-inflamatória quando comparada aos resultados da droga padrão fenilbutazona (MAZUMDER *et al.*, 2003).

Ainda tratando de *Vernonia cinerea*, os extratos clorofórmio, metanólico e etanólico das folhas avaliados em testes comportamentais e de indução de edema e piroxia em ratos mostraram o potencial analgésico, antipirético e anti-inflamatório, levando os autores a inferir que estes efeitos e alterações observados podem contribuir para a utilização de *V. cinerea* no tratamento da malária (IWALEWA; IWALEWA; ADEBOYE, 2003).

A atividade de *Vernonia amygdalina* foi avaliada a partir do extrato das folhas na linhagem de células tumorais de mama - MCF-7, onde foi demonstrado o potencial inibidor da síntese de DNA e ainda antiproliferativo da espécie (IZEVBIGIE, 2003).

O mesmo efeito antiproliferativo do extrato etanólico das folhas de *V. amygdalina* contra células de câncer de mama foi confirmado em diferente estudo com outra linhagem além de MCF-7, a MDA- MB -231, também de células tumorais mamárias; mostrando inibição dose-dependente do crescimento celular, induzindo apoptose e ainda apresentando

um importante resultado que mostra sinergismo da espécie com a Doxorubicina, um quimioterápico comercial conhecido, apontando seu potencial como terapia complementar ao tratamento corrente (WONG *et al.*, 2013).

Vernonia pachyclada também apresentou atividade anticâncer, através de um fracionamento biomonitorado a partir do extrato etanólico das folhas, que levou ao isolamento de três novas lactonas sesquiterpênicas que apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem de câncer de ovário humano - A2780 (WILLIAMS *et al.*, 2005).

Em uma revisão de plantas com potencial medicinal do gênero *Vernonia*, a espécie *V. amygdalina* foi indicada como a mais utilizada do gênero, especialmente no tratamento da malária e diabetes, enquanto *Vernonia cinerea* foi apontada como a espécie promissora contra o câncer e doenças inflamatórias. Uma classe de lactonas sesquiterpênicas, os vernolídeos, foram identificados como os compostos mais estudados em *Vernonia*, apresentando diversas atividades biológicas, onde vernolídeo A aparece como um dos compostos com maior potencial anticâncer encontrado até agora em espécies do gênero. Porém, para realmente determinar o seu potencial terapêutico, os autores ressaltam a necessidade de novas investigações sobre outras espécies de *Vernonia*, além de estudos adicionais que avaliem outros compostos isolados (TOYANG; VERPOORTE, 2013).

Vernonia rubricaulis avaliada no presente trabalho e cujas propriedades ainda são pouco conhecidas, é um arbusto de 1-2 m de altura, com caule arroxeadado, fino e pouco ramificado e com "batata" lenhosa subterrânea. Com distribuição pela América do Sul, da Colômbia à Argentina e no Pantanal, nas sub-regiões de Poconé, Cáceres, Miranda e Nabileque, esta espécie é comum em áreas alagáveis e solos argilosos. Apesar de quase desconhecida por pecuaristas, é uma planta hepatotóxica para o gado, levando à morte 24 horas após sua ingestão, sendo ainda mais tóxica ao rebrotarem após as queimadas (AFONSO; POTT, 2001).

2.8 Família Erythroxylaceae

Com distribuição pantropical, a família Erythroxylaceae possui cerca de 250 espécies, difundidas em quatro gêneros: *Aneulophus*, *Nectaropetalum*, *Pinacopodium* e *Erythroxylum*, sendo os três primeiros exclusivos da África (LOIOLA *et al.*, 2007; LORENZI; SOUZA, 2008).

A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum*, o maior e mais representativo, com aproximadamente 230 espécies espalhadas nos quatro continentes, sobretudo na América do Sul, especialmente no Brasil e na Venezuela, e ainda na África e na Ilha de Madagascar, onde suas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular (LOIOLA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011; ZANOLARI *et al.*, 2003).

Melhor conhecido pela espécie *Erythroxylum coca*, que produz naturalmente a cocaína, o gênero caracteriza-se quimicamente pela presença de alcalóides do grupo tropano, além de flavonóides, taninos, terpenos e fenilpropanóides (EVANS, 1981; GRIFFIN; LIN, 2000; HEGNAUER, 1981; ZUANAZZI *et al.*, 2001).

Segundo Cazaña-Martinez *et al.* (2004) e Jiménez Alemán *et al.* (2004) espécies de *Erythroxylum* são utilizadas medicinalmente por sua grande variedade de atividades farmacológicas, citadas por possuírem propriedades antiinflamatória, anestésica, analgésica, estimulante, entre outras. Empregadas por índios Kayapós do sul do Pará, no tratamento de queimaduras de “poraquê” (*E. macrophyllum*) e má digestão, assim como anestésico e anti-reumático (*E. suberosum*) (BARBOSA; PINTO, 2003).

Outras espécies como *E. vacciniifolium* e *E. catuaba*, também são muito valorizadas pela população, devido ao uso da casca como remédio para disfunção erétil, sendo que na Paraíba, são muito usadas pela população local como afrodisíacas e estimulantes do sistema nervoso central (ZANOLARI *et al.*, 2003).

Das espécies avaliadas no presente estudo, *Erythroxylum anguifugum* é popularmente conhecido como fruta-de-pomba, tem sua raiz citada como eficaz contra picada de cobra. A espécie *Erythroxylum daphnites* é citada em estudos sendo utilizada como alimento para fauna (DE PAULA *et al.*, 2009; IMAÑA-ENCINAS *et al.*, 2009).

2.9 Família Sapindaceae

Também conhecida como Saponáceas, devido aos frutos e sementes de algumas espécies ricos em saponina, utilizados na fabricação de sabonetes, especialmente *Sapindus saponaria* (GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2000). A família Sapindaceae compreende mais de 2000 espécies em 150 gêneros, sendo a maioria das espécies nativas da Ásia, embora existam algumas na América do Sul, África e Austrália (MENZEL, 2002).

Econômica e popularmente importante, outra espécie representativa, *Paullinia cupana* (o guaraná), é a espécie desta família mais explorada no Brasil (HERCULANO; MATOS, 2008), conhecida por suas propriedades estimulantes e pelo refrigerante produzido a partir de seus frutos, significante no comércio brasileiro (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

Na medicina tradicional, espécies de Sapindaceae são utilizadas como estimulantes, diuréticas, expectorantes, vermífugas, sedativas, contra dores estomacais e no tratamento de dermatites, além de citadas na literatura por ações antiinflamatória, analgésica, antipirética, antimicrobiana e antifúngica de algumas espécies (CAVALCANTI *et al.*, 2001; DOS SANTOS *et al.*, 2010; PENDOTA *et al.*, 2009; TSUZUKI *et al.*, 2007).

Da família Sapindaceae foram isolados saponinas, diterpenos e flavonóides, entre outros metabólitos secundários (TSUZUKI *et al.*, 2007), tais como, sesquiterpenos acíclicos e diterpenos oligoglicosídicos, presentes em diversas espécies desta família usadas na medicina oriental (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

Diplokeleba floribunda popularmente conhecida como canela-de-cotia ou farinha é utilizada como ornamental e para arborização, além do seu uso como lenha e carvão (GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade anticâncer de espécies vegetais de Mato Grosso do Sul.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar a atividade anticâncer em seis linhagens de células neoplásicas humana de extratos, fases resultantes da partição dos mesmos e substâncias puras obtidos de *Mezilaurus crassiramea* e *Aniba heringerii* (Lauraceae), *Annona dioica* (Annonaceae), *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae), *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae), *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* (Erythroxylaceae) e *Diplokeleba floribunda* (Sapindaceae).

3.2.2. Avaliar a seletividade das amostras testadas para as linhagens de células neoplásicas em relação a uma linhagem de células normais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

As amostras testadas no presente estudo consistiram de extratos, fases resultantes de partição dos mesmos, substâncias puras e óleos essenciais das espécies vegetais avaliadas - *Mezilaurus crassiramea*, *Aniba heringerii*, *Annona dioica*, *Macrosiphonia petraea*, *Vernonia rubricaulis*, *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* e *Diplokeleba floribunda* (Tabela 1), gentilmente fornecidos pela equipe dos Profs. Dr^a. Fernanda R. Garcez e Dr. Walmir S. Garcez do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS.

Tabela 1 - Relação de amostras testadas de cada família e espécie avaliada.

Família	Espécie	Parte da Planta	Amostras	
Lauraceae	<i>Mezilaurus crassiramea</i>	Frutos	Extrato bruto	
			Fase diclorometânica	
			Fase hexânica	
			Fase acetato de etila	
			Fase hidrometanólica	
		Folhas	Extrato bruto	
			Fase diclorometânica	
			γ -lactona 1	
			γ -lactona 2	
	Galhos	γ -lactona 3		
		<i>Aniba heringerii</i>	Folhas	Extrato bruto
				Extrato etanólico
				Fase acetato de etila
Fase hexânica				
Benzoato de benzila				
Salicilato de benzila				
Espatulenol				
Óleo Essencial				
Caule	Óleo Essencial			
Annonaceae	<i>Annona dioica</i>	Raiz	Extrato hexânico	
Apocynaceae	<i>Macrosiphonia petraea</i>	Raiz	Extrato diclorometânico	
			Extrato etanólico	
			Extrato etanólico	
			Fase hexânica	
Asteraceae	<i>Vernonia rubricaulis</i>	Folhas	Fase acetato de etila	
			Fase hidrometanólica	
			Extrato etanólico	
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum anguifugum</i>	Casca do caule	Extrato diclorometânico	
			Extrato bruto	
	<i>Erythroxylum daphnites</i>	Casca do caule	Extrato bruto	
			Extrato bruto	
Sapindaceae	<i>Diplokeleba floribunda</i>	Folhas	Extrato etanólico	

As espécies vegetais foram coletadas em diferentes cidades do Estado de Mato Grosso do Sul: *Mezilaurus crassiramea* e *Aniba heringeri* (Campo Grande); *Annona dioica* (Corumbá); *Macrosiphonia petraea* (Bonito); *Vernonia rubricaulis* (Porto Murtinho); *Erythroxylum anguifugum* e (Campo Grande); *Erythroxylum daphnites* (Campo Grande) e *Diplokeleba floribunda* (Corumbá).

Estas espécies são estudadas com relação à sua composição química no LP-1 do Instituto de Química da UFMS e fazem parte de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado em Química da UFMS.

4.2 Avaliação *in vitro* da atividade anticâncer das amostras

4.2.1 Cultura de células

Na avaliação inicial da atividade antiproliferativa das amostras, para triagem dos extratos foi utilizada a linhagem B16-F10 (ATCC-CRL-6322, células de melanoma murino). Posteriormente, fases e compostos originados destes extratos foram testados em seis linhagens de células neoplásicas humanas: MCF-7 (ATCC-HTB-22, adenocarcinoma de mama), PC-3 (ATCC-CRL-1435, adenocarcinoma de próstata), 786-0 (ATCC-CRL-1932, adenocarcinoma de rim), HT-29 (ATCC-HTB-38 adenocarcinoma de cólon), UACC-62 (melanoma humano), NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário resistente). Também foi utilizada uma linhagem de células não neoplásicas - NIH/3T3 (ATCC-CRL-1658, fibroblasto murino) para determinação do Índice de Seletividade.

As células foram doadas pelos Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – UNICAMP e Prof. Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP ou adquiridas do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo (SP) e do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Todas as linhagens estão criopreservadas em nitrogênio líquido. Para os testes de citotoxicidade, as células foram descongeladas e cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² de área contendo meio de cultura RPMI 1640 ou DMEM, penicilina-estreptomicina 1%, suplementados com 10% de soro fetal bovino - SFB (denominado meio completo). Em seguida foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ até a formação da monocamada com pelo menos 80% de confluência (FRESHNEY, 2005).

4.2.2 Preparo das amostras-teste

As amostras-teste foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição nas células, as amostras foram novamente diluídas em meio de cultura, de tal modo que a maior concentração de DMSO utilizada foi de 0,25%, o que não altera a viabilidade celular.

4.2.3 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado conforme o descrito por Skehan *et al.*, (1990).

Quando as células atingiram a confluência necessária, ou seja, quando as células em crescimento formaram uma monocamada de células aderidas à superfície de contato do frasco de cultivo, ocupando pelo menos 80% da área disponível, foi realizado o repique. O repique consiste na desagregação das células através da ação de tripsina e transferência das mesmas para um ambiente (frasco) maior para que possam continuar se multiplicando. O meio de cultura contido na garrafa foi aspirado, seguido da adição de aproximadamente 0,5 mL de solução tampão fosfato salino para lavagem e retirada de resquícios do meio contendo soro fetal bovino, para que não interfira na ação da tripsina-EDTA 2,5 g/L adicionada logo em seguida com mesmo volume nas garrafas, sendo incubadas por 2-3 minutos em média. As células suspensas foram transferidas para tubo cônico contendo meio completo (3X o volume da tripsina para sua inativação pelo SFB). O tubo contendo as células foi centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi aspirado e o *pellet* de células ressuspendido em meio novo homogeneizado com as células que foram então transferidas para dois novos frascos de área 25 cm² (volume - 60ml), para crescer novamente até que cada um destes novos frascos estivesse com 80% de confluência. Para obtenção do número de células adequado para os experimentos foram padronizados dois repiques.

As células em crescimento exponencial após o segundo repique foram diluídas em Trypan Blue® (1:5), contadas em Câmara de Neubauer para obtenção de uma suspensão com 7.500 células em 100 µL de meio, e semeadas em placas de 96 cavidades (plaqueamento). As placas foram incubadas por 24h antes da adição das amostras e da leitura da placa T0. A placa T0 não recebe aplicação das amostras e os valores da leitura desta placa indicam quanto as células cresceram desde o plaqueamento até a adição das amostras nas placas-teste.

Ao término das 24h foi feita a leitura da placa T0 e as amostras foram aplicadas nas placas-teste em triplicata de quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), sendo as placas-teste novamente incubadas por 48h.

Decorrido o último tempo, foi feita a leitura das placas-teste. O volume de meio das cavidades da placas de 96 poços foi aspirado e as células aderidas foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas 5x em água corrente e secas na capela de fluxo vertical para adição de 50µL de SRB 1% para coloração das células durante 30 minutos. Após o tempo de coloração, seguiu-se com a lavagem das placas 4x com ácido acético 1% para retirar o excesso de corante e secagem, para posterior adição do tampão Trizma Base (10 mM, pH 10,5) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas, possibilitando a leitura no espectrofotômetro em 540nm (Figura 2).

