UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

APARECIDA RIOS SOARES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Aristolochia spp*. E DE SEUS PRODUTOS DE BIOCONVERSÃO POR *Battus polydamas*

CAMPO GRANDE – MS

2021

APARECIDA RIOS SOARES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Aristolochia spp*. E DE SEUS PRODUTOS DE BIOCONVERSÃO POR *Battus polydamas*

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 do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Bogo
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira.

CAMPO GRANDE – MS

2021

APARECIDA RIOS SOARES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Aristolochia spp*. E DE SEUS PRODUTOS DE BIOCONVERSÃO POR *Battus polydamas*

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 do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito

_____.

Campo Grande, 08 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA CONCEITO

_____ _____

Profa. Dra. Danielle Bogo - FACFAN - UFMS (presidente)

_____ _____

Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda - UFMS

_____ _____

Profa. Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães - FACFAN - UFMS

_____ _____

Prof. Dr. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos (suplente) - UFMS

AGRADECIMENTOS

Como “agradecer” a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui e ser quem eu sou?

Começo agradecendo sobre tudo e todos, ao meu Pai celestial, o meu Deus. A Esse Deus que diante das minhas inseguranças, fraquezas e medos sempre me mostrou o caminho que eu deveria trilhar e sempre esteve ao meu lado.

A Este Pai celestial, que em algumas vezes quando eu estava desanimada e sem forças cheguei a duvidar que os meus pedidos de orações fossem ouvidos, diante das minhas limitações e incertezas que o mundo me apresentava. Mas, que em sonhos e testemunhos me revelou que a mim só cabia crer e orar, pois o mais Ele faria.

O meu eterno agradecimento ao meu Deus, o Deus do impossível, que sempre ouviu as minhas orações e me entregou todas as bênçãos prometidas mesmo eu não sendo merecedora.

A minha família de origem, minha mãe, mulher guerreira, que eu amo muito; meu pai e meu irmão Beto *in memoriam*, que deixaram saudades; aos meus outros irmãos os quais eu amo muito, muita gratidão.

As minhas filhas, Júlia e Roberta, que me ensinaram a ver com os olhos do coração e que são a razão da motivação do meu viver. Agradeço muito a Deus por essas duas bênçãos que Ele me deu, me permitindo ser mãe e conhecer o verdadeiro amor.

Ao meu marido, Vailto, que mais uma vez me deu o apoio que eu precisava para realizar o meu sonho, a este homem que admiro muito pelo seu caráter, por ser um exemplo a ser seguido de como ser um verdadeiro pai, o meu eterno agradecimento.

A minha orientadora, profa. Dra. Danielle Bogo, mulher humana, sábia, dedicada, carismática, professora e pesquisadora exemplar, que sabe lidar com as diferenças que existem entre seus alunos e todos que a rodeiam respeitando a individualidade de cada um, a você professora MEUS PARABÉNS e os meus agradecimentos.

Ao meu co-orientador, o prof. Dr. Cláudio, pessoa super atenciosa, dedicada, compreensiva, o meu muito obrigada.

Às professoras Dra. Carla e a Dra. Mônica, do Programa Ciências Farmacêuticas da UFMS, mulheres sábias, as quais admiro muito e tenho um carinho muito especial, que tive o prazer de conhecê-las e que fizeram parte desta minha conquista, muito obrigada.

A todas as pessoas que me ajudaram nesta jornada, a coordenadora, profa. Dra Alexandra e todos os demais professores do PPGSD que fizeram a base do meu aprendizado me dando

subsídios para pôr em prática conceitos, estratégias, para que essa pesquisa fosse realizada, meus agradecimentos.

Aos servidores técnicos da UFMS, Magali, técnica do Laboratório Biomol; Ademir, secretário do PPGSD; Maria Paula e o Wagner do Biotério, que sempre estiveram prontos para ajudar, o meu muito obrigada.

Quero agradecer também a todos os servidores da Universidade Federal do Mato Grosso, que de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram, desde a minha liberação até a conclusão deste processo, para que eu pudesse me qualificar, muito obrigada.

Por último, quero externar a minha gratidão, a uma grande amiga parceira que conheci aqui em Campo Grande, Suzane, muito obrigada.

“Não haverá borboletas se a
vida não passar por longas e
silenciosas metamorfoses.”
Rubem Alves

RESUMO

O câncer é o nome dado ao crescimento desordenado das células formando uma massa celular, chamada de tumor. Nesse sentido, pesquisas realizadas com plantas do gênero *Aristolochia* demonstraram seus fins medicinais apresentando atividade anticâncer. Além disso, outros estudos relataram que após a ingestão dessas plantas pelas lagartas, ocorre um processo denominado bioconversão obtendo assim, possíveis substâncias inéditas candidatas a protótipos para novos fármacos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade anticâncer *in vitro* dos extratos de *Aristolochia spp*. e de seus produtos de bioconversão realizado por borboletas *Battus polydamas*, nas linhagens celulares neoplásicas (B16-F10 e 786-0) e em linhagem celular não neoplásica (NIH/3T3), bem como calcular o índice de seletividade destes extratos. Para realização dos ensaios *in vitro*, foi utilizado o teste de citotoxicicidade com corante Sulforrodamina B (SRB). Os extratos metanólicos com os melhores resultados foram: Extrato metanólico das folhas de *Aristolochia galeata* (GI_{50} = 32,96 µg/mL na linhagem B16-F10) e extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *Aristolochia gigantea* (GI_{50} = 35,68 µg/mL na linhagem 786-0). Os extratos metanólicos das folhas de *A. gigantea* apresentaram GI_{50} 55,58 µg/mL *e* Índice de Seletividade (IS)= 4,74; enquanto as fezes das lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. gigantea* apresentaram a GI_{50} 35,68 µg/mL e IS= 6,93; indicando serem mais ativos em linhagem neoplásica quando comparada com a normal. Diante dos resultados encontrados nesta pesquisa, este trabalho sugere que pode ter ocorrido um processo de bioconversão pelas lagartas *B. polydamas* após a ingestão da planta *A. gigantea* e a metabolização por este inseto, quando testadas na linhagem 786-0. Portanto, outros estudos são necessários para elucidar o processo de bioconversão por parte dos insetos e o mecanismo de ação desses extratos.

Palavras-chave: Atividade antiproliferativa, bioconversão, *Aristolochia, Battus polydamas.*

ABSTRACT

Cancer is the name given to the disorderly growth of cells forming a cell mass, called a tumor. In this sense, researches carried out with plants of the *Aristolochia* genus demonstrated its medicinal purposes for anticancer activity. Furthermore, other studies have reported that after the ingestion of these plants by caterpillars, a process called bioconversion occurs, thus obtaining possible new prototype candidates for new drugs. The objective of this work was to evaluate an in vitro anticancer activity of *Aristolochia spp*. and its bioconversion products performed by *Battus polydamas* butterflies, in neoplastic cell lines (B16-F10 and 786-0) and in non-neoplastic cell lines (NIH / 3T3), as well as calculating the selectivity index of the extracts. To perform the *in vitro* assays, it was used for cytotoxicity test with Sulforrhodamine B (SRB) dye. The methanol extracts with the best results were: Methanolic extract from the leaves of *Aristolochia galeata* (GI_{50} = 32,96 µg / mL in the line B16-F10) and methanolic extract from the feces of *B. polydamas* caterpillars fed on *Aristolochia gigantea* leaves (GI_{50} = 35,68 µg/mL in the 786-0) lineage. Methanolic extracts from *A. gigantea* leaves showed GI_{50} 55,58 µg/mL and Selectivity Index (SI) = 4,74; while the feces of *B. polydamas* caterpillars fed on *A. gigantea* leaves presented GI_{50} 35,68 µg/mL and IS= 6,93; indicating that they are more active in a neoplastic lineage when compared to the normal one. Given the results found in this research, this work suggests that a process of bioconversion by *B. polydamas* caterpillars may have occurred after the ingestion of the plant *A. gigantea* and its metabolism by this insect, when tested in the 786-0 lineage. Therefore, further studies are needed to elucidate the bioconversion process by insects and the mechanism of action of these extracts.

Keywords: Antiproliferative activity, bioconversion, *Aristolochia*, *Battus polydamas*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da morfologia celular e tecidual.....15
Figura 2. Espessura do tumor melanoma.....16
Figura 3. Lesões características do Câncer de Pele tipo Melanoma.....19
Figura 4. Flor e folha de *Aristolochia galeata* Mart. & Zucc.....22
Figura 5. Lagarta de último estádio de *Battus polydamas* alimentando-se de *Aristolochia arcuata* Mast.; borboleta *Battus polydamas* sobre *Aristolochia mossii* S.Moore.....25
Figura 6. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das folhas de *Aristolochia galeata* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.....34
Figura 7. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das fezes de lagartas *Battus polydamas* alimentadas com folhas de *Aristolochia galeata* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.....35
Figura 8. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das folhas de *Aristolochia gigantea* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.....36
Figura 9. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das fezes de lagartas *Battus polydamas* alimentadas com folhas de *Aristolochia gigantea* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de inibição de crescimento (GI_{50})* e índice de seletividade (IS) dos extratos metanólicos das folhas de *Aristolochia giberti*, *A. galeata*, *A. gigantea*; e extratos metanólicos das fezes de lagartas *Battus polydamas* alimentadas com folhas destas plantas e doxorrubicina em linhagens B16-F10 (melanoma murino), 786-0 (carcinoma de rim) e NIH/3T3 (fibroblasto murino).....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg/mL	Micrograma por mililitro
CN	Controle Negativo
CPM	Câncer de Pele Melanoma
CPNM	Câncer de Pele Não Melanoma
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
GI_{50}	Inibição do crescimento de 50% das células (*Growth inhibition* of *50%*)
IS	Índice de Seletividade
NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (*National Cancer Institute*)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato (phosphate buffered saline)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio criado pelo Instituto Memorial Roswell Park (*Roswell Park Memorial Institute Medium)*
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
T0	Tempo zero
TCA	Ácido tricloroacético

