



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

PAULA PEREIRA DE PAIVA

**“Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da  
fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos de  
*Boehmeria caudata* Sw.”**

Campinas

2016

**PAULA PEREIRA DE PAIVA**

**“Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da  
fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos de  
*Boehmeria caudata* Sw.”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como parte  
dos requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na  
Área de Biologia Celular.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE  
À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA PAULA PEREIRA DE PAIVA  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOÃO  
ERNESTO DE CARVALHO.

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

**Campinas**

**2016**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2011/22458-3

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P166a Paiva, Paula Pereira de, 1984-  
Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos de *Boehmeria caudata* Sw. / Paula Pereira de Paiva. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.  
Coorientador: Mary Ann Foglio.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. Edema. 3. Plantas medicinais. 4. Urticaceae. 5. Farmacologia.  
I. Carvalho, João Ernesto, 1954-. II. Foglio, Mary Ann, 1960-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of antitumor and anti-inflammatory activity of phenanthroquinolizidines alkaloids rich fraction of *Boehmeria caudata* Sw.

**Palavras-chave em inglês:**

Cancer

Edema

Medicinal plants

Urticaceae

Pharmacology

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Patrícia Moriel

Severino Matias de Alencar

Alexandre Bechara

**Data de defesa:** 26-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 26 de agosto de 2016.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.

Profa. Dra. Patrícia Moriel.

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar.

Prof. Dr. Alexandre Bechara.

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.*



*Aos meus pais, José Ricardo e Eliane.  
Por estarem sempre presentes, mesmo morando longe.  
Por fazer dos meus sonhos os seus.  
Por todo o suporte e carinho.  
Dedico-lhes este trabalho.*

*Aos meus avós, pela preocupação constante e carinho.  
Dedico-lhes este trabalho.*

*Ao Leonel, meu companheiro.  
Por toda a paciência, incentivo e carinho.  
Dedico-lhe este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais esta etapa concluída, sem sua ajuda, força e amparo, o caminho teria sido mais difícil.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por possibilitar a realização do meu doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa (2011/22458-3) e suporte financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Liliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelo seu apoio e auxílio, sempre presente e muito eficiente em todos os momentos.

À Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete pelo ótimo trabalho para manter o nível do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Ao meu orientador, Dr. João Ernesto de Carvalho pela confiança, amizade e pela oportunidade de trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. Mary Ann Foglio pela amizade, conselhos e oportunidade de trabalho.

À Dra. Ana Lúcia, coordenadora da Divisão de Farmacologia e Toxicologia (DFT), que sempre com muita paciência me auxiliou durante o doutorado. Obrigada pelos conselhos, carinho e amizade.

Às queridas funcionárias: Sirlene, Ilza, Ana Possenti, Karin e Núbia; pelo suporte técnico, pelos ensinamentos compartilhados, pela amizade e carinho.

Aos funcionários do CPQBA: Orlando e Benício pelo apoio técnico.

Aos colaboradores: Dr. Diogo Noin de Oliveira e Dr. Rodrigo Ramos Catharino, ambos do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP e ao Dr. Daniel Fábio Kawano da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP, que enriqueceram este trabalho.

À Professora Dra. Anita Jocelyne Marsaiol e Pós-Doutoranda Bruna Zucoloto da Costa, do Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica do Instituto de Química, UNICAMP, pelo auxílio e colaboração na análise da autofluorescência da fração rica em alcaloide.

Ao Misael Silva Palapardo, assessor técnico-científico da Merck Millipore, pela consultoria prestada.

Aos Doutores membros da qualificação e da banca de Doutorado pela disponibilidade, pelas contribuições e sugestões que enriqueceram esta tese.

À Dra. Fabiana Nonato eu gostaria de expressar o meu muito-obrigado, não só pela parceria nos experimentos, conselhos e colaboração, mas pela amizade verdadeira.

Ao Msc. Rafael Rosolen pela amizade e auxílio com os experimentos *in vivo*.

À Msc. Yumi Okubo, minha companheira de experimentos *in vitro*. Nós passamos longas horas no laboratório em busca de resultados. Obrigada pelos conselhos e amizade.

Aos queridos amigos da Divisão da Farmacologia e Toxicologia: Lúcia, Larissa, Adriana, Tamires, Giovanna Fiorito, Giovanna Longato, Gabriela, Thais, Michelle, Vanessa, Mariana, Humberto, Paula Monteiro, Débora, Ana Paula, Érica, Marianinha, Lucas, Lidiane e Livia. E aos amigos da Divisão de Química de Produtos Naturais: Ícaro, Naty, Elaine, Leila Servat, Leila Giarola, Paty, Rosanna e Rogério. Obrigada a todos pela amizade, companheirismo, sugestões e por fazer o meu dia a dia no laboratório tão prazeroso.

Aos meus pais: Eliane e José Ricardo pelo apoio desde quando decidi ser Bióloga. Obrigada pelo carinho, suporte, conselhos e amor incondicional.

Ao Leonel Cabral pela paciência, carinho, suporte, conselhos e amor.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*  
*(Martin Luther King)*

*“A persistência é o menor caminho do êxito”*  
*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

Câncer é a segunda causa de morte no mundo, com um aumento progressivo no número de casos, deixando clara a necessidade de desenvolvimento de novos quimioterápicos mais eficientes e, sempre que possível, com menos efeitos colaterais. Os produtos naturais constituem uma rica fonte de novos quimioterápicos, principalmente pela possibilidade de ação sobre multialvos. Neste contexto, estudos preliminares de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato bruto etanólico (EBE) das folhas de *Boehmeria caudata* Sw. foi efetivo no teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial antitumoral e anti-inflamatório da fração rica em alcaloides obtida de *B. caudata* através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que o potencial antiproliferativo de *B. caudata* pode ser atribuído a presença de alcaloides fenantroquinolizidínicos (FA). Dentre as linhagens avaliadas, uma das mais sensíveis foi a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460) com 0,17  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de inibição total de crescimento. Somado ao fato de que no Brasil, o câncer de pulmão é o segundo de maior incidência entre os homens e o quarto entre as mulheres, esta linhagem foi escolhida para as análises de mecanismo de ação. Assim, a FA promoveu parada no ciclo celular de NCI-H460, com aumento na subpopulação em fase G2/M, após 24 e 48 h de tratamento, promovendo também um leve aumento nas subpopulações de células com exposição de resíduos de fosfatidilserina sem perda de permeabilidade de membrana, após 24 h de tratamento e naquelas com exposição e perda de integridade de membrana, após 36 h de tratamento. Além disso, FA diminuiu a capacidade de recuperação e de replicação das células de NCI-H460, após a retirada do tratamento, reforçando o possível efeito de FA sobre o ciclo celular. Nos experimentos *in vivo*, tanto o EBE quanto a FA reduziram a progressão do tumor sólido de Ehrlich em camundongos Balb-c, com alguns sinais clínicos de toxicidade apenas após o tratamento com EBE. Além disso, FA também reduziu a inibição e/ou migração de neutrófilos nas patas de camundongos com tumor sólido de Ehrlich. As amostras EBE e FA também foram avaliadas em modelos de inflamação. Assim, o EBE apresentou efeito antiedematogênico no modelo de edema de pata induzido por carragenina apenas nas doses menor e intermediária enquanto o efeito anti-inflamatório de FA foi independente da dose. Já no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, tanto EBE quanto FA foram ativos independente da via de administração empregada (vias oral, intraperitoneal e tópica) sugerindo uma ação inibitória inespecífica sobre LOX/COX. Além disso, a FA inibiu a ativação ou migração de neutrófilos para o local inflamado. Por fim, esses resultados indicam que as partes aéreas de *B. caudata* são uma promissora fonte de alcaloides fenantroquinolizidínicos com potencial uso nas terapias anti-inflamatória e antitumoral; estudos futuros poderão aprofundar os conhecimentos a respeito dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas atividades farmacológicas evidenciadas neste estudo.

## ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of mortality worldwide, with progressive increase in the number of cases, highlighting the need of new chemotherapeutic with greater effectiveness and, whenever possible, with fewer side effects. Natural products have shown to be a rich source of new chemotherapeutic agents, mainly by action of multi-target activity. In this context, preliminary studies in our research group showed that the leaves' crude ethanol extract (EBE) of *Boehmeria caudata* Sw. was effective *in vitro* antiproliferative activity test against cultured human cancer cell lines and non-cancer cells lines. Thus, the present study aimed to evaluate the antitumor and anti-inflammatory potencial of alkaloids rich fration obtained of *B. caudata* with *in vitro* and *in vivo* experiments. The results showed that the potential antiproliferative activity of *B. caudata* could be attributed to phenanthroquinolizidines alkaloids (FA). Among the tested cell lines, one of the most sensitive was the lung tumor line (NCI-H460) with 0,17  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of total growth inhibiton; considering that in Brazil, lung cancer is the second most prevalent among men and the fourth among women, this cell line was chosen to studies the mechanism of action. Thus, FA promoted cell cycle arrest in NCI-H460 human lung cancer cells, with increase in the subpopulation at the G2/M, phase 24 and 48 hrs after treatment, promoting also an slight increase in cell subpopulations with exposure of phosphatidylserine residues without loss of permeability membrane, 24 h after treatment and those with exposure and loss of membrane integrity 36 hrs after treatment. Furthermore, FA decreases the ability NCI-H460 cells recuperation and replication, after the withdrawal of treatment, strengthening the possible FA effect on the cell cycle. *In vivo* experiments, with both EBE and FA reduced the progression of Ehrlich solid tumor in Balb/c mice, with some clinical signs of toxicity only after treatment with EBE. Furthermore, FA also reduced the inhibition and/or migration of neutrophil mouse paw when evaluated with Ehrlich solid tumor. EB and FA were also assessed in inflammation experimental models. Thus, EBE showed antiedematogenic effect on carrageenan-induced paw edema model only in the lowest and intermediate dose, whereas the anti-inflammatory effect of FA was independent of dose. In the croton oil-induced ear edema model, both EBE and FA were, effective, independent of the administration route (oral, intraperitoneal and topical) suggesting a nonspecific inhibitory action on LOX/COX. The accumulation of myeloperoxidase per milligram of tissue and the FA inhibition of the activation e/or migration of neutrophil to the inflamed site. Finally, these results indicate that the aerial parts of *B. caudata* are a promising source of phenanthroquinolizidines alkaloids with potential use in anti-inflammatory and anti-tumor therapies; further studies will provide knowledge of cellular and molecular mechanisms involved in the pharmacological activities evidenced in this study.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

|                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Vias de metabolização do ácido araquidônico.....                                                                                                                                                           | 30 |
| <b>Figura 2.</b> Sítio de ligação de moduladores de tubulina. ....                                                                                                                                                          | 37 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura química do alcaloide Boehmeriasina A pertencente à família fenantroquinolizidínico, que é composta por um anel fenantreno conjugado com uma molécula quinolizidínica.....                        | 41 |
| <b>Figura 4.</b> Foto da espécie <i>Boehmeria caudata</i> Sw. presente no campo experimental do CPQBA. (A) Foto do hábito (B) Detalhe da folha e da inflorescência. ....                                                    | 44 |
| <b>Figura 5.</b> Fluxograma da obtenção dos extratos brutos de <i>Boehmeria caudata</i> . ....                                                                                                                              | 48 |
| <b>Figura 6.</b> Fluxograma do extrato bruto etanólico total (EB1) e do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2).....                                                                       | 50 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema da obtenção da fração rica em alcaloide por extração ácido base. ....                                                                                                                              | 52 |
| <b>Figura 8.</b> Desenho experimental da placa teste utilizada no modelo de atividade antiproliferativa in vitro.....                                                                                                       | 58 |
| <b>Figura 9.</b> Administração tópica do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2) para avaliação do efeito antiedematogênico em modelo de edema de orelha induzida por óleo de crôton. .... | 74 |
| <b>Figura 10.</b> Cromatofolha (CCD) dos extratos brutos diclorometanos de <i>Boehmeria caudata</i> avaliados com a fase móvel diclorometano/metanol (97:3). ....                                                           | 78 |
| <b>Figura 11.</b> Cromatofolha de CCD dos extratos brutos etanólicos de <i>Boehmeria caudata</i> avaliados com a fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). ....                                                    | 79 |
| <b>Figura 12.</b> Cromatofolha de CCD dos extratos brutos aquosos de <i>Boehmeria caudata</i> avaliados com a fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5) ....                                                        | 80 |
| <b>Figura 13.</b> Cromatofolha de CCD dos extratos brutos etanólicos EB1 e EB2 avaliados com a fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). ....                                                                      | 82 |
| <b>Figura 14.</b> Cromatofolha de CCD das frações obtidas pela extração ácido-base avaliados com a fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). ....                                                                  | 84 |
| <b>Figura 15.</b> Espectro dos alcaloides encontrados na fração rica em alcaloides. ....                                                                                                                                    | 86 |
| <b>Figura 16.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais in vitro da Doxorubicina, quimioterápico de referência. ....                                                         | 87 |
| <b>Figura 17.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais in vitro dos extratos brutos diclorometanos de <i>Boehmeria caudata</i> . ....                               | 88 |

|                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 18.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais in vitro da Doxorubicina, quimioterápico de referência. ....                                                                                        | 90  |
| <b>Figura 19.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas e não tumorais in vitro dos extratos brutos etanólicos da <i>Boehmeria caudata</i> . ....                                                                  | 91  |
| <b>Figura 20.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais in vitro da Doxorubicina, quimioterápico de referência. ....                                                                                        | 93  |
| <b>Figura 21.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais in vitro dos extratos brutos aquosos da <i>Boehmeria caudata</i> . ....                                                                     | 94  |
| <b>Figura 22.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais in vitro da Doxorubicina, quimioterápico de referência. ....                                                                                        | 96  |
| <b>Figura 23.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais in vitro do extrato bruto etanólico total (EB1) (A) e do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2) (B). .... | 97  |
| <b>Figura 24.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais in vitro da Doxorubicina, quimioterápico de referência. ....                                                                                        | 98  |
| <b>Figura 25.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais in vitro das frações obtidas pela extração ácido-base. ....                                                                                 | 99  |
| <b>Figura 26.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais in vitro da fração rica em alcaloides obtida pela extração ácido-base. ....                                                                 | 100 |
| <b>Figura 27.</b> Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais in vitro da fração rica em alcaloides e da doxorubicina. ....                                                                               | 101 |
| <b>Figura 28.</b> Análise das fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após 24 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                                                                                                | 103 |
| <b>Figura 29.</b> Análise das fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após 48 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                                                                                                | 104 |
| <b>Figura 30.</b> Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após 12 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                                            | 106 |
| <b>Figura 31.</b> Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após 24 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                                            | 107 |
| <b>Figura 32.</b> Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após 36 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                                            | 108 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 33.</b> Imagens representativas da formação de colônia das células NCI-H460 sem tratamento (A) com 0,0025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FA (B) e 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FA (C), 5 dias após a retirada do tratamento. ....                                                                         | 110 |
| <b>Figura 34.</b> Número de colônias formadas pelas células NCI-H460 5 dias após a retirada do tratamento com FA. ....                                                                                                                                                                                          | 110 |
| <b>Figura 35.</b> Sobreposição da estrutura cristalográfica da colchicina (em amarelo) em seu respectivo sítio de interação da tubulina junto às poses de docagem dos compostos R-boehmeriasina A (verde), R-boehmeriasina B (violeta), R-criptopleurina (ciano) e (15R)-hidróxicriptopleurina (vermelho). .... | 113 |
| <b>Figura 36.</b> Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose cristalográfica da colchicina e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina. ....                                                                                                                  | 113 |
| <b>Figura 37.</b> Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da R-boehmeriasina A e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina. ....                                                                                                                | 114 |
| <b>Figura 38.</b> Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da R-boehmeriasina B e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina. ....                                                                                                                | 115 |
| <b>Figura 39.</b> Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da R-criptopleurina e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina. ...                                                                                                                  | 116 |
| <b>Figura 40.</b> Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da R-(15R)-hidróxicriptopleurina e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina. ....                                                                                                    | 117 |
| <b>Figura 41.</b> Peso relativo do tumor sólido de Ehrlich no flanco ao final de dez dias de tratamento. ....                                                                                                                                                                                                   | 120 |
| <b>Figura 42.</b> Evolução do peso corporal durante o experimento de tumor sólido de Ehrlich no flanco em função dos tratamentos. ....                                                                                                                                                                          | 121 |
| <b>Figura 43.</b> Parâmetros sanguíneos dos camundongos Balb/c fêmeas ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich no flanco em função dos tratamentos e em comparação com o grupo satélite. ....                                                                                                         | 122 |
| <b>Figura 44.</b> Avaliação do peso relativo dos órgãos dos camundongos Balb/c fêmeas ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich no flanco em função dos tratamentos e em comparação com o grupo satélite. ....                                                                                         | 124 |
| <b>Figura 45.</b> Variação do volume tumoral no modelo de tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos. ....                                                                                                                                                                                       | 125 |

|                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 46.</b> Dosagem de mieloperoxidase da pata de camundongos 15 dias após a inoculação de células tumorais de Ehrlich em função dos tratamentos. ....                                               | 126 |
| <b>Figura 47.</b> Variação do peso corporal de camundongos durante 15 dias de experimento do tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos. ....                                               | 127 |
| <b>Figura 48.</b> Avaliação dos parâmetros sanguíneos de camundongos ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos. ....                                            | 129 |
| <b>Figura 49.</b> Avaliação do peso relativo dos órgãos de camundongos ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos. ....                                          | 131 |
| <b>Figura 50.</b> Avaliação do extrato bruto etanólico (EB2) de <i>Boehmeria caudata</i> no modelo de edema de pata induzido por carragenina. ....                                                         | 132 |
| <b>Figura 51.</b> Avaliação da fração rica em alcaloides no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....                                                                                          | 135 |
| <b>Figura 52.</b> Efeito da aplicação tópica de EB2 da <i>Boehmeria caudata</i> no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.). ....                                 | 138 |
| <b>Figura 53.</b> Efeito da administração intraperitoneal do EB2 de <i>Boehmeria caudata</i> no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.). ....                    | 138 |
| <b>Figura 54.</b> Efeito da administração por via oral do EB2 de <i>Boehmeria caudata</i> no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.). ....                       | 139 |
| <b>Figura 55.</b> Avaliação do efeito da administração por via oral de FA de <i>Boehmeria caudata</i> no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.). ....           | 140 |
| <b>Figura 56.</b> Dosagem de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.) em função do tratamento com FA por via oral. ....                        | 141 |
| <b>Figura 57.</b> Avaliação do efeito tópico de FA de <i>Boehmeria caudata</i> no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.). ....                                  | 142 |
| <b>Figura 58.</b> Dosagem de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton ( <i>Croton tiglium</i> L.) em função do tratamento com FA por via tópica. ....                      | 143 |
| <b>Figura 59.</b> Perfil de atividade antiproliferativa de vincristina, paclitaxel e colchicina (inibidores mitóticos) e da fração rica em alcaloides obtida das partes aéreas de <i>B. caudata</i> . .... | 147 |
| <b>Figura 60.</b> Fórmula estrutural do alcaloide fenantroquinolizidínico julandina e da combretastatina A. ....                                                                                           | 149 |
| <b>Figura 61.</b> Semelhança estrutural entre as subunidades da colchicina (4), combretastatina (6) e combretastatina A (4).....                                                                           | 150 |
| <b>Figura 62.</b> Fração rica em alcaloide foi avaliada por cromatofolha de sílica RP-18.....                                                                                                              | 191 |

|                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 63.</b> Cromatofolha de CCD das 13 frações obtidas após a purificação da fração rica em alcaloides por SPE avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).....                                            | 192 |
| <b>Figura 64.</b> Cromatofolha de CCD das frações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). ....                                                       | 194 |
| <b>Figura 65.</b> Cromatofolha de CCD das subfrações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). ....                                                    | 195 |
| <b>Figura 66.</b> Cromatofolha de CCD das frações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide em fase reversa avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). ....                                       | 197 |
| <b>Figura 67.</b> Cromatofolha de CCD das subfrações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide em fase reversa avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).....                                     | 198 |
| <b>Figura 68.</b> Espectro de emissão de fluorescência do DMSO (diluyente) e de 0,024; 0,24 e 2,4 mg mL <sup>-1</sup> da fração rica em alcaloides, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 355 nm (A) e 370 nm (B). .... | 200 |
| <b>Figura 69.</b> Gráficos da análise da autofluorescência da fração rica em alcaloide nas concentrações de 0,025; 0,25 e 2,5 µg mL <sup>-1</sup> na linhagem de NCI-H460 por 24 horas. ....                                         | 202 |
| <b>Figura 70.</b> Histograma representativos do conteúdo de DNA em células NCI-H460 marcadas com iodeto de propídeo. ....                                                                                                            | 204 |
| <b>Figura 71.</b> Representação esquemática dos quadrantes do gráfico de apoptose. ....                                                                                                                                              | 205 |
| <b>Figura 72.</b> Histograma representativo de células NCI-H460 marcadas com anexina-PE e 7-AAD no tempo de 12 horas de tratamento. ....                                                                                             | 205 |
| <b>Figura 73.</b> Histograma representativo de células NCI-H460 marcadas com anexina-PE e 7-AAD no tempo de 24 horas de tratamento. ....                                                                                             | 206 |
| <b>Figura 74.</b> Histograma representativo de células NCI-H460 marcadas com anexina-PE e 7-AAD no tempo de 36 horas de tratamento. ....                                                                                             | 207 |

## LISTA DE TABELA

|                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios tumorais <i>in vitro</i> . ....                                                                                                                             | 55  |
| <b>Tabela 2.</b> Densidade de inoculação das linhagens celulares tumorais e não tumoral <i>in vitro</i> . ....                                                                                                                   | 57  |
| <b>Tabela 3.</b> Distribuição dos grupos experimentais nos testes de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. ....                                                                                                 | 72  |
| <b>Tabela 4.</b> Distribuição dos grupos experimentais nos testes de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. ....                                                                                            | 73  |
| <b>Tabela 5.</b> Cálculo do rendimento (%) dos extratos brutos para cada método e solvente. ....                                                                                                                                 | 77  |
| <b>Tabela 6.</b> Cálculo do rendimento expresso em média (gramas) e em porcentagem (%) do EB1 e EB2*. ....                                                                                                                       | 81  |
| <b>Tabela 7.</b> Cálculo do rendimento expresso em média (gramas) e em porcentagem (%) das frações obtidas através da extração ácido-base. ....                                                                                  | 83  |
| <b>Tabela 8.</b> Dados de HRESI-MS obtidos da fração rica em alcaloides. ....                                                                                                                                                    | 85  |
| <b>Tabela 9.</b> Valores de TGI (inibição total do crescimento, $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos brutos diclorometanos e da doxorubicina. ....                                                                               | 89  |
| <b>Tabela 10.</b> Valores de TGI (inibição total do crescimento, $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos brutos etanólicos e da doxorubicina. ....                                                                                  | 92  |
| <b>Tabela 11.</b> Valores de TGI (inibição do crescimento total, $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos brutos aquosos e da doxorubicina. ....                                                                                     | 95  |
| <b>Tabela 12.</b> Valores de TGI (inibição do crescimento total) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos brutos etanólicos 1 e 2 e da doxorubicina. ....                                                                           | 97  |
| <b>Tabela 13.</b> Valores de TGI (inibição do crescimento total) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ das frações obtidas por extração ácido-base tanto por EB1 quanto por EB2. ....                                                         | 100 |
| <b>Tabela 14.</b> Valores de TGI (inibição do crescimento total) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ da fração rica em alcaloides. ....                                                                                                     | 102 |
| <b>Tabela 15.</b> Subpopulações celulares (em %) na análise de fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                                                 | 104 |
| <b>Tabela 16.</b> Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após tratamento com a fração rica em alcaloides. ....                                              | 109 |
| <b>Tabela 17.</b> Estruturas químicas e os respectivos escores de docagem calculados pela função de escore GoldScore do programa Gold 5.3 para a colchicina e demais compostos envolvidos nos estudos de docagem molecular. .... | 112 |

|                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 18.</b> Avaliação da variação do edema e da taxa de inibição (%) promovida por EB2 no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....      | 133 |
| <b>Tabela 19.</b> Avaliação da variação do edema e da taxa de inibição (%) promovida por FA no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....       | 136 |
| <b>Tabela 20.</b> Cálculo do rendimento (%) das frações obtidas após a purificação da fração rica em alcaloide pelo método de extração em fase sólida..... | 193 |
| <b>Tabela 21.</b> Cálculo do rendimento (%) das frações reunidas após o fracionamento da fração rica em alcaloide em coluna clássica. ....                 | 196 |
| <b>Tabela 22.</b> Cálculo do rendimento (%) das frações reunidas após o fracionamento da fração rica em alcaloide em fase reversa. ....                    | 198 |
| <b>Tabela 23.</b> Solução de tampão fosfato em salina de Dulbecco.....                                                                                     | 203 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