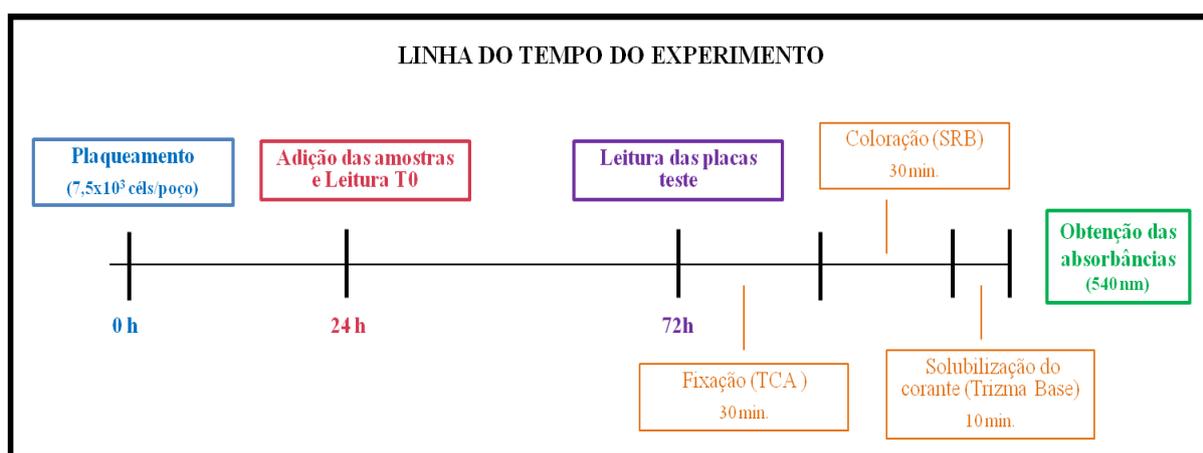


Figura 2. Etapas do experimento no decorrer do tempo. Adaptado de Cândido-Bacani *et al.*, 2013.

Foram medidas as seguintes absorvâncias: placas-teste, ou seja, das células tratadas com as amostras-teste (T), controle negativo (CN), branco das amostras-teste e a leitura do início da incubação, portanto, antes da adição das amostras (T0). Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo, Doxorubicina (Eurofarma) nas concentrações de 0,025 - 0,25 - 2,5 - 25 µg/mL (Figura 3).

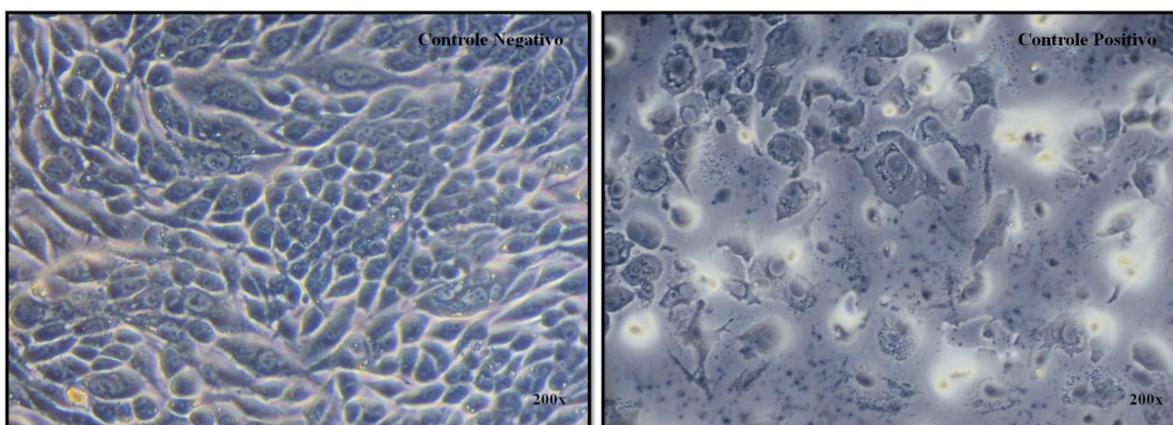


Figura 3. Células da linhagem neoplásica humana de próstata - PC-3. Controle negativo (células não tratadas) e Controle positivo (células tratadas com Doxorrubicina na concentração de 25 µg/mL), após 48 horas de incubação.

A inibição de crescimento - GI (%) de cada amostra-teste foi calculada em programa Excel, utilizando-se as fórmulas segundo Monks *et al.* (1991):

$$\text{Se } T \geq T_0 \text{ e } < \text{CN: } GI_{50} = 100. [(T-T_0) / (CN-T_0)]$$

$$\text{Se } T < T_0: GI_{50} = 100. [(T-T_0) / (T_0)]$$

A concentração que inibe 50% do crescimento celular (GI_{50}) foi determinada por análise de regressão não linear em programa de análises de dados (Origin Versão 6.0). Os valores de GI_{50} são resultantes da média das triplicatas ($n=3$) de cada experimento e foram calculados a média e o desvio padrão das GI_{50} originadas de 3 experimentos independentes.

As amostras-teste com $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas potencialmente ativas (ITARATH *et al.*, 2004). As amostras foram consideradas inativas quando $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$.

4.2.4 Índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) corresponde à divisão entre o valor da GI_{50} de cada amostra na linhagem de células não neoplásicas NIH/3T3 (fibroblasto murino) e o valor da GI_{50} de cada amostra em cada linhagem de células neoplásicas ($GI_{50} \text{ NIH/3T3} / GI_{50} \text{ célula neoplásica}$).

Este parâmetro indica o uso potencial das amostras, sendo considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (HOUGHTON *et al.*, 2007), que significa que a amostra testada é duas vezes mais ativa na linhagem de células neoplásicas do que em células normais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem da atividade antiproliferativa dos extratos das espécies foi feita por meio da linhagem B16-F10 (melanoma murino) onde a GI_{50} variou entre $2,84 \pm 0,015$ e $26,69 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Uma vez que estas espécies foram consideradas potencialmente ativas, pois seus extratos brutos apresentaram valores de GI_{50} inferiores a $30 \mu\text{g/mL}$ (ITARATH *et al.*, 2004), foi avaliada a atividade antiproliferativa de frações e substâncias proveniente dos mesmos.

Tabela 2 - Valores de GI_{50} * ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm \text{sd}$ para a linhagem neoplásica B16-F10 (melanoma murino) na triagem dos extratos de cada espécie avaliada e do controle positivo Doxorubicina.

ORIGEM	AMOSTRA	B16-F10
<i>Mezilaurus crassiramea</i> Frutos, folhas e galhos	Extrato bruto – frutos	$2,95 \pm 0,05$
	Extrato bruto – folhas	$26,69 \pm 0,13$
	Extrato bruto – galhos	>250
<i>Aniba heringeri</i> Folhas	Extrato etanólico	$25,06 \pm 0,07$
<i>Ammona dioica</i> Raiz	Extrato hexânico	$3,44 \pm 0,37$
	Extrato diclorometânico	$3,44 \pm 0,05$
	Extrato etanólico	$3,81 \pm 0,04$
<i>Macrosiphonia petraea</i> Raiz	Extrato etanólico	$5,96 \pm 5,55$
<i>Vernonia rubricaulis</i> Folhas	Extrato etanólico	$2,84 \pm 0,015$
<i>Erythroxylum anguifugum</i> Casca do caule	Extrato bruto	>250
<i>Erythroxylum daphnites</i> Casca do caule	Extrato bruto	>250
<i>Diplokeleba floribunda</i> Folhas	Extrato etanólico	>250
	Doxorrubicina	$0,019 \pm 0,008$

* GI_{50} : concentração que inibe 50% do crescimento celular.

As amostras, provenientes dos extratos ativos na triagem, que apresentaram $GI_{50} > 250$ $\mu\text{g/mL}$ em pelo menos três linhagens de células neoplásicas foram consideradas inativas e não foram testadas novamente em outras linhagens.

Os resultados da avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* das amostras testadas frente às linhagens neoplásicas humanas estão apresentados em tópicos por espécie vegetal avaliada.

Os gráficos correlacionam as porcentagens de crescimento (eixo das ordenadas) variando de 100% a -100% nas determinadas concentrações avaliadas (eixo das abscissas). Dentre os valores mais importantes, destacam-se o controle negativo (CN), representado pelo valor 100%, demonstrando o quanto as células que não foram expostas às amostras cresceram ao término do experimento; o ponto 50% que corresponde a GI_{50} e aponta a concentração da amostra necessária para inibição de 50% do crescimento celular; e o tempo zero (T0), que é apresentado em 0% e indica ao atingir este ponto, a inibição total do crescimento.

5.1 Família Lauraceae

5.1.1 *Mezilaurus crassiramea*

As amostras testadas de *M. crassiramea* consistiram de extratos brutos obtidos de frutos, folhas e galhos, fases provenientes da partição dos extratos dos frutos e folhas e substâncias puras isoladas da fase diclorometânica das folhas. Os resultados referentes aos valores de média \pm desvio padrão ($\bar{x} \pm sd$) das GI₅₀ de cada amostra-teste nas linhagens de células neoplásicas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de GI₅₀* ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae) e do controle positivo Doxorubicina nas linhagens celulares.

ORIGEM	AMOSTRA	B16-F10	PC-3	786-0	HT-29	MCF-7	UACC-62	NCI/ADR-RES	NIH/3T3
Fruto	Extrato bruto	2,95 \pm 0,005	>250	54,99 \pm 1,60	211,5 \pm 2,19	42,78 \pm 1,93	>250	42,72 \pm 2,24	>250
	Fase diclorometânica	-----	24,06 \pm 2,19	29,01 \pm 1,07	105,9 \pm 2,1	23,57 \pm 2,43	20,09 \pm 1,3	178,0 \pm 26,5	31,48 \pm 2,4
	Fase hexânica	-----	42,35 \pm 4,24	42,99 \pm 5,43	39,14 \pm 2,46	22,76 \pm 2,83	38,94 \pm 4,1	41,03 \pm 3,04	31,90 \pm 1,3
	Fase acetato de etila	-----	>250	>250	>250	-----	-----	-----	>250
	Fase hidrometanólica	-----	>250	>250	>250	-----	-----	-----	>250
Folhas	Extrato bruto	26,69 \pm 0,13	37,86 \pm 1,46	33,32 \pm 0,73	>250	54,37 \pm 1,65	>250	50,83 \pm 0,86	40,91 \pm 1,4
	Fase diclorometânica	-----	23,35 \pm 0,20	29,13 \pm 1,77	30,23 \pm 2,98	19,37 \pm 4,2	30,95 \pm 0,84	26,6 \pm 0,38	47,81 \pm 1,1
	γ -lactona 1	-----	21,18 \pm 1,25	31,51 \pm 0,24	29,46 \pm 0,014	26,39 \pm 1,90	46,52 \pm 4,3	21,47 \pm 2,48	34,26 \pm 3,9
	γ -lactona 2	-----	19,15 \pm 1,39	16,51 \pm 0,47	30,70 \pm 0,30	17,15 \pm 2,17	>250	23,56 \pm 0,23	22,27 \pm 2,9
	γ -lactona 3	-----	9,95 \pm 2,05	18,86 \pm 0,99	5,11 \pm 1,98	3,74 \pm 0,85	3,35 \pm 1,0	22,6 \pm 2,16	4,81 \pm 1,2
Galho	Extrato bruto	>250	>250	>250	-----	-----	>250	-----	>250
	Doxorubicina	0,019 \pm 0,008	0,24 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01	0,30 \pm 0,07	0,12 \pm 0,04	0,29 \pm 0,06	2,99 \pm 0,4	0,54 \pm 0,2

* GI₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento celular.

As três substâncias puras avaliadas foram isoladas da fase diclorometânica do extrato bruto das folhas de *M. crassiramea* e são compostos γ -lactônicos, um derivado mono-acetilado (**1**), já isolado uma vez de *Mezilaurus vanderwerffii*; um di-acetilado (**2**) e um di-hidroxilado (**3**), sendo os dois últimos inéditos na literatura (TÓFOLI, 2013) - Figura 4.

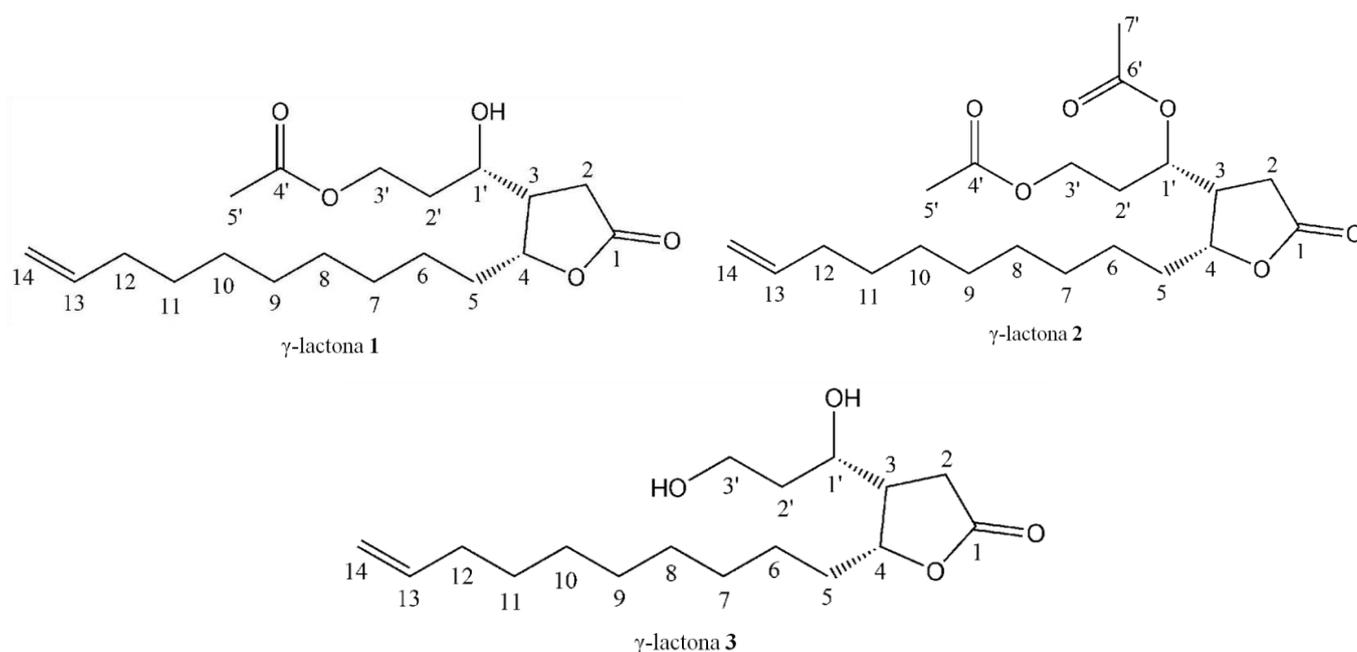


Figura 4 - Estruturas químicas das γ -lactonas 1, 2 e 3 isoladas da fase diclorometânica do extrato bruto das folhas de *Mezilarurus crassiramea*. Fonte: Tófoli, 2013.