TGI_{50}	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
B16-F10	Melanoma murino
786-0	Carcinoma humano de rim
NIH/3T3	Fibroblasto murino
IP	Intraperitoneal
λ	Comprimento de onda
UV	Ultravioleta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MS	Ministério da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....15
2.1 Câncer.....15
2.1.1 Câncer de pele.....18
2.2 Insetos e plantas.....20
2.3 *Aristolochia spp*.....22
2.4 Ordem: Lepidoptera (com ênfase em *B. polydamas*).....24
2.5 Bioconversão/ Biotransformação.....26
3 OBJETIVOS.....27
3.1 Objetivo geral.....27
3.2 Objetivos específicos.....27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....28
4.1 Obtenção dos extratos.....28
4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*.....28
4.2.1 Preparo das amostras-teste.....29
4.2.2 Teste de Citotoxicidade.....29
4.2.2.1 método sulforrodamina B (SRB).....29
4.2.3 Índice de Seletividade.....31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....32
5.1 Efeito antiproliferativo *in vitro*.....32
6 CONCLUSÕES.....39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....40

1 INTRODUÇÃO

O câncer é o nome dado a mais de 100 tipos de doenças, que têm como características em comum o crescimento desordenado das células formando uma massa celular, chamada de tumor. Esses tumores podem ser chamados de benignos, ou seja, não são classificados como câncer, pois podem ser retirados por um procedimento cirúrgico, sem causar dano ao organismo e raramente levam o paciente a óbito. No entanto, há também os que são chamados de malignos, sendo classificados como câncer. Estes têm a capacidade de realizar metástase, ou seja, as células saem dos órgãos ou tecidos de origem e invadem outros tecidos adjacentes, vasos sanguíneos e linfáticos, e implantam estas células tumorais (OPPERMANN, 2014).

De acordo com a estimativa mundial, no ano de 2018, ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma) (BRAY *et al*., 2018).

A neoplasia com maior taxa de ocorrência entre a população branca é o melanoma acometendo 50 pessoas brancas e 1 pessoa negra para cada 100.000 habitantes. O melanoma cutâneo primário corresponde 4,6% de todas as neoplasias diagnosticadas (FILHO *et al*., 2018). Assim, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para o tratamento deste câncer, sendo uma alternativa utilizada pela população o uso de plantas medicinais.

As plantas medicinais têm sido utilizadas há muitos anos devido a suas propriedades químicas e farmacológicas (BOURHIA *et al*., 2019). Nesse sentido, vale destacar o gênero *Aristolochia*, diante do número de compostos bioativos que apresenta para fins medicinais (NOGUEIRA *et al*., 2021).

O gênero *Aristolochia* compreende cerca de 500 espécies, sendo considerado o mais numeroso da família Aristolochiaceae (BERJANO *et al*., 2009; MARCHESINI *et al*., 2009). Pesquisas realizadas com este gênero demonstraram propriedades terapêuticas, por exemplo: analgésica, anti-diurética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária (ALEIXO *et al*., 2014), bem como atividades antiproliferativa e antitumoral (BENARBA; MEDDAH, 2014).

Além disso, vêm sendo estudados os produtos da bioconversão dessas plantas pelos insetos. Bioconversão é um processo realizado por seres vivos, os quais modificam estruturas específicas de uma substância resultando em modificações químicas e sequenciais, dando origem a produtos inéditos e/ou bioativos (NOGUEIRA, 2014).

Assim, o presente trabalho foi proposto para avaliar a atividade anticâncer dos extratos das folhas de *A. giberti*, *A. galeata* e *A. gigantea in vitro* frente às linhagens neoplásicas B16-F10 (melanoma murino); 786-0 (carcinoma de rim) e na linhagem normal NIH/3T3 (fibroblasto murino), avaliar os extratos das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas destas espécies; além de calcular o índice de seletividade destes extratos nas linhagens neoplásicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

A palavra câncer vem do grego “karkínos”, que significa caranguejo. Ao longo da história, várias descobertas foram realizadas a cerca dessa doença. No período hipocrático acreditava-se que ela era resultado de um desequilíbrio entre o sangue, fleuma, bile amarela e bile negra, sendo a sangria o tratamento realizado na época. Já no século XVIII, era considerada uma doença em algumas partes do corpo humano. Em meados do século XIX, o anatomista Wilhelm Waldeyer, confirmou que era a partir das células normais que surgiam as células cancerosas, e que as metástases era consequência do transporte destas células cancerosas pela corrente sanguínea. Já em 1840, foram realizadas as cirurgias de câncer mais invasivas (MEDRADO, 2015).

Os tecidos do nosso corpo podem sofrer alterações, sem necessariamente ser câncer. Nessa perspectiva, temos a hiperplasia e displasia (Figura 1). A hiperplasia é o aumento de células, devido a uma divisão mais rápida que o normal, havendo o acúmulo das células extras ou proliferação dessas, por exemplo, irritação crônica. Já a displasia, apesar de haver um acúmulo de células extras, estas parecem ser anormais e há mudanças na organização do tecido, sendo que quanto maior a alteração, maior probabilidade de originar o câncer, por exemplo: o nevo displásico (uma mancha anormal que se forma na pele), quando não tratada pode se transformar em melanoma (NCI, 2015).

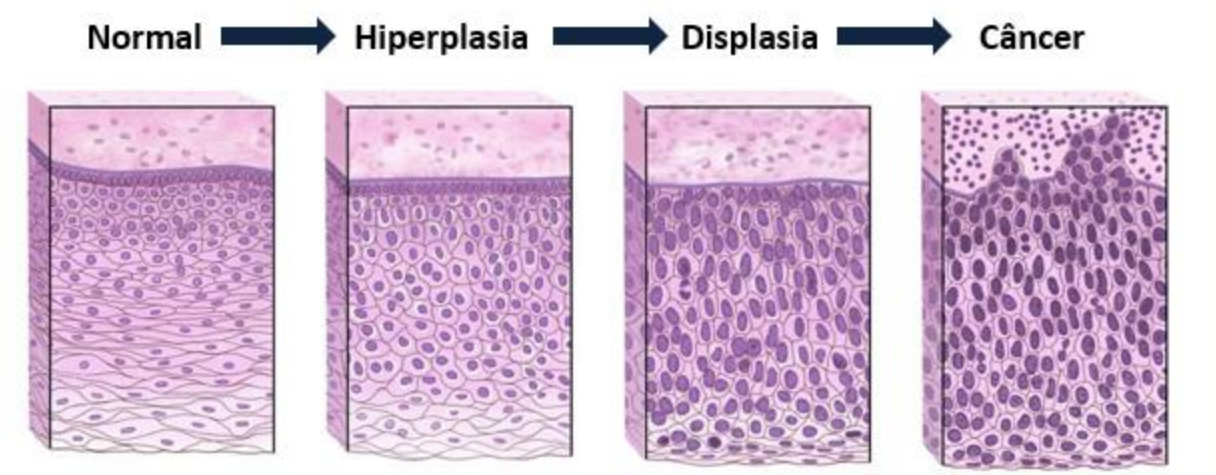

Figura 1. Estágios da morfologia celular e tecidual. Adaptado de https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer

Sendo assim, os principais critérios para classificar os tumores em benignos ou malignos são: diferenciação celular e anaplasia (indiferenciação celular), velocidade de

crescimento tumoral, invasão local e metástases. Baseado nisso, o desenvolvimento do tumor não acontece pelo simples contato do agente carcinógeno com a célula-alvo, sendo necessárias algumas etapas, tais como: a iniciação, a promoção, a progressão e a manifestação. Na fase da iniciação, após o contato com os agentes oncogênicos, ocorrerão alterações no DNA da célula-alvo, havendo diminuição de resposta dos fatores de inibição do crescimento, da diferenciação celular e da apoptose; na fase da promoção existem substâncias irritativas e proliferativas, promovendo a expressão do gene alterado, dando origem a grupos de células com genoma alterado. A fase da progressão é a fase da malignidade e, na fase da manifestação, já se percebe o tumor. Diante da sua expansão, nesta fase surgem os problemas fisiológicos e vários sintomas clínicos (MEDRADO, 2015).

As células indiferenciadas ou anaplásicas possuem uma enorme variação em sua morfologia, chamada de pleomorfismo, com variação no tamanho e forma nuclear, apresentando núcleo muito corado e escuro (hipercromático) e nucléolo único ou múltiplos (KUMAR *et al*., 2021).

Vale ressaltar que as células tumorais apresentam algumas características peculiares, tais como: não têm a facilidade de produzir as moléculas conhecidas como caderinas, que ajudariam na adesão de uma célula à outra, sendo assim, elas conseguem se desprender do tumor primário e infiltrar nos tecidos vizinhos; outros fatores importantes são a velocidade na locomoção apresentada por muitas dessas células e a produção de metaloproteínases; com isso elas conseguem dissolver as camadas de colágenos presentes na membrana basal desestruturando, assim, os tecidos. Além de tudo isso, por necessitar de muitos nutrientes, elas se mantêm na periferia dos vasos sanguíneos, e com sua capacidade de produzir fatores de crescimento promovem a angiogênese, ou seja, a formação de mais vasos capilares (MEDRADO, 2015).

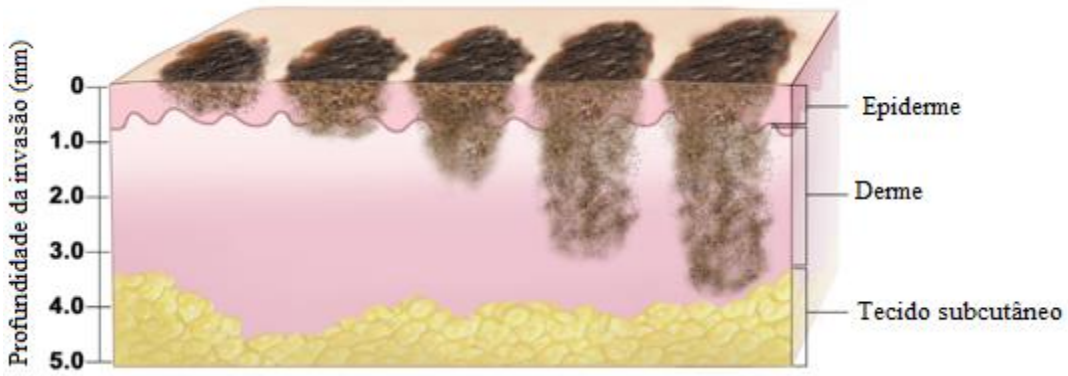

Figura 2. Espessura do tumor melanoma. Adaptado de: https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#_96

Neste sentido, quando o tumor cresce lentamente (Figura 2) é possível que os tecidos adjacentes que não foram atingidos promovam uma barreira sobre o tumor na forma de cápsula, possibilitando a formação de um tumor benigno. Entretanto, quando a multiplicação está ocorrendo de uma forma exacerbada, o mecanismo de encapsulamento não é possível; dessa maneira, as células neoplásicas infiltram em meio às células dos tecidos adjacentes alcançando os vasos sanguíneos até atingir outras partes do organismo, desenvolvendo assim metástases (MEDRADO, 2015).