786-0: linhagem celular de adenocarcinoma de rim;

7AAD: 7-aminoactinomicida D;

$\alpha$ : alfa;

A: água destilada;

AA: ácido araquidônico;

AE: solução orgânica de acetato de etila;

AINES: anti-inflamatórios não esteroideal;

APA: área de proteção ambiental;

ANOVA: teste estatístico de análise de variância;

ATG: proteína relacionada com autofagia;

$\beta$ : beta;

BAW: mistura de butanol: ácido acético: água destilada na proporção de 4:1:5;

BFGS: *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*;

BP corresponde ao valor em volume (mL) basal da pata;

CCD: cromatografia em camada delgada;

CD8 T: Linfócito T citotóxico com a proteína de superfície CD8;

Células KB: carcinoma epidermóide humano de nasofaringe;

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório;

CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético;

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

CAPES: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono;

COX: enzima ciclooxygenase;

COX-1: enzima ciclooxygenase do tipo 1 constitutiva;

COX-2: enzima ciclooxygenase do tipo 2 induzível;

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas;

CPMA: Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas;

CRMV: Conselho Regional de Medicina Veterinária;

CYP450: monooxygenase citocromo P450;

DBE: equivalente de duplas ligações (*double bonds equivalent*);

DC: média da densidade óptica obtida das orelhas do controle negativo;

DCM: diclorometano;

DCM2: solução orgânica de diclorometano;

DE: média da densidade óptica obtida das orelhas dos grupos experimentais;

Dexa: dexametasona;

d.i.: densidade de inoculação;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DMT: dose máxima tolerada;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

D-PBS: solução de tampão fosfato em salina de Dulbecco;

D.O.: densidade óptica;

DOXO: Doxorubicina;

DP: desvio padrão;

E: etanol 95%;

EBA: extrato bruto aquoso;

EBAs: extratos brutos aquosos;

EBD: extrato bruto diclorometano;

EBDs: extratos brutos diclorometanos;

EBE: extrato bruto etanólico;

EBEs: extratos brutos etanólicos;

EB1: extrato bruto etanólico total;

EB2: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano;

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;

EE: solução orgânica de éter etílico;

EET: ácido epoxieicosatrienoico;

EETs: ácido epoxieicosatrienoicos;

EF-2: fator de elongação;

EP: corresponde ao edema medido em volume (mL) da pata após indução da inflamação pela carragenina;

EPM: erro padrão da média;

ESI-MS: *electrospray mass spectrometry*;

ESI-MS/MS: *electrospray tandem mass spectrometry*;

EUA: Estados Unidos da América;

F: flores mais galhos;

F1: folhas;

FA: fração rica em alcaloides;

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;

FDA: *US Food and Drug Administration*;

FMDA: flores mais galho maceração dinâmica água;

FMDD: flores mais galho maceração dinâmica diclorometano;

FMDE: flores mais galho maceração dinâmica etanol;

F1MDA: folhas maceração dinâmica água;

F1MDD: folhas maceração dinâmica diclorometano;

F1MDE: folhas maceração dinâmica etanol;

FOP: Faculdade de Odontologia de Piracicaba;

FSA: flores mais galho *soxhlet* água;

FSD: flores mais galho *soxhlet* diclorometano;

FSE: flores mais galho *soxhlet* etanol;

F1SA: folhas *soxhlet* água;

F1SD: folhas *soxhlet* diclorometano;

F1SE: folhas *soxhlet* etanol;

GABA: Ácido gama-aminobutírico (*gamma aminobutyric acid*);

GI<sub>50</sub>: concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (*50% growth inhibition*);

GFAP: proteína glial fibrilar ácida;

GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*) -;

GTP: trifosfato de guanosina;

HaCaT: linhagem celular de queratinócito humano;

Hbg: hemoglobina;

HETE: ácido hidroxiieicosatetraenoico;

HETEs: ácido hidroxiieicosatetraenoicos;

8-HETE: ácido 8-hidroxiieicosatetraenoico

12-HETE: ácido 12-hidroxiieicosatetraenoico

15-HETE: ácido 15-hidroxiieicosatetraenoico

HCT116: linhagem de colo retal;

HVL: doença de *Von Hippel-Lindau*;

5-HPETE: ácido 5-monohidroperoxieicosatetraenoico;

HRESI-MS: espectrometria de massas de alta resolução;



HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal;

HTAB: hexadeciltrimetilamonio;

5-HT<sub>2a</sub>: receptor 2a de serotonina;

HTS: *High Throughput Screening*;

IB: Instituto de biologia;

INCA: Instituto Nacional do Câncer;

NO: óxido nítrico;

IP: iodeto de propídio;

i.p.: via intraperitoneal;

K-562: linhagem celular de leucemia mielógena crônica;

LC3-II: proteína de cadeia leve 3 que após sofrer clivagem e se associa a membrana do autofagossomo;

LOX: enzima lipoxigenase;

5-LOX: enzima 5-loxigenase;

8-LOX: enzima 8loxigenase;

12-LOX: enzima 12-loxigenase;

15-LOX: enzima 15-loxigenase;

15-LOX-1: enzima 15-loxigenase tipo 1;

15-LOX-2: enzima 15-loxigenase tipo 2;

LTA<sub>4</sub>: leucotrieno A<sub>4</sub>;

LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>;

LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>;

LTD<sub>4</sub>: leucotrieno D<sub>4</sub>;

LTE<sub>4</sub>: leucotrieno E<sub>4</sub>;

M: mistura;

MC: média da diferença da massa entre as orelhas do controle negativo;

MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma de mama;

Mcl-1: proteína responsável pela diferenciação celular em leucemia mielóide induzida (*induced myeloide leukemia cell differentiation protein*)

MDA-MB-231 (tumor de mama, linhagem representativa de tumores triplo negativo;

MDR1: Gene de resistente múltiplas à drogas;

ME: média da diferença da massa entre as orelhas do grupo experimental;

MMA: Ministério do Meio Ambiente;

MMDA: mistura maceração dinâmica água;

MMDD: mistura maceração dinâmica diclorometano;  
MMDE: mistura maceração dinâmica etanol;  
MMP-9: metaloproteinase-9 da matriz;  
MPO: enzima mieloperoxidase;  
MSA: mistura *soxhlet* água;  
MSD: mistura *soxhlet* diclorometano;  
MSE: mistura *soxhlet* etanol;  
MV: média da variação do edema;  
MVC: média da variação do edema do grupo controle negativo;  
MVT: média da variação do edema dos grupos tratados;  
MVTC: média da variação do volume tumoral da pata do grupo controle;  
MVTT: média da variação do volume tumoral da pata dos grupos tratados;  
N1: neutrófilo fenótipo 1;  
N2: neutrófilo fenótipo 2;  
NaCl: cloreto de sódio;  
NAT: neutrófilos associados ao tumor;  
NCI: Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*);  
NCI-ADR/Res: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas;  
NCI-H460: linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células;  
NO: óxido nítrico;  
 $\omega$ : ômega;  
OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico;  
OECD: Organização para a Cooperação Económica;  
OVCAR-3: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário;  
*P2P-R: Proliferation Potential Protein-Related (P2P-R) Gene*;  
p/v: peso/volume  
PBS: tampão fosfato-salina [(0,2 mM, pH 7,0) em solução de NaCl 0,9%];  
PC-3: linhagem celular de adenocarcinoma de próstata;  
PE: estreptavidina-ficoeritrina;  
PGG<sub>2</sub>: prostaglandina G<sub>2</sub>;  
PGH<sub>2</sub>: prostaglandina H<sub>2</sub>;  
PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>;  
Placa T<sub>0</sub>: placa controle;  
PT: plaquetas;

PV: precipitado de coloração verde escura;

Raf-1: homólogo 1 ao oncogenes viral (v-raf-1) de leucemia murina. Proteína quinase ativada pelo mitógeno (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*);

RBC: eritrócitos;

Rf: (*retention fator*) fato de retenção;

RMSD: *Root-Mean-Square Deviation*;

rpm: rotação por minuto;

ROS: espécies reativas de oxigênio;

RPI: Proteína inativadora de ribossomo

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640);

SAA: solução aquosa ácida;

SAB: solução aquosa básica;

SNC: sistema nervoso central;

SF: subfração;

SFB: soro fetal bovino;

SPE: extração em fase sólida;

SRB: sulforrodamina B;

T<sub>0</sub>: média das absorbâncias das células no tempo 0;

T<sub>1</sub>: controle de célula;

T<sub>A</sub>: média das absorbâncias das células tratadas;

TC: peso médio do tumor no grupo controle negativo;

TCA: ácido tricloroacético Sigma®;

TE: o peso médio do tumor no grupo experimental;

TGF-β: fator de transformação de crescimento-β;

TGI: concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (*total growth inhibition*);

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa;

TO: via tópica;

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato;

TOPOI: enzima topoisomerase I;

TOPOII: enzima topoisomerase II;

U251: linhagem celular de glioblastoma;

UACC-62: linhagem celular de melanoma;

UEC: Herbário da Universidade Estadual de Campinas;

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas;

UDP: *Up-and-Down-Procedure*;

USA: *United States of America*

UV: ultravioleta;

VB: volume basal da pata;

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular;

v.o.: via oral;

VT: volume medido da pata inoculada com tumor;

v/v: volume/volume;

WBC: leucócitos totais.

# SUMÁRIO

|                                                                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                | <b>27</b> |
| 1.1. CÂNCER .....                                                                                                                                         | 27        |
| 1.2. CÂNCER E INFLAMAÇÃO .....                                                                                                                            | 29        |
| 1.3. PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA DO CÂNCER .....                                                                                                        | 34        |
| 1.4. BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS – <i>BOEHMERIA CAUDATA SW.</i> .....                                                                                       | 39        |
| <b>2. PROPOSIÇÕES .....</b>                                                                                                                               | <b>43</b> |
| 2.1. PROPOSIÇÃO GERAL .....                                                                                                                               | 43        |
| 2.2. PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS .....                                                                                                                        | 43        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                       | <b>44</b> |
| 3.1. FITOQUÍMICA .....                                                                                                                                    | 44        |
| 3.1.1. Coleta do Material Vegetal .....                                                                                                                   | 44        |
| 3.1.2. Obtenção dos extratos brutos para triagem inicial .....                                                                                            | 45        |
| 3.1.3. Extrato bruto etanólico total <i>versus</i> extrato bruto etanólico obtido após a extração com diclorometano .....                                 | 49        |
| 3.1.4. Obtenção da fração rica em alcaloides por extração ácido-base .....                                                                                | 50        |
| 3.1.5. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) .....                                                                                            | 53        |
| 3.1.6. Caracterização da fração rica em alcaloides por Espectrometria de massas de alta resolução (HRESI-MS) .....                                        | 53        |
| 3.2. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....                                                                                                        | 54        |
| 3.2.1. Linhagens celulares: .....                                                                                                                         | 54        |
| 3.2.2. Triagem farmacológica em teste antiproliferativo em cultura de células tumorais e não tumorais humanas <i>in vitro</i> .....                       | 56        |
| 3.2.3. Citometria de fluxo .....                                                                                                                          | 59        |
| 3.2.4. Teste clonogênico .....                                                                                                                            | 63        |
| 3.3. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN SILICO</i> .....                                                                                                       | 64        |
| 3.3.1. Docagem molecular ( <i>Molecular docking</i> ) .....                                                                                               | 64        |
| 3.4. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VIVO</i> .....                                                                                                         | 65        |
| 3.4.1. Animais .....                                                                                                                                      | 65        |
| 3.4.2. Preparo das amostras e tratamentos .....                                                                                                           | 66        |
| 3.4.3. Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> .....                                                                                                 | 66        |
| 3.4.4. Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto etanólico (EB2) e da fração rica em alcaloides (FA) em modelo de tumor sólido de ehrlich ..... | 68        |
| 3.4.5. Avaliação da Atividade do extrato bruto etanólico (EB2) e da fração rica em alcaloides (FA) em modelos de inflamação .....                         | 71        |
| 3.4.6. Dosagem de mieloperoxidase .....                                                                                                                   | 74        |
| 3.5. ESTATÍSTICA .....                                                                                                                                    | 75        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                | <b>77</b> |

|                                                                                                                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1. FITOQUÍMICA .....                                                                                                                                    | 77         |
| 4.1.1. Análise dos extratos brutos .....                                                                                                                  | 77         |
| 4.1.2. Análise do extrato bruto etanólico total <i>versus</i> extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano .....                    | 81         |
| 4.1.3. Análise das frações obtidas através da extração ácido-base.....                                                                                    | 82         |
| 4.1.4. Análise do resultado de espectrometria de massaS DE alta resolução (HRESI-MS).....                                                                 | 85         |
| 4.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....                                                                                             | 86         |
| 4.2.1. Resultado do teste de atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais <i>in vitro</i> .....                      | 86         |
| 4.2.2. Citometria de fluxo .....                                                                                                                          | 102        |
| 4.2.3. Avaliação da fração rica em alcaloides na redução da capacidade para formação de colônias.....                                                     | 109        |
| 4.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN SILICO</i> .....                                                                                            | 110        |
| 4.3.1. Resultado do teste de docagem molecular .....                                                                                                      | 110        |
| 4.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VIVO</i> .....                                                                                              | 117        |
| 4.4.1. Resultado da toxicidade aguda <i>in vivo</i> .....                                                                                                 | 117        |
| 4.4.2. Resultado da atividade antitumoral do extrato bruto etanólico (EB2) e da fração rica em alcalóides (FA) em modelos de tumor sólido de ehrlich..... | 120        |
| 4.4.3. Resultado da atividade do extrato bruto etanólico (EB2) e da fração rica em alcalóides (FA) em modelos de inflamação .....                         | 132        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                 | <b>144</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                          | <b>168</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                 | <b>171</b> |
| <b>8. APÊNDICE .....</b>                                                                                                                                  | <b>191</b> |
| <b>9. ANEXO .....</b>                                                                                                                                     | <b>208</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER

O câncer representa um grande problema de saúde pública (Siegel et al., 2016; Wang et al., 2016) por ser a segunda maior causa de morte no mundo, perdendo somente para as doenças cardiovasculares (Carvalho et al., 2015). A organização mundial da saúde declara que, sem uma ação imediata, o número de mortes globais de câncer irá aumentar 80% em 2030, com maior ocorrência em países em desenvolvimento (Khazir et al., 2014).

Para o Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, que só de pele não melanoma será aproximadamente 180 mil novos casos. Entre as mulheres e os homens há diferenças em relação à incidência dos casos de câncer. Para homens, depois do câncer de pele não melanoma, o segundo câncer mais frequente é o câncer de próstata, seguido pelo de pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Já nas mulheres, depois do câncer de pele não melanoma, a doença mais prevalente é o câncer de mama, seguido pelo intestino, colo do útero, pulmão e estômago (ESTIMATIVA-INCA, 2016).

Os fatores que levam ao câncer são variados, podendo estas serem externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente (poluição, químicos, radiações, organismos infecciosos e outros) e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade (tabaco, alimentos processados, alcoolismo e outros). As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2016).

Em relação a sua biologia, o câncer é considerado uma doença genética, pois ocorre quando a informação no DNA celular está comprometida, e este comprometimento leva a uma expressão anormal do gene. Os principais mecanismos pelos quais o comprometimento do código genético ocorre é através de mutações e alterações epigenéticas, que conferem à célula uma vantagem seletiva em relação às células vizinhas, tornando-a mais apta a se desenvolver no ambiente. Muitas das mutações que contribuem para o seu desenvolvimento ocorrem em dois grupos de genes, um que confere ganho de função à célula e o outro confere perda de função. O grupo que concede ganho de função converte os proto-oncogenes em oncogenes e desta forma estimulam a divisão celular, em contrapartida, mutações do tipo perda de função, inativam os supressores de tumor, incapacitando a célula de controlar o crescimento celular (Alberts et al., 2010). Desta forma, as células alteradas passam a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada e a

rápida divisão dessas células tende a torná-las agressivas e incontroláveis, determinando formações de tumores ou neoplasias malignas, com a capacidade de invadir outros tecidos de órgãos vizinhos ou distantes, por meio da migração celular pelos vasos sanguíneos e linfáticos (INCA, 2016).

Pelo fato do câncer ser uma doença genética, no início o seu estudo era feito pensando somente nas células tumorais e em seus genes mutados. No entanto, no final do século XX, tornou-se cada vez mais claro que muitos dos aspectos dos tumores não poderiam ser definidos somente a partir das células cancerosas e seus genes, e que na verdade o câncer é uma doença de tecido, que envolve todo o microambiente tumoral (Weinberg, 2008; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012).

Sendo o câncer uma doença complexa e que apresenta uma grande variedade de tipos de tumores (mais de 100 tipos de doenças), os pesquisadores Hanahan e Weinberg (2000) publicaram um artigo de revisão sugerindo que, este vasto catálogo de genótipos de células cancerígenas é uma manifestação de seis essenciais alterações na fisiologia da célula, que coletivamente ditam o crescimento maligno. Os autores discutem que essas modificações fisiológicas vão sendo adquiridas durante o desenvolvimento da célula tumoral, e que cada modificação fisiológica adquirida confere às células tumorais um tipo de vantagem, constituindo desta forma as características (*hallmarks*) do câncer, que são: a autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase.

Após 11 anos, estas características foram revisadas e os autores descreveram que o tumor é mais do que células cancerígenas em proliferação, e sim um tecido complexo composto de vários tipos de células que participam de interações heterotípicas umas com as outras. Dentro deste ambiente tumoral, as células normais são recrutadas, formam um estroma associado com o tumor e agem como participantes ativos na carcinogênese, e que, por fim, estas células normais contribuem para o desenvolvimento e expressão de certas características do tumor. Assim, completando as seis primeiras características do câncer, mais quatro características foram incluídas, como os processos pró-tumorais, que são: instabilidade genômica (que gera a diversidade genética que acelera a aquisição das demais características) e a inflamação associada ao tumor (que favorece e alimenta as características adquiridas) e as características emergentes: reprogramação do metabolismo celular para suportar o contínuo crescimento e proliferação celular e evasão da destruição pelo sistema imune (Hanahan e Weinberg, 2011).



Dentre os processos pró-tumorais propostos por Hanahan e Weinberg (2011) está a inflamação associada ao tumor. Atualmente, dados epidemiológicos indicam que mais de 20% das mortes por câncer estão relacionados à inflamação e infecções crônicas (Greene et al., 2011).

## 1.2. CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Virchow, em 1863, foi o primeiro a sugerir a existência de uma ligação entre inflamação e câncer. Essa hipótese foi baseada na observação de que células inflamatórias frequentemente estavam infiltradas no estroma tumoral. Porém, a questão ainda permanece aberta e a relação entre inflamação e câncer está distante de ser completamente resolvida e esclarecida (Sgambato e Cittadini, 2010).

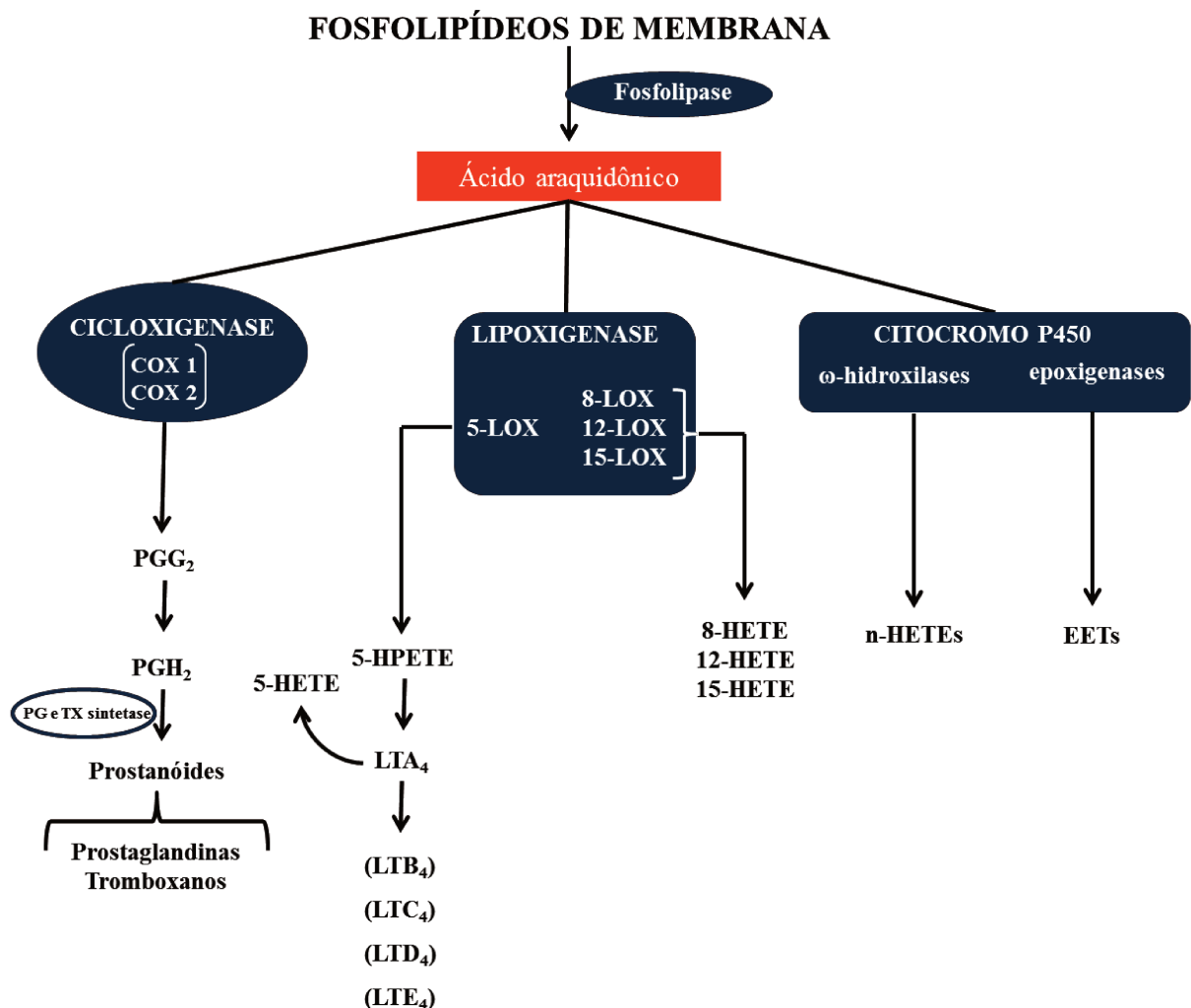
A inflamação é um processo fisiológico em resposta ao dano no tecido que pode ser resultado de uma infecção por patógenos, irritação química ou ferida (Philip e Rowley, 2004; Lu et al., 2006). A inflamação pode ser aguda ou crônica, a primeira se caracteriza por se iniciar rapidamente (em alguns segundos ou minutos) e tem uma duração relativamente curta, de alguns minutos a várias horas ou alguns dias; suas principais características são a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. A inflamação aguda de maneira geral beneficia o organismo e mantém a homeostase local (Robbins et al., 2010).

Já a inflamação crônica tem uma duração maior e está histologicamente associada à presença de linfócitos e macrófagos, à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tissular (Robbins et al., 2010). Entretanto, na inflamação crônica, os macrófagos e outras células inflamatórias presentes no tecido geram uma grande quantidade de fatores de crescimento, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio que podem causar danos no DNA. Se os macrófagos ativados persistem, eles podem levar a contínuos danos no tecido. Assim, o microambiente constituído por todos estes elementos supracitados pode induzir uma proliferação celular pelo contínuo dano ao tecido, aumentando desta forma o risco de se desenvolver o câncer (Lu et al., 2006). Além disso, há evidências também da relação câncer-inflamação em tumores que não tiveram início em processos inflamatórios crônicos (Vendramini-Costa, 2012).