No processo de triagem o extrato bruto dos frutos apresentou forte atividade na linhagem B16-F10 de melanoma murino, que levou a obtenção das fases, das quais a fase diclorometânica foi a mais ativa, apresentando moderada atividade em quatro linhagens de células neoplásicas: PC-3, 786-0, MCF-7 e UACC-62 (GI_{50} 20,09 \pm 1,3 a 29,01 \pm 1,07 μ g/mL). A fase hexânica do fruto apresentou moderada atividade, embora com maiores valores de GI_{50} .

O extrato bruto das folhas apresentou moderada atividade na triagem em B16-F10, que se manteve na fase diclorometânica das folhas e mostrou melhora da atividade nas γ -lactonas **1**, **2** e **3** isoladas desta fase, apresentando valores de moderado a forte. Com destaque para γ -lactona **3**, o derivado di-hidroxilado que foi ativo em todas as linhagens neoplásicas avaliadas, evidenciando a forte atividade apresentada frente quatro destas linhagens, PC-3 (GI_{50} 9,95 μ g/mL), HT-29 (GI_{50} 5,11 μ g/mL), MCF-7 (GI_{50} : 3,74 μ g/mL) e UACC-62 (GI_{50} : 3,35 μ g/mL) - Figura 5.

Ambos os extratos dos frutos e das folhas apresentaram moderada a fraca atividade frente às demais linhagens neoplásicas mostrando menor atividade com relação às linhagens de adenocarcinoma de cólon (HT-29) e melanoma humano (UACC-62). O extrato bruto do galho não apresentou atividade antiproliferativa até a maior concentração testada em pelo

menos três das linhagens neoplásicas, bem como as fases acetato de etila e hidrometanólica proveniente dos frutos, não sendo testadas frente às linhagens seguintes.

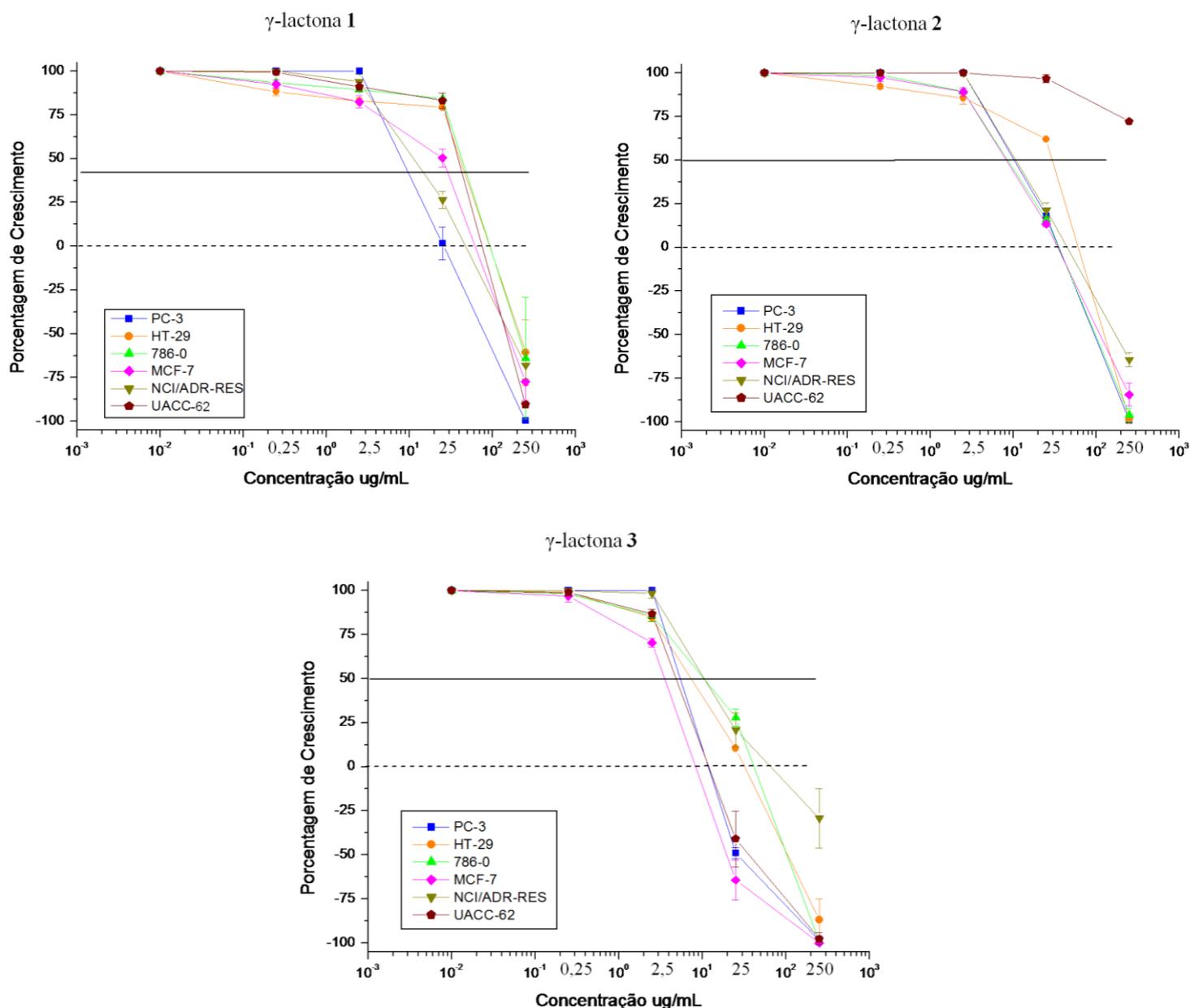


Figura 5 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas as quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) dos compostos γ -lactônicos **1**, **2** e **3** de *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae).

Em relação à citotoxicidade de todas as amostras, a interpretação dos gráficos segue o preconizado por Monks *et al.* (1991), onde observando as porcentagens de crescimento, até o ponto zero considera-se efeito citostático, pois há apenas inibição do crescimento celular, seja parcial ou total, sendo a linha sólida que cruza o eixo y em 50% a representação da estimativa

da GI₅₀ calculada por análise de regressão não linear pelo programa Origin (versão 6.0). Os valores negativos, abaixo de 0%, são avaliados como efeito citocida, correspondendo à porcentagem de células mortas nas referentes concentrações testadas. Os símbolos na curva, desconsiderando o primeiro, marcam as quatro concentrações teste.

Os pontos onde as curvas tocam a linha que estima a GI₅₀ mostram que os compostos γ -lactônicos apresentam valores de GI₅₀ variando próximos a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ para as γ -lactonas **1** e **2**, e próximo a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para a γ -lactona **3**, conforme já observado na tabela 3, em que os valores de GI₅₀ variaram de 3,35 a 9,95 $\mu\text{g/mL}$, nas linhagens neoplásicas em que esta substância foi mais ativa.

As substâncias isoladas (**1**, **2** e **3**), avaliadas no presente trabalho, são butanolídeos de origem policetídica (TÓFOLI, 2013). Compostos desta classe são apontados na literatura como responsáveis pela citotoxicidade em espécies de lauráceas, corroborando com o observado nos nossos resultados.

No gênero *Mezilaurus* as γ -lactonas foram descritas em *M. synandra* em 1983 por Silva e colaboradores, que mostraram a presença de butanolídeos no seu tronco. Os butanolídeos são substâncias citotóxicas que aparecem com frequência em espécies da família Lauraceae, como *Cinnamomum reticulatum* (LIN *et al.*, 2011), *Litsea acutivena* (CHENG *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2007), *Litsea glutinosa* (AGRAWAL *et al.*, 2013), *Machilus wangchiana* (CHENG *et al.*, 2009) entre outras.

O efeito citotóxico de butanolídeos foi demonstrado para os compostos epilitsenolídeo C₁ e isoobtusilactona A, extraídos das raízes de *Aiouea trinervis*, uma espécie de Lauraceae, que apresentaram significativa atividade antiproliferativa frente a uma linhagem de células de câncer de laringe - Hep2 e ainda importante efeito genotóxico (GARCEZ *et al.*, 2005).

Um estudo de *Cinnamomum kotoense* apontou a presença do butanolídeo kotomolídeo A nas folhas, que foi avaliado quanto ao seu potencial para inibição do crescimento celular através do ensaio XTT e também seu efeito sobre o ciclo celular e a apoptose em duas linhagens de células tumorais de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, com valores de IC₅₀ 4,98 μM e 4,67 μM respectivamente, demonstrando seletividade para estas linhagens, não apresentando toxicidade em células epiteliais mamárias normais. Os resultados obtidos demonstraram que o butanolídeo citado provoca um aumento de ROS (espécies reativas de oxigênio) nas células do câncer, resultando em efeitos apoptóticos, além do mais, quando investigado *in vivo*, injeções intraperitoneais diárias do composto em camundongos nude,

resultaram num decréscimo de cerca de 50% do volume do tumor quando comparado com o controle (KUO *et al.*, 2008). Nos nossos resultados uma das melhores atividade observada nesta espécie foi para mesma linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7), com $GI_{50} = 3,74 \mu\text{g/mL}$ para a γ -lactona **3**, o butanolídeo di-hidroxilado isolado também das folhas.

A melhor atividade encontrada para a γ -lactona **3** poderia ser explicada pela presença de hidroxilas nos carbonos C-1' e C-3', simultaneamente, que parece potencializar o efeito citotóxico desta substância, tornando-a mais ativa em relação às demais γ -lactonas isoladas (**1** e **2**), a primeira com apenas uma hidroxila e a segunda sem grupos hidroxila, conforme Tófoli (2013).

Investigações na família Lauraceae apontam os compostos butanolídeos como responsáveis pela citotoxicidade, bem como pela sua atuação no ciclo celular e no processo de apoptose encontrado nos estudos realizados, demonstrando o seu potencial anticâncer (CHEN *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2011). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o potencial anticâncer dos butanolídeos isolados, especialmente a γ -lactona **3** (di-hidroxilada), confirmando a atividade biológica desta classe de substâncias relatada na literatura. Assim, pode-se inferir que os butanolídeos provavelmente sejam os constituintes responsáveis pelo efeito citotóxico observado em *M. crassiramea*.

Com relação ao Índice de Seletividade (IS), que expressa quantas vezes uma amostra é mais seletiva (ativa) para uma linhagem tumoral do que para linhagem de células normais, o extrato dos frutos apresentou seletividade de mais de 7x para as linhagens tumorais de mama e de ovário expressando resistência a múltiplas drogas (MCF-7 e NCI/ADR-RES respectivamente) e 5x para a linhagem de adenocarcinoma de rim (786-0), embora com moderada atividade antiproliferativa para estas linhagens. A fase diclorometânica das folhas apresentou seletividade de duas ordens de grandeza para as linhagens de células de câncer de próstata (PC-3) e de mama (MCF-7).

A seletividade de um composto é importante e justifica-se pelo fato de que mesmo quimioterápicos de uso comum na terapêutica apresentam citotoxicidade em células normais *in vitro* (HENRIKSSON *et al.*, 2006). Portanto, sugere o uso potencial da amostras de *M. crassiramea*.

É importante ressaltar a relevância da continuidade dos estudos destas substâncias e da busca de outros butanolídeos que possam estar presentes em *M. crassiramea*, uma vez que

conforme já dito, duas destas substâncias são inéditas na literatura e não apresentam ainda relatos de sua atividade biológica além do descrito por Tofóli (2013).

5.1.2 *Aniba heringerii*

As amostras de *A. heringerii* foram obtidas a partir das folhas e do caule, que consistiram de: extrato etanólico das folhas, fases oriundas de sua partição, substâncias puras isoladas da fase hexânica e óleo essencial. No caso do caule, foi testado apenas o óleo essencial. Os resultados referentes aos valores de média \pm desvio padrão ($\bar{x} \pm sd$) das GI_{50} de cada amostra-teste nas linhagens de células neoplásicas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de GI_{50} * ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Aniba heringerii* (Lauraceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares.

ORIGEM	AMOSTRA	B16-F10	PC-3	786-0	HT-29	MCF-7	UACC-62	NCI/ADR-RES	NIH/3T3
Folha	Extrato etanólico	25,06 \pm 0,07	44,29 \pm 1,13	130,08 \pm 1,4	205,62 \pm 1,48	55,63 \pm 1,59	209,72 \pm 5,9	176,27 \pm 0,07	194,5 \pm 3,8
	Fase acetato de etila	-----	>250	>250	>250	-----	-----	-----	>250
	Fase hexânica	-----	37,12 \pm 1,59	55,06 \pm 2,17	>250	37,97 \pm 1,91	43,18 \pm 2,1	47,01 \pm 1,78	30,16 \pm 0,2
	Benzoato de benzila	-----	>250	241,12 \pm 2,81	180,31 \pm 10,5	-----	-----	-----	>250
	Salicilato de benzila	-----	>250	184,54 \pm 3,17	>250	-----	-----	-----	>250
	Espatulenol	-----	23,78 \pm 0,70	22,51 \pm 0,53	28,7 \pm 3,51	31,43 \pm 0,5	39,62 \pm 3,3	-----	40,22 \pm 0,7
	Óleo Essencial	-----	201,41 \pm 2,31	>250	>250	>250	-----	-----	>250
Caule	Óleo Essencial	-----	232,06 \pm 0,11	45,14 \pm 1,13	230,28 \pm 1,99	35,73 \pm 2,46	68,39 \pm 6,7	-----	>250
	Doxorrubicina	0,019 \pm 0,008	0,24 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01	0,30 \pm 0,07	0,12 \pm 0,04	0,29 \pm 0,06	2,99 \pm 0,4	0,54 \pm 0,2

* GI_{50} : concentração que inibe 50% do crescimento celular.

A partir da triagem em B16-F10 (melanoma murino), os valores de GI_{50} das amostras das folhas de *A. heringerii* nas linhagens neoplásicas mostram que o extrato etanólico apresentou moderada atividade nesta linhagem e na fase hexânica deste extrato, essa atividade foi mantida também nas demais linhagens, com exceção da linhagem tumoral de células de cólon (HT-29), na qual não apresentou atividade ($GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$). Das amostras isoladas desta fase, a atividade se concentrou no composto espatulenol, que embora apresentando moderada atividade antiproliferativa, com valores de GI_{50} variando de 22,51 \pm 0,53 a 39,62 \pm 3,3 $\mu\text{g/mL}$, demonstrou melhora da atividade antiproliferativa em todas as linhagens,

quando comparado a fase da qual foi isolado (Figura 6). A fase acetato de etila não apresentou atividade até a maior concentração testada.