O principal problema de saúde pública no mundo é o câncer. Em muitos países, está entre as 4 principais causas de morte, antes mesmo das pessoas atingirem os 70 anos de idade. A estimativa mundial aponta que no ano de 2018 ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (excluindo 9,5 milhões os cânceres de pele não melanoma) (INCA, 2019).

No Brasil, estima-se que, a cada ano, no período compreendido entre 2020-2022, o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Nesse sentido, o câncer de pele não melanoma corresponderá a 27,1% de todos os tipos de câncer nos homens e 29,5% nas mulheres (INCA, 2019).

Segundo o *World Cancer Report da International Agency for Research on Cancer* (IARC), diante das exposições das pessoas a fatores de risco, a projeção é que em 2030 aproximadamente 22 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com câncer (ANTUNES *et al*., 2015), uma vez que apenas 1% dos casos de câncer é hereditário, enquanto 99% são esporádicos (BECKER; BARBOSA, 2018).

São diversas as causas que levam uma pessoa a desenvolver câncer. Isso se deve ao crescimento exponencial nas mudanças dos hábitos alimentares e nas condições sociais, ambientais, políticas e econômicas dos indivíduos no mundo contemporâneo (MEDRADO, 2015). Dessa maneira, há uma interação entre fatores genéticos (internos), que correspondem à capacidade do organismo em se defender das agressões externas, e os fatores ambientais (externos), que incluem o meio ambiente e os hábitos do indivíduo (por exemplo, sedentarismo, dieta inadequada, exposição solar excessiva, tabagismo, consumo de álcool em excesso, etc.) (OPPERMANN, 2014).

Nessa perspectiva, as substâncias que atuam causando danos ao DNA da célula, gerando mutações no seu genoma, são chamadas de carcinógenos. Já os genes que sofrem as mutações a ponto de causar o câncer são chamados de proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes são os responsáveis pela regulação da proliferação celular, e diante de

uma mutação se transformam em oncogenes, alterando a sua função; dessa forma, o aumento exacerbado de sua expressão pode levar à estimulação constante na divisão celular, gerando um tumor maligno (BATISTA *et al*., 2018). Já os genes supressores tumorais têm como funções inibir o crescimento celular anormal e reparar os danos do DNA; com isso mantêm a estabilidade genômica (BECKER; BARBOSA, 2018).

O diagnóstico do câncer é realizado através de um procedimento denominado biópsia, que é quando um fragmento do tecido comprometido é retirado e examinado por um profissional habilitado. Após esta etapa, novos exames são realizados para definir a extensão da doença, possibilitando confirmar se ocorreram metástases. Diante disso, o câncer é uma doença que tem cura, inclusive naqueles que já tenham desenvolvido metástases, quando diagnosticado precocemente e quando buscam o tratamento, sendo o último a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, de acordo o tipo de câncer (OPPERMANN, 2014).

2.1.1 Câncer de pele

As neoplasias cutâneas estão distribuídas em dois grupos, sendo eles: melanoma e não melanoma. Os carcinomas de pele não melanoma, subdividem-se em Carcinoma Basocelular (CBC) e Carcinoma Espinocelular (CEC) ou Epidermoide. O CBC origina-se a partir de células não queratinizadas, as quais são responsáveis por formar a camada basal da epiderme e as lesões aparecem de uma forma lenta, em áreas que estão mais expostas ao sol, sendo os adultos e idosos os mais acometidos. Já o CEC se manifesta nos ceratinócitos, nas células escamosas, nas camadas superiores da pele e pode apresentar metástase (LOPES *et al.*, 2020).

As Neoplasias de Pele Não Melanoma (NPNM) correspondem a 95% das neoplasias de pele, possuem baixo risco de mortalidade e altos custos devido ao investimento em tratamentos. Além disso, os pacientes que já apresentaram este tumor possuem tendência maior de desenvolver melanoma cutâneo primário (FILHO *et al*., 2018). São consideradas as neoplasias malignas mais diagnosticadas no mundo, e predominam em ambos os sexos; são mais comuns em pessoa de pele clara acima dos 40 anos (INCA, 2019). Raramente sofrem metástases, apresentando alto índice de cura a partir de pequenos procedimentos. Já as Neoplasias de Pele Tipo Melanoma (NPTM) representam aproximadamente 5% dos tumores de pele, sendo mais agressivos e apresentando maior letalidade que os anteriores (ANTUNES *et al*., 2015).

A NPTM é um tumor maligno, que se origina devido à modificação do melanócito em melanócito atípico, sendo o nível da junção dermoepidérmica da pele, o local de acometimento mais comum. Quando não diagnosticado no início (fase de crescimento radial),

infiltra a derme (fase de crescimento vertical) podendo evoluir para metástase. As patogêneses do melanoma estão associadas com modificações celulares, tais como proliferação e imortalização celular, e também às alterações moleculares, como: processo de via de sinalização, ciclo celular e adesão celular (FILHO *et al*., 2018).

Como fatores de risco vale destacar a combinação dos fatores constitucionais quanto à exposição aos fatores ambientais. Em se tratando dos constitucionais podemos citar: antecedente familiar de melanoma, tipo de pele, idade avançada, presença de múltiplos nevos, xeroderma pigmentoso e nevos displásico. E como fator ambiental, temos o mais importante à exposição solar sem proteção, devido os raios ultravioletas tipos A e B. Dessa forma, as pessoas que apresentam pele, olhos e cabelos claros estão mais predispostas ao seu desenvolvimento, principalmente, em regiões do corpo que ficam expostas ao sol (FILHO *et al*., 2018).

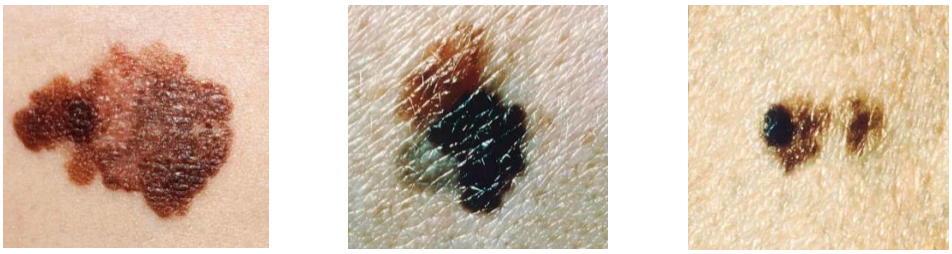

Figura 3. Lesões características do Câncer de Pele tipo Melanoma. Fonte: <https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/799465.jpg>

Há subtipos de melanoma (Figura 3) com diferentes taxas de incidência, tipos e evoluções, sendo os quatro principais tipos: melanoma extensivo superficial, nodular, acrolentiginoso e lentigo maligno melanoma. O melanoma extensivo superficial é o tipo de melanoma mais comum em pessoas de pele clara, com idade entre 30-60 anos, representando cerca de 70% dos melanomas cutâneos (FILHO *et al*., 2018).

Em 2018, foi estimado no mundo, 1,04 milhão de casos novos de câncer de pele não melanoma e 290 mil casos de câncer de pele melanoma. Sendo que, no Brasil, ocorreram em 2017, 1.301 óbitos de câncer de pele não melanoma em homens e 949 óbitos em mulheres. Enquanto o câncer de pele melanoma foram 1.031 e 804 óbitos em homens e mulheres respectivamente (INCA, 2019).

No Brasil, espera-se para cada ano do triênio (2020-2022) 83.770 casos novos de câncer de pele não melanoma em homens correspondendo a 80,12 casos novos a cada 100 mil homens e 93.160 em mulheres (86,65 casos novos a cada 100 mil mulheres). Em relação ao câncer de pele melanoma, o número de casos novos será de 4.200 em homens correspondendo

a (4,03 casos novos a cada 100 mil homens) e de 4.250 em mulheres (3,94 casos novos para cada 100 mil mulheres) (INCA, 2019).

O diagnóstico clínico do melanoma baseia-se na inspeção de lesões cutâneas irregulares, seguindo a regra do ABCD: Assimetria, Bordas irregulares, Cor variada (desde o castanho-claro passando por vários matizes, chegando até a cor negra, ou também área esbranquiçada com despigmentação). Quando o diagnóstico é realizado precocemente, conforme a extensão da lesão e a escolha do tratamento haverá um melhor prognóstico para a maioria dos casos de câncer. É válido ressaltar que após o tratamento, deve ser realizado acompanhamento de cinco anos, período no qual há possibilidade de haver recidivas (FILHO *et al.*, 2018), além disso, a fotoproteção e a redução da exposição aos raios UV são essenciais para prevenir o paciente de desenvolver carcinoma (ANTUNES *et al*., 2015).

2.2 Insetos e plantas

Os insetos possuem uma relação muito próxima com as plantas, principalmente aqueles que são considerados fitófagos, que utilizam as plantas como alimentos ou aqueles que são conhecidos como polinizadores, como exemplo, as flores que são polinizadas por mariposas apresentam cores claras, pendentes para baixo e têm antese (abertura das flores) noturna, já as flores que são polinizadas pelas borboletas apresentam cores vermelhas, amarelas ou azuis e estão direcionadas para cima, apresentando antese diurna (GULLAN; CRANSTON, 2017). Dessa maneira, cada grupo de insetos ao interagir com as plantas apresentam as suas peculiaridades, isso se deve aos diversos fatores que existem, tais como, clima, predação, parasitismo, composições químicas e morfologia (WANKE *et al*., 2006).