O câncer associado à inflamação apresenta um microambiente tumoral, no qual incluem as células tumorais e o tecido do estroma, este último é formado por: células do sistema imune, fibroblastos, miofibroblastos, citocinas, produtos de lipídeos, tecido vascular e

a matriz extracelular ao redor do tumor (Schneider e Pozzi, 2011; Weber e Kuo, 2012). Entre os produtos dos lipídeos presentes no microambiente tumoral, os produtos derivados do ácido araquidônico (AA) são os mais estudados em relação ao crescimento e desenvolvimento do tumor. O ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado presente no domínio fosfolípido da maioria das membranas celulares, é liberado da membrana para o citoplasma por uma enzima chamada fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) em processos patológicos, como a inflamação crônica e o câncer. O AA livre pode ser metabolizado a eicosanoides através de três principais vias: via da ciclooxygenase (COX), via da lipoxigenase (LOX) e a via da monooxygenase citocromo P450 (Fig. 1)(Wang e Dubois, 2010).

**Figura 1.** Vias de metabolização do ácido araquidônico.



Fluxograma das três vias de metabolização do ácido araquidônico a eicosanoides. COX: ciclooxygenase, LOX: lipoxigenase; PGG<sub>2</sub>: prostaglandina G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>: prostaglandina H<sub>2</sub>, 5-HPETE: ácido monohidroperoxieicosatetraenoico, HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico, LTA<sub>4</sub>: leucotrieno A<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>: leucotrieno D<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>: leucotrieno E<sub>4</sub> e EET: ácido epoxieicosatrienoicos. Fonte: baseado nos artigos: Wang e Dubois, 2010; Greene et al., 2011.

A via da monooxigenase citocromo P450 (CYP450) dependente do metabolismo do AA ocorre em vários tecidos, incluindo fígado, rim e sistema cardiovascular. O seu papel é particularmente relevante em tecidos que tem baixa expressão da atividade da COX e LOX. As enzimas do CYP450 relevantes para o metabolismo do ácido araquidônico incluem dois distintos mecanismos: a da  $\omega$ -hidroxilases, que converte o ácido araquidônico em ácido hidroieicosatetraenoicos (HETEs) e a das epoxigenases, que converte o AA em ácido epoxieicosatrienoicos (EETs). Porém, pelo fato da via da CYP450 estar correlacionada mais com a inflamação e doenças cardiovasculares, muito pouco foi estudado sobre esta via no câncer, no entanto, alguns trabalhos mostram que os metabólitos desta via também apresentam relevância no microambiente tumoral (Greene et al., 2011).

Na via da cicloxigenase, esta enzima converte o AA no metabólito intermediário: prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) a qual é ainda reduzida a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) através da atividade de peroxidase da COX. A  $PGH_2$  é sequencialmente metabolizada em prostanóides, incluindo prostaglandinas e tromboxanos pelas prostaglandinas sintetase e tromboxano sintetase, respectivamente. Já a via da lipoxigenase, o AA é convertido no metabólito intermediário ácido monohidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), o qual é ainda metabolizado no instável leucotrieno  $A_4$  ( $LTA_4$ ) pela enzima 5-lipoxigenase (5-LOX). O  $LTA_4$  é subsequentemente convertido a ácido hidroieicosatetraenoico (5-HETE), leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ), leucotrieno  $C_4$  ( $LTC_4$ ), leucotrieno  $D_4$  ( $LTD_4$ ) e leucotrieno  $E_4$  ( $LTE_4$ ). Os 8, 12 e 15-HETE são convertidos pelas 8, 12 e 15-LOX respectivamente (Wang e Dubois, 2010; Yarla et al., 2016).

Em relação a COX, há duas isoformas, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutivamente ativa e está presente na maioria das células do corpo, enquanto que a expressão da COX-2 é restrita ao rim e em áreas do sistema nervoso. Porém, os níveis da COX-2 são altamente induzidos em muitos tecidos por mediadores pró-inflamatórios e mitógenos, incluindo fatores de crescimento, citocinas (Nakanishi e Rosenberg, 2013) e carcinógenos (Schneider e Pozzi, 2011).

Desta forma, os níveis de expressão da COX-2 estão aumentados em um grande número de cânceres como os de estômago, esôfago, fígado, pâncreas, cabeça e pescoço, pulmão, mama, próstata, bexiga (Wang e Dubois, 2010), intestino e pele (Yarla et al., 2016). Além disso, o aumento da expressão da COX-2 está associado à diminuição da sobrevivência entre os pacientes com câncer (Groot et al., 2007). Ainda em relação a COX-1, foi observado o aumento da sua expressão em câncer de ovário (Gupta, 2003).

Levando em conta o microambiente tumoral como alvo terapêutico, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) tem sido utilizado em tratamento do câncer, seja ele sozinho ou combinado com outras terapias. Isso porque o principal alvo do AINES é a enzima COX, tanto a COX-1 quanto a COX-2 (Hussain et al., 2012). De fato, o uso de AINES tem apresentado efeitos benéficos na redução do risco do desenvolvimento de alguns tumores sólidos, tais como: mama, cólon, pulmão e câncer de próstata (Wang e Dubois, 2010). O anti-inflamatório Celebra<sup>®</sup>, por exemplo, foi aprovado pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para o tratamento da polipose adenomatosa familiar do cólon (Bissell e Hines, 2011).

No entanto, o uso de AINES tem apresentados efeitos colaterais nestes tratamentos, isso porque, estes anti-inflamatórios inibem a COX-1, a qual mantém a integridade da mucosa epitelial do estômago e do intestino. Quando a COX-1 é inibida por AINES, esta inibição leva a danos nesses órgãos, como úlceras e hemorragias (Yarla et al., 2016). Contudo, o entendimento do papel das prostaglandinas no microambiente tumoral pode ajudar a desenvolver biomarcadores do câncer e agentes quimiopreventivos e terapêuticos que apresentem benefícios antitumorais, mas com poucos efeitos colaterais (Wang e Dubois, 2010).

Apesar de a maioria dos trabalhos focarem na via da COX, estudos mostram que a via da LOX também apresenta um importante papel na progressão do tumor e na sua sobrevivência (Greene et al., 2011). A LOX é expressa em diversos cânceres de origem epitelial, tais como: cólon, esôfago, pulmão, próstata e mama (Wang e Dubois, 2010). As principais lipoxigenases expressadas em humanos são as 5-lipoxigenase (5-LOX), 12-lipoxigenase (12-LOX) e 15-lipoxigenase (15-LOX); podendo existir dois tipos: 15-LOX-1 e 15-LOX-2. Tanto a 5-LOX quanto a 12-LOX estimulam a angiogênese e o crescimento do tumor, a 15-LOX-2 tem ação anti-tumoral enquanto que a 15-LOX-1 tem ambas atividades anti e pró-tumoral (Greene et al., 2011).

Estudos de análises histológicas com amostras de adenoma humano sugerem uma forte correlação da 5-LOX com o aumento do pólipó, indicando que esta enzima poderia ter um papel nos estágios iniciais de câncer de cólon (Wasilewicz et al., 2010; Schneider e Pozzi, 2011). Confirmando este resultado, a inibição da 5-LOX com o antagonista de receptores de cisteinil-leucotrieno (REV5901) impede a proliferação de células tumorais de cólon tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Melstrom et al., 2008; Schneider e Pozzi, 2011). O aumento da atividade da 5-LOX também tem sido associado ao câncer da cavidade oral e o tratamento com Zyflamend<sup>™</sup> reduziu significativamente a hiperplasia e displasia em modelo de carcinoma de

células escamosa orais em camundongos (Yang et al., 2008; Schneider e Pozzi, 2011). Além da 5-LOX, a 12-LOX está presente em câncer de ovário e a inibição desta enzima tem apresentado resultados promissores quanto à redução da proliferação destas células tumorais, e por fim, a 15-LOX-1 tem sido bastante expressa no linfoma de Hodgkin (Greene et al., 2011).

Muitos cânceres associados à inflamação expressam tanto COX-2 quanto 5-LOX. Assim, a combinação de um inibidor de 5-LOX e um inibidor de COX-2 tem apresentado uma melhor opção e ação para o tratamento de vários tumores - pulmão, cólon, pele, pâncreas e esôfago - do que inibir somente com um desses eicosanoides. Desta forma, inibidores de COX/5-LOX estão sendo desenvolvidos e podem induzir apoptose nas células tumorais independente da via do ácido araquidônico (Greene et al., 2011).

Tanto os leucotrienos quanto as prostaglandinas secretadas pelas células tumorais, bem como células do sistema imune residentes no tecido, recrutam uma grande quantidade de células do sistema imune (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos) da circulação para o microambiente tumoral e em seguida reprogramam estas células para células pró-inflamatórias (Wang e Dubois, 2010). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue e são considerados a primeira linha de defesa durante as inflamações e infecções. Além do seu papel clássico como antimicrobiano, o neutrófilo também está presente em um grande número de tumores. E diferente do que se acreditava, de que os neutrófilos seriam meros espectadores no microambiente tumoral, pelo fato de serem células de vida curta, estudos recentes têm demonstrado que os neutrófilos possuem um papel relevante no câncer, podendo agir tanto como pró-tumoral quanto como anti-tumoral (Uribe-Querol e Rosales, 2015).

Este papel contraditório dos neutrófilos associados ao tumor (NAT) pode ser explicado pelo fato de que há dois fenótipos de neutrófilos, o N1 e o N2. Assim, dependendo do seu fenótipo o neutrófilo pode ter ação antitumoral (N1) ou pró-tumoral (N2). Até o momento, a ocorrência dos fenótipos N1/N2 tem sido observada somente em modelos de tumor murinos, sendo necessária esta confirmação em tumores humanos (Hagerling e Werb, 2016). Os NAT com fenótipo N1 produzem espécies reativas de oxigênio e ácido hipocloroso, que podem danificar diretamente e destruir as células tumorais, já o fenótipo N2, secretam metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) que libera fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) sequestrado pela matriz extracelular para promover a angiogênese, possuem altos níveis da enzima arginase 1, a qual inibe a células CD8 T (linfócitos T citotóxico) (Uribe-Querol e Rosales, 2015).

Além disso, os estudos com camundongos têm demonstrado que neutrófilos com fenótipo N1 podem ser convertidos para o fenótipo N2 e vice-versa (Moses e Brandau, 2016), isso porque, o microambiente tumoral envolvido com a progressão do tumor pode influenciar o estado de polarização dos NAT, como por exemplo, o fator de transformação de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que pode diferenciar os neutrófilos de um fenótipo para o outro. O que se tem observado é que no estágio inicial do desenvolvimento do tumor, os neutrófilos recrutados são do fenótipo N1, mas que com a progressão do tumor os neutrófilos infiltrados tornam-se mais pró-tumorais e adquirem o fenótipo N2 (Hagerling e Werb, 2016).

Além disso, tem sido relatado, que muitos pacientes com câncer em estado avançado apresentam elevados níveis de neutrófilos no sangue e essa neutrofilia está correlacionada com um pobre prognóstico em vários tipos de câncer: pulmão, melanoma e carcinoma renal (Uribe-Querol e Rosales, 2015). Portanto, reconhecendo que os componentes do estroma do microambiente tumoral exercem um papel importante na formação e manutenção do tumor, o entendimento de seu papel na tumorigênese poderá auxiliar na transposição desses conhecimentos para a clínica (Bissell e Hines, 2011) fazendo destas células “não tumorais” um novo alvo terapêutico, pois essas células frequentemente não apresentam taxas de proliferação desregulada ou instabilidade genética (Onuchic e Chammas, 2010).

### 1.3. PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA DO CÂNCER

Para o tratamento do câncer, o objetivo da quimioterapia é desenvolver drogas seletivas que possam matar as células malignas, mas sem provocar danos às células normais (Khazir et al., 2014). Desta forma, os produtos naturais podem apresentar uma significativa vantagem em relação às terapias convencionais, pelo fato de elas apresentarem ação a multialvos, bem como serem relativamente menos tóxicas (Shanmugam et al., 2016).

Além disso, Aravindaram e Yang (2010) relatam que plantas medicinais usadas como extrato bruto ou fração ou princípio ativo, apresentam efeitos quimiopreventivos ou terapêuticos em vários cânceres, induzindo ou suprimindo atividades específicas inflamatórias e mecanismos associados com sinalização molecular.

Os produtos originários das plantas têm uma longa história no tratamento do câncer (Khazir et al., 2014). Newman e Cragg (2012) fizeram um levantamento e relataram que das drogas disponíveis para o tratamento do câncer entre 1981-2010, 65% das moléculas utilizadas são de origem natural e/ou inspiradas na natureza e apenas 35% são sintéticas,

enquanto que, nos tratamentos de processos inflamatórios, apenas 27% das moléculas utilizadas são de origem natural e/ou inspiradas na natureza e 73% são sintéticas.

Com esse enfoque na descoberta de novos agentes antitumorais, o isolamento e identificação de compostos de fontes naturais têm propiciado o aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para inúmeras indicações terapêuticas. Nesse sentido, foi desenvolvido métodos de triagem biológicas (*High Throughput Screening* - HTS) que permitem testar *in vitro* milhares de substâncias frente a alvos biológicos específicos em curto espaço de tempo (Brandão, 2010).

Na década de 60 o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou um programa de triagem em larga escala para a descoberta de agentes antitumorais derivados de plantas (Nobili et al., 2009). Dentre os agentes tumorais descobertos na triagem com alto potencial, os alcaloides têm apresentado um papel importante como agente antitumoral (Qiu et al., 2014).

Os alcaloides representam uma grande classe de metabólitos secundário de plantas e de outros organismos, sendo muito utilizados como fármaco em vários processos biológicos, tais como: anticolinérgico, antitumoral, diurético, antiviral, anti-hipertensivo, antimicrobiano, relaxante muscular, hipnoanalgésico, anti-inflamatório, etc (Souto et al., 2010).

Entre os diversos grupos existentes, os alcaloides das famílias isoquinolina, quinolina e indol são os mais estudados para a atividade anti-inflamatória. Entre as isoquinolinas, a berberina, isolada de *Coptis chinensis*, é a mais estudada e é frequentemente utilizada na medicina tradicional chinesa para tratamento de processos inflamatórios (Souto et al., 2010). Além do efeito anti-inflamatório, a berberina também possui ação antitumoral e quimiopreventiva por sua atuação em diversos alvos, inclusive no metabolismo do AA, como por exemplo, na inibição do crescimento do hepatocarcinoma tanto *in vitro*, quanto *in vivo* através da inibição da expressão dos genes da PLA<sub>2</sub> e da COX-2 (Yarla et al., 2012). Os alcaloides quinolizidínicos matrinalina e oximatrina, isolados da *Sophora subprostrata* exibiram inibição da via da ciclooxigenase *in vitro* e atividade antioxidante (Souto et al., 2010). Matrinalina também apresentou atividade anticâncer através da inibição da proliferação e indução da apoptose (Qiu et al., 2014).

Além do foco no microambiente tumoral, muitos alcaloides descobertos pela triagem realizada pelo NCI, apresentam a sua ação na própria célula tumoral, como por exemplo: os alcaloides da vinca, taxol, camptotecinas e colchicina (Khazir et al., 2014). Com exceção da camptotecinas, os outros alcaloides apresentam ação anti-mitótica através da sua interação com as tubulinas, proteínas globulares que compõem o microtúbulo, sendo este

formado através da polimerização e despolimerização dos dímeros  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina (Santos, 2015). Os microtúbulos possuem diversas funções celulares, tais como: participam do processo de divisão celular; formam o citoesqueleto que dá forma à célula e determina a posição das organelas; transmitem sinais celulares; auxiliam na reorganização das organelas; proporcionam mobilidade às células; intervêm no processo de secreção celular e na comunicação neuronal, o que explica sua abundância nos neurônios (Souza, 2004).

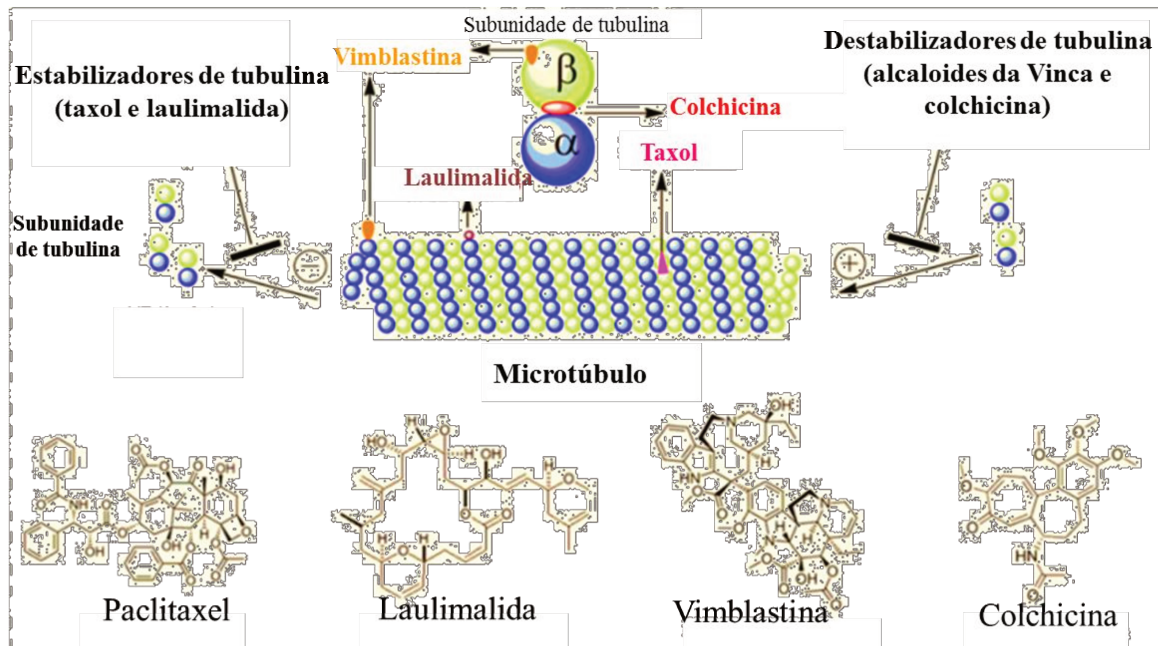
Devido à versatilidade dos microtúbulos, estas proteínas têm sido comumente consideradas importantes alvos subcelulares para a atuação de agentes quimioterápicos (Souza, 2004). Tanto que Kingston (2009) comenta que entre os mecanismos de ação dos produtos naturais, aqueles que interagem com as tubulinas, estão entre os mais importantes e que segundo Butler (2008) mais de 25% dos novos candidatos à triagem clínica opera por este mecanismo.

Drogas que agem nos microtúbulos podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo ser agentes desestabilizadores de microtúbulos ou agentes estabilizadores de microtúbulos (Vuuren et al., 2015). Os agentes desestabilizadores de microtúbulos evitam a formação do mesmo, impedindo que as células formem as fibras do fuso mitótico necessárias para separar os cromossomos duplicados na fase final da mitose. Exemplos de agentes desestabilizadores são os alcaloides da vinca e a colchicina, enquanto que agentes estabilizadores de microtúbulos são aqueles que impedem que as células desfçam as fibras do fuso após a separação dos cromossomos duplicado nas etapas finais da mitose. Exemplo de agente estabilizador é o taxol (paclitaxel) (Santos, 2015). Portanto, a ação desses anticancerígenos resulta em lentidão ou bloqueio da mitose na transição da metáfase para anáfase e por fim, a indução da apoptose (Jordan e Wilson, 2004; Brandão et al., 2010).

Na literatura são descritas quatro regiões distintas para a ligação de moduladores de tubulinas. Há dois sítios para os estabilizadores de tubulina, o sítio do taxol e o sítio da laulimalida. E dois sítios para os desestabilizadores de tubulina, os sítios da colchicina e da vimblastina (Fig. 2) (Lu et al., 2012). Com exceção da laulimalida, um macrolídeo de origem marinha (*Cacospongia mycofijiensis* – esponja) (Souza, 2004), os outros são bem caracterizados na literatura.



**Figura 2.** Sítio de ligação de moduladores de tubulina.



Fonte: Modificada de Lu et al., 2012.

O primeiro agente anti-mitótico identificado como um desestabilizador de microtúbulo foi a colchicina, um alcaloide isolado da *Colchicum autumnale*. O sítio de ligação da tubulina fica na interface entre os dois monômeros  $\alpha$  e  $\beta$  da tubulina livre no citosol impedindo desta forma a formação do microtúbulo (Lu et al., 2012). Em 2009, o FDA autorizou o uso da colchicina no tratamento da gota e na febre familiar do mediterrâneo, no entanto, devido a sua toxicidade como: neutropenia, desconforto gastrointestinal, dano na medula óssea e anemia; até o momento este medicamento não é utilizado na terapia do câncer (Stanton et al., 2011; Lu et al., 2012). No entanto, derivados semissintéticos têm sido avaliados visando contornar os efeitos tóxicos da colchicina (Brandão, 2010).

Já os alcaloides da vinca: vinblastina e vincristina foram os primeiros desestabilizadores de tubulina a serem utilizados na clínica como antimitóticos (Kingston, 2009). Estes alcaloides foram extraídos da planta *Catharanthus roseus*, identificados no final dos anos 50 e aprovados pelo FDA como anticancerígenos nos anos 60 (Kingston, 2009; Vuuren et al., 2015). Estes compostos ligam-se a  $\beta$ -tubulina próximo ao sítio de ligação do trifosfato de guanossina (GTP) na interface dos heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina (Vuuren et al., 2015). Esta ligação é rápida e reversível, induz mudanças conformacionais na proteína e dificulta a associação de outras moléculas de tubulina. Além disso, os alcaloides podem ligar-se diretamente com o microtúbulo pela extremidade terminal positiva e desta forma, desestabilizar o microtúbulo (Brandão, 2010).

A vincristina é usada como terapia combinatória para leucemia linfóide aguda e linfomas, enquanto que a vimblastina é usada em terapia combinatória para o tratamento de câncer de mama, bexiga e doença de Hodgkin's (Kingston, 2009). No entanto, esses alcaloides também apresentam efeitos colaterais como neuropatias periféricas e mielossupressão reversível (Brandão, 2010).

A partir destes alcaloides, outros análogos foram semissintetizados, tais como: vinorelbina, vindesina e vinflunina. Vindesina foi o primeiro análogo de vinblastina a ser utilizado na clínica, apesar de ter a toxicidade hematológica um pouco mais elevada do que a vincristina, este composto tem sido incluído em vários tratamentos combinatórios com resultados efetivos para o tratamento de leucemia, linfoma e carcinoma de pulmão tipo não pequenas células. A vinorelbina é utilizada para o tratamento de câncer de mama e carcinoma de pulmão tipo não pequenas células (Kingston, 2009). Já vinflunina é um derivado de vinorelbina, foi aprovado na Europa para o tratamento de câncer urotelial avançada, no entanto, falhou após o uso de tratamento à base de platina (Retz et al., 2015; Médioni et al., 2016).

O Taxol, ou paclitaxel, foi o primeiro estabilizador de microtúbulos identificado (Zhao et al., 2015). Este alcaloide é um diterpénico, da família de taxanos, que foi extraído da árvore *Taxus bravifolia* em 1962 por Wall e Wani (Kingston, 2009; Brandão, 2010; Zhao et al., 2015). Por ter apresentado excelentes resultado em testes *in vitro*, no ano de 1977 iniciou-se os testes pré-clínicos pelo NCI, mas as propriedades estabilizadoras de microtúbulo do taxol, só foram descobertas no ano de 1979 por pesquisadores do *Albert Einstein Medical College* (Souza, 2004; Brandão, 2010). No entanto, para extrair esta substância, precisaria de uma grande quantidade da espécie *Taxus bravifolia*, pois o rendimento do alcaloide era muito baixo. Por fim, pela impossibilidade de manter a fonte de obtenção, a introdução deste composto na terapêutica só ocorreu após a sua produção pela via sintética (Brandão, 2010).

No ano de 1992 o paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) foi aprovado pelo FDA para o tratamento clínico de câncer ovariano metastático. Um análogo semissintético do paclitaxel, o docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>) foi aprovado em 1996 (Zhao et al., 2015). Tanto paclitaxel quanto o docetaxel são administrados pela via intravenosa. Porém, o uso clínico deles tem sido limitado, pois ambos têm baixa solubilidade em água. Para contornar este problema, foi produzida uma formulação em emulsão lipídica (Cremophor EL), que por um lado aumentou a solubilidade dos compostos, só que por outro, aumentou o número de pacientes com hipersensibilidade. Assim, várias novas formulações têm sido desenvolvidas e aprovadas para aumentar a solubilidade dos taxanos com efeitos colaterais reduzidos (Kingston, 2009; Zhao et al., 2015).