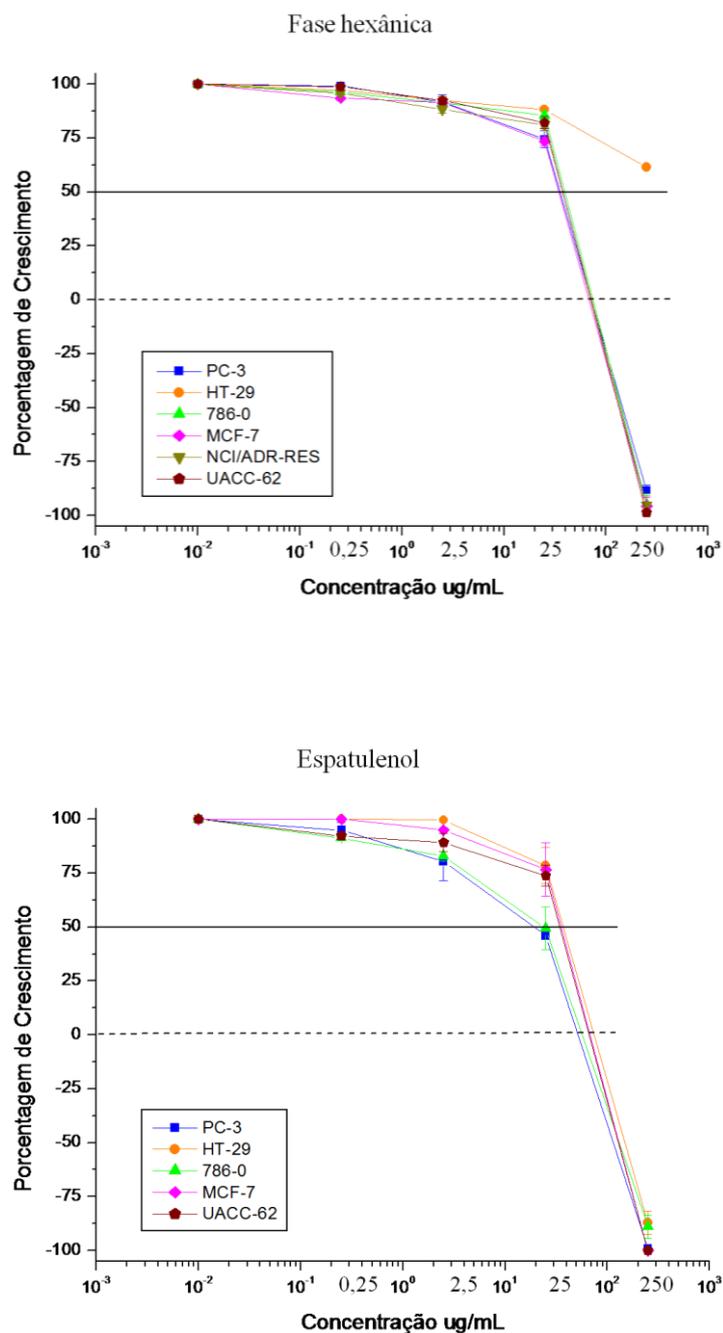


Figura 6 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas a quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) da fase hexânica das folhas e do espatulenol oriundo desta fase de *Aniba heringerii* (Lauraceae).

O gráfico referente à fase hexânica, apresenta as porcentagens de crescimento, mostrando moderada atividade, onde as curvas de crescimento cruzam a linha de estimativa da GI₅₀ entre a concentração de 25 e 250 µg/mL; exceto para a linhagem HT-29 que permaneceu acima desta referência até a maior concentração testada.

As curvas de crescimento das linhagens para o composto espatulenol, tocam a linha de GI₅₀ entre a as mesmas concentrações observadas para a fase, porém, com valores mais próximos da concentração de 25 µg/mL.

O espatulenol (Figura 7) apresentou os melhores resultados dentre os obtidos com as amostras de *A. heringerii*, apesar de sua atividade moderada. Este composto é um sesquiterpeno que apresenta atividade biológica e ainda pode influenciar no aroma de vários óleos de interesse para indústria de perfumaria (ALCÂNTARA *et al.*, 2010b). Seu efeito citotóxico é relatado em células leucêmicas (FULLAS *et al.*, 1994), em ensaios com *Artemia salina* e células KB (PACCIARONI *et al.*, 2000), em linhagem de células resistentes a múltiplas drogas (células L5178), linfoma de células T de rato transfectadas com pHa MDR1/A retrovírus (MARTINS *et al.*, 2010), além de atividade antimicrobiana (BOUGATSOS *et al.*, 2004; ULUBELEN *et al.*, 1994), dentre outras. Uma vez que este composto foi obtido da fase hexânica das folhas que, por sua vez, também obteve resultados com valores moderados, provavelmente o espatulenol seja, portanto, o responsável pela atividade apresentada por *A. heringerii* ao menos em se tratando dos constituintes das folhas.

As demais substâncias puras isoladas da fase hexânica do extrato das folhas: benzoato de benzila e salicilato de benzila (Figura 7) foram apenas fracamente ativas em duas linhagens tumorais (786-0 e HT-29) e não apresentaram atividade até a maior concentração testada frente às demais linhagens avaliadas.

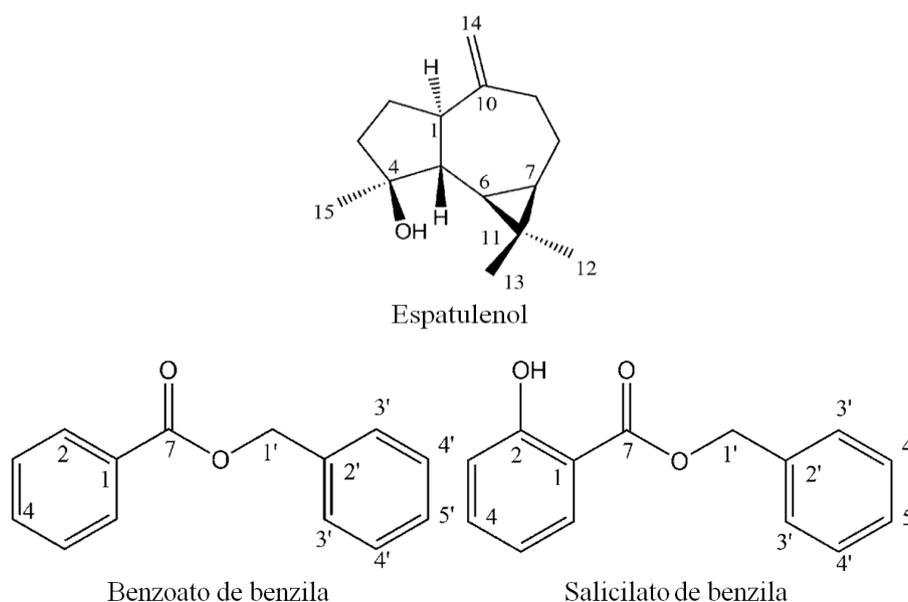


Figura 7 - Estrutura química dos compostos espatulenol, benzoato de benzila e salicilato de benzila, isolados da fase hexânica das folhas. Fonte: Tófoli, 2013.

O óleo essencial obtido de outra espécie do gênero *Aniba* também é citado na literatura por possuir efeito citotóxico. *Aniba rosaeodora*, cujo óleo é disponível comercialmente, apresentou atividade anticâncer contra uma linhagem celular de carcinoma epidermóide (A431), onde o efeito citotóxico do óleo foi seletivo para a esta linhagem, induzindo apoptose seletivamente nas células neoplásicas e pré-neoplásica, mostrando um importante potencial anticâncer (SÆUR *et al.*, 2011).

Em *A. heringerii*, porém, apenas o óleo essencial do caule apresentou atividade, sendo esta moderada e somente em três linhagens neoplásicas de adenocarcinoma de rim (786-0: GI₅₀ 45,14±1,13 µg/mL), de mama (MCF-7: GI₅₀ 35,73±2,46 µg/mL) e melanoma humano (UACC-62: GI₅₀ 68,39 ± 6,7 µg/mL), enquanto o óleo essencial das folhas mostrou-se inativo, com GI₅₀>250 µg/mL para todas as linhagens. Diferenças no percentual de constituintes majoritários no óleo essencial do caule desta espécie (3,7% de monoterpenos, 16,4% de monoterpenos oxigenados, 26,6% de sesquiterpenos, 14,2% de sesquiterpnos oxigenados e 23,2% de ésteres benzílicos) podem justificar estes resultados, em relação ao observado em outras espécies do gênero na literatura (Tófoli, 2013).

Os óleos de *Aniba rosaeodora* são ricos em linalool, um monoterpeno que possui atividade biológica (SAMPAIO *et al.*, 2012; SIMIĆ *et al.*, 2004). No estudo de Sœur *et al.*, (2011), descrito parágrafos acima, os óleos apresentados são constituídos de 90% de linalool. Este composto foi detectado em quantidade inferior nos óleos de *Aniba heringerii*, que possuem nos seus constituintes majoritários não só o monoterpeno linalool, mas especialmente benzoato de benzila, salicilato de benzila e espatulenol (TÓFOLI, 2013), justificando talvez o porquê não foi encontrada atividade semelhante no presente trabalho.

É válido citar que óleos essenciais de *A. heringerii* apresentaram composição química muito semelhante, embora, de um modo geral, os constituintes majoritários apareceram em maior concentração no óleo essencial das folhas. Todavia, o óleo essencial do caule, apresentou um maior percentual do composto salicilato de benzila, quando comparado ao óleo das folhas (TÓFOLI, 2013). Deste modo, talvez este constituinte possa estar envolvido na atividade anticâncer observada neste óleo frente às linhagens 786-0, MCF-7 e UACC-62.

Portanto, embora os óleos de espécies do gênero *Aniba* possuam estudos relatando suas propriedades biológicas, estas estão relacionadas principalmente com o monoterpeno linalool. Os óleos de *Aniba heringerii*, porém, possuem diferenças na quantidade deste constituinte quando comparado com óleos descritos na literatura, dificultando comparações e podendo mesmo ser o motivo da ausência de uma atividade mais acentuada.

O óleo essencial do caule ainda demonstrou seletividade para as três linhagens neoplásicas nas quais foi ativo, quando comparado a linhagem de células normais NIH/3T3 (fibroblasto murino). Apesar da sua moderada atividade antiproliferativa, apresentou alta seletividade, com IS = 12,8 (786-0), IS=16,2 (MCF-7) e IS=8,4 (UACC-62), que mostra o uso potencial deste óleo mesmo sendo ativo apenas nestas linhagens.

O Índice de Seletividade também apresentou valores significativos para o extrato etanólico, que embora com atividade antiproliferativa variando de moderada a fraca, apresentou seletividade de cerca de 4x para a linhagem PC-3 (próstata) e de mais de 3x para linhagem MCF-7 (mama).

Assim, *Aniba heringerii* demonstrou potencial anticâncer principalmente através da fase hexânica do extrato das folhas, do espatulenol (composto oriundo desta fase) e do óleo essencial do caule. Mesmo apresentando moderada atividade antiproliferativa, os valores significativos de IS apresentados para o extrato bruto das folhas e para o óleo do caule indicam o potencial de utilidade clínica de suas amostras.

5.2 Família Annonaceae

5.2.1 *Annona dioica*

As amostras de *A. dioica* foram todas obtidas das raízes e consistiram de extratos: hexânico, diclorometânico e etanólico. Os resultados referentes aos valores de média \pm desvio padrão ($\bar{x} \pm sd$) das GI_{50} de cada amostra-teste nas linhagens de células neoplásicas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de GI_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Annona dioica* (Annonaceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares.

ORIGEM	AMOSTRA	B16-F10	PC-3	786-0	HT-29	MCF-7	UACC-62	NCI/ADR-RES	NIH/3T3
	Extrato hexânico	3,44 \pm 0,37	69,45 \pm 2,36	48,14 \pm 2,81	47,23 \pm 0,31	2,77 \pm 0,15	33,05 \pm 3,9	2,14 \pm 0,18	36,21 \pm 2,5
Raiz	Extrato diclorometânico	3,44 \pm 0,05	3,22 \pm 1,04	5,02 \pm 0,56	4,87 \pm 1,72	2,13 \pm 0,49	3,43 \pm 0,23	0,24 \pm 0,005	4,60 \pm 0,2
	Extrato etanólico	3,81 \pm 0,04	15,73 \pm 1,06	24,17 \pm 1,33	27,26 \pm 1,80	2,77 \pm 0,53	5,88 \pm 0,6	28,92 \pm 1,00	26,51 \pm 1,9
	Doxorrubicina	0,019 \pm 0,008	0,24 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01	0,30 \pm 0,07	0,12 \pm 0,04	0,29 \pm 0,06	2,99 \pm 0,4	0,54 \pm 0,2

* GI_{50} : concentração que inibe 50% do crescimento celular.

Os resultados da triagem mostraram que os três extratos apresentaram forte atividade na linhagem de melanoma murino (B16-F10). Os valores de GI_{50} nas demais linhagens de células neoplásicas mostram que todos os extratos de *A. dioica* apresentaram forte atividade para a linhagem de adenocarcinoma de mama - MCF-7, com valores variando em torno da concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato hexânico, além do resultado para células MCF-7, também apresentou forte atividade para a linhagem de adenocarcinoma de ovário NCI/ADR-RES (GI_{50} 2,14 \pm 0,18 $\mu\text{g/mL}$), chamando atenção para o fato de que esta linhagem expressa resistência a múltiplas drogas e que ainda apresentou valor semelhante ao controle positivo (Doxorrubicina), tornando este resultado ainda mais relevante. O extrato etanólico ainda apresentou forte atividade frente à linhagem de melanoma - UACC-62 (GI_{50} 5,88 \pm 0,6 $\mu\text{g/mL}$). Nas demais linhagens os extratos etanólico e hexânico apresentaram moderada atividade (Figura 8 - A e B).

O grande destaque de *A. dioica*, porém, ainda é o extrato diclorometânico que foi ativo em todas as linhagens testadas com GI_{50} variando de 0,24 a 5,02 $\mu\text{g/mL}$. O menor valor de

GI₅₀ foi observado frente à linhagem neoplásica resistente a múltiplas drogas (NCI/ADR-RES), sendo considerado um resultado expressivo, visto que este extrato foi 10x mais ativo nesta linhagem do que a Doxorrubicina (GI₅₀ 2,99±0,4 µg/mL), demonstrando grande potencial antitumoral *in vitro* deste extrato diante de diferentes tipos de câncer (Figura 8 - C).