A maioria das lagartas são fitófagas e acabam sendo consideradas pragas para as plantas, pois as larvas maiores alimentam-se nas bordas das folhas, enquanto as larvas menores alimentam-se perfurando as folhas. No entanto, diante da diversidade de espécies que existem há aquelas que se alimentam de grãos armazenados e farinhas (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2015).

Sendo assim, os insetos foram classificados em 3 categorias: monófagos aqueles que se alimentam de apenas uma espécie de vegetal; oligófagos os que se alimentam de diversos gêneros que constitui a mesma família e os polífagos, que são os que se alimentam de diferentes espécies vegetais, compreendendo várias famílias (BERNAYS; CHAPMAN, 1994).

Quando algumas larvas alimentam-se das substâncias químicas de defesa produzidas pelas plantas, geralmente elas conseguem reter estas toxinas, ficando retidas no inseto até a fase adulta. Consequentemente, este consegue vencer as barreiras, e acabam se tornando especialistas em desintoxicar ou sequestrar estas toxinas vegetais; dessa forma conseguem se desenvolver nestas plantas e acabam utilizando estas toxinas vegetais ou metabolizam-nas para a formação de outros compostos, com isso conseguem se tornar impalatáveis, contribuindo também para a sua própria defesa (GULLAN; CRANSTON, 2017).

No entanto, há insetos que utilizam outros meios para vencer as barreiras químicas presentes nos vegetais, tais como aqueles que se alimentam de algumas partes das plantas com baixas concentrações de metabólitos; outros que possuem intestinos impermeáveis a determinados aleloquímicos, contribuindo com a excreção das toxinas e também aqueles insetos que metabolizam os constituintes químicos presentes nas plantas, fazendo uso de vias metabólicas com o auxílio dos microrganismos endossimbióticos (HARTMANN, 2008; LILLY, 1994).

Estudos anteriores evidenciaram que lagartas de *B. polydamas* podem metabolizar ácidos aristolóquicos, aristolactamas, diterpenos e lignanas. Ácidos aristolóquicos, por exemplo, são geralmente transformados em derivados mais polares, por meio de reações de desmetilação, hidroxilação e/ou glicosilação. Por outro lado, um estudo sobre o metabolismo das aristolactamas I e II por esse inseto mostrou que estas eram bioconvertidas para ácidos aristolóquicos I e II, respectivamente (NOGUEIRA *et al*., 2021).

A metabolização das lignanas dibenzilbutirolactônicas kusunoquinina e hinoquinina, bem como do diterpeno ácido (–)-(5R,8R,9S,10R,13R)-8-hidroxi-labdan-15-óico, por lagartas de B. polydamas foi também previamente relatada na literatura. Foram obtidas duas lignanas dibenzilbutânicas glicosiladas inéditas: ácido (–)-(8S,8R’)-(3,4-metilenedioxi)-(3’,4’)-(dimetoxi)-9’-O-β-glucopiranosil-lignan-9-óico e ácido (–)-(8S,8R’)-[3,4:3’,4’-bis(metilenedioxi)]-9’-O-β-glucopiranosil-lignan-9-óico. O grupo metílico (C-18) do ácido (–)-(5R,8R,9S,10R,13R)-8-hidroxi-labdan-15-óico foi sequencialmente oxidado para grupos -CH2OH e -CO2H, sendo parte do produto de monohidroxilação adicionalmente hidroxilado em C-7 para dar um derivado acídico triidroxilado. Os três produtos de bioconversão desse diterpeno não haviam sido descritos na literatura e foram caracterizados como ácidos (4S,5S,8R,9S,10R,13R)-8,18-dihidroxi-labdan-15-óico, (4S,5S,7R,8S,9S,10R,13R)-7,8,18-trihidroxi-labdan-15-óico e (–)-(4S,5S,8R,9S,10R,13R)-8-hidroxi-labdan-15,18-dióico (NOGUEIRA *et al*., 2021).

2.3 *Aristolochia spp*

De acordo com Thorne (1992, 2001), as angiospermas estão divididas em 450 famílias, distribuídas em 13.678 gêneros, com aproximadamente 257.400 espécies. Entre elas, encontra-se a Aristolochiaceae, que se encontra distribuída em regiões tropicais e temperadas (JUDD *et al*., 2009). Essa família está dividida em 2 subfamílias: 1) Aristolochioideae, formada pelos gêneros *Aristolochia sensu lato* (s.l) e *Thottea*; e 2) Asaroideae, constituída pelos gêneros *Asarum* e *Saruma* (LOPES *et al*., 2001; NOGUEIRA, 2010).

O gênero *Aristolochia* compreende cerca de 500 espécies, sendo considerado o mais numeroso na família Aristolochiaceae, com aproximadamente 100 espécies catalogadas na flora brasileira (BERJANO *et al*., 2009; MARCHESINI *et al*., 2009). As espécies que fazem parte dessa família são consideradas ervas lianas ou arbustos, que tem como características: folhas alternas e espiraladas, simples, às vezes lobadas, inteiras; flores bissexuais, radiais a bilaterais; sépalas; pétalas geralmente ausentes; estames, quase sempre com 6-12 filetes; e carpelos 4 a 6; os grãos de pólen quase sempre apresentam sem aberturas; 4 a 6 estigmas; sementes aplanadas e fruto cápsula abrindo desde a base (JUDD *et al*., 2009).

Figura 4. Em destaque, flor e folha de *Aristolochia galeata* Mart. & Zucc. (sinônimo heterotípico de *Aristolochia labiata* Willd.). Fonte: Arquivo pessoal de Cláudio R. Nogueira.

Pesquisas realizadas com o gênero *Aristolochia* demonstraram algumas propriedades terapêuticas, por exemplo: analgésica, anti-diurética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e antiparasitária (ALEIXO *et al*., 2014).

Além das propriedades citadas acima, a planta *Aristolochia* apresenta também atividade antiproliferativa e antitumoral, como mostra um estudo realizado por Benarba e Meddah (2014), que utilizaram a planta *Aristolochia longa*, demonstrando que o extrato aquoso dessa planta induziu a inibição do crescimento celular das células do linfoma de Burkitt (BL41), por apoptose (BENARBA; MEDDAH, 2014). Em outro estudo *in vivo* utilizou-se dietilnitrosamina em camundongos Balb/c para a formação do carcinoma hepatocelular. Logo após, os camundongos foram tratados com extratos metanólicos de raízes de *Aristolochia tagala*, e os resultados sugeriram que os componentes ativos da *Aristolochia* podem exercer efeitos anticâncer por meio da sinalização NF-kB mediada por fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α). (HADEM *et al*., 2016).

Quanto ao seu perfil químico, existem diferenças significativas nos perfis químicos das espécies brasileiras de Aristolochiaceae, ocorrendo com maior frequência compostos das classes dos lignoides, terpenoides, alcaloides, alcamidas e flavonoides (LOPES *et al*., 2001; LEITÃO; KAPLAN, 1992; PRIESTAP *et al*., 2002).

Um estudo fitoquímico demonstrou que a espécie *A. galeata* (Figura 4), também conhecida como “jarrinha” ou, “cipó mil homens” (ALVES *et al*., 2011), é uma das espécies que se encontra distribuída no bioma Cerrado, contém esteroides, triterpenoides, flavonoides, cumarinas e alcaloides (ALEIXO *et al*., 2014).

Em outro estudo realizado por Nogueira *et al*., 2021 identificou-se o ácido colavênico como sendo o constituinte químico mais abundante nos extratos das folhas de *A. galeata* (cultivada em Dourados-MS) e das fezes de lagartas alimentadas com folhas dessa planta. Ao se comparar entre as porções solúveis em $CDCl_3$ desses dois extratos (brutos), não foram detectados possíveis produtos de bioconversão, sendo observada apenas uma diferença sutil entre eles – a presença de 2-metilpropanol no extrato fecal, que não foi detectado no extrato foliar. Todavia, diferenças significativas foram observadas quando se comparou os espectros de RMN das respectivas porções insolúveis em $CDCl_3$.

Os ácidos aristolóquicos encontrados no gênero *Aristolochia* são considerados nefrotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (ABDELGADIR, 2011). Entretanto, pesquisas realizadas no sudoeste da Nigéria revelaram a inexistência desta toxicidade induzida por *Aristolochia* em pacientes com diabetes que faziam uso nas decocções (SULYMAN *et al*., 2016). De acordo com ZHOU *et al*. (2019), é preciso mais pesquisas, pois não há indícios epidemiológicos e experimentos em animais suficientes, que possa ter relação direta dos ácidos aristolóquicos com o câncer, havendo então, muitas divergências entre o real poder

farmacológico do gênero *Aristolochia* com os estudos toxicológicos apresentados de citotoxicidade e mutagenecidade (SILVA *et al*., 2019).

2.4 Ordem: Lepidoptera (com ênfase em *B. polydamas*)

Os insetos são considerados seres que apresentam grande biodiversidade, sendo a ordem Lepidoptera conhecida como uma das principais ordens dos insetos (GULLAN; CRANSTON, 2017).

De acordo com os entomologistas, uma das primeiras divisões dessa ordem foi a subdivisão em duas subordens, conforme as características das antenas, sendo elas: Rhopalocera (borboletas), apresentando antenas delgadas e intumescidas no ápice e a subordem Heterocera (mariposas), que apresentam antenas filiformes, setáceas ou plumosas (TRIPLEHORN e JOHNSON, 2015).

A família Papilionidae é composta por três subfamílias: Papilioninae, Baroniinae e Parnassinae. A subfamília Papilioninae é constituída por três tribos: Troidini, Papilionini e Graphiini (AUBERT *et al*., 1999; SILVA-BRANDÃO *et al*., 2005). A tribo Troidini predomina nas Américas Central e Sul e na região Indo-australiana (SILVA-BRANDÃO *et al*., 2005; HAUSER, 1993). Dos doze gêneros que são reconhecidos, apenas três deles encontram-se no Brasil: *Battus*, *Euryades* e *Parides* (SCALCO, 2012).