O paclitaxel liga-se a tubulina pela superfície interna do microtúbulo, em uma alça hidrofóbica da  $\beta$ -tubulina, e estabiliza o microtúbulo pelo aumento da interação entre as subunidades da tubulina (Singh et al., 2008; Stanton et al., 2011). A sua ação ocorre principalmente em tumores sólidos, tais como: tumores de mama, ovário e próstata (Stanton et al., 2011).

Portanto, os compostos derivados de plantas e seus análogos têm ajudado os pesquisadores a entender melhor a doença, fornecendo eficientes terapias com novos mecanismos de ação, abrindo um leque de novas rotas e inspirando o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer, pois o reino vegetal apresenta uma enorme diversidade e somente uma pequena porção dela foi explorada (Khazir et al., 2014).

#### 1.4. BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS – *Boehmeria caudata* Sw.

Com o objetivo de buscar novos compostos na natureza com ação antitumoral, durante os anos de 2004 a 2008, a divisão de Farmacologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP), sob responsabilidade do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, constituiu uma equipe multidisciplinar de pesquisadores de várias instituições e participou do projeto BIOPROSPECTA - FAPESP (04/15410-0), que objetivou a busca de novos compostos obtidos a partir de plantas, para atividades anticâncer, controle de colesterol, pressão arterial e diurese, em uma região geográfica pouco estudada sob o ponto de vista químico e/ou farmacológico: a área de proteção ambiental (APA) da Serra Mantiqueira, que tem características fisionômicas vegetais bastante especiais, pois contempla vegetação de altitude e da Floresta Atlântica nos contrafortes da serra, com áreas de ecótono quando em contato com a vegetação das planícies do Vale do Rio Paraíba do Sul.

A partir deste projeto, vários outros trabalhos surgiram e entre as várias espécies avaliadas, a *Boehmeria caudata* Sw. foi que apresentou o melhor perfil de atividade em cultura de células tumorais humanas com valores de concentração efetiva TGI (inibição total de crescimento -*Total Growth Inhibitor*) da ordem de  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Pais, 2011).

Essa espécie pertence à família Urticaceae, família que apresenta uma grande variedade de hábitos. Podem ser árvores e arbustos, porém na sua maior parte são ervas ou subarbustos. Ainda, mais raramente, se apresentam como trepadeiras ou hemiepífitas (Gaglioti, 2011). Esta família apresenta distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 49 gêneros com distribuição tropical e subtropical, raramente em regiões temperadas, e possui

aproximadamente 2000 espécies. No Brasil são listados 13 gêneros e 95 espécies (Romaniuc Neto e Gaglioti 2010).

Para o gênero *Boehmeria* há 14 espécies no mundo (Wilmot e Friss, 2013) e no Brasil são encontradas cinco delas, todas elas endêmicas: *Boehmeria caudata* Sw., *Boehmeria cylindrica* (L.) Sw., *Boehmeria pavonii* Weed, *Boehmeria ramiflora* Jacq. e *Boehmeria ulmifolia* Wedd (Gaglioti, 2011).

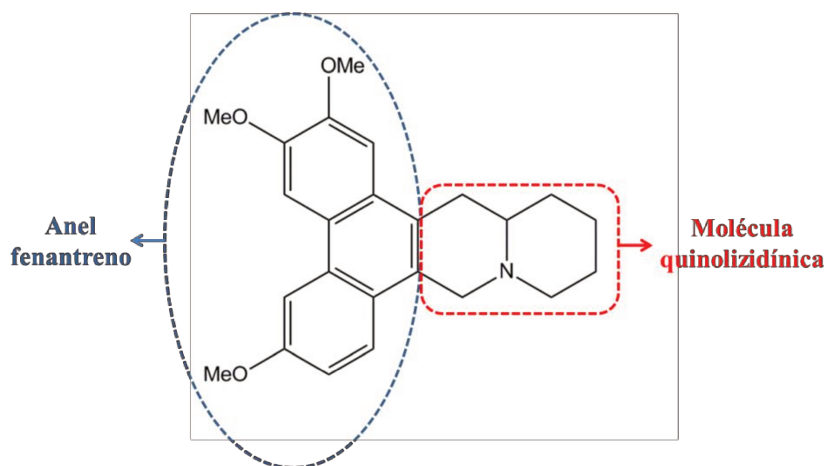
Em relação à espécie estudada, *Boehmeria caudata* Sw. apresenta ampla distribuição na região neotropical, ocorrendo desde México até a Argentina (Wilmot-Dear & Friis 1996). No Brasil ocorre nas regiões Sudeste e Sul, e no Estado do Mato Grosso do Sul (Romaniuc Neto e Gaglioti 2010), sendo comumente coletada em bordas de mata, áreas de pastagem e beira de estradas. Os nomes populares para esta planta são: assa-peixe e lixa-da-folha-larga (Gaglioti, 2011). Wilmot-Dear e Friis (1996) relatam que há 11 sinônimos para esta espécie, dentre esses *Boehmeria arguta*, que é descrita e ilustrada por Miquel (1853), na *Flora brasiliensis*.

Em relação ao seu potencial farmacológico, há poucos dados na literatura, dentre eles, podemos citar Corrêa (1984), que relata que as raízes de *B. caudata* são aperientes, anti-hemorragicas e depurativas, as suas folhas são um pouco aromáticas e usadas como anti-hemorragicas, antioftálmica (combate a oftalmia) e diurético. Já as flores possuem óleo essencial que substituí a arnica. Hoffmann et al. (1977), observaram atividade citotóxica do extrato etanólico do caule com casca da *Boehmeria caudata* para o carcinoma epidermóide humano de nasofaringe (células KB). Pelo conhecimento prévio de que outras espécies do mesmo gênero contém o alcaloide da família fenantroquinolizidínico, o criptopleurina, esses autores o isolaram e verificaram a atividade citotóxica em células KB.

De fato, alguns trabalhos com o gênero *Boehmeria* isolaram alcaloides da família fenantroquinolizidínicos, que pertence a um pequeno grupo de alcaloides existentes na família das Lauraceae, Vitaceae e Urticaceae (Cui e Wang, 2009; Wang et al., 2012a). Sendo que apenas seis desses alcaloides, (R)-criptopleurina (Lande, 1948), criptopleuridina (Johns et al., 1970), Julandina (Hart, 1968), (R)-boehmeriasin A, (R)-boehmeriasin B (Luo et al., 2003) e (14aR, 15R) -15-hidróxicriptopleurina (Cai et al., 2006), foram isolados até o momento. As pesquisas reportam que esses alcaloides possuem propriedades únicas e interessantes (Wang et al., 2012a) que inclui ação vesicante (Lande, 1948), antimicrobial (Al-Shamma et al., 1982), antiviral (Krmptotic et al., 1972; Yang et al., 2010a) e antitumoral (Jin et al., 2012; Wang et al., 2012b).

Estes alcaloides da família fenantroquinolizidínicos são formados por uma estrutura pentacíclica composta por um anel fenantreno conjugado com uma molécula quinolizidínica (Fig. 3) (Wang et al., 2012).

**Figura 3.** Estrutura química do alcaloide Boehmeriasina A pertencente à família fenantroquinolizidínico, que é composta por um anel fenantreno conjugado com uma molécula quinolizidínica.



Ainda sobre o gênero de *Boehmeria*, há na literatura vários relatos sobre as suas ações farmacológicas, tais como: **efeito anti-inflamatório** (Lin et al., 1997; Jin et al., 2012; Sung et al., 2013; Shin et al., 2014; Lee et al., 2014), **atividade hepatoprotetora** (Lin et al., 1997; Lin et al., 1998) **atividade antidiabética** (Semwal et al., 2009; Sancheti et al., 2010; Sancheti et al., 2011; Kim et al., 2013), **atividade antioxidante** (Lin et al., 1998; Sancheti et al., 2010; Sancheti et al., 2011; Lee et al., 2014); **antimicrobiana** (Krmptotic et al., 1972; Al-Shamma et al., 1982; Semwal et al., 2009; Xu et al., 2011; Lee et al., 2014), **atividade contra o vírus da hepatite B** (Huang et al., 2006; Chang et al., 2008; Huang et al., 2009; Wei et al., 2014), **no tratamento de doenças neurodegenerativas** (Sancheti et al., 2010); **segurança no desenvolvimento embrionário** (Tian et al., 2010), **tratamento de sinusite e gripe** (Williams et al., 2007), **atividade anti-hiperlipidêmica** (Sancheti et al., 2011) e **antitumoral** (Farnsworth et al., 1969; Luo et al., 2003; Yan et al., 2006; Wardihan et al., 2013; Lee et al., 2014).

Diante do que foram expostos, vários fatores estimularam o presente estudo sobre o potencial farmacológico de *Boehmeria caudata*. Primeiramente pelo fato dos extratos dessa espécie ter apresentado resultados promissores em relação ao seu potencial antitumoral em cultura de células humanas tumorais e não tumorais (Pais, 2011), além de apresentar poucos

relatos na literatura sobre o assunto, assim como pela descrição da presença de alcaloides do gênero *Boehmeria* com ação antitumoral. Todos esses fatores encorajaram estudos mais aprofundados em relação a seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*, bem como o seu mecanismo de ação.

## 2. PROPOSIÇÕES

### 2.1. PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar a atividade anticâncer e anti-inflamatória de extratos e frações obtidos de *Boehmeria caudata* em testes *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2. PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- Coletar material vegetal;
- Obter extratos brutos de diferentes polaridades;
- Obter fração rica em alcaloides;
- Identificar compostos presentes na fração rica em alcaloides por espectrometria de massas de alta resolução (HRESI-MS);
- Biomonitorar extratos brutos e frações através de teste de atividade antiproliferativa em células tumorais e não tumorais humanas *in vitro*;
- Investigar a atividade *in vitro* da fração rica em alcaloide sobre o processo de morte celular e sobre as fases do ciclo celular através de citometria de fluxo;
- Investigar o efeito da fração rica em alcaloide sobre capacidade de formação de colônia (teste de clonogenicidade);
- Avaliar através do método de docagem molecular se os alcaloides: - (-) criptopleurina, boehmeriasina A, (-)-C(15R)-hidróxicriptoleurina e boehmeriasina B poderiam interagir com o mesmo sítio de ligação da colchicina na tubulina;
- Avaliar a atividade antitumoral do extrato bruto etanólico e da fração rica em alcaloides em animais via tumor sólido de Ehrlich;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto etanólico e da fração rica em alcaloides sob o edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto etanólico e da fração rica em alcaloides sob o edema de orelha induzido por óleo de cróton.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. FITOQUÍMICA

##### 3.1.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas da espécie *Boehmeria caudata* Sw. (Fig. 4) foram coletadas na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), do CPQBA/UNICAMP, em Paulínia, São Paulo [Latitude: 22°45'40" (S), Longitude: 47°09'15" (W) e Altitude: 590 metros], sob supervisão da Dra. Glyn Mara Figueira da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA. A identificação botânica foi realizada pelo MSc Jorge Yoshio Tamashiro, pesquisador do Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia/UNICAMP.

**Figura 4.** Foto da espécie *Boehmeria caudata* Sw. presente no campo experimental do CPQBA. (A) Foto do hábito (B) Detalhe da folha e da inflorescência.



O espécime-testemunho de *Boehmeria caudata* está depositado no herbário do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP sob o número UEC 107966.

Pelo fato de *B. caudata* ser uma espécie nativa, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), nos termos da Deliberação 246/2009, emitiu autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, com a finalidade de pesquisa científica, viabilizando os estudos propostos com a espécie (Processo 010672/2012-5).



### 3.1.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS PARA TRIAGEM INICIAL

As etapas envolvendo os estudos de fitoquímica foram desenvolvidas na Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA-UNICAMP sob a orientação da Dra. Mary Ann Foglio.

Durante o doutorado foram coletados 3kg/ano das partes aéreas de *B. caudata*. Pelo fato da planta apresentar uma inflorescência de muitas flores, quase o ano todo, ou seja, inflorescência de janeiro a maio e de agosto a dezembro (Gaglioti, 2011), foram inicialmente separados em 1) folhas e 2) flores mais galhos, com o intuito de avaliar possíveis diferenças entre os perfis fitoquímicos e farmacológicos.

Assim, para a secagem do material fresco, as partes aéreas foram separadas, sendo cada parte identificada como: folhas (F1) e flores mais galhos (F). Além disso, para avaliar se haveria algum tipo de interação entre os compostos presentes nas folhas e nas flores mais galhos também foram realizados uma extração da mistura destes, denominada M.

O material vegetal foi seco em estufa ventilada (Precision, Modelo 28) a 40°C por 60 horas e em seguida foi moído em moinho com peneira de 40 mesh (Primotécnica, P1001-SBA.3, Brasil).

Os extratos foram preparados por dois métodos de extração distintos, a quente utilizando o sistema *soxhlet* e a frio com aparelho agitador orbital (maceração dinâmica) (Fig. 5), a fim de avaliar qual dos métodos apresentavam o melhor rendimento ou a melhor atividade no teste antiproliferativo em células tumorais e não tumorais humanas *in vitro*.

Para ambas as extrações foram utilizados 5 g de material vegetal seco. Para a mistura foram utilizados valores aproximadamente proporcionais em relação ao valor da massa de cada parte aérea da planta, sendo os valores utilizados: 3 g da F1 + 2 g da F fornecendo o total de 5 g.

Para a extração no sistema *soxhlet*, a proporção utilizada de planta:solvente foi de 1:5 (peso/volume: p/v), sendo os solventes utilizados: diclorometano (DCM) (Labsynt, Diadema, Brasil), após esgotado com o solvente apolar o resíduo de extração foi extraído com etanol (E) 95% (Labsynt, Diadema, Brasil) e por fim com água destilada (A).

Os extratos de diclorometano obtidos no sistema *soxhlet* foram evaporados até a secura sob vácuo (Rotavapor R-215, Buchi – Suíça), em temperatura de aproximadamente 40°C, fornecendo os extratos brutos diclorometanos (EBDs):

- Folhas *soxhlet* diclorometano (F1SD),
- Flores mais galho *soxhlet* diclorometano (FSD),

- Mistura *soxhlet* diclorometano (MSD).

Os extratos de etanol obtidos produzidos por sistema *soxhlet* foram evaporados até a secura sob vácuo, em temperatura de aproximadamente 42°C, fornecendo os extratos brutos etanólicos (EBEs):

- Folhas *soxhlet* etanol (F1SE),
- Flores mais galho *soxhlet* etanol (FSE),
- Mistura *soxhlet* etanol (MSE).

Os extratos de água destilada obtidos através do sistema *soxhlet* foram evaporados em temperatura de aproximadamente 42°C, para a retirada de solventes presentes e na sequencia foram liofilizados (virtis modelo 8 L, EUA), fornecendo os extratos brutos aquosos (EBAs):

- Folhas *soxhlet* água (F1SA),
- Flores mais galho *soxhlet* água (FSA),
- Mistura *soxhlet* água (MSA).

Para os processos de maceração dinâmica, as amostras foram extraídas em agitador oscilatório três vezes em processos de 1 hora, os volumes resultantes foram reunidos, filtrados e evaporados fornecendo os extratos brutos.

Os extratos de diclorometano a partir de maceração dinâmica foram evaporados até a secura sob vácuo, em temperatura de aproximadamente 40°C, fornecendo os EBDs:

- Folhas maceração dinâmica diclorometano (F1MDD),
- Flores mais galho maceração dinâmica diclorometano (FMDD),
- Mistura maceração dinâmica diclorometano (MMDD).

Os extratos de etanol obtidos através da maceração dinâmica foram evaporados até a secura sob vácuo, em temperatura de aproximadamente 42°C, fornecendo os EBEs:

- Folhas maceração dinâmica etanol (F1MDE),
- Flores mais galho maceração dinâmica etanol (FMDE),
- Mistura maceração dinâmica etanol (MMDE).

Os extratos de água destilada obtidos através da maceração dinâmica foram evaporados até a secura sob vácuo, em temperatura de aproximadamente 42°C, para a retirada de solventes presentes e na sequencia foram liofilizados, fornecendo os EBAs:

- Folhas maceração dinâmica água (F1MDA),
- Flores mais galho maceração dinâmica água (FMDA),
- Mistura maceração dinâmica água (MMDA).

Por fim, todos esses extratos brutos foram avaliados por cromatografia de camada delgada (CCD) e no teste antiproliferativo em células humanas tumorais e não tumorais *in vitro*.



### 3.1.3. EXTRATO BRUTO ETANÓLICO TOTAL *VERSUS* EXTRATO BRUTO ETANÓLICO OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO COM DICLOROMETANO

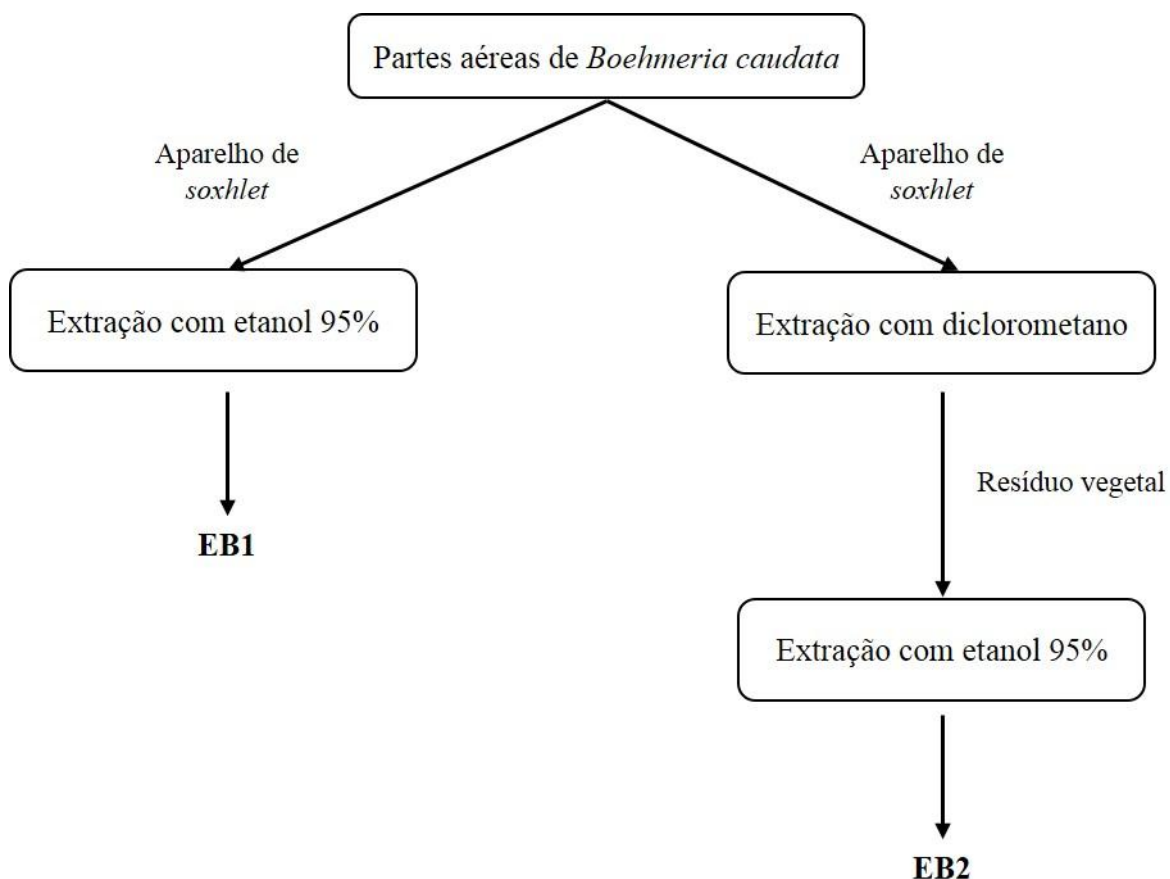
#### 3.1.3.1. Extrato bruto etanólico total (EB1)

Foram extraídos 100 g de partes aéreas de *B. caudata* moídas com etanol 95% em sistema *soxhlet*, com proporção planta:solvente de 1:5 (p/v), por 3 dias. No final desse processo o volume resultante foi filtrado e evaporado até *secura* sob vácuo à temperatura de aproximadamente de 42°C, fornecendo o extrato bruto etanólico total (EB1) (Fig. 6). Este extrato foi avaliado em CCD e no teste antiproliferativo em células tumorais e não tumorais humanas *in vitro*.

#### 3.1.3.2. Extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2)

Foram extraídos 100 g de partes de *B. caudata* moídas com diclorometano em sistema *soxhlet*, com proporção planta:solvente de 1:5 (p/v), por 2 dias. O extrato bruto diclorometano foi evaporado até *secura*, a 40°C, fornecendo o extrato bruto diclorometano. A seguir o material vegetal residual foi extraído com etanol 95%. O extrato bruto etanólico foi evaporado até a *secura*, sob vácuo, a 42°C, fornecendo o extrato bruto etanólico (EB2) (Fig. 6). O EB2 foi avaliado em CCD e no teste antiproliferativo em células humanas tumorais e não tumorais *in vitro*.

**Figura 6.** Fluxograma do extrato bruto etanólico total (EB1) e do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2).

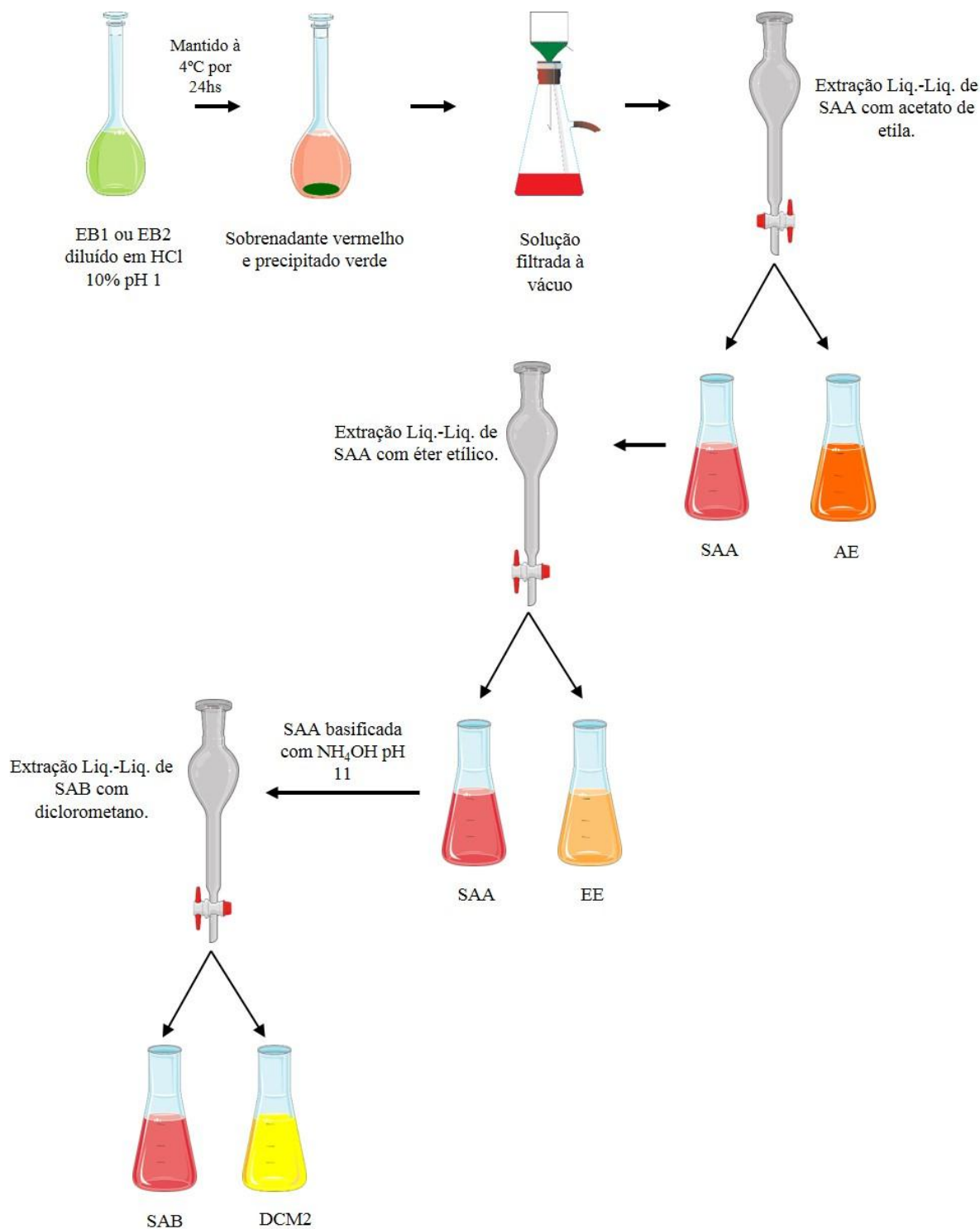


#### 3.1.4. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES POR EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

O EB1 ou EB2 foi acidificado com ácido clorídrico (Labsynty, Brasil) 10% até aproximadamente pH 1. A solução ácida foi mantida a 4°C por 24 h. Após 24 horas a solução ácida apresentou um precipitado de coloração verde escura (PV) e um sobrenadante de coloração vermelha, que foi filtrada a vácuo para separação das fases. O sobrenadante vermelho (solução ácida) foi extraído (extração líquido-líquido) com acetato de etila (Labsynty, Brasil) em funil de separação na proporção 3:1 (volume/volume: v/v). Este processo foi repetido três vezes, resultando em uma solução aquosa ácida (SAA) e uma solução orgânica de acetato de etila (AE). Essa solução aquosa ácida foi reextraída (extração líquido-líquido) com éter etílico (Labsynty, Brasil) em funil de separação na proporção 3:1 (v/v). Esse processo foi repetido três vezes, resultando numa segunda solução fase orgânica de

éter etílico (EE) e uma solução aquosa ácida. Na sequência a solução aquosa ácida foi basificada com hidróxido de amônia (Científica química<sup>®</sup>, Brasil) até aproximadamente pH 11. A solução básica foi extraída (extração líquido-líquido) com diclorometano em funil de separação na proporção 3:1 (v/v). Este processo foi repetido três vezes, resultando em uma solução aquosa básica (SAB) e uma solução orgânica de diclorometano (DCM2) (Fig. 7). O DCM2 foi lavado com água destilada por três vezes em funil de separação na proporção de 3:1 (v/v). Em seguida foi adicionado sulfato de sódio anidro (Êxodo Científica<sup>®</sup>, Brasil) para retirada de água residual e após 15 minutos foi filtrado, sendo na sequência evaporado até securo, sob vácuo em temperatura de aproximadamente 40°C. Amostras da PV, AE, EE, DCM2 foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e também foram analisadas no teste de atividade antiproliferativa *in vitro* em células humanas tumorais e não tumorais. Após a análise por CCD a fração DCM2 passou a ser chamada de FA: fração rica em alcaloides.