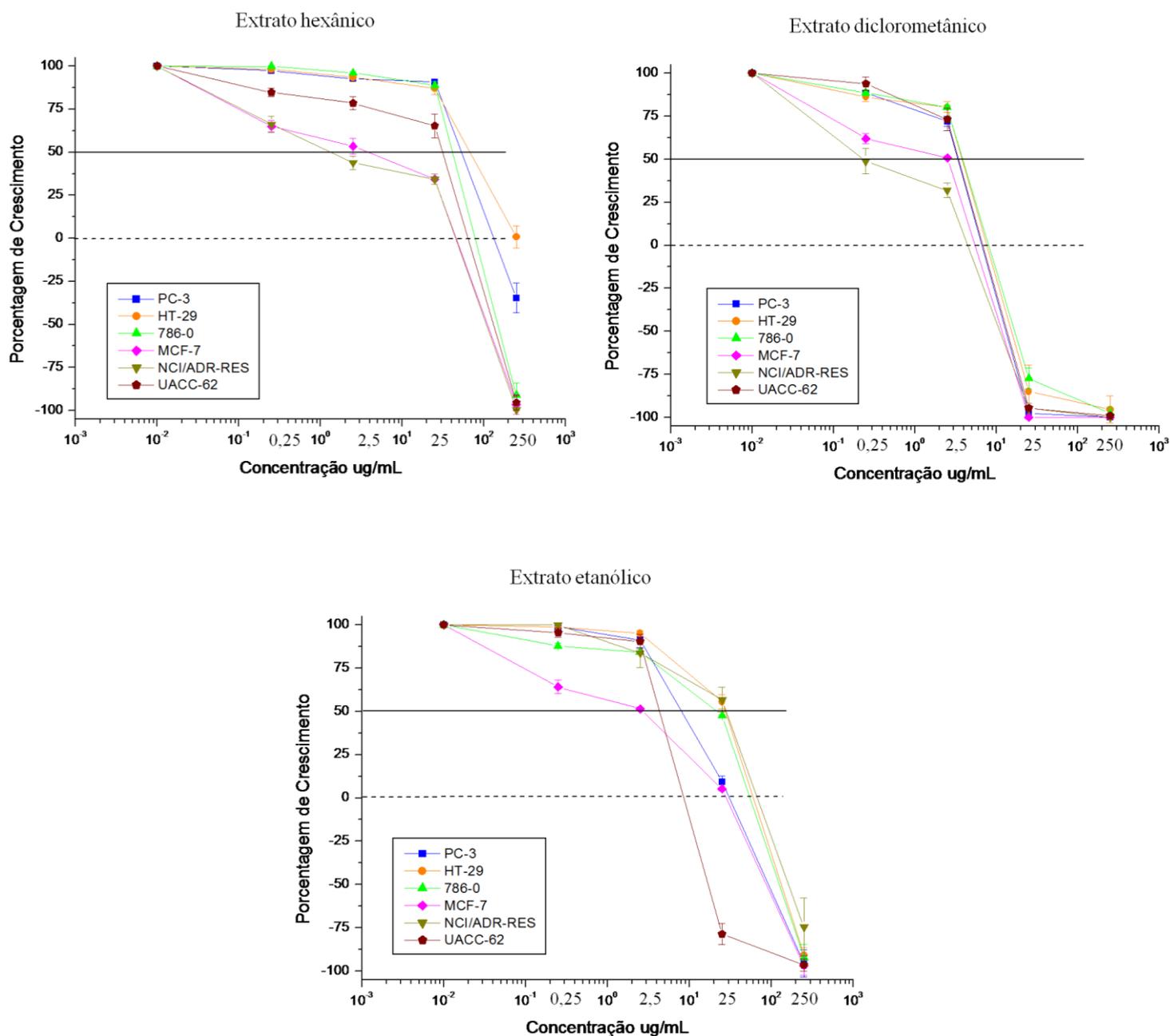


Figura 8 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas as quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) dos extratos de *Annona dioica* (Annonaceae).

Os pontos onde as curvas de crescimento das linhagens tocam a linha (sólida) que estima o valor calculado de GI_{50} indicam o efeito citostático e a forte atividade antiproliferativa de todos os extratos frente à linhagem MCF-7(mama), apresentada nas curvas cor de rosa dos três gráficos, que cruzam a linha de 50% do crescimento próximas à concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

No gráfico referente ao extrato hexânico, ressalta-se também a curva da linhagem NCI/ADR-RES (ovário resistente) que cruza a linha de 50% do crescimento acima da concentração 2,5 $\mu\text{g/mL}$, indicando uma concentração inibitória de 50% do crescimento inferior a este valor, conforme visto na tabela anterior, que este extrato obteve GI_{50} 2,14 \pm 0,18 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato diclorometânico, apresentou as curvas de crescimento das linhagens cruzando a linha estimada da GI_{50} próximas à concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, exceto a curva da linhagem NCI/ADR-RES que toca esta linha praticamente sobre a marcação da concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, lembrando seu valor de média GI_{50} , apresentado na tabela 5, que foi 0,24 $\mu\text{g/mL}$. É possível visualizar a forte atividade deste extrato observando que as curvas tocam a linha tracejada que indica 0%, ou seja, inibição total do crescimento, entre as concentrações intermediárias (2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), onde a partir deste ponto, através dos valores negativos, pode-se observar o seu efeito citocida, ocorrendo morte celular, sendo que na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ a amostra ocasionou 100% de morte celular para algumas linhagens.

Annona dioica mostrou-se como a espécie com maior potencial anticâncer mais no presente trabalho, especialmente frente às linhagens de câncer de mama e de ovário resistente (MCF-7 e NCI/ADR-RES), onde o extrato diclorometânico apresentou os melhores resultados em relação aos demais.

Estudo feito com amostras das folhas de *Annona dioica* demonstrou a potencial atividade antiproliferativa do extrato metanólico bruto desta espécie, também evidenciando resultados promissores com relação à atividade citotóxica frente às mesmas linhagens MCF-7 (GI_{50} 11,10 $\mu\text{g/mL}$) e NCI/ADR-RES (GI_{50} 1,95 $\mu\text{g/mL}$), atribuindo não só a esta potencial atividade anticâncer, mas também a outras propriedades avaliadas no mesmo estudo, a presença de flavonoides encontrados nos constituintes das folhas da planta, mostrando claramente as propriedades medicinais da espécie (FORMAGIO *et al.*, 2013a).

Em nosso estudo, porém, as amostras são provenientes da raiz, não podendo ser feitas comparações com resultados dos constituintes foliares. De Mesquita *et al.*, (2009), utilizando

também a raiz, como neste estudo, avaliaram o potencial anticâncer de *Annona crassiflora* através do ensaio do MTT. Os autores também encontraram acentuada atividade citotóxica do extrato da madeira da raiz, com valores de IC₅₀ variando de 6,0 µg/mL a 14,9 µg/mL, e do extrato da casca da raiz (IC₅₀ 13,3 a 24,9 µg/mL), contra quatro linhagens tumorais testadas: HCT-8 (côlon), SF-295 (glioblastoma), HL-60 (leucemia) e MDA-MB-435 (melanoma).

O estudo das amostras das raízes de *Annona dioica*, mostrou a presença de substâncias de duas classes: alcaloides e acetogeninas. As acetogeninas foram observadas em frações resultantes do extrato diclorometânico (o mais ativo no presente estudo) e também nas frações da fase acetato de etila, proveniente do extrato etanólico (NAZARO, 2013).

A crassiflorina, uma acetogenina isolada das sementes de *A. crassiflora*, apresentou citotoxicidade *in vitro*, contra células tumorais A-549 (pulmão), HT-29 (côlon), MCF-7 (mama), U-251 (glioma) e RPMI-7951 (melanoma), onde os autores destacam a espécie, que ocorre em regiões de cerrado, como potencial fonte de agentes antineoplásicos naturais (SANTOS; BOAVENTURA; DE OLIVEIRA, 1994).

Acetogeninas extraídas de *Annona squamosa* foram também avaliadas contra linhagens de células neoplásicas, apresentando atividade anticâncer, onde quatro das acetogeninas testadas exibiram seletividade para uma linhagem de tumor pancreático humano PACA-2 (HOPP *et al.*, 1997).

As acetogeninas são uma das classes mais interessantes de produtos naturais que apareceram nas últimas duas décadas, constituindo uma série de produtos naturais isolados de espécies de anonáceas que crescem em regiões tropicais e subtropicais. Por apresentarem excelentes atividades biológicas, estão em crescente evidência, sobretudo como potencial agente anticâncer, demonstrando citotoxicidade seletiva para células tumorais (CHEN *et al.*, 2013; MCLAUGHLIN *et al.*, 2008; VILLO *et al.*, 2013).

Além do mais, acetogeninas são eficientes inibidores da NADH ubiquinona oxidorreductase (complexo I) do sistema de transporte de elétrons mitocondrial. A produção de ATP é suprimida pela inibição do complexo I, principalmente em células cancerosas que possuem atividade metabólica muito alta, iniciando assim, a atividade citotóxica antitumoral (KOJIMA *et al.*, 2013). Um dos prováveis mecanismos de ação da atividade antitumoral encontrada em *A. dioica* poderia ser, portanto, este processo de inibição do complexo I.

O estudo guiado das amostras das raízes de *A. dioica*, mostrou que as acetogeninas foram observadas nas frações e fases mais ativas em testes de imersão de teleóginas do

carrapato bovino (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) e citotoxicidade em *Artemia salina* conforme Nazaro (2013). Desta forma, podemos inferir que constituintes desta classe de compostos podem apresentar-se como potenciais responsáveis pela forte atividade encontrada para os extratos de *Annona dioica* no presente trabalho.

Além disso, quando observado o IS, todos os extratos apresentaram seletividade de pelo menos duas ordens de grandeza para a linhagem neoplásica MCF-7 (mama), quando comparado a linhagem de células normais de fibroblasto murino - NIH/3T3, sendo o extrato hexânico o mais seletivo com IS=13, observando-se esta linhagem.

O extrato etanólico também apresentou seletividade de 4,5x para a linhagem de melanoma humano (UACC-62) e os extratos hexânico e diclorometânico ainda apresentaram significativa seletividade também para linhagem resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES - ovário) com valores de IS=16,9 e 19,1 respectivamente; lembrando que é considerado significativo um valor de $IS \geq 2,0$ (HOUGHTON *et al.*, 2007). Demonstrando que *A. dioica* apresenta grande potencial anticâncer *in vitro* diante de diferentes linhagens neoplásicas.

Annona dioica, portanto, a partir dos resultados obtidos, mostra-se como uma espécie extremamente promissora na busca por novos quimioterápicos, apresentando importantes resultados *in vitro*. Novos estudos que avaliem de forma mais aprofundada os constituintes desta espécie, notadamente as acetogeninas, no tratamento contra o câncer e outras doenças devem ser feitos. E vale lembrar ainda que no presente estudo foram avaliados apenas os extratos desta espécie e que as fases e frações provenientes destes extratos ainda devem ser avaliadas com relação a atividade anticâncer e também investigações que esclareçam os mecanismos de ação responsáveis pela elevada citotoxicidade contra células neoplásicas de diferentes origens aqui encontrada.

5.3 Família Apocynaceae

5.3.1 *Macrosiphonia petraea*

As amostras de *M. petraea* foram todas obtidas das raízes, consistindo de extrato etanólico e fases provenientes da partição do mesmo. Os resultados referentes aos valores de média \pm desvio padrão ($\bar{x} \pm sd$) das GI_{50} de cada amostra-teste nas linhagens de células neoplásicas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de GI_{50} * ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae) e do controle positivo Doxorubicina nas linhagens celulares.

ORIGEM	AMOSTRA	B16-F10	PC-3	786-0	HT-29	MCF-7	UACC-62	NCI/ADR-RES	NIH/3T3
	Extrato etanólico	5,96 \pm 5,55	31,74 \pm 2,01	56,98 \pm 0,79	49,30 \pm 4,39	53,47 \pm 5,96	68,95 \pm 0,98	229,02 \pm 5,88	17,41 \pm 0,8
Raiz	Fase hexânica	-----	>250	>250	>250	-----	-----	-----	34,59 \pm 1,1
	Fase acetato de etila	-----	21,59 \pm 4,58	36,27 \pm 1,76	23,57 \pm 2,90	31,21 \pm 2,34	30,06 \pm 1,5	27,41 \pm 0,68	2,36 \pm 0,01
	Fase hidrometanólica	-----	47,17 \pm 3,03	47,68 \pm 0,27	77,66 \pm 5,29	53,87 \pm 0,37	31,28 \pm 1,0	239,02 \pm 6,94	15,0 \pm 0,1
	Doxorubicina	0,019 \pm 0,008	0,24 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01	0,30 \pm 0,07	0,12 \pm 0,04	0,29 \pm 0,06	2,99 \pm 0,4	0,54 \pm 0,2

* GI_{50} : concentração que inibe 50% do crescimento celular.

Na triagem em B16-F10 (melanoma murino) os valores de GI_{50} mostram que o extrato etanólico das raízes de *M. petraea* foi fortemente ativo nesta linhagem. Das três fases obtidas, a fase acetato de etila foi a mais ativa, apresentando moderada atividade antiproliferativa (GI_{50} 21,59 a 36,27 $\mu\text{g/mL}$) - Figura 9.

O extrato etanólico frente às demais linhagens e a fase hidrometanólica apresentaram de moderada a fraca atividade, com GI_{50} próxima a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem de células resistente a múltiplas drogas - NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário). A fase hexânica não apresentou atividade até a maior concentração testada em três linhagens tumorais, não sendo testada nas demais linhagens.

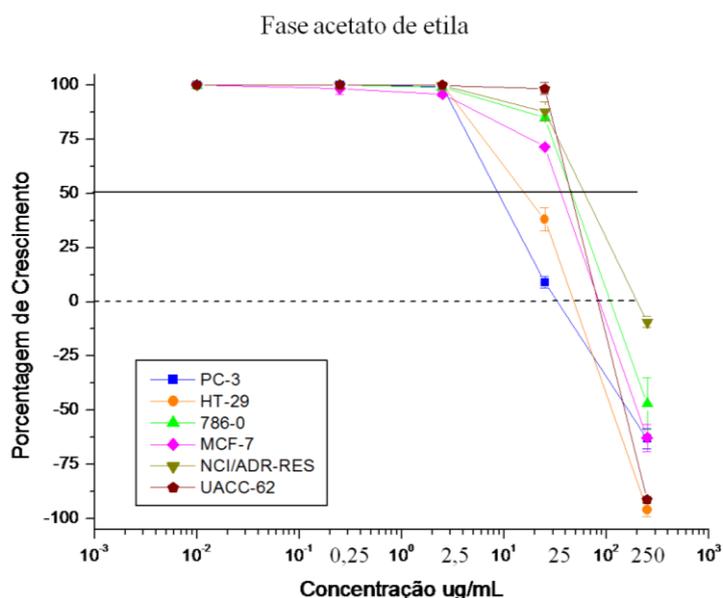


Figura 9 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas às quatro concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) da fase acetato de etila de *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae).