Em se tratando das borboletas, conforme a *Encyclopedia of insects* (RESH; CARDÉ, 2009), existem no mundo aproximadamente de 15.000 a 20.000 espécies. Destas foram descritas mais de 3.500 espécies no Brasil, com aproximadamente 1.000 espécies presentes no Cerrado (SOUSA, 2019). Vale ressaltar que os insetos que fazem parte desta ordem são bastante numerosos, predominam frequentemente em quase todos os lugares (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2015), e oferecem muitas vantagens econômicas, ambientais e inúmeros compostos químicos, os quais podem ser extraídos ou sintetizados para serem utilizados (GULLAN; CRANSTON, 2017).

São conhecidos como holometábolos, isto é, insetos que apresentam o desenvolvimento completo, passando pelas fases de ovo, larva, pupa ou crisálida e adulto (BERTI; CERIGNONI, 2010). Grande parte dos lepidópteros é capaz de gerar uma vez por ano, outros conseguem gerar duas ou mais vezes e há aqueles insetos que para completar uma geração precisam de dois ou três anos. Dessa maneira, eles são capazes de realizar uma metamorfose completa, dando origem às larvas, formando na maioria das vezes um casulo bem organizado que se transformam em pupa ou crisálida. As espécies dessa ordem que voam quase

exclusivamente durante o dia são as borboletas, enquanto a maiorias das mariposas são ágeis à noite (GULLAN; CRANSTON, 2017).

A larva de Lepidoptera ou lagarta é considerada mastigadora e apresenta-se eruciforme, com o corpo no formato cilíndrico, contendo 13 segmentos: 3 torácicos e 10 abdominais, acompanhados de pernas, sendo algumas delas consideradas falsas-pernas; possui também uma cabeça com seis estemas em cada lado e um par de antenas curtíssimo, um aspecto muito assustador que pode ser útil para a sua própria defesa, em se tratando dos predadores (BERTI; CERIGNONI, 2010; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2015). No período de crescimento ela passa por vários estágios trocando de pele, até o momento que ela chega ao último estágio surgindo então uma pupa, até atingir a fase adulta (FELIX *et al*., 2011) (Figura 5). Nesta fase, apresenta um aparelho bucal do tipo espirotromba passando a ser sugador (BERTI; CERIGNONI, 2010), quando surgem as asas, completando então o ciclo e estando pronta para a reprodução (FELIX *et al*., 2011; BERTI; CERIGNONI, 2010).

As lagartas da espécie *B. polydamas*, quando são ameaçadas, têm a capacidade de expor uma glândula de cor alaranjada em forma de "Y", denominada osmetério (BERTI; CERIGNONI, 2010). Estas se alimentam exclusivamente de plantas da família Aristolochiaceae (KLITZKE; BROWN, 2000; SIME *et al*., 2000).

Para que seja feita a identificação dos adultos dessa ordem devem ser levadas em conta algumas características, tais como: as asas (formato das asas, estrutura das escamas, venação), as peças bucais (os palpos e a probóscide), os ocelos (presença ou ausência), pernas, abdômen, tamanho, cor, genitália masculina e feminina (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2015).

Figura 5. Lagarta de último estádio de *Battus polydamas* alimentando-se de *Aristolochia arcuata* Mast.; borboleta *Battus polydamas* sobre *Aristolochia mossii* S.Moore. Fonte: Arquivo pessoal de Cláudio R. Nogueira.

2.5 Bioconversão/ Biotransformação

Biotransformação é quando uma substância catalisada por enzimas, sofre uma modificação na sua estrutura, sendo que ao utilizarmos organismos vivos a fim de obtermos uma modificação estrutural damos o nome de bioconversão; ambas são métodos práticos utilizados a fim de obtermos substâncias bioativas que servirão como protótipos para novos fármacos (NOGUEIRA, 2014).

Da mesma forma, Resende (2016) aborda que é vantajoso o processo de biotransformação para obtenção de produtos novos, com maior qualidade do produto final, com menores custos, quando comparados com os processos sintéticos.

Portanto, há um grande interesse em utilizar o método de bioconversão, diante das possibilidades do acesso a novos compostos, com a possível modificação estrutural e a desintoxicação reduzida dos produtos metabolizados (NOGUEIRA *et al*., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anticâncer *in vitro* de extratos aristoloquiáceos de folhas e de fezes de lagartas de *B. polydamas* alimentadas com folhas saudáveis de *Aristolochia spp*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos das folhas de *A. galeata*, *A.gigantea* e *A. giberti* e de seus produtos de bioconversão (material fecal) por lagartas de *B. polydamas* que foram alimentadas com essas plantas em linhagens celulares neoplásicas: B16-F10 (melanoma murino) e 786-0 (carcinoma de rim).

Determinar a citotoxicidade destes extratos na linhagem celular NIH/3T3 (fibroblasto murino).

Calcular o índice de seletividade destes extratos nas linhagens neoplásicas utilizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos extratos

Os extratos metanólicos das folhas de *A. giberti*, *A. galeata*, *A. gigantea* e das fezes das borboletas *B. polydamas* foram extraídas individualmente e exaustivamente por maceração com metanol. Após as etapas de filtração simples, as soluções de metanol obtidas foram concentradas sob pressão reduzida para dar os extratos das fezes e das folhas (NOGUEIRA *et al*., 2021), sob coordenação do professor Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira (coorientador deste projeto), da Universidade Federal da Grande Dourados, que gentilmente forneceu as amostras para os ensaios.

4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Para este ensaio, foram utilizadas as linhagens de células neoplásicas: adenocarcinoma humano de rim (786-0 ATCC CRL-1932), melanoma murino (B16-F10) e também células da linhagem não tumoral de fibroblasto murino (NIH-3T3 ATCC CRL-1658) adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro, para a determinação do Índice de Seletividade (HOUGHTON *et al*., 2007).

Segundo a metodologia descrita por Freshney (2005), para os testes de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens de células que estavam mantidas em nitrogênio líquido (-196 ºC), sendo estas descongeladas em banho maria a 37 °C e transferidas para um tubo cônico de 15 mL, contendo 9 mL de meio de cultura. Para as células NIH-3T3 foi utilizado o meio de cultivo DMEM (*Dulbecco 's Modified Eagle Medium*) e para o cultivo das demais células foi usado o meio RPMI (*Roswell Park Memorium Institute*), devido à melhor adaptabilidade ao crescimento. A estes meios foram acrescentados antibióticos (Penicilina ou Estreptomicina a 1%), juntamente com soro bovino fetal (SRB) a 10%.

Em seguida, o tubo foi colocado na centrífuga por 4 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o pellet foi ressuspendido em 5 mL de meio de cultura apropriado, sendo então transferida esta suspensão para garrafinhas de 25 cm² e levadas para a incubadora a 37 °C em atmosfera úmida 5% de CO_2. Neste momento a garrafinha ficou entreaberta permitindo com isso a penetração do CO_2, segundo a metodologia descrita por (FRESHNEY, 2005).

Após a adesão das células no frasco, apresentando aproximadamente 80% de confluência, aspirou-se o meio de cultura e procedeu-se à tripsinização. A saber: acrescentou-

se 1 mL de tripsina-EDTA (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4 mantendo em incubadora a 37 ºC por cerca de 1 a 4 min. Transferiu-se esta suspensão celular para um tubo cônico de 15 mL, contendo 3 mL do meio completo (meio + antibióticos e soro bovino fetal a 10%) para que a tripsina fosse inativada. Após, centrifugou-se por 4 min a 1000 rpm e aspirou o sobrenadante, obtendo o pellet de células.

O meio completo foi novamente acrescentado e o pellet ressuspendido, formando uma suspensão. Em seguida, para obtenção de um concentrado de 5000 células foi retirada uma alíquota dessa suspensão e acrescentou-se o corante azul de tripan (1:4), para que as células pudessem ser contadas na câmara de Newbauer (hemocitômetro).

4.2.1 Preparo das amostras-teste

Os extratos utilizados foram primeiramente pesados e dissolvidos em dimetilsufóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL, ou seja, 100.000 µg/mL.

Em seguida foram realizadas novas diluições em meio de cultura para obtenção de quatro concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL a serem testadas nas células, em triplicata (FIGUEIREDO *et al*., 2011). O DMSO por ser citotóxico em altas concentrações foi diluído com o meio, dessa forma ficou abaixo de 1% p/v (HOUGHTON *et al*., 2007).

4.2.2 Teste de Citotoxicidade

4.2.2.1 método sulforrodamina B (SRB)

O método selecionado para esta etapa foi o sulforrodamina B (SRB) conforme Skehan e colaboradores (1990).

Este método é sensível, simples e reprodutível, tendo como princípio a captação do corante rosa aminoxantina pelos aminoácidos básicos presentes no interior da célula. Dessa forma, quanto maior o número de células, maior a quantidade de corante captado por elas e maior será a liberação e solubilização do corante para a leitura (HOUGHTON *et al*., 2007).

Após a contagem celular realizada na câmara de Newbauer foram realizadas diluições para obter a densidade celular adequada para a inoculação nas placas de Elisa (MONKS *et al*., 1991). Sendo assim, foram preparadas as placas denominadas T0 (tempo zero) e as placas testes (T).

No dia da adição das amostras na placa T0, foram adicionados 100 µL da suspensão celular de cada linhagem e também foi colocado em outros poços apenas meio de cultura que serviu como branco, ambos em triplicata. Logo após, foi colocada na incubadora a 37 °C e 5% de CO_2 por um período de 24 h. Após este período, foi realizada a coloração usando o método sulforrodamina B (SRB); descrito abaixo, no qual utiliza um corante que tem como características afinidade pelos aminoácidos das células (SKEHAN *et al.*, 1990).

Nas placas-testes foram colocadas 100 µL da suspensão de células que tinham sido quantificadas para obtenção de uma densidade ideal, com o meio de cultura correspondente; e em outros poços foi colocado somente o meio de cultura que serviu como branco. Estas placas foram levadas para a incubadora a 37 °C e 5% de CO_2 por um período de 24 h, permitindo assim, a estabilização antes da adição das amostras testes. Após este período foram adicionadas as amostras (extratos) em triplicata, nas seguintes concentrações finais 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, sabendo que nos poços já haviam sido colocados 100 µL da suspensão de células, chegando então a essa concentração. Já em alguns poços que também estavam com suspensão de células utilizou-se somente meio, sem extrato, utilizando estes para o controle negativo. Nesta mesma placa foi feito o controle positivo com o uso da doxorrubicina nas seguintes concentrações: 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL, estas foram acrescentadas na suspensão de célula. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h e foi realizada a coloração SRB.