**Figura 7.** Esquema da obtenção da fração rica em alcaloide por extração ácido base.



**SAA:** solução aquosa ácida; **AE:** solução orgânica de acetato de etila; **EE:** solução orgânica de éter etílico; **SAB:** solução aquosa básica; **DCM2:** solução orgânica de diclorometano. Fonte de imagens: Slide Kit Servier medical art-chemistry, 2014 e Generalic, Eni. "Vacuum filtration", 2014.



### 3.1.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As análises por CCD foram efetuadas em cromatofolhas prontas de silicagel 60 (F254, Merck 5554). Foram utilizados os seguintes eluentes: mistura de diclorometano e metanol, na concentração de 3% (97:3 – v/v) e BAW (mistura de butanol: ácido acético: água destilada na proporção de 4:1:5). Após término da eluição, as cromatofolhas foram reveladas em câmara de UV (Solab Científica, Brasil), nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm para avaliar possíveis compostos com duplas ligações conjugadas. Os reveladores utilizados foram: Anisaldeído, utilizado como revelador universal, mas é principalmente utilizado para detectar terpenos e diterpenos; Dragendorff, para detectar compostos nitrogenados, entre eles os alcaloides (Gibbons, 2012).

O fator de retenção ( $R_f$ ) foi calculado segundo a equação:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{frente do solvente}}$$

### 3.1.6. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (HRESI-MS)

A FA foi dissolvida em 1 mL de MeOH e 10 µL desta solução foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/água (1:1, v/v) com 0,1 % de ácido fórmico (99 %) para ionização no modo positivo. A solução da amostra foi injetada por inserção direta via bomba seringa no espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS (*full scan*) foram adquiridos na faixa de  $m/z$  150 a 1800 e os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos a partir de  $m/z$  50 até um valor pouco acima do  $m/z$  do íon em estudo e com energia de colisão de 10 - 40 eV. As condições gerais de operação do equipamento foram: voltagem do *spray* de 3500 V, temperatura do capilar de 320°C, pressão do *sheat gas* de 10 psi e nível de RF da *S-Lens* de 50 V. Os espectros foram tratados com o software Xcalibur® (Thermo Scientific, Alemanha), específico do espectrometro de massas.

A análise por espectrometria de massas de alta resolução foi realizada em colaboração do Dr. Diogo Noin de Oliveira e Dr. Rodrigo Ramos Catharino, ambos do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP.

## 3.2. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

### 3.2.1. LINHAGENS CELULARES:

Para o teste de atividade antiproliferativa foram empregadas até 10 linhagens de células tumorais humanas (Tabela 1). Estas linhagens foram cedidas pelo NCI e mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Corning®, EUA) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco™, EUA) e 1% (v/v) de solução de penicilina:estreptomicina (Nutricell®, Campinas, 1000 U mL<sup>-1</sup>:1000 g mL<sup>-1</sup>), e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Além das linhagens tumorais, empregou-se também uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), doada pelo Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP).

Todos os experimentos *in vitro* foram conduzidos em meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% (v/v) de solução de penicilina:estreptomicina (1000 U mL<sup>-1</sup>:1000 g mL<sup>-1</sup>), denominado meio completo. As condições de incubação para a manutenção e experimentos foram de temperatura a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 1.** Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios tumorais *in vitro*.

| <b>Sigla</b>       | <b>Tecido</b>                                          | <b>Características</b>                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>U251</b>        | Glioblastoma                                           | Astrocitoma. Expressa GFAP e vimentina <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>UACC-62</b>     | Melanoma                                               | Originária de melanócitos <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>MCF-7</b>       | Adenocarcinoma de mama                                 | Produz proteínas insulina like (liga fatores de crescimento) <sup>1</sup> e superexpressa gene P2P-R <sup>2</sup> . TNF- $\alpha$ inibe seu crescimento <sup>1</sup> .                                                                                                               |
| <b>NCI-ADR/RES</b> | Adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas | Perdeu o receptor de estrógeno <sup>1</sup> , expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) <sup>3</sup> traduzindo para glicoproteína-P <sup>4</sup> . Proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas <sup>5</sup> .                  |
| <b>786-O</b>       | Adenocarcinoma de rim                                  | Produz peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoideano <sup>6</sup> . Mutações no gene HVL <sup>7</sup> e da prolina oxidase <sup>8</sup> propiciam a formação do tumor.                                                                                             |
| <b>NCI-H460</b>    | Adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células    | Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático <sup>9</sup> . Apresenta características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas <sup>10</sup> .                                                                                     |
| <b>PC-3</b>        | Adenocarcinoma de próstata                             | Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- $\alpha$ redutase, sem cromossomo Y normal detectado <sup>1</sup> . É uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos <sup>11</sup> .                                                                                                   |
| <b>OVCAR-3</b>     | Adenocarcinoma de ovário                               | Possui receptores de estrógeno, andrógeno e progesterona e poucos cromossomos normais representados. É adequada em estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal <sup>1</sup> . Apresenta alta produção da enzima 24-OHase e baixa de 1- $\alpha$ OHase <sup>12</sup> . |
| <b>HT-29</b>       | Adenocarcinoma colorretal                              | Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão de receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2 <sup>13</sup> .                                                           |
| <b>K-562*</b>      | Leucemia Mielóide Crônica                              | Células altamente indiferenciadas (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica <sup>1</sup> . Possui o gene fusionado Bcr-abl impedindo sua apoptose <sup>14</sup> .                                         |

\*Célula em suspensão. <sup>1</sup>ATCC, 2014. <sup>2</sup>Gao e Scott, 2003; <sup>3</sup>Yang et al., 2003a; <sup>4</sup>Xu et al., 2002; <sup>5</sup>Weinstein-Oppenheimer et al., 2002; <sup>6</sup>Thiede et al., 1988; <sup>7</sup>Iliopoulos et al., 1995; <sup>8</sup>Maxwell e Rivera, 2003; <sup>9</sup>Takahashi et al., 2002; <sup>10</sup>Schüller et al., 1987; <sup>11</sup>Bokhoven et al., 2003; <sup>12</sup>Miettinen et al., 2004; <sup>13</sup>His et al., 2000; <sup>14</sup>Cen et al., 2002. Fonte: Marchetti, 2012.

### 3.2.2. TRIAGEM FARMACOLÓGICA EM TESTE ANTIPROLIFERATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS HUMANAS *IN VITRO*

#### 3.2.2.1. Princípio do teste

O objetivo da triagem de atividade antiproliferativa *in vitro* foi a busca por substâncias que sejam capazes de inibir a proliferação de células tumorais, direcionando os compostos ativos para estudos em modelos experimentais de câncer em animais de laboratório (*in vivo*).

O teste da atividade antiproliferativa dos extratos brutos e frações foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks et al. (1991), que descreveram o método de triagem *in vitro* para drogas anticâncer realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*-NCI-EUA, 2016), que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (NCI60) (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006). De modo diferente de outros métodos, este protocolo prevê a determinação da densidade celular no tempo 0 (momento de adição das amostras), o que possibilita o cálculo da concentração que inibe totalmente o crescimento celular (Shoemaker, 2006).

Para avaliação do crescimento celular empregou-se o método não clonogênico, por espectrofotometria, utilizando-se o corante proteico sulforrodamina SRB (SRB, Sigma-Aldrich®, EUA), que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste (Rubinstein et al., 1990; Skehan et al., 1990; Monks et al., 1991).

#### 3.2.2.2. Procedimento experimental

##### 3.2.2.2.1. Preparo das suspensões celulares

No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com meio completo, nas suas respectivas densidades de inoculação (d.i., Tabela 2). Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 compartimentos (Corning®, EUA), que foram incubadas por 24 horas (placa teste). Da mesma forma, preparou-se a placa controle (placa T<sub>0</sub>), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

**Tabela 2.** Densidade de inoculação das linhagens celulares tumorais e não tumoral *in vitro*.

| <b>Sigla</b>       | <b>Densidade de inoculação<br/>(x10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>)*</b> |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>U251</b>        | 4.0                                                                           |
| <b>UACC-62</b>     | 4.0                                                                           |
| <b>MCF-7</b>       | 6.0                                                                           |
| <b>NCI-ADR/RES</b> | 5.0                                                                           |
| <b>786-O</b>       | 4.5                                                                           |
| <b>NCI-H460</b>    | 5.0                                                                           |
| <b>PC-3</b>        | 5.0                                                                           |
| <b>OVCAR-3</b>     | 7.0                                                                           |
| <b>HT-29</b>       | 4.0                                                                           |
| <b>K-562</b>       | 5.0                                                                           |
| <b>**HaCaT</b>     | 4.0                                                                           |

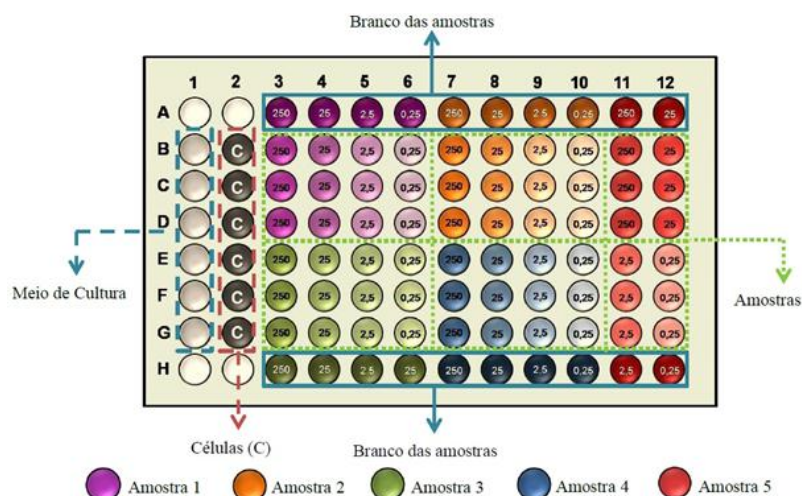
\*Placa de 96 compartimentos. U251: glioma, UACC-62: melanoma, MCF-7: mama, NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, 786-0: rim, NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células, PC-3: próstata, OVCAR-03: ovário, HT-29: colón, K-562: leucemia, \*\*HaCaT: queratinócito humano – Linhagem não tumoral.

### **3.2.2.2.2. Preparo e aplicação dos extratos brutos e da fração rica em alcaloide**

Para a preparação das amostras, uma alíquota de cada amostra (10 mg) foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, Alemanha). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio completo, para preparação da solução de trabalho, a qual foi diluída sucessivamente, em meio completo, para a preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL<sup>-1</sup> (Fig. 8). As amostras diluídas foram aplicadas (100 µL/compartimento, em triplicata) sobre as linhagens colocadas nas placas teste, as quais foram incubadas por 48 horas. A concentração final de DMSO (0,25%) utilizada neste teste não interferiu na viabilidade celular conforme resultados anteriores obtidos em nosso grupo de pesquisa (Della Torre, 2013).

A fração rica em alcaloides, obtida após a reunião das frações alcaloídicas tanto de EB1 quanto de EB2, também foi testada neste modelo *in vitro* com concentrações menores (0,0025; 0,025; 0,25 e 2,5 µg mL<sup>-1</sup>, em triplicata).

**Figura 8.** Desenho experimental da placa teste utilizada no modelo de atividade antiproliferativa *in vitro*.



Desenho experimental da placa de 96 compartimentos (placa teste) utilizada nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*, mostrando a disposição das concentrações utilizadas, do controle do meio de cultura (aplicou-se somente meio de cultura), do branco das amostras (aplicou-se somente amostra diluída) e das células (aplicaram-se somente células).

Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina (Cloridrato de doxorrubicina® - Europharma, Brasil), nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (100  $\mu\text{L/compartimento}$ ) em triplicata. A placa controle  $T_0$  foi fixada com ácido tricloroacético no momento da adição das amostras, conforme descrição a seguir, para determinação da quantidade de células no início do tempo de exposição.

Ao final de 48 horas de exposição, as células foram fixadas com 50  $\mu\text{L/compartimento}$  de ácido tricloroacético (TCA, Sigma-Aldrich®, EUA) a 50% (p/v) e incubadas por 1 hora a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água corrente para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. O TCA atua como um fixador, precipitando proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas. Depois de secas completamente à temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com 50  $\mu\text{L/compartimento}$  de SRB 0,4% (p/v) em ácido acético 1%; e mantidas por 15 min à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150  $\mu\text{L/compartimento}$  de Trizma Base (10 $\mu\text{M}$ , pH 10,5) (Sigma-Aldrich®, EUA).

### 3.2.2.2.3. Análise dos resultados

A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 540 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax, EUA). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se  $T_A > T_1$ , a amostra estimulou o crescimento.

Se  $T_1 \geq T_A > T_0$ , a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(T_A - T_0) / (T_1 - T_0)]$ .

Se  $T_A < T_0$ , a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(T_A - T_0) / (T_0)]$ .

Sendo  $T_A$  a média da absorbância da célula tratada,  $T_1$  o controle de célula e  $T_0$  o controle das células no dia da adição das amostras.

Os dados de absorbância foram então analisados para obtenção do crescimento celular, em porcentagem, e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra empregando-se o *software* Origin® 8.0. Nesse mesmo *software*, foi feita a regressão não linear, tipo sigmoidal, das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento para o cálculo de uma concentração efetiva, TGI (*total growth inhibition*, concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular) utilizada para amostras citocidas. Esse parâmetro permite a comparação de potência entre amostras além de evidenciar a seletividade das mesmas.

## 3.2.3. CITOMETRIA DE FLUXO

Os estudos envolvendo mecanismo de ação dos compostos foram realizados no citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini Flow Cytometry System, Millipore®, Billerica, MA, USA (FAPESP 09/51602-5). Antes do início dos experimentos, células tratadas com a fração rica em alcaloide, em diferentes concentrações, porém sem serem tratadas com qualquer marcador fluorescente, foram avaliadas nos diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão do equipamento utilizado, para determinação da existência ou não de autofluorescência da amostra, sob estas condições experimentais (dados no apêndice).

### 3.2.3.1. Análise do ciclo celular

#### 3.2.3.1.1 Princípio do teste

O objetivo deste teste é determinar as diferentes fases do ciclo celular através do seu conteúdo de DNA. O conteúdo de DNA é determinado pela incubação das células com

iodeto de propídio (IP), o qual intercala entre as duplas fitas dos ácidos nucleicos, após uma etapa de permeabilização da membrana celular. A intensidade de fluorescência lida por citometria de fluxo é então correlacionada com o número de células. Assim, a distribuição mostra dois picos, o G1, que corresponde ao conteúdo de DNA de 2N, e o G2/M que corresponde ao conteúdo de DNA de 4N; entre os dois, encontram-se as células na fase S (conteúdo de DNA entre 2N e 4N) (Almeida, 2005a)

### **3.2.3.1.2. Procedimento experimental**

A linhagem celular NCI-H460 foi inoculada em placas de 6 compartimentos (d.i.  $5 \times 10^4$  céls mL<sup>-1</sup>, 2 mL/compartimento) e, após 24 h de incubação, o meio completo foi substituído por 2 mL de meio RPMI 1640 sem SFB para a etapa de sincronização das células para o início do ciclo celular através do carenciamento de soro (Almeida, 2005a). As células foram incubadas por mais 24 h (sincronização) e em seguida foram tratadas com 0,0025 e 0,025 µg mL<sup>-1</sup> da fração rica em alcaloides (2 mL/compartimento, meio completo) e 0,25 % DMSO (diluente, em meio completo), em triplicata, por 24 e 48 horas.

Após cada período de tratamento, o meio de cultura de cada compartimento foi coletado em tubo de centrífuga com tampa (Sarstedt, Brasil) de 15 mL. Posteriormente, os compartimentos foram lavados com 1 mL de tampão fosfato (0,2 mM, pH 7,0) em solução de NaCl 0,9% (PBS) e em seguida o conteúdo foi coletado. As células aderidas foram removidas com auxílio de solução de tripsina (0,25% em EDTA, Nutricell®, Campinas 200 µL/compartimento) seguido da adição de 2 mL de meio completo. A suspensão celular foi recolhida, reunida às duas suspensões previamente coletadas e cada suspensão total foi centrifugada (centrífuga Eppendorf ® 5403, Alemanha) por 5 min, a 2500 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspensionado em 1 mL de PBS e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi aspirado de forma a deixar cerca de 100 µL de PBS, no qual o pellet final foi delicadamente ressuspensionado; cada suspensão resultante foi transferida para um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) previamente preenchido com 1 mL de etanol 70% gelado, o qual atuou como agente fixador e de permeabilização de membrana celular. As suspensões celulares foram então homogeneizadas e mantidas a 4°C por 24 horas (no mínimo 12 h antes do procedimento de marcação). Após o período de fixação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos (microcentrífuga de eppendorf, Eppendorf ® 5415C, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de PBS, para lavagem e retirada de todo o etanol. As amostras foram



centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado, mantendo-se cerca de 100 µl do sobrenadante para ressuspensão do precipitado celular. Em seguida, foram adicionados 200 µL/suspensão do reagente Guava® Cell cycle (Merck Millipore 4500-0220, EUA), as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz, e a seguir analisadas em citômetro de fluxo, com excitação realizada por laser de argônio, a 488 nm, e a detecção de fluorescência realizada a 650-670 nm (5000 eventos adquiridos por suspensão).

### **3.2.3.1.3. Análise dos resultados**

Utilizando o software *Guava Cell Cycle*®, foi realizada a quantificação (%) das subpopulações de células nas fases sub-G1, G1, S e G2/M do ciclo celular. Os dados obtidos foram de 2 experimentos independentes em que cada amostra foi testada em triplicata fornecendo como resultado final a média ± erro padrão.

### **3.2.3.2. Avaliação da externalização de resíduos de fosfatidilserina e permeabilização da membrana celular**

#### **3.2.3.2.1. Princípio do teste**

Durante alguns processos de morte celular programada, ocorre uma mudança na membrana plasmática das células que leva ao deslocamento do fosfolípídeo fosfatidilserina, originalmente localizados na camada interna da bicamada lipídica, para a camada externa da membrana plasmática. Essa exposição da fosfatidilserina funciona como um sinal para células vizinhas e macrófagos a fagocitarem (Alberts, 2010).

Essa sinalização pode ser evidenciada experimentalmente com o emprego de anexina V que é uma proteína que se liga especificamente a fosfatidilserina, na presença de íons de cálcio e magnésio (Telford et al., 2011). Como a anexina V por si só não apresenta fluorescência, esta pode ser acoplada a diferentes fluoróforos. No protocolo empregado neste projeto, utilizou-se a anexina V acoplada a estreptavidina-ficoeritrina (PE) para marcação das células com exposição de resíduos de fosfatidilserina e o corante 7-aminoactinomicida D (7AAD), que é específico para ligações C-G do DNA, como um indicador de integridade estrutural de membrana, por não ser permeável à membrana plasmática (Schmidt et al., 1992).

#### **3.2.3.2.2. Procedimento Experimental**

A linhagem celular NCI-H460 foi inoculada (1 mL/compartimento, d.i.  $5 \times 10^4$  céls mL<sup>-1</sup>) em placas de 12 compartimentos, em meio completo e incubadas por 24 h. Em seguida

o meio foi aspirado e as células foram tratadas com 0,025; 0,25 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da FA e 0,25 % DMSO (diluyente), em triplicatas, nos tempos de 12, 24 e 36 horas.

Após cada período de tratamento, o meio foi coletado em tubo de centrífuga com tampa, de 15 mL, cada compartimento foi lavado com PBS (1 mL/compartimento), o lavado foi coletado e as células aderidas foram removidas com auxílio de solução de tripsina (0,25% em EDTA, 200  $\mu\text{L}$ /compartimento) seguido da adição de 2 mL de meio completo. A suspensão celular foi recolhida, reunida às suspensões previamente coletadas e cada suspensão final foi centrifugada 5 min, a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado, reservando-se cerca de 100  $\mu\text{L}$  para a ressuspensão do pellet celular; cada suspensão celular final foi transferida para um tubo de microcentrifuga (1,5 mL) e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$ /tubo do reagente Guava Nexin Reagent (Merck Millipore 4500-0450, EUA), que contém anexina V-PE e 7- AAD. A incubação foi realizada por 20 min, em ambiente escuro, à temperatura ambiente, e a análise em citômetro de fluxo foi realizada com excitação a 488 nm, e a detecção de fluorescência realizada a 525-575 nm (PE) e 650-670 nm (7-AAD) (2000 eventos adquiridos por suspensão).

### 3.2.3.2.3. Análise dos resultados

A análise de resultados de 2 experimentos independentes, em que cada amostra foi testada em triplicata, foi realizado através do Software Guava Nexin<sup>®</sup>, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão das quatro subpopulações avaliadas:

- **Anexina-PE (-) 7-AAD (-)**  $\rightarrow$  células viáveis (sem exposição de resíduos de fosfatidilserina nem alterações na integridade da membrana);
- **Anexina-PE (+) 7-AAD (-)**  $\rightarrow$  células com exposição de resíduos de fosfatidilserina (marcados por anexina V-PE), no início do processo de morte celular programada com manutenção da integridade de membrana;
- **Anexina-PE (+) 7-AAD (+)**  $\rightarrow$  células duplamente marcadas (exposição de resíduos de fosfatidilserina e perda de integridade de membrana plasmática), em estágio tardio de morte celular programada ou de necrose;
- **Anexina-PE (-) 7-AAD (+)**  $\rightarrow$  células não viáveis, com perda de integridade de membrana plasmática (marcadas por 7-AAD) sem exposição de resíduos de fosfatidilserina, em necrose.

### 3.2.4. TESTE CLONOGÊNICO

#### 3.2.4.1. Princípio do teste

O teste de clonogenicidade tem por finalidade avaliar a indução de morte celular por falência reprodutiva ou morte clonogênica, que se caracteriza pela perda da capacidade de divisão celular (redução na formação de colônia), isto é, a célula fica estéril, porém morfolologicamente integra (Munshi et al., 2005).

#### 3.2.4.2. Procedimento experimental

O teste clonogênico foi realizado segundo o protocolo descrito por Freshney (2010) com algumas modificações.