As curvas de crescimento das linhagens cruzam a linha sólida estimando a inibição de 50% do crescimento celular próximas à concentração de 25 µg/mL mostrando o efeito citostático para a fase acetato de etila.

A fase acetato de etila, onde a atividade se concentrou, mostrou ainda uma melhora da atividade quando comparada ao extrato. Nota-se uma queda de 10 a 20x nos valores de GI₅₀, com exceção da linhagem NCI/ADR-RES (onde ambas as amostras obtiveram valores semelhantes), mostrando uma melhora do resultado a partir do fracionamento do extrato, diferentemente do observado nas demais fases isoladas, o que indica que os constituintes ativos responsáveis pela atividade anticâncer de *M. petraea*, provavelmente, devem se encontrar nesta fase.

Na investigação dos mesmos componentes da raiz de *Macrosiphonia petraea*, o extrato etanólico apresentou atividade genotóxica, provocando aumento no número de mutações, avaliada através do teste SMART (Somatic Mutation and Recombination Test). No estudo foram identificadas duas substâncias da classe dos pregnanos, que são compostos dotados de atividades biológicas e que poderiam estar envolvidos na ação detectada no extrato, sendo que os pregnanos, assim como as lignanas, ainda não haviam sido isolados do

gênero *Macrosiphonia*, embora representantes desta classe apareçam caracterizados em plantas de outros gêneros da família Apocynaceae (DE ASSIS JUNIOR; 2012).

O estudo fitoquímico das raízes de *M. petraea* proporcionou, a partir extrato etanólico, a identificação de compostos da classe dos triterpenos, lignanas, um ácido graxo hidroxilado inédito na família e dois pregnanos: neridienona A e cybisterol. Os pregnanos foram obtidos a partir do fracionamento da fase acetato de etila (DE ASSIS JUNIOR; GARCEZ; GARCEZ, 2013) que de acordo com os nossos resultados foi a que apresentou melhor atividade antiproliferativa das amostras obtidas de *M. petraea*.

O pregnano neridienona A é um composto que foi isolado inicialmente da espécie *Nerium odorum* mostrando possuir várias atividades biológicas (ABE; YAMAUCHI, 1976). Neridienona A, também isolada de *Nerium oleander*, mostrou-se ativa quando avaliada em testes biológicos, apresentando atividade anti-inflamatória e citotóxica, *in vitro*, funcionando como inibidor da indução da expressão de ICAM-1, molécula de adesão intercelular e inibindo o crescimento celular de linhagens tumorais como HepG2 - fígado, VA-13 - células malignas induzidas por fibroblasto humano (WI-38 transformado) e A-549 - pulmão (BAI *et al.*, 2007).

Deste modo, podemos sugerir que os pregnanos observados nos constituintes da raiz de *M. petraea*, notadamente neridienona A, podem ser os responsáveis pela atividade citotóxica encontrada nesta espécie. Todavia, a avaliação da atividade anticâncer de *M. petraea* deve ser continuada, através do estudo das frações e substâncias isoladas especialmente da fase acetato de etila.

5.4 Família Asteraceae

5.4.1 *Vernonia rubricaulis*

As amostras de *V. rubricaulis* (extrato etanólico e fase diclorometânica) foram obtidas a partir das folhas. Os resultados referentes aos valores de média \pm desvio padrão ($\bar{x} \pm sd$) das GI_{50} de cada amostra-teste nas linhagens de células neoplásicas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm sd$ das amostras-teste da espécie *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae) e do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares.

ORIGEM	AMOSTRA	B16-F10	PC-3	786-0	HT-29	MCF-7	UACC-62	NCI/ADR-RES	NIH/3T3
Folha	Extrato etanólico	2,84 \pm 0,015	34,65 \pm 0,79	3,75 \pm 0,1	243,99 \pm 4,95	249,02 \pm 0,3	>250	41,38 \pm 1,43	33,82 \pm 0,5
	Fase diclorometânica	-----	27,39 \pm 1,30	36,40 \pm 1,08	54,37 \pm 4,7	37,92 \pm 2,48	48,61 \pm 4,1	52,11 \pm 1,15	25,52 \pm 0,2
	Doxorrubicina	0,019 \pm 0,008	0,24 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01	0,30 \pm 0,07	0,12 \pm 0,04	0,29 \pm 0,06	2,99 \pm 0,4	0,54 \pm 0,2

* GI_{50} : concentração que inibe 50% do crescimento celular.

Para as amostras das folhas de *Vernonia rubricaulis* os valores de GI_{50} nas linhagens tumorais mostraram a forte atividade do extrato etanólico durante a triagem em B16-F10. A fase diclorometânica, oriunda da partição deste extrato, apresentou moderada atividade antiproliferativa (GI_{50} 27,39 a 54,37 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando um aumento desta atividade em relação ao extrato em quatro linhagens tumorais: próstata (PC-3), cólon (HT-29), mama (MCF-7) e melanoma (UACC-62), Figura 10 - B.

De maneira interessante, o extrato etanólico apresentou forte atividade frente à linhagem neoplásica 786-0 (rim), com GI_{50} =3,75 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que foi aproximadamente 10x mais ativo para esta linhagem do que a fase isolada, se comportando ao contrário do observado para as demais linhagens, onde a fase foi mais ativa (Figura 10 - A).

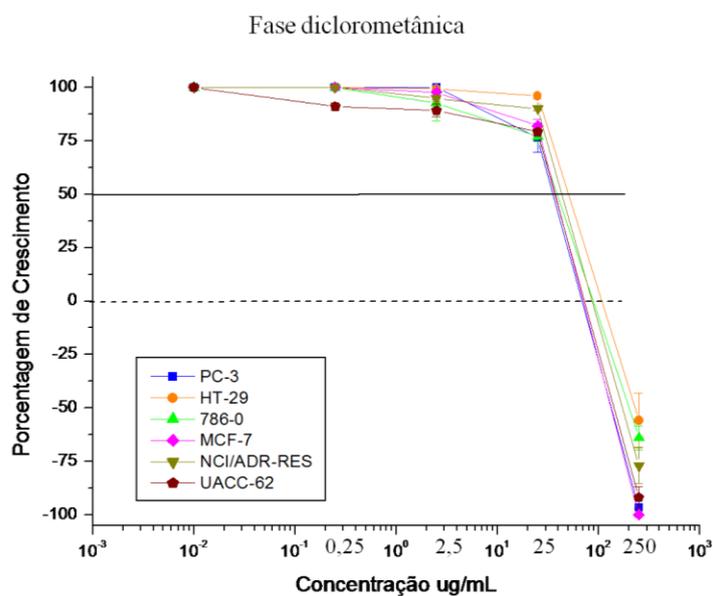
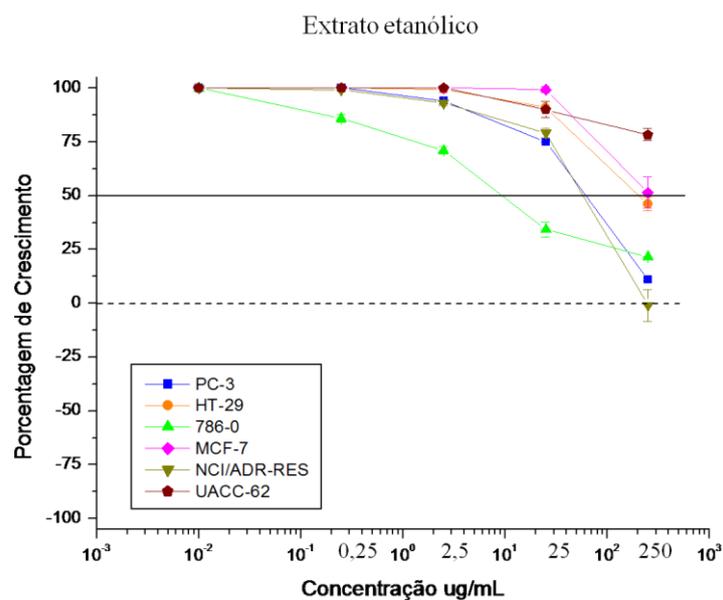


Figura 10 - Porcentagens de crescimento das linhagens de células neoplásicas expostas às concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL) das amostras de *Vernonia rubricaulis* (Asteraceae).

O gráfico representativo do extrato etanólico, mostra a atividade diferenciada para a linhagem 786-0 apresentada na curva verde. Nas demais linhagens, as curvas tocam a linha estimada da GI_{50} em torno da concentração de 25 µg/mL para PC-3 e NCI/ADR-RES e próximas a 250 µg/mL para MCF-7 e HT-29, indicando a atividade moderada a fraca deste extrato nestas linhagens.

No gráfico referente à fase diclorometânica, as curvas de crescimento das linhagens aparecem juntas, demonstrando a moderada atividade antiproliferativa da fase diclorometânica, onde para todas as linhagens as curvas cruzam a estimativa de GI₅₀ mais próximas a concentração de 25 µg/mL.

Jaki *et al.*, (2008) argumentam a relação do nível de pureza de uma amostra com a atividade apresentada nas pesquisas de produtos naturais. Na avaliação da atividade biológica do triterpeno ácido ursólico contra duas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, observou-se que o aumento do grau de pureza do composto poderia anular a atividade antibacteriana. Segundo os autores, esta atividade pode estar relacionada a um efeito sinérgico do ácido ursólico e alguma de suas impurezas comuns removidas no fracionamento, promovendo um efeito antimicrobiano seletivo.

Deste modo, podemos supor, que talvez algum constituinte do extrato etanólico de *V. rubricaulis* possa atuar em sinergia, sendo responsável pela seletividade para as células tumorais de rim (786-0). A partir do processo de partição, estes constituintes podem ter se separado, então a atividade específica para esta linhagem celular foi perdida, ao menos na fase diclorometânica, mantendo-se apenas a atividade moderada desta fase (GI₅₀=36,40 µg/mL), como observado nas demais linhagens

A atividade citotóxica da fase diclorometânica já foi relatada na literatura em *Vernonia scorpioides*. No estudo das folhas e flores desta espécie, a fase diclorometânica obtida da partição do extrato hidroalcoólico, resultou no isolamento e caracterização de um poliacetileno, que avaliado pelo ensaio do MTT, apresentou citotoxicidade para duas linhagens tumorais B16-F10 (melanoma murino) e Hela (adenocarcinoma cervical humano) e ainda efeito genotóxico, onde os autores inferiram que a morte celular deve ter ocorrido via apoptose (BUSKUHLE *et al.*, 2009).

Pagno *et al.*, (2006) também já haviam avaliado o potencial biológico da fase diclorometânica particionada do extrato etanólico das folhas de *V. scorpioides*, do mesmo modo que no presente estudo (com *V. rubricaulis*). A atividade antitumoral foi avaliada *in vivo*, mostrando expressiva inibição do crescimento tumoral e ainda atividade inflamatória, aumentando o influxo de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais tratados sugerindo seu forte potencial antineoplásico.

Além da fase, o extrato diclorometânico também é citado na literatura por sua atividade anticâncer. *Vernonia guineensis* usada popularmente em Camarões para tratamento

do câncer de próstata foi avaliada através dos extratos: aquoso, diclorometânico e metanólico dos tubérculos da plantas. O extrato diclorometânico foi o mais potente e levou ao isolamento do composto pentaisovaleril sucrose, que demonstrou atividade antiproliferativa em duas linhagens de células tumorais de próstata humana PC-3 e DU-145 e ainda atividade antiangiogênica (TOYANG *et al.*, 2012).

Em continuação do estudo de *V. guineensis*, o extrato diclorometano dos tubérculos, avaliado *in vivo* mostrou significativa diminuição do tamanho tumoral após injeção subcutânea de células tumorais de próstata (PC-3) em camundongos nude, quando comparado com o controle. E ainda em teste de citotoxicidade com o composto isolado pentaisovaleril sucrose, apresentou atividade *in vitro* em linhagens neoplásicas de próstata, mama, cólon, leucemia, pulmão, melanoma e ovário (TOYANG *et al.*, 2013).

Compostos isolados obtidos a partir do fracionamento do extrato diclorometânico das folhas da espécie *V. scorpioides*, também demonstraram a atividade anticâncer em células de melanoma murino B16-F10, *in vitro* e *in vivo*, sugerindo a apoptose como causa principal da ocorrência de morte celular (KLEIN *et al.*, 2013).

Nossos resultados apresentam a melhor atividade antiproliferativa da fase diclorometânica para a linhagem neoplásica PC-3. No estudo continuado de Toyang *et al.*, (2012 e 2013), o extrato diclorometânico levou ao isolamento de um composto que assim como o extrato foi ativo frente a esta linhagem. Assim em continuidade deste estudo torna-se necessária a avaliação não somente dos compostos da fase diclorometânica, mas também do extrato diclorometânico de *V. rubricaulis* que é uma espécie com atividade biológica ainda desconhecida e pouco relatada na literatura.

Deve-se observar também que o extrato etanólico demonstrou seletividade para a linhagem 786-0, de adenocarcinoma de rim humano, quando comparada com as demais linhagens, com forte atividade marcada. Além disso, apresentou importante valor de IS, sendo 9x mais seletivo para esta linhagem quando comparada com a linhagem não tumoral - NIH/3T3, de fibroblasto murino, o que ressalta ainda mais a atividade anticâncer do extrato observada.

De acordo a literatura, o gênero *Vernonia* apresenta grande potencial medicinal, sobretudo anticâncer, porém, ainda existe grande necessidade de novos estudos que esclareçam mais a respeito de substâncias isoladas do gênero e suas respectivas atividades biológicas.

Vernonia rubricaulis, avaliada neste estudo, é uma das espécies que ainda foi pouco investigada, sendo sua atividade biológica pouco conhecida. Há apenas alguns estudos que relatam sua toxicidade em animais que se alimentam da espécie, sendo apontada como causadora de intoxicação de gados em Mato Grosso do Sul (BRUM *et al.*, 2002)

Diante da atividade antiproliferativa desta espécie observada no presente estudo, há um amplo espectro de possibilidade de novos testes, motivando a continuidade dos estudos para avaliação do seu potencial biológico, tendo em vista o potencial especialmente citotóxico já relatado no gênero.

Deve-se ressaltar não só a importância de novos estudos que avaliem de forma mais aprofundada os constituintes de todas as espécies aqui avaliadas como promissoras no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer, mas também os mecanismos de atuação dos mesmos, bem como investigar as demais potenciais atividades biológicas dos compostos que ainda são carentes de relatos na literatura.