Para realizar a coloração, primeiramente foi aspirado o sobrenadante que estava nos poços da placa, com isso restaram às células.

Em seguida foram adicionados 100 µL do ácido tricloroacético (TCA) 20% para fixação das células e mantidas em repouso ao abrigo da luz numa temperatura de 4 °C por 30 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada com água corrente por 4 vezes sendo colocada para secar em temperatura ambiente. Nestas células fixadas foram acrescentados 50 µL do corante SRB (Sigma, USA) 0,1% dissolvido em ácido acético 1%. Depois, as placas foram envolvidas com papel alumínio e mantidas em repouso ao abrigo da luz, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após esse período o conteúdo dos poços foi descartado e acrescentou-se 100 µL de ácido acético a 1% em cada poço, repetindo-se este procedimento por 4 vezes, até que a solução de sulforrodamina B (SRB) livre fosse removida, colocando as placas para secarem em temperatura ambiente.

A seguir adicionou-se 100 µL da solução trizma base (10 mM, pH 10,5) em cada poço para que as células fossem diluídas e desprendidas no fundo dos poços. As placas foram colocadas no agitador automático por 20 minutos e levadas para o leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm para obtenção da absorbância (SKEHAN *et al.*, 1990)

Os experimentos foram realizados em triplicata, sabendo que a placa tempo zero (T0) indica a densidade de células viáveis no início do ensaio, após as 24 h de incubação, ou seja, antes de serem colocadas às amostras testes. Os poços marcados para o controle negativo (C) foram os que tinham células sem adição das amostras testes (extratos), após as 48 h. Ambos, descontadas dos seus respectivos brancos.

O cálculo da porcentagem de crescimento de cada linhagem foi realizado segundo Monks *et al*. (1991). A concentração que inibiu 50% do crescimento celular (GI_{50}) foi determinada em programas para gráficos e análises de dados (Origin Versão 6.0). As amostras testes com $IC_{50} < 30$ µg/mL foram consideradas ativas (ITHARAT *et al*., 2004).

4.2.3 Índice de Seletividade

O Índice de Seletividade (IS) avalia quantas vezes um composto é mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais. Essa análise foi realizada através da relação entre à divisão do valor da GI_{50} de cada amostra-teste na linhagem de células normais (NIH/3T3) e o valor da GI_{50} da amostra-teste na linhagem de células neoplásicas (IS= GI_{50} NIH-3T3 / GI_{50} células neoplásicas). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito antiproliferativo *in vitro*

A busca por novos agentes farmacológicos vem ocorrendo há muitos anos, sendo as plantas medicinais amplamente utilizadas para este fim, uma vez que as plantas contêm diversas substâncias químicas com diferentes atividades biológicas e farmacológicas (BOURHIA *et al*., 2019).

Neste sentido, os extratos metanólicos das folhas de *A. giberti*, *A. galeata*, *A. gigantea* e das fezes das borboletas *B. polydamas* após o consumo dessas plantas foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa nas linhagens neoplásicas B16-F10 (melanoma murino) e 786-0 (carcinoma de rim); assim como foram avaliados quanto à citotoxidade na linhagem de células normais NIH/3T3 (fibroblasto murino).

A Tabela 1, mostra a avaliadação das amostras quanto à atividade antiproliferativa e citotóxica, sendo os valores apresentados como concentrações capazes de inibir 50% do crescimento celular (GI_{50}) e expressos em μg/mL frente às linhagens mencionadas. Como controle positivo dos experimentos, foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina. Como parâmetro de atividade, consideram-se como potente atividade antineoplásica os compostos que apresentaram $GI_{50} \leq 30$ μg/mL (ITHARAT *et al*., 2004). No presente trabalho, consideramos ativos os valores de $GI_{50} < 250$ μg/mL e inativos valores de GI_{50} superiores a 250 μg/mL.

Tabela 1. Valores de inibição de crescimento (GI_{50})* e índice de seletividade (IS) dos extratos metanólicos das folhas de *Aristolochia giberti*, *A. galeata*, *A. gigantea*; e extratos metanólicos das fezes de lagartas *Battus polydamas* alimentadas com folhas destas plantas e doxorrubicina em linhagens B16-F10 (melanoma murino), 786-0 (carcinoma de rim) e NIH/3T3 (fibroblasto murino)

Amostras		**Linhagens celulares****		
		B16-F10	**786-0**	**NIH/3T3**
Extrato metanólico das folhas de *A. giberti*	**µg/mL**	81,05	43,02	25,37
	IS	0,31	0,59	
Extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. giberti*	**µg/mL**	78,55	51,57	26,40
	IS	0,34	0,51	
Extrato metanólico das folhas de *A. galeata*	**µg/mL**	32,96	41,91	25,33
	IS	0,77	0,60	
Extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. galeata*	**µg/mL**	78,49	39,21	22,47
	IS	0,29	0,57	
Extrato metanólico das folhas de *A. gigantea*	**µg/mL**	240,33	55,58	263,59
	IS	1,10	4,74	
Extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. gigantea*	**µg/mL**	241,68	35,68	247,27
	IS	1,02	6,93	
Doxorrubicina	**µg/mL**	0,025	0,025	0,25
	IS	10,00	10,00	

*Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa *ORIGIN* 6,0. IS significativos para valores maiores ou iguais a 2,0. (SUFFINES; PEZZUTO, 1991). **Linhagens celulares: B16-F10 (melanoma murino), 786-0 (carcinoma de rim) e NIH/3T3 (fibroblasto murino)

Para uma melhor visualização das atividades das amostras, foi utilizada a curva de concentração-resposta que fornece informações das atividades antiproliferativas dos extratos das folhas de *A. giberti*, *A. galeata* e *A. gigantea* e dos extratos metanólicos das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas dessas plantas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), frente às linhagens 786-0, e B16-F10 e a citotoxicidade em linhagem NIH/3T3. Nas referidas curvas podem ser observados os efeitos citostático e citocida. Os pontos onde as curvas de crescimento tocam a linha estima o valor calculado de $GI_{50,}$ indicam o efeito citostático, enquanto o efeito citocida equivale aos pontos da curva abaixo do zero.

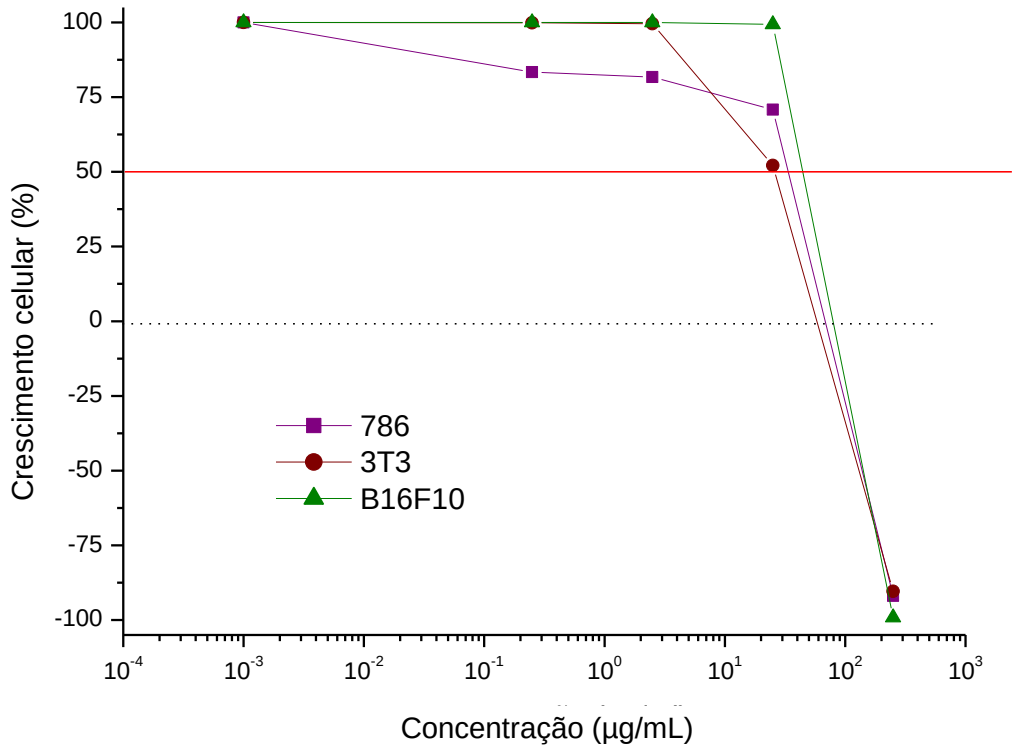

Figura 6. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das folhas de *Aristolochia galeata* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

Na figura 6, observa-se que o extrato metanólico das folhas de *A. galeata* apresentou atividade antiproliferativa na linhagem neoplásica B16-F10 com a GI_{50} 32,9 µg/mL.

Este resultado vai ao encontro dos estudos realizados pelos autores BENARBA *et al.*, 2012, quando relataram que o extrato aquoso da *A. longa* com IC_{50} de aproximadamente 15,63 µg/mL foi capaz de induzir a morte celular de forma dose-dependente em linfoma de

Burkitt BL41, chegando a conclusão que *A. longa* é uma fonte promissora de novos tratamentos para a doença de Burkitt e outros linfomas.

De forma semelhante, outro estudo realizado por Aleixo *et al*., 2014, demonstrou citotoxicidade moderada (CC50 = 90 µg/mL) ao utilizar fração diclorometano da planta *A. galeata* na linhagem celular de carcinoma do colo de útero humano (HeLa) por ensaio colorimétrico de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT).