No primeiro dia, a suspensão celular de NCI-H460 em meio completo (d.i.  $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>, 5 mL) foi inoculada em frascos T-25 cm<sup>3</sup>. Após 24h de incubação, os frascos foram tratados com 0,0025 e 0,025  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de FA e 0,25% de DMSO (diluente) e incubados por 24 horas. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Após o tratamento, o meio foi aspirado e os frascos foram lavados com PBS (1 mL/frasco) e as células aderidas foram removidas com auxílio de solução de tripsina (0,25% em EDTA, 500  $\mu$ L/frasco) seguido da adição de 5 mL de meio completo. Em seguida foi realizada a contagem das células no hemocitômetro com auxílio do corante azul de tripan (0,4%) (Invitrogen™, EUA), para exclusão das células permeabilizadas (inviáveis) (Gorjão, 2005).

Por fim, ajustou-se a densidade celular de cada suspensão de modo a obter-se um inóculo de 100 células/compartimento, em placas de 6 compartimentos, em triplicatas e as placas foram incubadas por 5 dias. Após esse período, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os compartimentos foram lavados com 1mL/compartimento uma única vez, com solução de tampão fosfato em salina de Dulbecco (D-PBS) (protocolo no apêndice). As colônias foram então fixadas com 3 mL/compartimento de Metanol:D-PBS (1:1, v/v) por 2 minutos, as soluções foram desprezadas e em seguida as colônias foram fixadas com 3 mL/compartimento de Metanol 100% por 10 minutos e depois a solução foi desprezada. Após secagem completa à temperatura ambiente, as colônias foram coradas com cristal violeta (Merck Millipore, Brasil) (0,1% em água destilada, 3 mL/compartimento) 10 minutos, seguida de três etapas de lavagem em água de torneira, 3 etapas de lavagem com água deionizada e secagem completa à temperatura ambiente.

#### 3.2.4.3. Análise dos resultados

Foram considerados como colônia os aglomerados celulares com mais de 50 células cada e com auxílio de microscópio invertido foi determinado o número de colônias por tratamento (0,0025 e 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de FA e 0,25% de DMSO). A redução no número de colônias foi expressa em porcentagem pelo seguinte cálculo (baseado no artigo Barcelos et al., 2014):

$$N^{\circ} \text{ de colônias} = \frac{\text{Número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Número de colônias formadas do controle negativo}} \times 100$$

### 3.3. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN SILICO*

#### 3.3.1. DOCAGEM MOLECULAR (*MOLECULAR DOCKING*)

##### 3.3.1.1. Princípio do teste

Esta metodologia é muito utilizada como uma triagem virtual para avaliar as possíveis atividades farmacológicas de novos compostos em centros de pesquisas relacionados com descoberta de novos fármacos, bem como em indústrias farmacêuticas. O método de docagem molecular investiga o modo de ligação (ligação de hidrogênio e ligações eletrostáticas) e a complementariedade de moléculas frente ao sítio de ligação de um alvo molecular específico, ou seja, avalia se a conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (proteína alvo), para a formação de um complexo receptor-ligante. As vantagens deste método são a versatilidade, economia de tempo, baixo custo e alto desempenho (Santos, 2015).

Desta forma, foi avaliado se os alcaloides: - (-) criptopleurina, boehmeriasina A, (-)-C(15*R*)-hidroxicriptoleurina e boehmeriasina B poderiam interagir com o mesmo sítio de ligação da colchicina na tubulina.

##### 3.3.1.2. Procedimento experimental

As estruturas tridimensionais dos compostos foram construídas utilizando-se a versão on-line do programa Corina ([https://www.mn-am.com/online\\_demos/corina\\_demo](https://www.mn-am.com/online_demos/corina_demo)) que atribui às estruturas 3-D comprimentos e ângulos pré-definidos dependendo do tipo de ligação, tipo de átomo e estado de hibridização. Corina também define os ângulos de torção mais prováveis de acordo com a natureza da estrutura (acíclica, anéis pequenos/médios, macro/políciclos, etc.), sendo capaz de reproduzir corretamente um número variado de estruturas de raios-X (Gasteiger et al., 1990). As geometrias moleculares foram então

refinadas usando-se o campo de força semi-empírico AM1 com o algoritmo Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS), tal como implementado no programa ArgusLab (Thompson, 2004). A estrutura foi considerada otimizada quando o gradiente de energia conformacional estava abaixo de  $0,001 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

As simulações de docagem molecular foram realizadas utilizando-se a estrutura da colchicina complexada à tubulina (PDB ID: 4O2B). A estrutura foi verificada acerca de átomos e resíduos de aminoácidos faltantes utilizando servidor PDB\_HYDRO ([http://lorentz.immstr.pasteur.fr/APO/frozen\\_submission.php](http://lorentz.immstr.pasteur.fr/APO/frozen_submission.php)) e nada foi identificado. Os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos da tubulina foram calculados no pH fisiológico usando o módulo PROPKA do PDB2PQR ([http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0/](http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/)) e definidos no programa GOLD 5.3 para as simulações de docagem empregando a função de escore GoldScore com parâmetros-padrão sugeridos no programa. As simulações foram realizadas dentro de uma esfera  $10 \text{ \AA}$ , para a qual o centro geométrico (coordenadas x, y e z) foi determinado calculando-se o centróide da colchicina no programa Discovery Studio Visualizer 4.0 (Accelrys, 2013), mesmo programa empregado para inspeção visual e análise das interações proteína-ligante.

O método de docagem molecular foi realizado em colaboração com professor Dr. Daniel Fábio Kawano da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP.

### **3.3.1.3. Análise do resultado**

As poses resultantes da simulação de docagem foram analisadas no programa Discovery Studio Visualizer 4.0, empregando-se as funções padrões para o cálculo das interações intermoleculares. Além disso, a estabilidade global dos complexos ligante-proteína foi estimada através da função de escore Goldscore do programa GOLD 5.3 ([http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life\\_sciences/gold/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/)).

## **3.4. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO***

### **3.4.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos das linhagens Balb/c e *Swiss* fêmeas, com dois meses de idade, obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP). Os grupos experimentais foram acondicionados no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro:escuro 12h:12h e com água

e ração *ad libitum*. Os cuidados dos animais e os protocolos de pesquisas estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e sob a orientação da médica veterinária Karin Maia Monteiro (CRMV–SP 19683). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob as numerações: 3440-1, 3036-1, 3441-1, 3391-1, 3390-1.

### 3.4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS E TRATAMENTOS

O extrato bruto etanólico (EB2) e a fração rica em alcaloide foram diluídos no veículo PBS (0,2 mM, pH7) com auxílio de Tween 80 (5%). O quimioterápico: doxorubicina (Europharma®) e os anti-inflamatórios: dexamentasona (Sigma-Aldrich®, EUA) e piroxicam (Neo Química, Brasil) foram diluídos no veículo PBS (0,2 mM, pH7). O controle negativo foi sempre o veículo PBS (0,2 mM, pH7) com Tween 80 (5%).

Para os testes com administração única dos extratos brutos e/ou da fração rica em alcaloides de *B. caudata* realizados por via oral (v.o.), os animais foram submetidos a um período mínimo de jejum de quatro horas, com acesso livre a água, possibilitando total esvaziamento gástrico e não interferência da alimentação na absorção dos princípios ativos. Além disso, para total absorção e distribuição sistêmica das amostras, os modelos experimentais se iniciaram uma hora após a administração. Para testes com doses repetidas pela via oral, os animais não foram mantidos em jejum, mas a administração foi realizada no final da tarde, período o qual os animais apresentavam o estômago mais vazio.

Para tratamento pela via tópica (TO), os modelos experimentais também se iniciaram uma hora após a administração.

### 3.4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO*

O teste de toxicidade aguda foi baseado na OECD/OCDE - 425/2008 - OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP), com modificações.

De maneira geral, camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, com a faixa de peso entre 25-35 g, foram separados em dois grupos de cinco animais cada; um indivíduo de cada grupo foi tratado com veículo (controle negativo) ou com a amostra (grupo teste), seja pela via intraperitoneal (i.p.) como pela oral, uma única vez. Para extratos brutos, a dose inicial sugerida é 2000 mg Kg<sup>-1</sup> (OECD/OCDE – 425/2008), mas o teste se iniciou com a dose de

1000 mg Kg<sup>-1</sup>. Após a administração, os dois animais foram observados continuamente por um período de quatro horas e após 24 h da administração da amostra, para avaliação de alterações comportamentais e sinais de toxicidade tais como, alterações em locomoção (tremor), comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, além de cianose de extremidades e mortalidade (Litchfield e Wilcoxon, 1949; Lapa et al., 2008).

Se não ocorressem alterações comportamentais e nem sinais de toxicidade da amostra dentro desse intervalo de tempo, o restante do grupo receberia a mesma dose e seria observado por quatro horas. Após este período, os animais foram observados clinicamente por 14 dias com seu peso corporal mensurado no 7º dia e no 14º dia.

Porém, se o indivíduo apresentasse sinais de toxicidade ou fosse a óbito durante o período inicial de 24 horas, outro animal era escolhido e recebia a mesma dose do primeiro, para confirmar a reação tóxica da amostra. Caso o segundo animal fosse a óbito, o experimento era encerrado e a dose reduzida pela metade.

#### **3.4.3.1. Extrato bruto etanólico (EB2)**

Para este teste, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (total de animais utilizados = 12). O extrato EB2 foi avaliado por via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 500 e 1000 mg Kg<sup>-1</sup> e por via oral, na dose de 1000 mg Kg<sup>-1</sup>. Em ambos os experimentos, o grupo controle negativo foi tratado com o veículo (10 mL Kg<sup>-1</sup>). Após os tratamentos, os animais foram observados continuamente por período de 4 horas, contados após a aplicação e então diariamente, por período de 14 dias.

#### **3.4.3.2. Fração rica em alcaloides**

Para este teste, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (total de animais utilizados = 11). A fração rica em alcaloides foi testada por via i.p. nas doses de 150 e 300 mg Kg<sup>-1</sup> e por v.o. na dose de 300 mg Kg<sup>-1</sup>; em ambos experimentos o controle negativo foi o veículo (10 mL Kg<sup>-1</sup>). Os animais foram observados continuamente por período de 4 horas, contados após a aplicação e então diariamente, por período de 14 dias.

### 3.4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO (EB2) E DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES (FA) EM MODELO DE TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

O Tumor de Ehrlich é um tumor sólido, derivado de adenocarcinoma de mama murino, com características agressivas e de rápido crescimento, podendo se desenvolver nas formas ascítica e sólida, dependendo do local de inoculação (Gomes et al., 2008; Sakai et al., 2010). Assim, o objetivo deste teste foi avaliar se as amostras em estudo seriam capazes de reduzir o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.

#### 3.4.4.1. Manutenção das células e preparo das células

As células de tumor de Ehrlich foram mantidas na sua forma ascítica, no peritônio de camundongos *Swiss*, por passagens semanais de  $5 \times 10^5$  células/animal. Para tanto, as células foram descongeladas, ressuspensas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular novamente ressuspenso em PBS, em volume suficiente para preparar uma suspensão celular na densidade de inoculação de  $5 \times 10^5$  células/animal. Dois animais foram inoculados (doadores) e eutanasiados após sete dias do inóculo; o líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, para preparo da suspensão de manutenção da linhagem ou para preparo da suspensão de trabalho (Oloris et al., 2002; Gomes et al., 2008).

#### 3.4.4.2. Avaliação da atividade de EB2 sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich

##### 3.4.4.2.1. Modelo de tumor sólido de Ehrlich no flanco:

Para o experimento, camundongos fêmeas da linhagem Balb/c ( $n = 6$ /grupo, peso entre 17-25 g) receberam um inóculo de células tumorais de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  células/60µL/animal em PBS) por via subcutânea no dorso posterior (flanco) do animal (modificado de Marchetti et al., 2012). No 3º dia após o inóculo das células, quando o tumor se tornou palpável, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, que foram tratados com veículo (controle negativo, 10 mL  $\text{Kg}^{-1}$ , v.o.), doxorrubicina (3 mg/kg, via i.p., controle positivo) e com EB2 nas doses de 150 (via i.p.) e 400 (v.o.) mg  $\text{Kg}^{-1}$ . As doses foram estabelecidas com base no trabalho de Mi et al. (2009), os quais sugerem a utilização de 40%



da dose máxima tolerada do teste de toxicidade aguda como dose máxima a ser administrada em doses repetidas.

Assim, os grupos foram tratados todos os dias (com exceção do grupo com doxorrubicina que foram tratados a cada dois dias), por 9 dias. Vinte e quatro horas após o último tratamento (13º dia de experimento), os camundongos foram pesados e procedeu-se a coleta de sangue, após anestesia com uma mistura de quetamina (100 mg Kg<sup>-1</sup>) e xilazina (5 mg Kg<sup>-1</sup>), através do plexo retro orbital com capilares de vidro. O sangue foi colocado em microtubos com EDTA (Quibasa-Bioclin, Brasil – EDTA sódico 300 mmol L<sup>-1</sup>). Após eutanásia por deslocamento cervical, procedeu-se a retirada do tumor, avaliação macroscópica e pesagem de alguns órgãos (fígado, rins e baço). A taxa de inibição do tumor (%) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de inibição do tumor: } \frac{TC - TE}{TC} \times 100$$

Sendo que **TC**, o peso médio do tumor no grupo controle negativo e **TE**, o peso médio do tumor no grupo experimental (Bezerra et al., 2006). Este cálculo também foi utilizado para o peso relativo do tumor, o qual foi obtido pela divisão do peso tumoral pelo peso do animal.

#### 3.4.4.2.2. Avaliação da evolução do peso corporal, dos parâmetros sanguíneos e biometria dos órgãos

Com a finalidade de obter mais dados a respeito da toxicidade de EB2, foram avaliados a evolução do peso corporal, os parâmetros sanguíneos e a biometria dos órgãos dos animais tratados e inoculados com as células tumorais em comparação com um grupo satélite (n = 6 animais, peso entre 17-25 g), o qual não foi inoculado as células tumorais nem recebeu qualquer tratamento.

A evolução do peso corporal foi realizada através da pesagem de todos os animais no início do experimento (dia do inóculo) e em dias alternados até o final do experimento, em balança semianalítica. Os parâmetros sanguíneos foram obtidos em aparelho veterinário para análise de hemograma (Sysmex®, modelo pocH-100iV, EUA), avaliando-se contagem de leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg) e plaquetas (Pt).

Após a eutanásia dos animais, fígado, rins e baço foram colhidos, avaliados macroscopicamente e pesados em balança analítica sendo calculado o peso relativo do órgão em função do peso do animal.

### 3.4.4.3 Avaliação da atividade de FA sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich

#### 3.4.4.3.1. Modelo de tumor sólido de Ehrlich na pata

Camundongos fêmea da linhagem Balb/c ( $n = 8/\text{grupo}$ , peso entre 17-25 g) tiveram o volume basal da pata traseira direita avaliado em aparelho de hidroplestímetro (Ugo Basile®, Itália) e em seguida receberam um inóculo de células tumorais de Ehrlich em PBS ( $2,5 \times 10^6$  células/30 $\mu$ L/animal no coxim plantar dessa mesma pata (Vendramini-Costa et al., 2012, com modificações). O volume tumoral (expresso em mL) foi avaliado a cada três dias e a variação de volume foi determinada pela diferença entre o volume medido no dia e o volume basal e em seguida foi calculado a variação do volume tumoral pela seguinte fórmula:

$$\text{Variação do volume tumoral: } \frac{VT - VB}{VT} \times 100$$

Sendo que **VT**: volume medido da pata inoculada com tumor e **VB**: volume basal da pata (de Oliveira et al., 2015).

No terceiro dia após o inóculo das células, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais e tratados a cada três dias com veículo (controle negativo, v.o., 10 mL Kg<sup>-1</sup>), doxorubicina (controle positivo, i.p., 3 mg Kg<sup>-1</sup>), piroxicam (controle positivo, v.o., 40 mg Kg<sup>-1</sup>) e FA (v.o., 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>).

No 16º dia de experimento, após a última avaliação do volume das patas, os camundongos foram pesados e procedeu-se a coleta de sangue, após anestesia com uma mistura de quetamina (100 mg Kg<sup>-1</sup>) e xilazina (5 mg Kg<sup>-1</sup>), através do plexo retro orbital com capilares de vidro. O sangue foi colocado em microtubos com EDTA. Após eutanásia por deslocamento cervical dos animais anestesiados, procedeu-se a retirada de ambas as patas traseiras e avaliação macroscópica e pesagem de alguns órgãos (fígado, rins e baço). As patas traseiras direita, após pesagem, foram armazenadas em nitrogênio líquido para a dosagem de mieloperoxidase.

Para a análise da taxa de inibição do tumor, este foi calculado somente para a última medição do volume tumoral da pata (15º dia), pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição do tumor de pata: } \frac{MVTC - MVTT}{MVTC} \times 100$$

Sendo que, **MVTC**: média da variação do volume tumoral da pata do grupo controle e **MVTT**: média da variação do volume tumoral da pata dos grupos tratados.

#### 3.4.4.3.2. Avaliação da evolução do peso corporal, dos parâmetros sanguíneos, análise bioquímica e biometria dos órgãos

Com a finalidade de obter mais dados a respeito da toxicidade de FA, foram avaliados os parâmetros de evolução do peso corporal, os parâmetros sanguíneos, análise bioquímica e a biometria dos órgãos dos animais tratados e inoculados com as células tumorais em comparação com dois grupos ( $n = 8$  animais/grupo, peso entre 17-25 g), a saber: grupo satélite (sem inoculação de células tumorais e sem tratamento) e um grupo tratado com a maior dose de FA ( $30 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) no qual não foram inoculadas as células tumorais.

A evolução do peso corporal foi realizada através da pesagem de todos os animais a cada três dias até o final do experimento, em balança semianalítica. Já os parâmetros sanguíneos foram avaliados em aparelho veterinário conforme descrito no item 3.3.4.2.2. Para análise de bioquímica o sangue foi coletado em tubos de microcentrífuga de 2 ml sem qualquer composto anticoagulante. Os tubos de microcentrífuga foram centrifugados em centrífuga por 2500 RPM e 5 minutos. O soro foi colhido para a análise de creatinina e gamaglutamiltransferase (GGT) em tiras reativas (Reflotron®- Roche, Macromed, São José do Rio Preto, Brasil) em aparelho (Reflotron® Plus- Roche, Macromed, São José do Rio Preto, Brasil). Finalmente, fígado, rins e baço foram colhidos, avaliados macroscopicamente e pesados em balança analítica sendo calculado o peso relativo do órgão em função do peso do animal.

#### 3.4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO (EB2) E DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES (FA) EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO

##### 3.4.5.1. Edema de pata induzida por carragenina

O objetivo deste teste é avaliar a capacidade da amostra reduzir o edema de pata induzido por polissacarídeos sulfatados (carragenina) extraídos de algas vermelhas da família Rhodophyceae (Campo et al., 2009; Jiao et al., 2011).

Os experimentos foram conduzidos de acordo com Posadas e colaboradores (2004) e Nunes e colaboradores (2007), com algumas modificações. O volume basal da pata traseira direita de camundongos Balb/c ( $n = 6$  a 8/grupo, entre 18 e 22 g) foi avaliado em aparelho de hidropletismômetro e, então, os grupos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos por experimento (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição dos grupos experimentais nos testes de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

| Experimento 1 <sup>a</sup> |                                     | Experimento 2 <sup>b</sup> |                                     |
|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Grupos                     | Dose (mg Kg <sup>-1</sup> )         | Grupos                     | Dose (mg Kg <sup>-1</sup> )         |
|                            | v.o                                 |                            | v.o.                                |
| Veículo <sup>c</sup>       | 10 mL Kg <sup>-1</sup> <sup>e</sup> | Veículo <sup>c</sup>       | 10 mL Kg <sup>-1</sup> <sup>e</sup> |
| Dexametasona <sup>d</sup>  | 25                                  | Dexametasona <sup>d</sup>  | 25                                  |
|                            | 75                                  |                            | 3                                   |
| EB2                        | 150                                 | FA                         | 10                                  |
|                            | 300                                 |                            | 30                                  |

a) n = 6 animais/grupo, entre 18 e 22 g; b) n = 8 animais/grupo, entre 18 e 22 g; c) Controle negativo; d) Controle positivo; e) volume máximo de administração pela via oral em animais em jejum. EB2: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano, FA: Fração rica em alcaloide.

Após 60 minutos do tratamento, a inflamação foi induzida através da injeção de 30 µL de carragenina 3% (Sigma-Aldrich®, EUA) no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos e o volume da pata foi avaliado após 1, 2, 4, 6 e 24 horas da injeção de carragenina.

A mensuração do edema de pata foi determinada para cada camundongo através da diferença entre os valores de volume final e basal. Em seguida a variação do edema (%) para cada animal em cada um dos tempos de medição foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Variação do edema de pata: } \frac{EP - BP}{BP} \times 100$$

Sendo que **EP**: corresponde ao edema medido em volume (mL) da pata após indução da inflamação pela carragenina e **BP** corresponde ao valor em volume (mL) basal da pata.

Finalmente, a inibição do edema (%) em cada um dos tempos de medição foi calculada pela diferença da média da variação do edema dos grupos tratados (MVT) em relação à média da variação do edema do grupo controle negativo (MVC) multiplicado por 100 (Equação baseada no artigo Lin et al., 1997):

$$\text{Inibição do edema de pata: } \frac{MVC - MVT}{MVC} \times 100$$

### 3.4.5.2. Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O objetivo deste teste foi avaliar a capacidade da amostra reduzir o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Este óleo é obtido das sementes de *Croton tiglium* L. e contém uma mistura de ésteres de forbol, sendo o 12-O-tetracanoilphorbol-13-acetato (TPA) o composto majoritário (Carlson et al., 1985; Otuki et al., 2005).

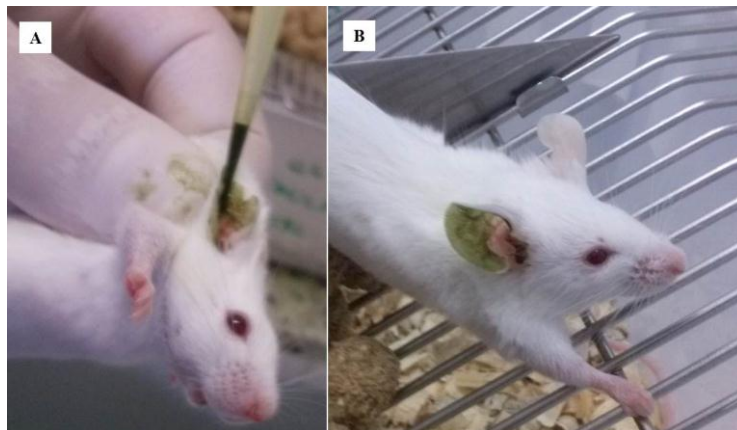
Experimentalmente, camundongos fêmeas da linhagem Balb/c ( $n = 6$ /grupos, entre 20 e 22 g) foram pesadas e distribuídas aleatoriamente nos grupos experimentais e cada grupo recebeu o tratamento especificado na Tabela 4 uma hora antes da aplicação do agente irritante. Foram realizados dois experimentos, um com EB2 e outro com FA. A Figura 9 exemplifica o tratamento por via tópica.

**Tabela 4.** Distribuição dos grupos experimentais nos testes de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

| Via               | Grupos <sup>a</sup>    |                           |                        |                              |
|-------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------------|
|                   | Veículo <sup>b</sup>   | Dexametasona <sup>c</sup> | EB2 <sup>d</sup>       | FA <sup>e</sup>              |
| Tópica            | 20 $\mu$ L             | 5 mg mL <sup>-1</sup>     | 75 mg mL <sup>-1</sup> | 3,10, 30 mg mL <sup>-1</sup> |
| Oral              | 10 mL Kg <sup>-1</sup> | 25 mg Kg <sup>-1</sup>    | 75 mg Kg <sup>-1</sup> | 3,10, 30 mg Kg <sup>-1</sup> |
| i.p. <sup>f</sup> | 10 mL Kg <sup>-1</sup> | 5 mg Kg <sup>-1</sup>     | 75 mg Kg <sup>-1</sup> | N.T.                         |

**a)**  $n = 6$  camundongos fêmeas da linhagem Balb/c /grupo, entre 18 e 22g; **b)** Controle negativo (acetona 70% na administração por via tópica e PBS + Tween 80 (5%) nas demais); **c)** Controle positivo; **d)** extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano; **e)** fração rica em alcaloides. i.p. = administração intraperitoneal, **N.T.** = não testada.