5.5 Família Erythroxylaceae e Família Sapindaceae

Os extratos bruto da casca do caule das espécies *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* (Erythroxylaceae), bem com o extrato etanólico das folhas de *Diplokeleba floribunda* (Sapindaceae) não apresentaram atividade até a maior concentração testada na triagem em células B16-F10, este resultado foi confirmado em pelo menos duas outras linhagens neoplásicas, não sendo testados novamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de GI_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$) expressos em $\bar{x} \pm \text{sd}$ dos extratos das espécies *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* (Erythroxylaceae) e *Diplokeleba floribunda* (Sapindaceae), além do controle positivo Doxorrubicina nas linhagens celulares.

ORIGEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	AMOSTRA	B16-F10	PC-3	786-0	NIH/3T3
Casca do caule	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum anguifugum</i>	Extrato bruto	>250	>250	>250	>250
		<i>Erythroxylum daphnites</i>	Extrato bruto	>250	>250	>250	225,27 \pm 0,5
Folhas	Sapindaceae	<i>Diplokeleba floribunda</i>	Extrato etanólico	>250	>250	>250	>250
Doxorrubicina				0,019 \pm 0,008	0,24 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01	0,54 \pm 0,2

Das três espécies citadas acima apenas um estudo da atividade biológica do extrato bruto de *E. daphnites*, foi encontrado, tendo resultados não significativos para atividade antibacteriana (Silva, 2013). Para estas espécies são mais comuns estudos botânicos (GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2005 GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2000).

6. CONCLUSÃO

A partir de seis famílias botânicas, as oito espécies vegetais avaliadas no presente trabalho (*Mezilaurus crassiramea*, *Aniba heringerii*, *Annona dioica*, *Macrosiphonia petraea*, *Vernonia rubricaulis*, *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* e *Diplokeleba floribunda*) originaram um total de 31 amostras, que foram testadas frente a seis linhagens de células tumorais, onde a maioria apresentou potencial anticâncer.

Mezilaurus crassiramea apresentou moderada atividade para a fase diclorometânica dos frutos e das folhas. Os melhores resultados foram obtidos para a γ -lactona **3**, que foi ativa em todas das linhagens tumorais testadas (PC-3, HT-29, MCF-7 e UACC-62).

Das amostras de *Aniba heringerii*, o composto espatulenol apresentou atividade moderada frente a todas as linhagens testadas. O óleo essencial do caule, apesar da moderada atividade antiproliferativa, quando comparado à linhagem de células normais (NIH/3T3), mostrou seletividade para as linhagens nas quais foi ativo (786-0, MCF-7 e UACC-62).

Annona dioica demonstrou grande potencial antitumoral *in vitro*. Os extratos obtidos das raízes apresentaram forte atividade antiproliferativa para linhagem de câncer de mama (MCF-7), com destaque para o extrato diclorometânico que foi 10x mais ativo do que o controle positivo (Doxorrubicina) na linhagem neoplásica resistente a múltiplas drogas (NCI/ADR-RES - ovário), além de apresentar seletividade para esta linhagem em relação à linhagem de células normais (NIH/3T3).

A partir do extrato etanólico das raízes, *Macrosiphonia petraea* apresentou atividade moderada para fase acetato de etila, frente a todas as linhagens avaliadas. As demais amostras apresentaram de moderada a fraca atividade antiproliferativa.

Para *Vernonia rubricaulis*, a fase diclorometânica foi ativa frente a todas as linhagens tumorais avaliadas, apresentando moderada atividade antiproliferativa, com menor valor de GI₅₀ para a linhagem PC-3 (próstata). Destacou-se também a citotoxicidade do extrato etanólico das folhas para a linhagem 786-0 (adenocarcinoma de rim), que ainda apresentou seletividade para a mesma.

As espécies *Erythroxylum anguifugum*, *Erythroxylum daphnites* e *Diplokeleba floribunda* não apresentaram atividade até a maior concentração testada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; YAMAUCHI, T. Pregnanes in the root bark of *Nerium odorum*. **Phytochemistry**, v.15, n.11, p.1745-1748, 1976.

ABOSI, A. O.; RASEROKA, B. H. *In vivo* antimalarial activity of *Vernonia amygdalina*. **British Journal of Biomedical Science**, v.60, n.2, p.89-91, 2003.

AFONSO, E.; POTT, A. **Plantas no Pantanal tóxicas para bovinos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 51p, 2001.

AGRAWAL, N.; PAREEK, D.; DOBHAL, S.; SHARMA, M. C.; JOSHI, Y. C.; DOBHAL, M. P. Butanolides from methanolic extract of *Litsea glutinosa*. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, n.3, p.394-400, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York : Garland Science, 2002.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI K. K. L.; SILVA, J. R. A.; VEIGA JUNIOR, V. F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazônica**, v.40, n.3, p.567 - 572, 2010.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K.; VEIGA JUNIOR, V. F. da.; LIMA, E. S. Essential oils composition from *Aniba* and *Licaria* species and their antioxidant and antiplatelet activities. **Química Nova**, v.33, n.1, p.141-145, 2010b.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ALVES, F. M.; BAITELLO, J. B. Uma nova espécie de *Mezilaurus taubert* (Lauraceae) para a flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, n.2, p.355-358, 2008.

AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v.34, p.1-20, 2011.

ARAÚJO, A. C. R. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná - UFPR. 2012.

ATCC. [Acesso em novembro de 2013]. Disponível em: <http://www.atcc.org/en.aspx>

BAI, L.; WANG, L.; ZHAO, M.; TOKI, A.; HASEGAWA, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; HIROSE, K.; SAKAI, J.; BAI, J.; Ando, M. Bioactive pregnanes from *Nerium oleander*. **Journal of Natural Products**, v.70, n.1, p.14-18, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BARATA-SILVA, A. W.; MACEDO, R. L. G.; GOMES, J. E. Potencial de utilização de espécies arbóreas medicinais no Rio Grande do Sul. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, ano III, n.6, 2005.

BARATTO, L. C. **Estudo químico-analítico e morfoanatômico de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (Müll Arg.) Woodson e *Rauvolfia sellowii* Müll Arg.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná/ UFPR, Curitiba, 2010.

BARBOSA, W. L. R., PINTO, L. D. N.. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu-sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.47-49, 2003.

BARRECA, D.; LAGANA, G.; FICARRA, S.; TELLONE, E.; LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill.(Annonaceae). **Food Research International**, v.44, n.7, p.2302-2310, 2011.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. E. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.4, p.531-535, 1999.

BOUGATSOS, C.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D. K. B.; CHINOU, I. B. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. **Verlag der Zeitschrift für Naturforsch**, v.59c, n.5-6, p.368-372, 2004.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BROTTO, M.L.; SANTOS, E.P.; BAITELLO, J.B. Lauraceae no morro dos perdidos (Floresta Atlântica), Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v.60, n.2 p.445-459, 2009.

BRUM K.B.; PURISCO E.; LEMOS R.A.A.; RIET-CORREA F. Intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em bovinos no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.3, p.119-128, 2002.

BUSKUH, H.; FREITAS, R. A.; DELLE MONACHE, F.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R., CORILO, Y.; EBERLIN, M. N.; BIAVATTI, M. W. A new polyacetylene from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.(Asteraceae) and its *in vitro* antitumoral activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.7 p.1327-1333, 2009.

CAIRNS, J. The origin of human cancers. **Nature**, v.289, n.5796, p.353-357, 1981.

CALUX, N. M. DE C. T.; RIBALTA, J. C. L.; STÁVALE, J. N.; FOCCHI, J.; BARACAT, E. C.; DE LIMA, G. R. Angiogenesis in squamous cervical neoplasia: comparative study of two endothelial cells. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.23, n.5, p.313-319, 2001.

CAMPOS, P. A.; GUARIM-NETO, G. Plantas medicinais do Cerrado: velame - *Macrosiphonia velame* (a. St.-hil.) M. Arg.(Apocynaceae). **FLOVET - Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica**,v.1, n.2, p.1-68, 2010.

CÂNDIDO-BACANI, P.M.; CUNHA, M.C.; MARTINS, L.A.V.; PIRES, B.P.; CORDEIRO, K.W.; MATOS, M.F.C.; GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S. **Cytotoxic activity of medicinal plants of the Brazilian Cerrado**. 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2013.

CARBONEZI, C. A.; LOPES, M. N.; SILVA, D. H. S.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M.; SILVA, M. R. da. Derivado cinamoílico com atividade no reparo de

DNA e outras substâncias de *Cinnamomum australe* (Lauraceae). **Química Nova**, v.27, n.2, p.196-198, 2004.

CARMELIET, P.; RAKESH, K. J. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v.407, p.249-257, 2000.

CARVALHO, A. M. R. de. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatório da riparina II (O-Metil-N-2-Hidroxi-Benzoil Tiramina) em modelos experimentais.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2011.

CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; DE ARAUJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.19, n.3, p.197-202, 2000.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. D. O.; PEREIRA, M. D. S. V.; ARRUDA, T. A. D.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, n.4, p.247-249, 2005.

CAVALCANTI, S. B., TELES, H. L., SILVA, D. H., FURLAN, M., YOUNG, M. C. M., BOLZANI, V. S. New tetra-acetylated oligosaccharide diterpene from *Cupania vernalis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.3, p.413-416, 2001.

CAZAÑA-MARTINEZ, Y.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PRIETO-GONZALEZ, S.; MOLINA-TORRES, J.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; URQUIOLA-CRUZ, A. Evaluación fitoquímica preliminar de tres especies cubanas de *Erythroxylum*. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.23, n.2, p. 193-197, 2004.

CHEN, C. Y.; HSU, Y. L.; CHEN, Y. Y.; HUNG, J. Y.; HUANG, M. S.; KUO, P. L. Isokotomolide A, a new butanolide extracted from the leaves of *Cinnamomum kotoense*, arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of p53/p21 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells. **European Journal of Pharmacology**, v.574, n.2, p.94-102, 2007.

CHEN, Y.; CHEN, J. W.; ZHAI, J. H.; WANG, Y.; WANG, S. L.; LI, X. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**, v.58, p.394-400, 2013.

CHENG, H.; LIN, W.; DUH, C.; LEE, K.; TSAI, I.; CHEN, I.; LIN, W. New cytotoxic butanolides from *Litsea acutivena*. **Journal of Natural Products**, v.64, n.12, p.1502-1505, 2001.

CHENG, W.; ZHU, C.; XU, W.; FAN, X.; YANG, Y.; LI, Y.; CHEN, X.; WANG, W.; Shi, J. Chemical constituents of the bark of *Machilus wangchiana* and their biological activities. **Journal of Natural Products**, v.72, n.12, p.2145-2152, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; & DA SILVA, S. A. S. Alcalóides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v.32, n.6, p.1566-1570, 2009.

DE ASSIS JUNIOR, L. R. **Estudo fitoquímico e de genotoxicidade das raízes da *Macrosiphonia petraea*, Apocynaceae**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, 2012.

DE ASSIS JUNIOR, L. R.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; DA ROSA GUTERRES, Z. Pregnanos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v.36, n.4, p.519-523, 2013.

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.439-445, 2009.

DE OLIVEIRA LIMA, I., OLIVEIRA, R. D. A. G., DE OLIVEIRA LIMA, E., FARIAS, N. M. P., DE SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

DE PAULA, J. E., IMAÑA ENCINAS, J., SANTANA, O. A., RIBEIRO, G. S., IMAÑA, C. R. Levantamento florístico e sua distribuição diamétrica da vegetação de um cerrado sensu stricto e de um fragmento de floresta de galeria no ribeirão Dois Irmãos na APA de Cafuringa, DF, Brasil. **Biotemas**, v.22, n.3, 2009.

DOS SANTOS, J. C., DE OLIVEIRA, C. A. N., VARELLA, L., MATOS, A. P., TEREZAN, A. P., LEITE, A. C., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P.C., DA SILVA, M. F. DAS G. F. PIRANI, J. R. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (SAPINDACEAE). **Química Nova**, v.33, n.10, p.2080-2082, 2010.

EVANS, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxyton*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, n.2, p.265-277, 1981.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. D.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcaloides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, suppl.1, p.17-19, 2002.

FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v.7, n.1, p.21-33, 2006.

FIGUEIREDO, E. R.; VIEIRA, I. J.; SOUZA, J. J. D.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; KANASHIRO, M. M.; CÔRTEZ, F. H. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmännii* (A. DC.), Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p.675-681, 2010.

FIGUEIREDO, P. O., GARCEZ, F. R., MATOS, M. F. C., PERDOMO, R. T., QUEIROZ, L. M. M., POTT, A., GARCEZ, A. J. S., GARCEZ, W. S. A new cytotoxic β -carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. **Planta Medica**, v.77, n.16, p.1852-1854, 2011.

FORMAGIO, A. S.; KASSUYA, C. A.; NETO, F. F.; VOLOBUFF, C. R.; IRIGUCHI, E. K.; DO C VIEIRA, M.; FOGGIO, M. A. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.1, p.13-14, 2013 a.

FORMAGIO, A. S.; VIEIRA, M. D. C.; DOS SANTOS, L. A.; CARDOSO, C. A.; FOGGIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E.; ANDRADE-SILVA, M.; KASSUYA, C. A. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, v.16, n.1, p.20-25, 2013 b.

FRESHNEY, I.R. **Culture of Animal Cells**. A manual of Basic Technique. 5th ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

FULLAS, F., HUSSAIN, R. A., CHAI, H. B., PEZZUTO, J. M., SOEJARTO, D. D., & KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v.57, n.6, p.801-807, 1994.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v.32, n.2, p.407-411, 2009.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S. T. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. **Planta Medica**, v.71, n.10, p.923-927, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA A. L. B. D.; ALVES, M. M.; MATOS, M. F. C. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Teminalia fagifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.7, p.1223-1228, 2006.

GARCEZ, F. R.; SILVA, A. F. G.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, M. F. C.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v.77, n.4, p.383-387, 2011.

GONZALEZ-GARCIA, K.; GONZALEZ-LAVAUT, J. A.; GONZALEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZALEZ, S. Género *Erythroxylum*: análisis de la información científica. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 284, 2005.

GRIFFIN, W.J; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v.53, p. 623-637, 2000.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v.140, n.6, p.883-899, 2010.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. D. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.4, p.561-584, 2003.

GUARIM NETO, G.; SANTANA, S.R.; SILVA, J.V.B. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botanica Brasilica**, v.14, n.3, p. 327-334, 2000.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; MANIKANDAN, L.; HALDAR, P. K.; BHATTACHARYA, S.; KANDAR, C. C. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia**, v.74, n.1, p.148-150, 2003.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.59, n.4, p.687-749, 2008.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on old world species). **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, n.2, p.279-292, 1981.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTROM, J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assays. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.42, n.10, p.320-323, 2006.