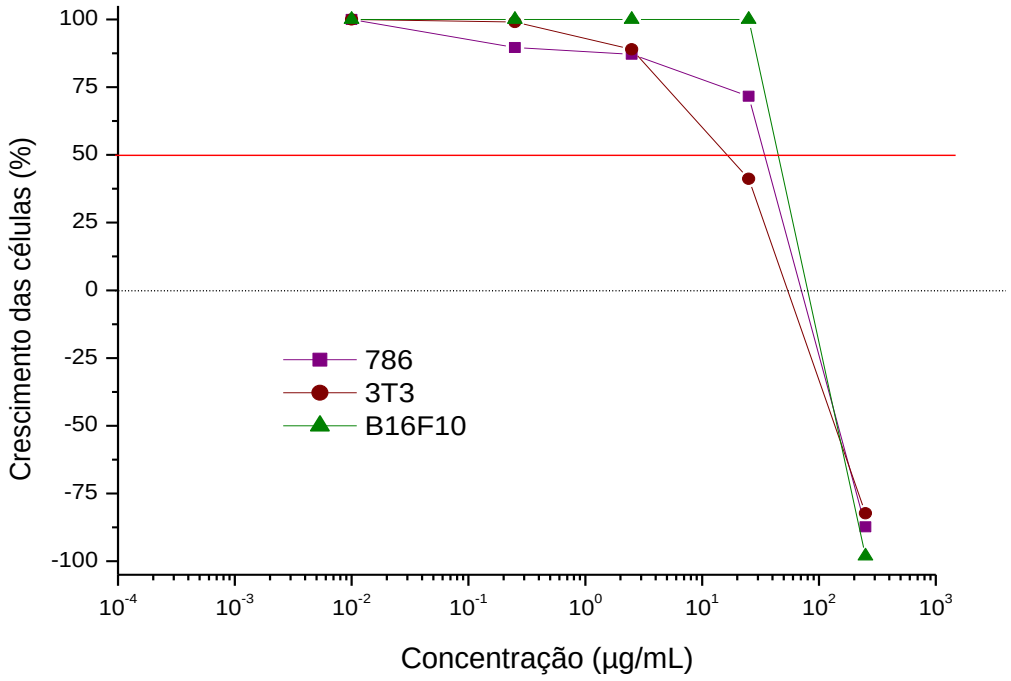

Figura 7. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das fezes de lagartas *Battus polydamas* alimentadas com folhas de *Aristolochia galeata* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

A figura 7, o extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. galeata* apresentou atividade antiproliferativa para a linhagem neoplásica B16-F10 com GI_{50} 78,49 µg/mL e para a linhagem 786-0 com GI_{50} 39,21 µg/mL.

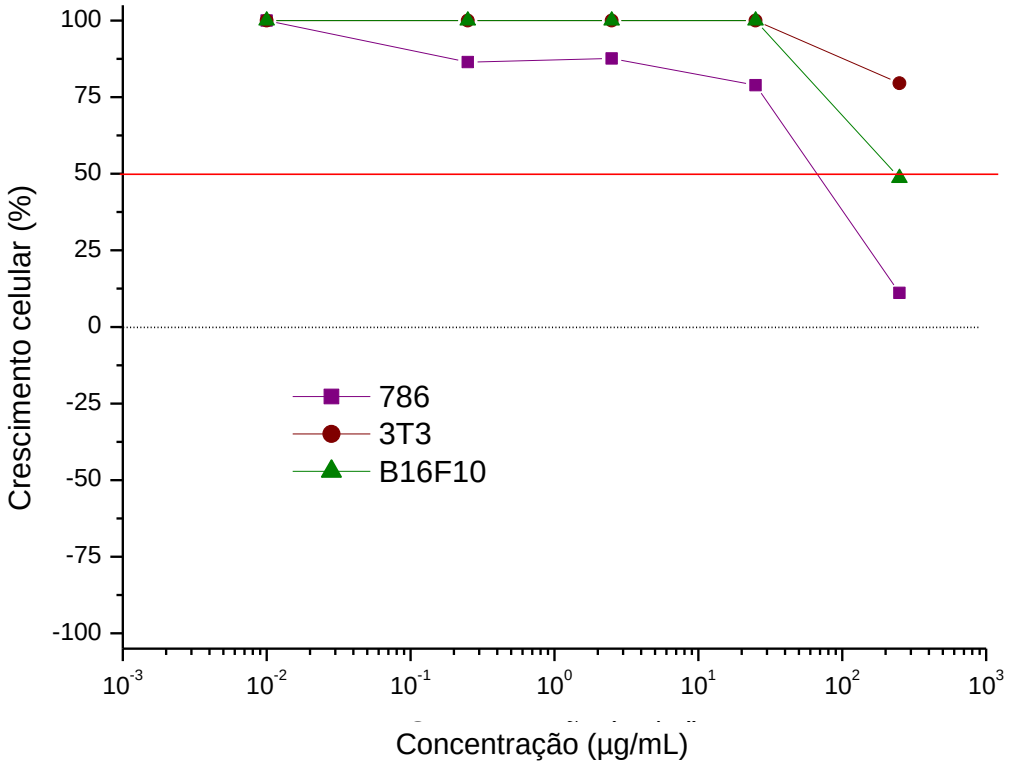

Figura 8. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das folhas de *Aristolochia gigantea* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

A figura 8 apresenta o extrato metanólico das folhas de *A. gigantea* com GI_{50} de 263,59 µg/mL frente à linhagem NIH/ 3T3, sendo que para a linhagem neoplásica 786-0 a GI_{50} foi de 55,58 µg/mL.

Já a figura 9 indica o comportamento do extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. gigantea* com GI_{50} de 247,27 µg/mL frente à linhagem NIH/ 3T3, enquanto que para a linhagem neoplásica 786-0 a GI_{50} foi de 35,68 µg/mL.

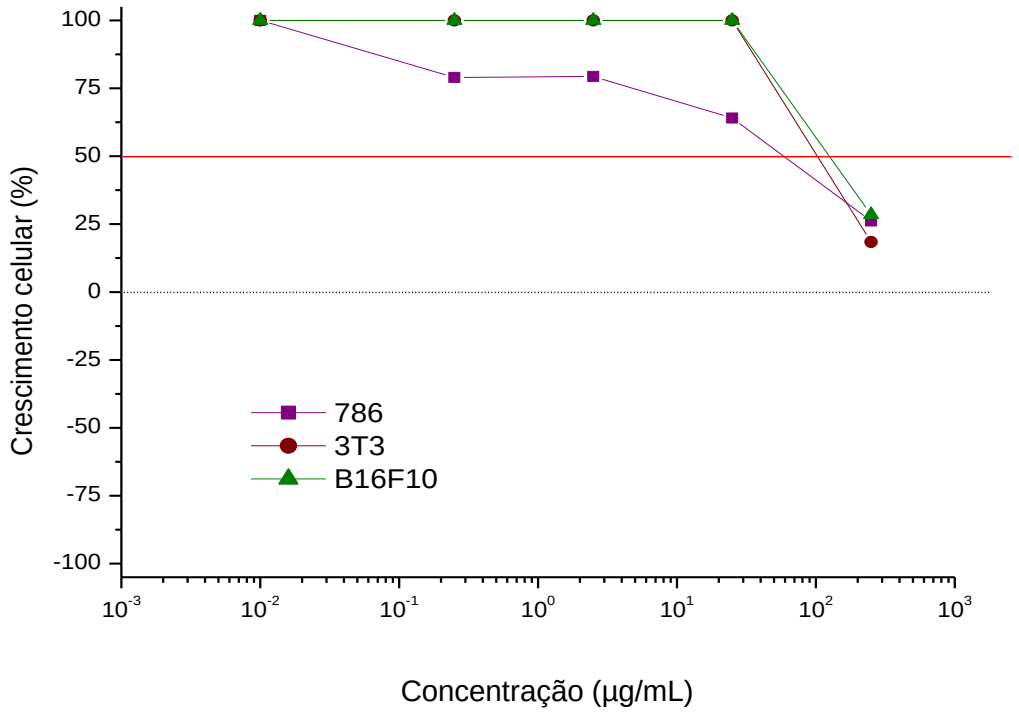

Figura 9. Atividades antiproliferativa e citotóxica do extrato metanólico das fezes de lagartas *Battus polydamas* alimentadas com folhas de *Aristolochia gigantea* frente às linhagens B16-F10, 786-0 e 3T3 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

Na Tabela 1, observamos que a maior atividade foi obtida com os extratos metanólicos das folhas de *A. galeata* 32,96 µg/mL (B16-F10); extratos metanólicos das fezes das lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. gigantea* 35,68 µg/mL (786-0) e extratos metanólicos das fezes das lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. galeata* 39,21 µg/mL (786-0).

A Tabela 1 apresenta também os valores dos IS (Índice de Seletividade) para a doxorrubicina, os extratos metanólicos das folhas de *A. giberti*, *A. galeata*, *A. gigantea* e os extratos metanólicos das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas dessas plantas, em linhagens neoplásicas B16-F10 (melanoma murino) e 786-0 (carcinoma de rim), avaliados em relação à linhagem de células normais (NIH/3T3). Foram consideradas seletivas as substâncias que apresentaram valores de IS ≥ a 2,0 para as linhagens neoplásicas (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Dessa forma, os extratos metanólicos das folhas de *A. gigantea* e o extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas dessa planta foram os que apresentaram melhores Índices de Seletividade frente à linhagem neoplásica 786-0.

Na linhagem 786-0, observa-se que a GI_{50} do Extrato metanólico das folhas de *A. gigantea* foi de 55,58 µg/mL, enquanto que para o Extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. gigantea*, a GI_{50} foi de 35,68 µg/mL. Isso vai ao encontro da sugestão de Urzúa *et al.* (1983), quanto ao alto grau de seletividade e/ou transformação que apresentam os insetos da tribo Troidini (NOGUEIRA, 2014). Dessa forma, as larvas de *B. polydamas* conseguem desintoxicar compostos de suas plantas hospedeiras, fazendo uso das estratégias que os insetos fitófagos desenvolveram para superar as barreiras químicas geradas pelas plantas, consequentemente formando compostos mais polares e menos tóxicos (NOGUEIRA *et al*., 2021).

Segundo Moreira *et al*. (2021), o potencial da bioconversão para a potencialização e modulação das características biológicas da biomassa foliar de *A. galeata* pode estar associado à presença de micromoléculas bioconvertidas, as quais foram produzidas durante o processo digestivo das lagartas. Os autores sugerem ainda que, baseado nos estudos que eles realizaram por RMN e diante das evidências na literatura, as lagartas de *B. polydamas* podem metabolizar lignoides e diterpenoides, ficando demonstrado nas suas conclusões que a bioconversão é um método muito útil para o acesso a novas substâncias e para a obtenção de substâncias inéditas e/ou bioativas.