**Figura 9.** Administração tópica do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2) para avaliação do efeito antiedematogênico em modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton.



(A) Administração tópica de EB2 na concentração de 75 mg mL<sup>-1</sup> diluído em acetona 70% (20 uL/orelha). (B) Imagem do camundongo após a administração tópica de EB2 na orelha direita

Após uma hora do tratamento (pelas vias tópica, oral ou intraperitoneal), cada animal recebeu por via topica a suspensão de óleo de cróton (Sigma-Aldrich®, 5% v/v em acetona 70%, 20 uL/orelha) na orelha direita, enquanto a orelha esquerda foi tratada apenas acetona 70% (20 uL/orelha). Após 4 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e fragmentos de 7 mm de diâmetro foram retirados de cada orelha. O edema induzido pelo óleo de cróton foi expresso como a diferença de peso entre porções iguais obtidas das orelhas tratadas e não tratadas para cada animal, sendo então calculada a média para o grupo. A taxa de inibição do edema foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de inibição do edema de orelha: } \frac{MC - ME}{MC} \times 100$$

Sendo que **MC**: média da diferença da massa entre as orelhas do controle negativo, **ME**: média da diferença da massa entre as orelhas do grupo experimental (Equação baseada em Schinella et al., 2014).

Imediatamente após a pesagem, os fragmentos de orelhas dos experimentos avaliando a fração rica em alcaloides foram armazenados em ultrafreezer -80°C (Forma™ Scientific- mod. 925, EUA) para a dosagem de mieloperoxidase.

#### 3.4.6. DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE

A mieloperoxidase (MPO) serve como indicador do processo de quimiotaxia e a presença de leucócitos polimorfonucleares em exsudato inflamatório (Zanusso-Junior et al.,

2011). Assim, a inibição da atividade da MPO após a administração de um composto pode ser decorrente da redução da migração e/ou indução de neutrófilos no tecido inflamado (Rauh, 2008).

Foi realizada a dosagem de mieloperoxidase, empregando-se a metodologia de Bradley et al. (1982), nos fragmentos de orelhas (edema de orelha por óleo de cróton) e nas patas (tumor sólido de Ehrlich) obtidos dos grupos experimentais tratados com FA em comparação com os grupos controles.

Assim, para a quantificação da MPO, fragmentos congelados do tecido (orelha ou pata) foram colocados em uma solução tampão na proporção de 1 mL de tampão para cada 100 mg de tecido, em banho de gelo. O tampão utilizado foi o tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 com hexadeciltrimetilamonio 0,5% (HTAB) (250 mg de HTAB para 50 mL de tampão). As amostras foram homogeneizadas em triturador IKA (Disperser T 10 basic, Staufen, Germany) e em seguidas centrifugadas por 10 minutos 12.000 rpm a 4°C (Microcentrifuga Eppendorf®, Centrifuge 5415R). Em placa de 96 compartimentos, foram pipetados 30 µL/compartimento do sobrenadante de cada amostra, em triplicata e, em seguida, 270 µL/compartimento de tampão substrato (0,167 mg mL<sup>-1</sup> de orto-dianisina e 0,002% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato) foram adicionados à preparação. Para o branco, utilizou-se 270 µL/compartimento do tampão substrato mais 30 µL do tampão com HTAB. Incubou-se a placa a 37°C por 5 minutos e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas.

Para avaliar a taxa de redução da migração e/ou ativação dos neutrófilos para o local inflamado, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Taxa de redução da migração dos neutrófilos} : \frac{DC - DE}{DC} \times 100$$

Sendo que **DC**: média da densidade óptica (D.O.) obtida das orelhas do controle negativo, **DE**: média da densidade óptica obtida das orelhas dos grupos experimentais.

### 3.5. ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média, avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguida do teste de comparação de média, o teste de Tukey (para uma via) ou Bonferroni (para duas vias). Valores de p menores do que 0,05 (p<0,05) foram considerados como indicativos de significância e representados por: (1) p<0,05, \*; (2) p<0,01, \*\*; (3) p<0,001, \*\*\*. Os cálculos foram

realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 5.00, San Diego Califórnia, EUA.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. FITOQUÍMICA

#### 4.1.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS

##### 4.1.1.1. Rendimento

Os rendimentos obtidos pelos diversos processos de extração de *Boehmeria caudata* estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Cálculo do rendimento (%) dos extratos brutos para cada método e solvente.

|           | Soxhlet    |     |            |     |            |      | Maceração dinâmica |     |            |      |            |      |
|-----------|------------|-----|------------|-----|------------|------|--------------------|-----|------------|------|------------|------|
|           | DCM        |     | E          |     | A          |      | DCM                |     | E          |      | A          |      |
|           | Massa (mg) | (%) | Massa (mg) | (%) | Massa (mg) | (%)  | Massa (mg)         | (%) | Massa (mg) | (%)  | Massa (mg) | (%)  |
| <b>F1</b> | 290        | 5,8 | 400        | 8,0 | 400        | 8,0  | 472                | 9,5 | 593        | 11,8 | 580        | 11,6 |
| <b>F</b>  | 161        | 3,2 | 268        | 5,4 | 536        | 10,7 | 211                | 4,2 | 305        | 6,1  | 293        | 10,0 |
| <b>M</b>  | 249        | 5,0 | 231        | 4,6 | 335        | 6,7  | 390                | 7,8 | 366        | 7,3  | 546        | 11,0 |

**DCM:** diclorometano; **E:** etanol; **A:** água destilada; **F1:** folhas, **F:** flores mais galho, **M:** mistura

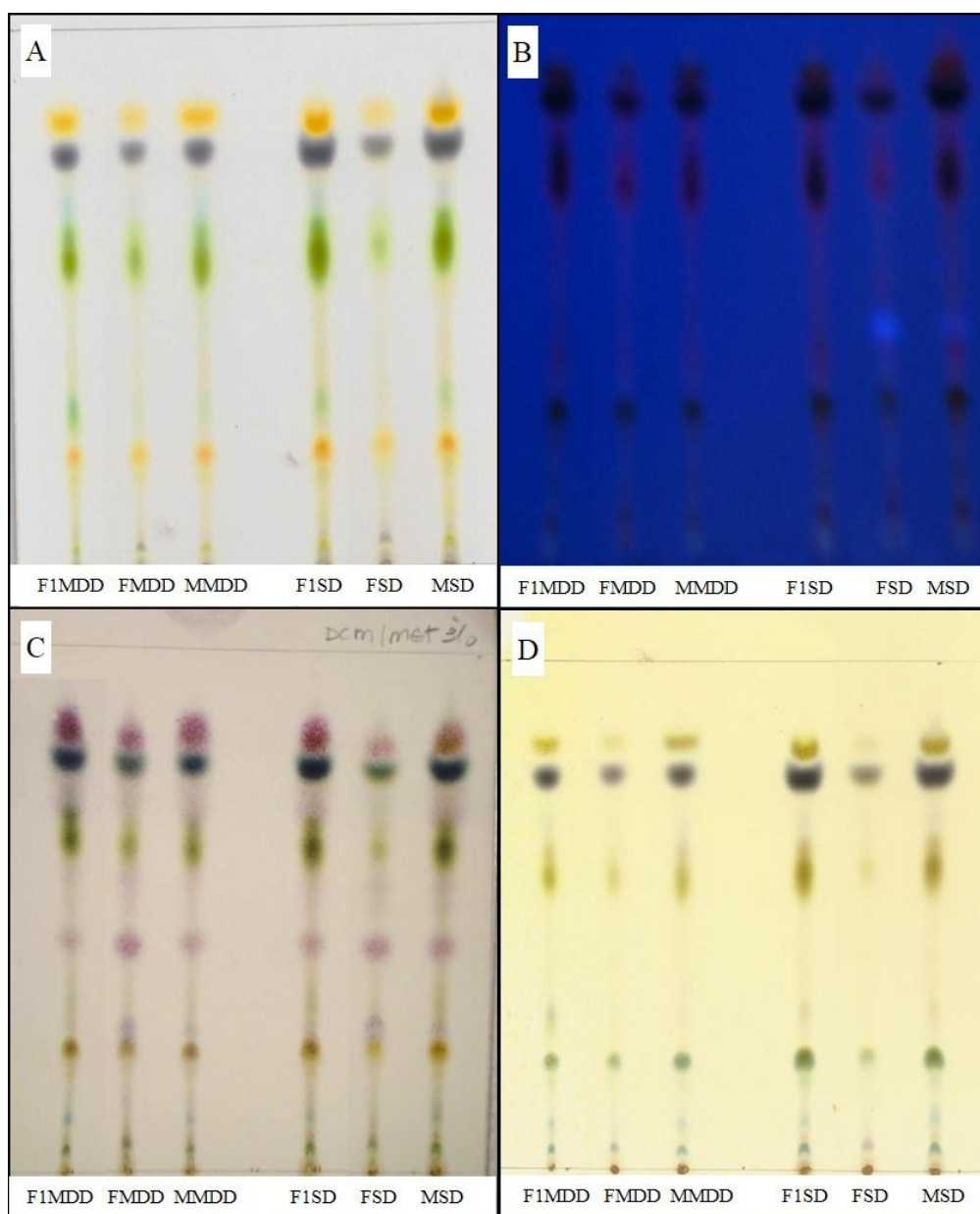
Assim, analisado a Tabela 5, observa-se que o método de extração por maceração dinâmica apresentou o melhor rendimento para todos os solventes utilizado. Este estudo foi realizado somente uma vez.

##### 4.1.1.2. Análise por cromatografia em camada delgada

###### 4.1.1.2.1. Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos diclorometano

Para os extratos de diclorometano a fase móvel utilizada foi diclorometano/metanol (97:3) (Fig. 10A). As cromatofolhas foram reveladas sob a luz de UV no comprimento de 254 nm e de 366 nm (Fig. 10B). Em seguida foram utilizados os reveladores: Anisaldeído (Fig. 10C) seguida de aquecimento em estufa a 105°C durante 1 minuto e Dragendorff (Fig. 10D).

**Figura 10.** Cromatofolha (CCD) dos extratos brutos diclorometanos de *Boehmeria caudata* avaliados com a fase móvel diclorometano/metanol (97:3).



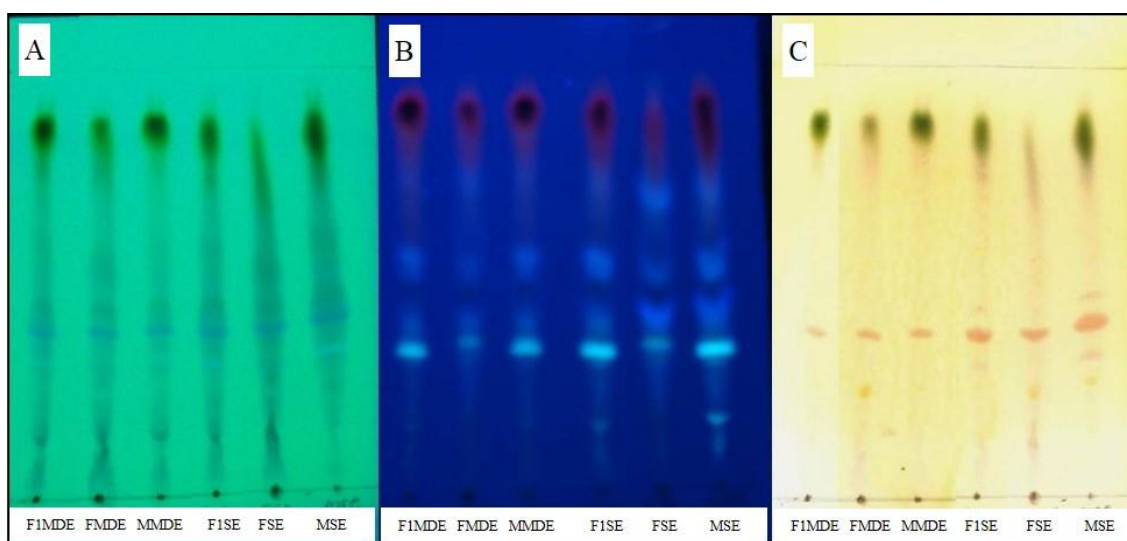
**F1MD:** folhas maceração dinâmica diclorometano, **FMDD:** flores mais galhos maceração dinâmica diclorometano, **MMDD:** mistura maceração dinâmica diclorometano, **F1SD:** folhas *soxhlet* diclorometano, **FSD:** flores mais galhos *soxhlet* diclorometano, **MSD:** mistura *soxhlet* diclorometano. (A) Sem revelar; (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm; (C) Revelada com Anisaldeído; (D) Revelada com Dragendorff.

Não foi confirmada a presença de alcaloides nos extratos brutos diclorometano empregando a mistura de solventes utilizada como fase móvel.

#### 4.1.1.2.2. Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos etanólicos

Para os extratos etanólicos a fase móvel utilizada foi BAW. A cromatofolha foi revelada sob a luz de UV no comprimento de 254 nm (Fig. 11A) e de 366 nm (Fig. 11B) a seguir foi revelada por Dragendorff (Fig. 11C).

**Figura 11.** Cromatofolha de CCD dos extratos brutos etanólicos de *Boehmeria caudata* avaliados com a fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



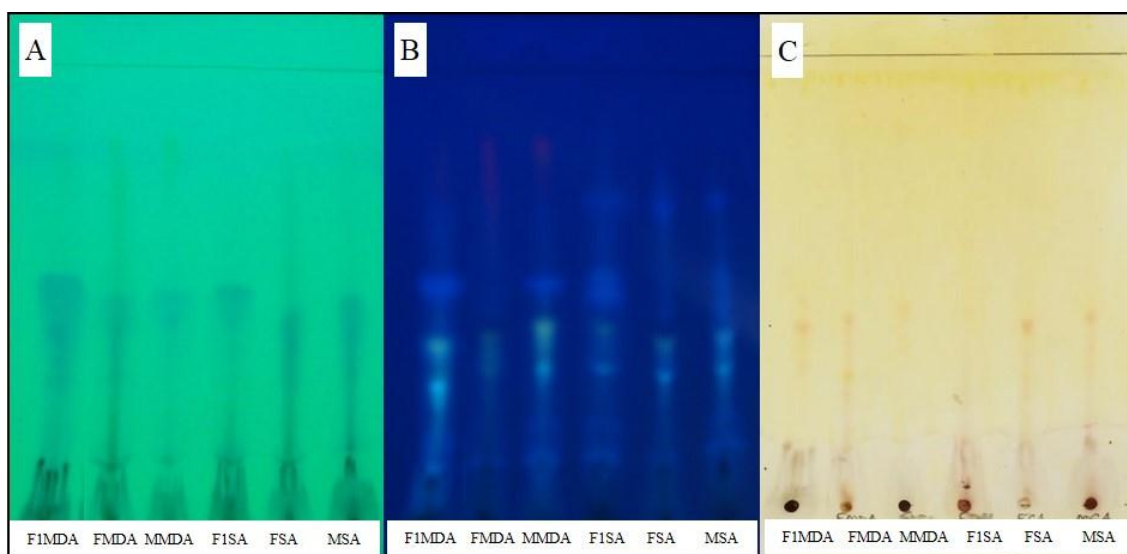
**F1MDE:** folhas maceração dinâmica etanólico, **FMDE:** flores mais galhos maceração dinâmica etanólico, **MMDE:** mistura maceração dinâmica etanólico, **F1SE:** folhas *soxhlet* etanólico, **FSE:** flores mais galhos *soxhlet* etanólico, **MSE:** mistura *soxhlet* etanólico. (A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm; (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm; (C) Revelada com Dragendorff.

Nas Figuras 11A e 8B observou-se a presença de manchas fluorescentes sob a luz de UV, em tons de azul o que sugere a presença de compostos químicos com duplas ligações conjugadas. Na figura 8A observam-se as manchas nos  $R_f$ : 0,32 e 0,37. Na figura 11B observaram-se manchas nos  $R_f$ : 0,19; 0,32; 0,37; 0,5; 0,68. Os  $R_f$ : 0,19 só foram observados nos extratos F1SE e MSE. Na figura 11C notou-se que essas duplas ligações conjugadas se equivalem com as manchas acastanhadas reveladas por Dragendorff, que sugere presença de alcaloides. No entanto há também outros compostos com duplas ligações conjugadas que não correspondem às manchas reveladas por Dragendorff. Os  $R_f$  revelados pelo Dragendorff são: 0,25; 0,32; 0,37 e 0,5 sendo que o  $R_f$  0,25 só foi observado nos extratos FSE e MSE.

#### 4.1.1.2.3. Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos aquosos

Para os extratos brutos aquosos a fase móvel utilizada foi BAW. A cromatofolha foi revelada sob a luz de UV no comprimento de onda de 254 nm (Fig. 12A) e 366 nm (Fig. 12B) a seguir foi revelada por Dragendorff (Fig. 12C).

**Figura 12.** Cromatofolha de CCD dos extratos brutos aquosos de *Boehmeria caudata* avaliados com a fase movél BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5)



**F1MDA:** folhas maceração dinâmica água, **FMDA:** flores mais galhos maceração dinâmica água, **MMDA:** mistura maceração dinâmica água, **F1SA:** folhas *soxhlet* água, **FSA:** flores mais galhos *soxhlet* água, **MSA:** mistura *soxhlet* água. (A) Placa revelada em câmara de UV no comprimento de onda de 254 nm; (B) Placa revelada em câmara de UV no comprimento de onda de 366 nm; (C) Revelada com Dragendorff.

Nas Figuras 12A e 12B observou-se que a CCD apresentou compostos químicos com duplas ligações conjugadas. Na figura 9A observou-se mancha no  $R_f$  0,56, e na figura 9B observou manchas nos  $R_f$  0,31; 0,43 e 0,56; nos extratos brutos das flores mais galhos não se observou o  $R_f$  0,56. A figura 12C que foi revelada com Dragendorff apresentou pequenas manchas acastanhadas no  $R_f$  0,31, presente somente nos extratos brutos das flores mais galhos, e no  $R_f$  0,43 presente em todos os extratos aquosos.

#### 4.1.2. ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO TOTAL *VERSUS* EXTRATO BRUTO ETANÓLICO OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO COM O DICLOROMETANO

##### 4.1.2.1. Rendimento

Foi calculado o rendimento do extrato bruto etanólico total (EB1) e do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2) (Tabela 6). Como essas extrações foram realizadas em triplicata, foram realizadas as médias das massas obtidas, em gramas, somente das extrações que partiram de 100 g de planta seca moída.

**Tabela 6.** Cálculo do rendimento expresso em média (gramas) e em porcentagem (%) do EB1 e EB2\*.

| Extrato    | Média da massa (g) | Rendimento (%) |
|------------|--------------------|----------------|
| <b>EB1</b> | 15,70 ± 1,93       | 15,70 ± 1,93   |
| <b>EB2</b> | 9,01 ± 1,71        | 9,01 ± 1,71    |

**EB1:** extrato bruto etanólico total; **EB2:** extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano.

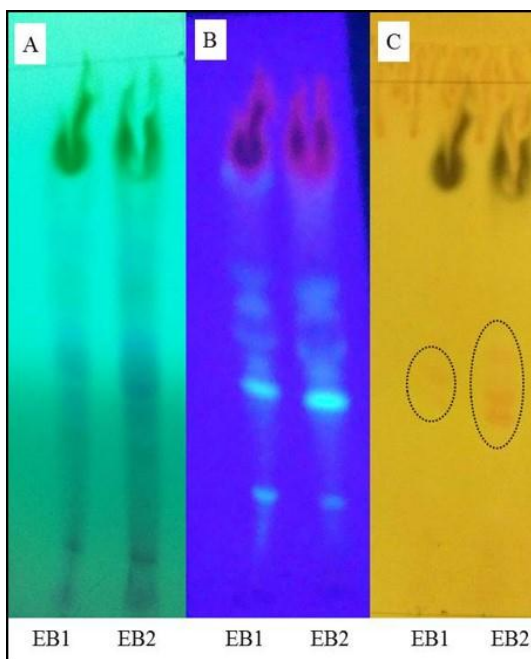
\*Esses cálculos foram baseados somente em extrações que partiram de 100g de planta seca moída.

##### 4.1.2.2. Análise por cromatografia em camada delgada

###### 4.1.2.2.1. Cromatografia em camada delgada do extrato bruto etanólico total e do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano

Para os extratos: EB1 e EB2 a fase móvel utilizada foi BAW. As cromatofolhas foram reveladas sob a luz de UV no comprimento de 254 nm (Fig. 13A) e de 366 nm (Fig. 13B) a seguir foi revelada por Dragendorff (Fig. 13C).

**Figura 13.** Cromatofolha de CCD dos extratos brutos etanólicos EB1 e EB2 avaliados com a fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



**EB1:** extrato bruto etanólico total; **EB2:** extrato bruto etanólico obtido após a extração com diclorometano. (⋈) Destaque para as manchas acastanhadas. Fase móvel: BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5). (A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Não foram observadas diferenças significativas entre o EB1 e o EB2.

### 4.1.3. ANÁLISE DAS FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

#### 4.1.3.1. Rendimento

Foram calculados os rendimentos das frações obtidas do EB2 e EB1, através da extração ácido-base. Essas extrações foram realizadas em triplicata tanto para EB1 quanto para EB2. Assim, foram calculados as médias e os rendimentos das massas obtidas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Cálculo do rendimento expresso em média (gramas) e em porcentagem (%) das frações obtidas através da extração ácido-base.

| Frações     | EB1         |                 | EB2         |                 |
|-------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
|             | Massa (g)   | Rendimentos (%) | Massa (g)   | Rendimentos (%) |
| <b>PV</b>   | 5,8 ± 0,98  | 32,63 ± 2,80    | 1,46 ± 0,48 | 23,59 ± 3,0     |
| <b>AE</b>   | 0,26 ± 0,11 | 1,47 ± 0,37     | 0,10 ± 0,05 | 1,56 ± 0,45     |
| <b>EE</b>   | 0,13 ± 0,11 | 0,77 ± 0,20     | 0,05 ± 0,04 | 0,90 ± 0,58     |
| <b>DCM2</b> | 0,08 ± 0,03 | 0,46 ± 0,09     | 0,08 ± 0,02 | 0,97 ± 0,36     |

**EB1:** extrato bruto etanólico total; **EB2:** extrato bruto etanólico obtido após a extração com diclorometano; **PV:** precipitado de coloração verde escura; **AE:** solução orgânica de acetato de etila; **EE:** solução orgânica de éter etílico; **DCM2:** solução orgânica de diclorometano.

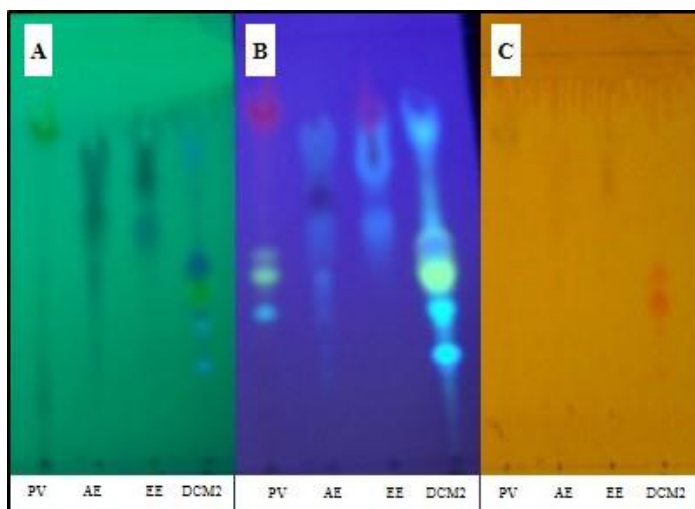
Observou-se que não houve grandes diferenças quanto à média e o rendimento da fração de DCM2 obtidas tanto pelo EB1 quanto pelo EB2. Assim, como o rendimento da fração de DCM2 foi baixo e não houve diferenças quanto ambas as extrações, a continuidade da extração ácido-base foi realizada somente pelo EB1.

#### 4.1.3.2. Análise por cromatografia em camada delgada

##### 4.1.3.2.1. Cromatografia em camada delgada das frações obtidas pela extração ácido-base

Foi realizada a análise por CCD das frações: solução orgânica de acetato de etila (AE); solução orgânica de éter etílico (EE); solução orgânica de diclorometano (DCM2). A fase móvel utilizada foi BAW. A cromatofolha foi revelada sob a luz de UV no comprimento de 254 nm (Fig. 14A) e de 366 nm (Fig. 14B) e posteriormente revelada por Dragendorff (Fig 14C).