HERCULANO, A. C. M.; MATOS, W. R. Levantamento das espécies de Sapindaceae arbóreas no estado do Rio de Janeiro. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.3, n.1, p.76-85, 2008.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z. M.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. **Journal of Natural Products**, v.60, n.6, p.581-586, 1997.

HOSTETTMANN, K. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, n.11, p.23-27, 1998.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; Lee, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n.4, p.377-387, 2007.

HOWARD, C. B.; STEVENS, J.; IZEVBIGIE, E. B.; WALKER, A.; McDANIEL, O. Time and dose-dependent modulation of phase 1 and phase 2 gene expression in response to

treatment of MCF-7 cells with a natural anti-cancer agent. **Cell and Molecular Biology**, v.49, n.7, p.1057-1065, 2003.

IMAÑA-ENCINAS, J., SANTANA, O. A., RIBEIRO, G. S., IMAÑA, C. R. Estrutura diamétrica de um trecho de floresta estacional semidecidual na área do Ecomuseu do Cerrado, Goiás. **Cerne**, v.15, n.2, p.155, 2009.

INCA - **Instituto Nacional do Câncer**. [acesso em agosto de 2011]. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012. **Incidência de Câncer no Brasil**. [acesso em novembro de 2013]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014. **Incidência de Câncer no Brasil**. [acesso em janeiro de 2014]. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014

ISSA, A.Y.; VOLATE, S. R.; WARGOVICH, M.J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: new directions and perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.5, p.405-419, 2006.

ITHARAT, 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.33-38, 2004.

IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, n.2, p.229-234, 2003.

IZEVBIGIE, E. B. Discovery of water-soluble anticancer agents from a vegetable found in Benin city, Nigeria. **Experimental Biology and Medicine**, v.228, n.3, p.293-298, 2003.

JAKI, B. U.; FRANZBLAU, S. G.; CHADWICK, L. R.; LANKIN, D. C.; ZHANG, F.; WANG, Y.; PAULI, G. F. Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. **Journal of Natural Products**, v.71, n.10, p. 1742-1748, 2008.

JESUS, N. Z. T. D.; LIMA, J. C. D. S.; SILVA, R. M. D.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, D. T. D. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlceras e

antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1A, p.130-139, 2009.

JIMÉNEZ ALEMÁN, N. M.; GONZÁLEZ-LAVAUT, A.; PRIETO-GONZALEZ S.; MOLINA-TORRES, J.; URQUIOLA-CRUZ, A. Evaluación fitoquímica de 3 especies de *Erythroxylum*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales [revista eletrônica]**, v.9, n.2, 2004.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.10, p.1732-1735, 2004.

KLEIN, J. B.; NOWILL, A. E.; JUNIOR, G. C. F.; BIAVATTI, M. W.; QUINTÃO, N. L. M.; FREITAS, R. A. Cytotoxic, anti-tumour and anti-metastatic activity of two new polyacetylenes isolated from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, n.5, p.307-315, 2013.

KOJIMA, N.; FUSHIMI, T.; TATSUKAWA, T.; YOSHIMITSU, T.; TANAKA, T.; YAMORI, T.; DAN, S.; IWASAKI, H.; YAMASHITA, M. Structure–activity relationships of hybrid annonaceous acetogenins: powerful growth inhibitory effects of their connecting groups between heterocycle and hydrophobic carbon chain bearing THF ring on human cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, p.833-839, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, ABUL, K.; FAUSTO, N. ROBBINS & COTRAN. **Patologia** – Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUO, P. L.; CHEN, C. Y.; TZENG, T. F.; LIN, C. C.; HSU, Y. L. Involvement of reactive oxygen species/c-Jun NH₂-terminal kinase pathway in kotomolide A induces apoptosis in human breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.229, n.2, p.215-226, 2008.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis* **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.10-12, 2006.

LIN, I. J.; YEH, H. C.; CHAM, T. M.; CHEN, C. Y. A new butanolide from the leaves of *Cinnamomum reticulatum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, n.1, p.43-45, 2011.

LOIOLA, M. I. B., AGRA, M. D. F., BARACHO, G. S., QUEIROZ, R. T. D. Flora of Paraíba, Brazil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.2, p.473-487, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p.85-89, 2008.

MAAS, P. J.; MAAS-VAN DE KAMER, H.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v.52, n.80, p.65-98, 2001.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAGALHÃES, F. I. E. **Atividade Antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) das fisalinas B e D isoladas da *Physalis angulata* LIN.** Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará, 2005.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. D. Ó.; LOTUFO, L. V.; MAGALHÃES, H. I.; MORAES, M. O. D.; DE LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. D. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

MAIOLI-AZEVEDO V.; FONSECA-KRUEL V. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.2, p.263-275, 2007.

MANGAL, M.; SAGAR, P.; SINGH, H.; RAGHAVA, G. P. S.; AGARWAL, S. M. NPACT: Naturally occurring plant-based anti-cancer compound-activity-target database. **Nucleic Acids Research**, v.41, n.D1 p.D1124-D1129, 2013.

MANTLE, D.; LENNARD, T. W. J.; PICKERING, A. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v.19, n.3, p.223-240, 2000.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae lindl. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.195-206, 2001.

MARTINS, A.; HAJDÚ, Z.; VASAS, A.; CSUPOR-LÖFFLER, B., MOLNÁR, J.; HOHMANN, J. Spathulenol inhibit the human ABCB1 efflux pump. **Planta Medica**, v.76, p.608, 2010.

MATOS, M. F. C.; LEITE, L. I. S. P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J. M. DE.; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F. G.; SILVA, D. B. DA. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, v.77, n.3, p.227-229, 2006.

MAZUMDER, U. K.; GUPTA, M.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P. K.; ROY, S. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. **Phytomedicine**, v.10, n.2-3, p.185-188, 2003.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw Paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, v.71, n.7, p.1311-1321, 2008.

MELO, C. T. V. **Estudo dos efeitos farmacológicos de (O-METIL)-N-2,6-Dihidroxi-benzoil Tiramina (Riparina III) de *Aniba Riparia* (NEES) mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2006.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, article ID 365359, p.14, 2011.

MENZEL, C. M. **Lychee crop in Asia and the pacific.** Food and Agricultural Organization of the United Nations, Bangkok, Thailand, p. 8-9, 2002.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAU, K.; VISTICA, D.; CURTIS, H.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, n.11, p.757-766, 1991.

MORAES, P. L. R. Sinopse das lauráceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v.5, n.2, p.253-270, 2005.

MORALES, J. Estudios en las Apocynaceae neotropicales XIX: la familia Apocynaceae (Apocynoideae, Rauvolfioideae) en Costa Rica. **Darwiniana**, v.43, n.1-4, p.90-191, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NAKANISHI, Y.; CHANG, F. R.; LIAW, C. C.; WU, Y. C.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Acetogenins as selective inhibitors of the human ovarian 1A9 tumor cell line 1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n.15, p.3185-3188, 2003.

NAZARO, J. M. **Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *rhhipicephalus (boophilus) microplus***. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, S. L., DA SILVA, M. S., TAVARES, J. F., SENA-FILHO, J. G., LUCENA, H. F., ROMERO, M. A., BARBOSA-FILHO, J. M. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, n.2, p.302-326, 2011.

PACCIARONI, A. V.; MONGELLI, E.; ESPINAR, L. A.; ROMANO, A.; CICCIA, G.; SILVA, G. L.; Bioactive constituents of *Conyza albida*. **Planta Medica**, v.5, n.3, p.571-573, 2000.

PADRÓN MÁRQUEZ, B. **Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae**. Tese PhD. UANL, 2010.

PAGNO, T.; BLIND, L. Z.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. O. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.(Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.11, p.1483-1491, 2006.

PENDOTA, S. C., YAKUBU, M. T., GRIERSON, D. S., AFOLAYAN, A. J. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the aqueous extract of *Hippobromus pauciflorus* (Lf) Radlk leaves in male Wistar rats. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.10, 2009.

PEREIRA, M. D. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. D. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p.970-983, 2007.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl.01, p.37-40, 2004.

PINTO, A. C.; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

PLATE, K. H.; BREIER, G.; MILLAUER, B.; ULLRICH, A.; RISAU, W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v.53, n.23, p.5822-5827, 1993.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. D. V.; MAAS, P. J. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.2, p.281-293, 2004.

PRIETO, J. A.; PABLÓN, L. C.; PATINO, O. J.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (Lauraceae). **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v.39, n.2, p.199-209, 2010.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, n.6, p.388-392, 2004.

RIBEIRO, R. V.; SILVA, R. M. D.; LIMA, J. C. D. S.; MARTINS, D. T. D. O. Antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of hydroethanolic extract from *Macrosiphonia velame* (A. St.-Hil.) M. Arg. in animal models. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.3, p.515-523, 2010.

ROUHI, A. M.; WASHINGTON, C. Rediscovering natural products. **Chemical & Engineering News**, v.81, n.41, p.77-91, 2003

SAMPAIO, L. D. F. S.; MAIA, J. G. S.; PARIJÓS, A. M.; SOUZA, R. Z.; BARATA, L. E. S. Linalool from rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) oil inhibits adenylate cyclase in the retina, contributing to understanding its biological activity. **Phytotherapy Research**, v.26, n.1, p.73-77, 2012.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p.442-458, 2013.

SANTOS, P. L.; BOAVENTURA, M. D. A.; DE OLIVEIRA, A. B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurância citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). **Química Nova**, v.17, n.5, p.387-391, 1994.

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.3, p.369-400, 2003.

SHEN, K. H.; LIN, E. S.; KUO, P. L.; CHEN, C. Y.; HSU, Y. L. Isolinderanolide B, a butanolide extracted from the stems of *Cinnamomum subavenium*, inhibits proliferation of T24 human bladder cancer cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Integrative Cancer Therapies**, v.10, n.4, p.350-358, 2011.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1809-1812, 2007.

SILVA, R.; NAGEM, T. J.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIE, O. R. γ -lactones from *Mezilaurus synandra*. **Phytochemistry**, v.22, n. 3, p. 772-773, 1983.

SILVA, S. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SIMIĆ, A.; SOKOVIĆ, M. D.; RISTIĆ, M.; GRUJIĆ-JOVANOVIĆ, S.; VUKOJEVIĆ, J.; MARIN, P. D. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v.18, n.9, p.713-717, 2004.

SIMIONATTO, E.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C.; SILVA, C. B.; CHAGAS, M. O.; POPPI, N. R.; PRATES, C. B.; MATOS, M. F. C.; SANTOS, E. C. S.; CARVALHO, J. E. Chemical composition and cytotoxic activity of leaves essential oil from *Mangifera indica* var. *Coquinho* (Anacardiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.22, n.6, p.596-599, 2010.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n.13, p.1107-1112, 1990.

SŒUR, J.; MARROT, L.; PEREZ, P.; IRAQUI, I.; KIENDA, G.; DARDALHON, M.; MEUNIER, J. R.; AVERBECK, D.; HUANG, M. E. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. **Mutation Research**, v.718, n.1-2, p.24-32, 2011.

SOUZA F. C. F.; MELO C. T. V.; CITÓ M. C. O.; FÉLIX F. H. C.; VASCONCELOS S. M. M.; FONTELES M. M. F.; BARBOSA-FILHO J. M.; VIANA G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.642-654, 2008.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v.45, n.8, p.719-24, 2009.

TOFÓLI, D. **Busca de substâncias bioativas em Lauráceas de Mato Grosso do Sul: constituintes fixos e voláteis de *Aniba heringerii* vattimo-gil e *Mezilaurus crassiramea* (Meissner) Taubert ex Mez.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, 2013.

TOYANG, N. J.; ATEH, E. N.; DAVIS, H.; TANE, P.; SONDEGAM, L. B.; BRYANT, J.; VERPOORTE, R. *In vivo* antiprostata tumor potential of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) tuber extract (VGDE) and the cytotoxicity of its major compound pentaisovaleryl sucrose. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.2, p.724-728, 2013.

- TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, n.3, p.681–723, 2013.
- TOYANG, N. J.; WABO, H. K.; ATEH, E. N.; DAVIS, H.; TANE, P.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, L. B.; Bryant, J. *In vitro* anti-prostate cancer and *ex vivo* antiangiogenic activity of *Vernonia guineensis* Benth.(Asteraceae) tuber extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, n.3, p.866-871, 2012.
- TSAI, I. L.; CHEN, J. H.; DUH, C. Y.; CHEN, I. S. Cytotoxic neolignans and butanolides from *Machilus obovatifolia*. **Planta Medica**, v.67, n.6, p.559-561, 2001.
- TSAI, I.; CHENG, M.; HUNG, H.; CHENG, H.; CHEN, I. Chemical constituents from the leaves of *Litsea acutivena*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Taipei, v.54, n.2, p.503, 2007.
- TSUZUKI, J. K., SVIDZINSKI, T. I., SHINOBU, C. S., SILVA, L. F., RODRIGUES-FILHO, E., CORTEZ, D. A., FERREIRA, I. C. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, n.4, p.577-583, 2007.
- ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; ERIS, C.; SONMEZ, U.; KARTAL, M.; KURUCU, S.; BOZOK-JOHANSSON, C. Terpenoids from *Salvia sclarea*. **Phytochemistry**, v.36, n.4, p.971-974, 1994.
- VAN DER WERFF, H. A revision of *Mezilaurus* (Lauraceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.74, n.1, p.153-182, 1987.
- VAN DER WERFF, H.; RITCHER, H. G. Toward an Improved Classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.83, n.3, p.409-418, 1996.
- VEGA, M. R.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.8, p.1554-1559, 2007.
- VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

VILLO, P.; TOOM, L.; ERISTE, E.; VARES, L. Synthesis of linear aza and thio analogues of acetogenins and evaluation of their cytotoxicity. **European Journal of Organic Chemistry**, v.30, v.2013, p.6886-6899, 2013.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Revista **Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, p.452-457, 2009.

ZANOLARI, B., GUILLET, D., MARSTON, A., QUEIROZ, E. F., DE Q. PAULO, M., HOSTETTMANN, K. Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v.66, n.4, p.497-502, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S., TREMEA, V., LIMBERGER, R. P., SOBRAL, M., HENRIQUES, A. T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.8, p.819-825, 2001.

WHO - World Health Organization. **World Cancer Day**: Global action to avert 8 million cancer-related deaths by 2015. Genebra, 2006. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr06/en/index.html>

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; SLEBODNICK, C.; MEROLA, J.; MILLER, J. S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia pachyclada* from the Madagascar rainforest 1. **Journal of Natural Products**, v.68, n.9, p.1371-1374, 2005.

WONG, F. C.; WOO, C. C.; HSU, A.; TAN, B. K. H. The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. **Plos One**, v.8, n.10, p.e78021, 2013.