Os resultados obtidos *in vitro* (Tabela 1) mostram que a GI_{50} (32,96 µg/mL) do extrato das folhas da *A. galeata* representou maior atividade antiproliferativa em relação aos extratos metanólicos das fezes das lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas dessa planta com GI_{50} (78,49 µg/mL).

6 CONCLUSÕES

Os extratos metanólicos das folhas de *A. giberti*, *A. galeata*, *A. gigantea* e das fezes das lagartas *B. polydamas* após o consumo dessas folhas apresentaram GI_{50} variando entre 32,96 µg/mL (no extrato metanólico das folhas de *A. galeata*) a 241,68 µg/mL (no extrato metanólico das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas de *A. gigantea*) sobre a linhagem B16-F10. Já na linhagem 786-0, os valores das GI_{50} foram menores, variando entre 35,68 a 55,58 µg/mL, indicando uma melhor atividade destes extratos nesta linhagem.

Quanto à linhagem normal 3T3 (fibroblasto murino), observou-se que apenas os extratos metanólicos das folhas de *A. gigantea* e das fezes de lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas desta planta, apresentaram GI_{50} (263,59 e 247,27 µg/mL) respectivamente, indicando não apresentarem citotoxicidade. Para as demais amostras os valores sugerem citotoxicidade (GI_{50} entre 22,47 a 26,40 µg/mL).

Os extratos metanólicos das folhas de *A. gigantea* apresentaram $GI_{50=}$55,58 µg/mL com o IS=4,74, enquanto os extratos metanólicos das fezes das lagartas *B. polydamas* alimentadas com folhas dessa planta apresentaram a GI_{50}=35,68 µg/mL e IS=6,93 em relação a linhagem 786-0, indicando serem extratos promissores para estudos de protótipos com atividade anticâncer.

Diante dos resultados encontrados nesta pesquisa, este trabalho sugere que pode ter ocorrido um processo de bioconversão pelas lagartas *B. polydamas* após a ingestão da planta *A. gigantea* e a metabolização por este inseto, quando testadas na linhagem 786-0. Portanto, outros estudos são necessários para elucidar o processo de bioconversão por parte dos insetos e o mecanismo de ação desses extratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGADIR, A. A. *et al*. Isolation, Characterization and Quantity Determination of Aristolochic Acids, Toxic Compounds in *Aristolochia bracteolata* L. **Environmental Health Insights**, v. 5, p. 1-8, Feb. 2011.

ALEIXO, Á. A. *et al*. Potencial antibacteriano e antibacteriano citotóxico de extrato de etanol e frações de *Aristolochia galeata* Mart. ex Zucc Álan. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, p. 326-330, Feb. 2014.

ALVES, M. M. *et al*. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, dez. 2011.

ANTUNES, R. C. P. *et al*. **Prevenção do Câncer**. 2 ed. Barueri-SP: Manole, 2015.

AUBERT, J. *et al*. Molecular phylogeny of swallowtail butterflies of the tribe Papilionini (Papilionidae, Lepidoptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 156-167, Jul. 1999.

BATISTA, B. G. *et al*. **Biologia molecular e biotecnologia**. Porto Alegre: Sagah, 2018.

BECKER, R. O.; BARBOSA, B. L. da F. **Genética básica**. Porto Alegre: Sagah, 2018.

BENARBA, B. *et al*. *Aristolochia longa* aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells. International Journal of Green Pharmacy, v. 6, p. 45-49, jun. 2012.

BENARBA, B.; MEDDAH, B. Ethnobotanical study, antifungal Scopelled activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa*. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 13, Sep. 2014.

BERJANO, R. *et al*. Cytotaxonomy of diploid and polyploid Aristolochia (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, n. 1/2, p. 219-227, Jul. 2009.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York: Chapman and Hall, p.305. 1994.

BERTI FILHO, E.; CERIGNONI, J. A. **Borboletas**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 94.

BOURHIA, M. *et al*. Phytochemical Screening and Toxicological Study of *Aristolochia baetica* Linn Roots: Histopathological and Biochemical Evidence. **Journal of Toxicology**. Fev. 2019.

BRAY, F. *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA**: a cancer journal for clinicians, Hoboken, v. 68, n.6, p. 394-424, Nov. 2018.

FELIX, M. *et al*. **Insetos**: uma aventura pela biodiversidade. Rio de Janeiro: Otten, 2011. p. 376.

FIGUEIREDO, P.O. *et al*. A new cytotoxic β-carboline alkaloid from Galianthe thalictroides. **Planta Medica**, v.77, p. 1852-1854, 2011.

FILHO, A. B.; CAMPOS, E. C. R. de; LEAL, F. R. P. de C. **Oncologia Cutânea**. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

FRESHNEY, I. R. **Culture of animal cells**. A manual of Basic Technique and Specialized Applications. 5 ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GULLAN P. J.; CRANSTON P. S. **Insetos**: fundamentos da entomologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

HADEM, K. L. H. *et al*. Phytochemicals of A*ristolochia tagala* and *Curcuma caesia e*xert anticancer effect by tumor necrosis factor-a-mediated decrease in nuclear factor kappa B binding activity. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v.7, p. 1-11. 2016.

HARTMANN, T. The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 12, p. 4541-4546, Sept. 2008.

HAUSER, C. L. Critical comments on the phylogenetic relationships within the family Papilionidae (Lepidoptera). **Nota Lepidopterologica**, v. 16, n. 1, p. 34-43, 1993.

HOUGHTON, P. *et al*. 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.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER-INCA. Estimativa 2020. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2019. Disponível em <inca.gov.br/sites/document/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa_2020_incidencia_decancer_no_brasil.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2021.

ITHARAT, A. *et al*. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p. 33-38, 2004.

JUDD, W. S. *et al*. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KLITZKE, C. F.; BROWN, K. S. Jr. The occurrence of aristolochic acids in neotropical troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae). **Chemoecology**, v. 10, n. 2, p. 99-102, Jan. 2000.

KUMAR, V. *et al*. **Robbins patologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 65-75, 1992.

LILLY, M. D. Advances in biotransformation processes. **Chemical Enginerring Science**, v. 49, n. 2, p. 151-159, 1994.

LOPES, L. M. X. *et al*. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: MOHAN, R. M. (Ed.). **Research advances in phytochemistry**. Kerala: Global Research Network, v. 2, p. 19-108, 2001.

LOPES, N. R. T. *et al*. Fatores relacionados ao câncer de pele não melanoma na população masculina. **Enfermagem Brasil**, v.19, n. 3, p. 268-277, jun. 2020.

MARCHESINI, A. M. *et al*. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1598-1608, Aug. 2009.

MEDRADO, L. **Carcinogênese**: desenvolvimento, diagnóstico e tratamento das neoplasias. São Paulo: Érica, p. 12-124, 2015.

MONKS, A. *et al*. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. JNCI: **Journal of National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

NATIONAL CANCER INSTITUTE– NIH. O que é câncer? 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> Acesso em: 27 abr. 2021.

NATIONAL CANCER INSTITUTE– NIH. Tratamento de melanoma (PDQ®) versão do paciente, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#_96> Acesso em: 27 abr. 2021.

NOGUEIRA, C. R. **Biotransformação e sequestro de micromoléculas de *Aristolochia giberti* por *Battus polydamas***. 2014. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química/ Universidade Estadual Paulista, , Araraquara, 2014.

NOGUEIRA, C. R. **Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso**: compostos nitrados. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química/ Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

NOGUEIRA, C. R. *et al*. Citotoxicidade e estratégia de bioconversão de *Aristolochia* spp. **Arq. Inst. Biol**, v. 88. São Paulo: Epub, 2021.

OPPERMANN, C. P. **Entendendo o câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PRIESTAP, H. A. *et al*. Essential oils from aerial parts of *Aristolochia gibertii* Hook. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 67-71, Jan./Feb. 2002.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agroindústria:** fundamentos e aplicações, v. 4, São Paulo: Blucher, 2016.

RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. 2. ed. London: Elsevier Sciences, 2009. 1132 p.

SCALCO, V. W. **Biologia populacional de papilionídeos (Lepidoptera, Papilionidae) ocorrentes no Morro Santana e no Jardim Botânico de Porto Alegre, RS**. 2012. Trabalho de Conclusão (Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna) - Instituto de Biociências/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SILVA-BRANDÃO, K. L. *et al*. Phylogenetic relationships of the new world Troidini swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) based on COI, COII, and EF-1α genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, n. 3, p. 468-483, Sept. 2005.

SILVA, J. D. A. *et al*. Toxicological properties of an aqueous extract of *Aristolochia triangularis* leaves, using the brine shrimp lethality and *Allium* cepa bioassays. **Ciência Rural**, v. 49, n. 8, p. 1-7, 2019.

SIME, K. R. *et al*. Sequestration of aristolochic acids by the pipevine swallowtail, *Battus philenor* (L.): evidence and ecological implications. **Chemoecology**, v. 10, n. 4, p. 169-178, Dec. 2000.

SKEHAN, P. *et al*. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOUSA, E. dos S. Borboletas e mariposas. **Agência de Informação Embrapa**. Disponível em:<http://www.agência.cnptia.embrapa.br//Agencia16/AG01/arvore/AG01_81_911200585235.html >. Acesso em: 17 set. 2019.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6, p. 71-133, 1991.

SULYMAN, A. O. *et al*. Antidiabetic potentials of ethanolic extract of *Aristolochia ringens* (Vahl) roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.182, p 122-128, 2016.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudos dos insetos**. 2 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

URZÚA, A. *et al*. Aristolochic acids in *Aristolochia chilensis* and the *Aristolochia* feeder *Battus archidamas* (Lepidoptera). **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 48, p. 1513-1519, 1983.

WANKE, S. *et al*. Systematics of pipevines: combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 167, n. 6, p. 1215-1227, 2006.

ZHOU, Q. *et al*. Worldwide research trends on aristolochi acid (1957-2017): Suggestions for researchers. **PLOS ONE**, v. 14, n.5, p. 1 - 23, 2019.