**Figura 14.** Cromatofolha de CCD das frações obtidas pela extração ácido-base avaliados com a fase movél BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



**PV:** precipitado de coloração verde escura; **AE:** solução orgânica de acetato de etila; **EE:** solução orgânica de éter etílico; **DCM2:** solução orgânica diclorometano. (A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Nas Figuras 14A e 14B observou-se que a CCD apresentou compostos químicos com duplas ligações conjugadas, principalmente na fração DCM2. Na figura 14A a fração EE apresentou  $R_f$  de 0,56 e a fração DCM2 apresentou manchas com  $R_f$ : 0,25; 0,32; 0,37 e 0,43. Na figura 14B a fração PV apresentou manchas com  $R_f$ : 0,32; 0,37 e 0,43, a fração AE apresentou leves manchas nos  $R_f$ : 0,37 e 0,5, a fração EE apresentou mancha no  $R_f$ : 0,56 e por fim a fração DCM2 apresentou as manchas nos  $R_f$ : 0,25; 0,32; 0,37 e 0,43. Quando CCD foi revelada com Dragendorff, somente a fração DCM2 apresentou manchas nos mesmo  $R_f$  observados quando revelados em UV, apresentando manchas com mais intensidade nos  $R_f$ : 0,37 e 0,43. No entanto, nota-se que PV e DCM2 tem manchas de cores parecidas quando revelada em 366 nm e também apresentam  $R_f$  iguais neste comprimento de onda.

Após a análise de CCD a fração DCM2 passou a ser chamada de fração rica em alcaloides (FA), pois o Dragendorff revelou a possível presença de alcaloides.



#### 4.1.4. ANÁLISE DO RESULTADO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (HRESI-MS)

Pelo fato da FA apresentar compostos revelados com Dragendorff e também por existir relatos na literatura da presença de alcaloides no gênero *Boehmeria*, esta fração foi avaliada em espectrometria de massas de alta resolução para identificar e comprovar a presença de alcaloides. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 8 e figura 15.

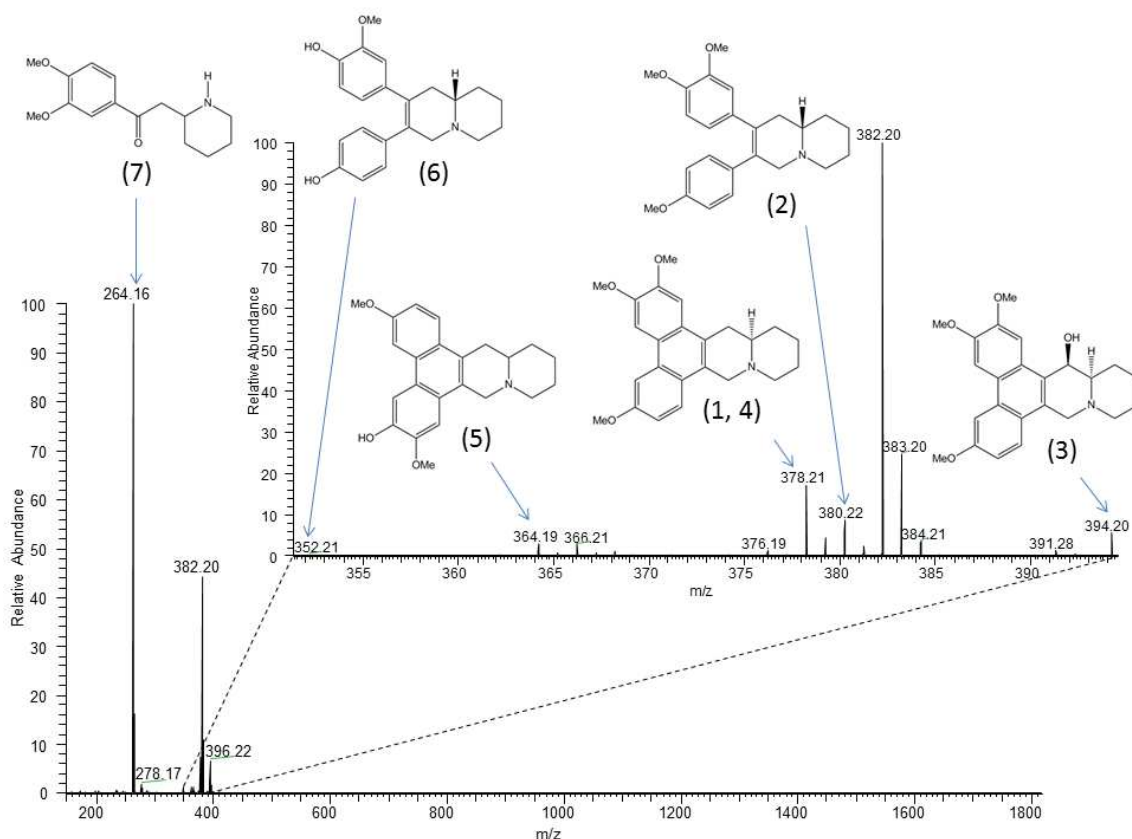
**Tabela 8.** Dados de HRESI-MS obtidos da fração rica em alcaloides.

| [M + H] <sup>+</sup> |                                                  |                      |                         |            |                  |                                                                                 |
|----------------------|--------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Composto             | Fórmula molecular                                | <i>m/z</i> calculado | <i>m/z</i> experimental | Erro (ppm) | DBE <sup>a</sup> | Referência                                                                      |
| <b>1, 4</b>          | C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> N | 378.20637            | 378.20599               | -1.01      | 11.5             | Luo et al., 2003; Banwell et al., 2006; Cai et al., 2006; Pansare e Dyapa, 2012 |
| <b>2</b>             | C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> N | 380.22068            | 380.22159               | -1.13      | 10.5             | Trigo et al., 1979; Banwell et al., 2006                                        |
| <b>3</b>             | C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> N | 394.20128            | 394.20058               | -1.87      | 11.5             | Cai et al, 2006                                                                 |
| <b>5</b>             | C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> N | 364.19072            | 364.19001               | -1.95      | 11.5             | Luo et al., 2003                                                                |
| <b>6</b>             | C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> N | 352.19072            | 352.19067               | -0.20      | 10.5             | Luo et al., 2001                                                                |
| <b>7</b>             | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> N | 264.15942            | 264.15899               | -1.67      | 5.5              | Al-Shamma et al., 1981; Hart et al., 1968; Semwal et al., 2009                  |

<sup>a</sup>DBE = *double bonds equivalent* (equivalente de duplas ligações)

**(1,4)** - (-) Criptopleurina, Boehmeriasina A **(2)** Julandina **(3)** (-)-C(15R)-Hidróxicriptoleurina **(5)** Boehmeriasina B **(6)** 3-(4-hidroxifenil)-4-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3, 4-dehidroquinolizidina **(7)** 3,4-Dimetoxi-ω- (2'-piperidil) acetofenona.

**Figura 15.** Espectro dos alcaloides encontrados na fração rica em alcaloides.



(1,4) - (-) Criptopleurina, Boehmeriasina A (2) Julandina (3) (-)-C(15R)-Hidróxicriptoleurina (5) Boehmeriasina B (6) 3-(4-hidroxifenil)-4-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3, 4-dehidroquinolizidina (7) 3,4-Dimetoxi-ω-(2'-piperidil) acetofenona. A diferença entre o criptopleurina e a boehmeriasina A é que a boehmeriasina A não possui o hidrogênio no anel quinolizídínico.

Esse resultado confirmou a presença de alcaloides na fração FA, que pela análise em HRESI-MS, são majoritariamente da família de alcaloides fenantroquinolizidínicos.

## 4.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

### 4.2.1. RESULTADO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM CULTURA DE CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS *IN VITRO*

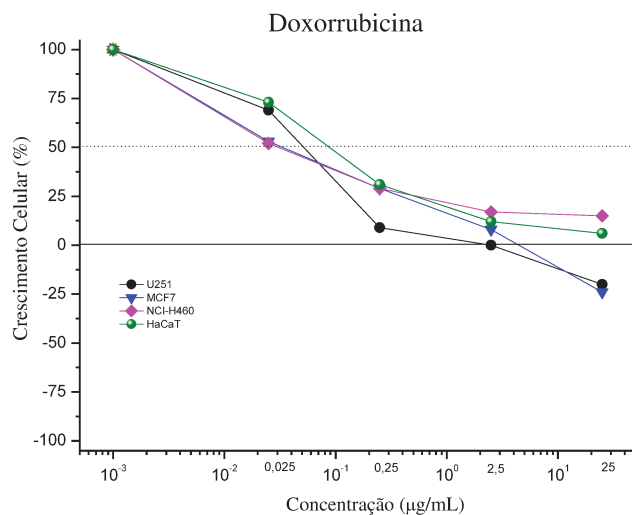
#### 4.2.1.1. Extratos brutos

##### 4.2.1.1.1. Extrato bruto diclorometano

A seguir estão apresentados os gráficos da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da doxorrubicina (Fig. 16) e dos extratos brutos diclorometanos extraídos pelo método de maceração dinâmica: F1MDD, FMDD,

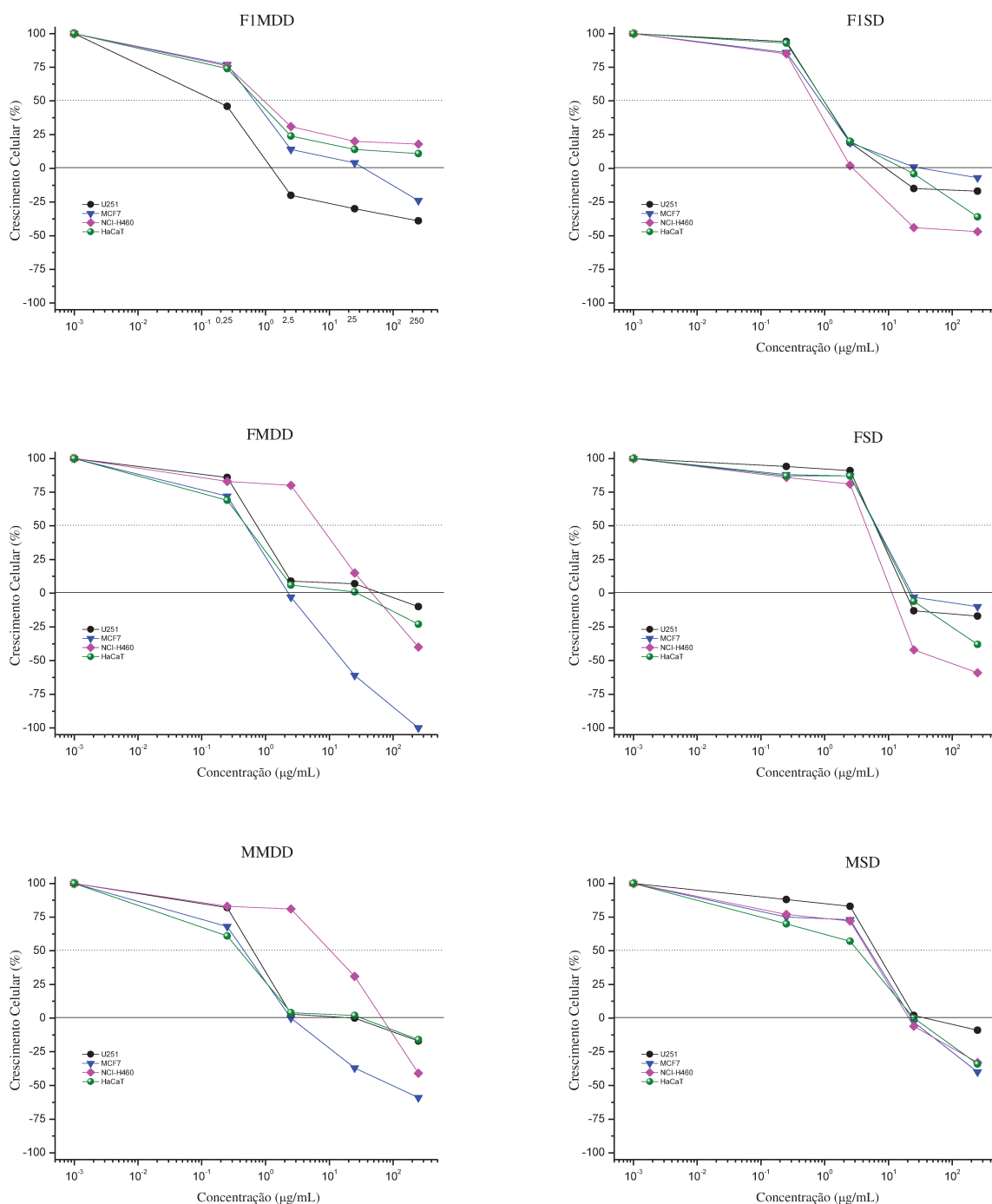
MMDD e pelo método de *soxhlet*: F1SD, FSD, MSD (Fig. 17). Em seguida, a Tabela 9 apresenta os valores de concentração necessária dos extratos diclorometânicos e de doxorubicina para inibição total de crescimento (TGI,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Figura 16.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais *in vitro* da Doxorubicina, quimioterápico de referência.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral.

**Figura 17.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* dos extratos brutos diclorometanos de *Boehmeria caudata*.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **F1MDD**: folhas maceração dinâmica diclorometano, **FMDD**: flores mais galho maceração dinâmica diclorometano, **MMDD**: mistura maceração dinâmica diclorometano, **F1SD**: folhas *soxhlet* diclorometano, **FSD**: flores mais galho *soxhlet* diclorometano, **MSD**: mistura *soxhlet* diclorometano.

**Tabela 9.** Valores de TGI (inibição total do crescimento,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos brutos diclorometanos e da doxorubicina.

| Linhagens    |       |       |       |       |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| Extratos     | 2*    | M*    | 4*    | Cat*  |
| <b>F1MDD</b> | 2,78  | 29,94 | >250  | >250  |
| <b>F1SD</b>  | 27,03 | 56,25 | 5,68  | 21,90 |
| <b>FMDD</b>  | 51,70 | 2,58  | 51,87 | 23,50 |
| <b>FSD</b>   | 56,43 | 81,30 | 13,89 | 39,22 |
| <b>MMDD</b>  | 29,21 | 4,54  | 66,26 | 28,09 |
| <b>MSD</b>   | 90,50 | 35,26 | 38,19 | 35,57 |
| <b>DOXO</b>  | 2,66  | 3,69  | >25   | 19,41 |

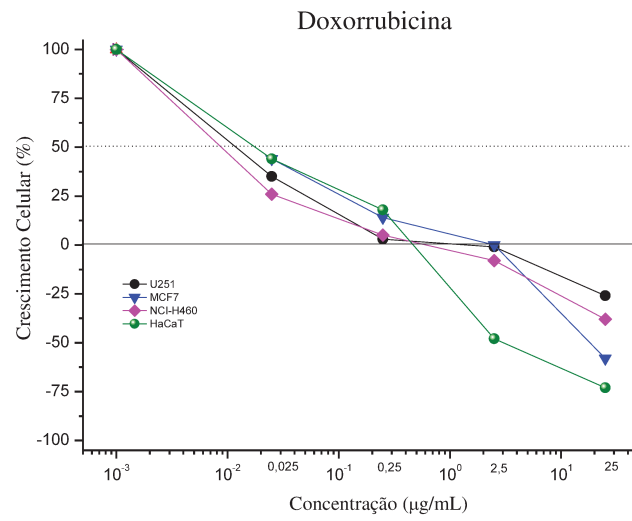
\*Linhagens celulares tumorais humanas: **2** (U251, glioma), **M** (MCF-7, mama), **4** (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), **Cat** (HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral). **F1MDD**: folhas maceração dinâmica diclorometano, **FMDD**: flores mais galho maceração dinâmica diclorometano, **MMDD**: mistura maceração dinâmica diclorometano, **F1SD**: folhas *soxhlet* diclorometano, **FSD**: flores mais galho *soxhlet* diclorometano, **MSD**: mistura *soxhlet* diclorometano, **DOXO**: Doxorubicina.

Os extratos obtidos por maceração dinâmica apresentaram valores de TGI menores do que os extratos obtidos por *soxhlet* para as linhagens de U251 e MCF7, enquanto que para NCI-H460 os extratos brutos obtidos por *soxhlet* foram mais potentes.

#### 4.2.1.1.2. Extrato bruto etanólico

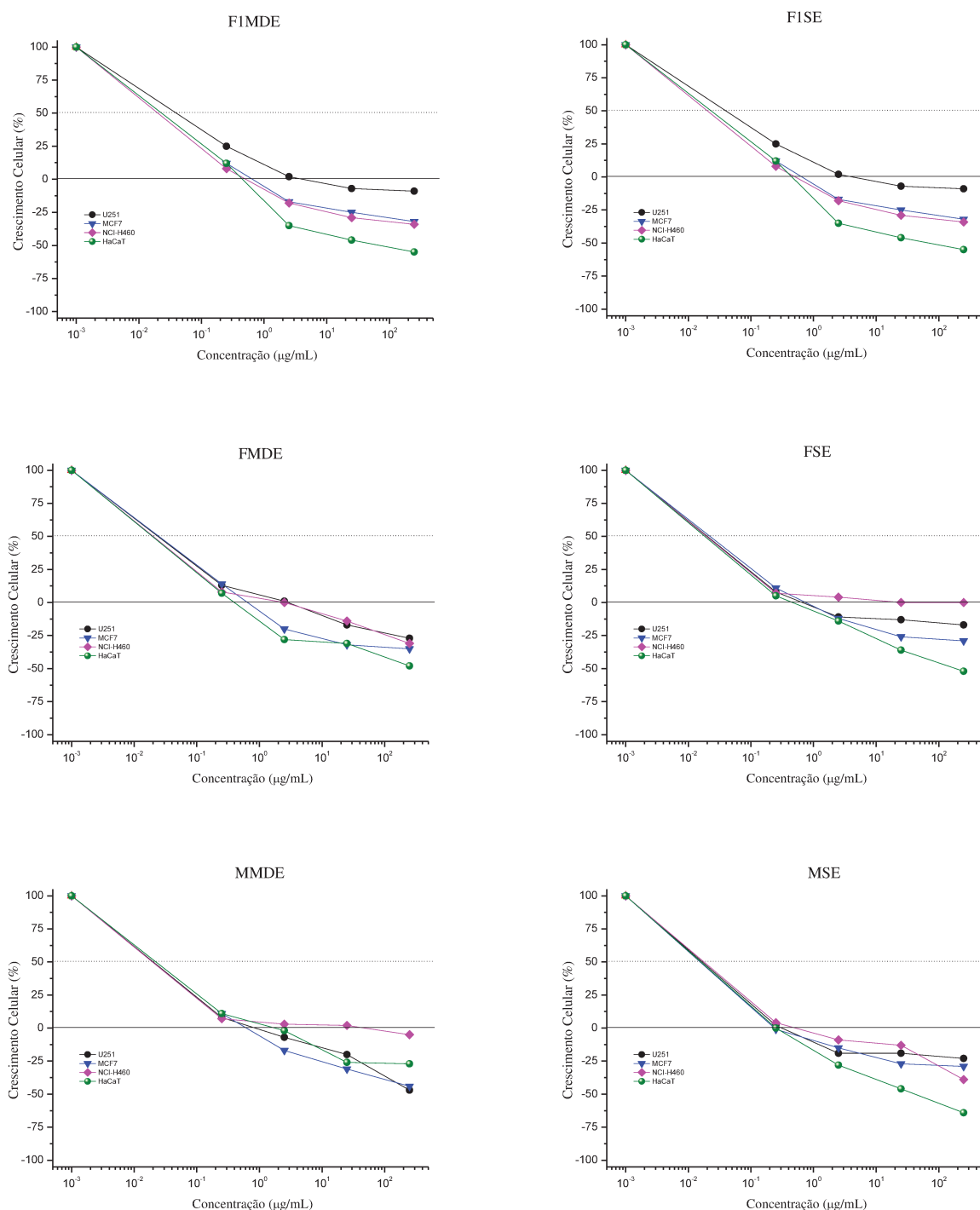
A seguir estão apresentados os gráficos da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da doxorubicina (Fig. 18) e dos extratos brutos etanólicos extraídos pelo método de maceração dinâmica: F1MDE, FMDE, MMDE e pelo método de *soxhlet*: F1SE, FSE, MSE (Fig. 19). Em seguida, a Tabela 10 apresenta os valores de concentração necessária dos extratos etanólicos e de doxorubicina para inibição total de crescimento (TGI,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Figura 18.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais *in vitro* da Doxorrubicina, quimioterápico de referência.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral.

**Figura 19.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas e não tumorais *in vitro* dos extratos brutos etanólicos da *Boehmeria caudata*.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **F1MDE:** folhas maceração dinâmica etanólico, **FMDE:** flores mais galho maceração dinâmica etanólico, **MMDE:** mistura maceração dinâmica etanólico, **F1SE:** folhas *soxhlet* etanólico, **FSE:** flores mais galho *soxhlet* etanólico, **MSE:** mistura *soxhlet* etanólico.

**Tabela 10.** Valores de TGI (inibição total do crescimento,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos brutos etanólicos e da doxorrubicina.

| Extratos     | Linhagens |       |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|
|              | 2*        | M*    | 4*    | Cat*  |
| <b>F1MDE</b> | 13,86     | 0,63  | 0,39  | 0,33  |
| <b>F1SE</b>  | <0,25     | 0,75  | <0,25 | <0,25 |
| <b>FMDE</b>  | 2,24      | 0,58  | 1,54  | 0,28  |
| <b>FSE</b>   | 0,67      | 0,72  | 99,51 | 0,46  |
| <b>MMDE</b>  | 0,92      | 0,60  | 23,52 | 1,26  |
| <b>MSE</b>   | <0,25     | <0,25 | 0,66  | <0,25 |
| <b>DOXO</b>  | 8,46      | 6,28  | 4,82  | 1,02  |

\*Linhagens celulares tumorais humanas: **2** (U251, glioma), **M** (MCF-7, mama), **4** (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), **Cat** (HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral). **F1MDE**: folhas maceração dinâmica etanólico, **FMDE**: flores mais galho maceração dinâmica etanólico, **MMDE**: mistura maceração dinâmica etanólico, **F1SE**: folhas *soxhlet* etanólico, **FSE**: flores mais galho *soxhlet* etanólico, **MSE**: mistura *soxhlet* etanólico. **DOXO**: doxorrubicina.

Os extratos das folhas e da mistura obtidos pelo método de *soxhlet* foram em geral os mais ativos, porém, não houve grande diferença entre os extratos das diversas partes da planta obtidos por ambos os métodos, com exceção para a linhagem NCI-H460 para o FSE. Assim, optou-se por dar continuidade aos estudos empregando-se como matéria prima vegetal a mistura de folhas, flores e galhos de *B. caudata* e a técnica de extração por *soxhlet*. Quanto ao líquido extrator, os resultados obtidos sugeriram que a extração com etanol seria a mais promissora, uma vez que de maneira geral, os EBEs apresentaram valores de TGI (Tabela 10) menores do que os observados para os EBDs (Tabela 9).

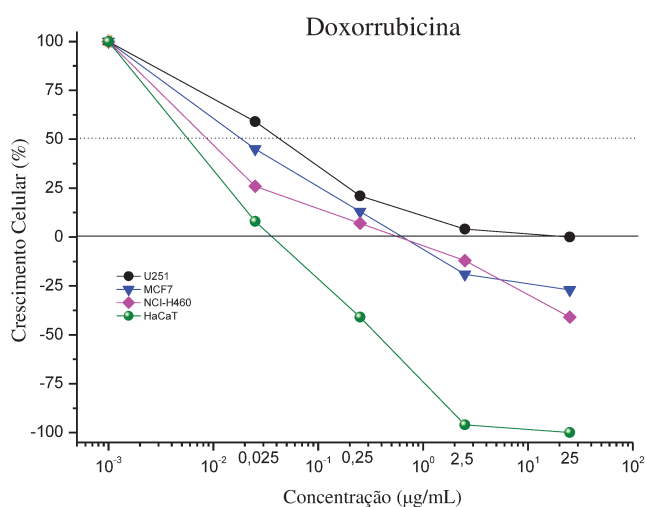
#### 4.2.1.1.3. Extrato bruto aquoso

A seguir estão apresentados os gráficos da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da doxorrubicina (Fig. 20) e dos extratos



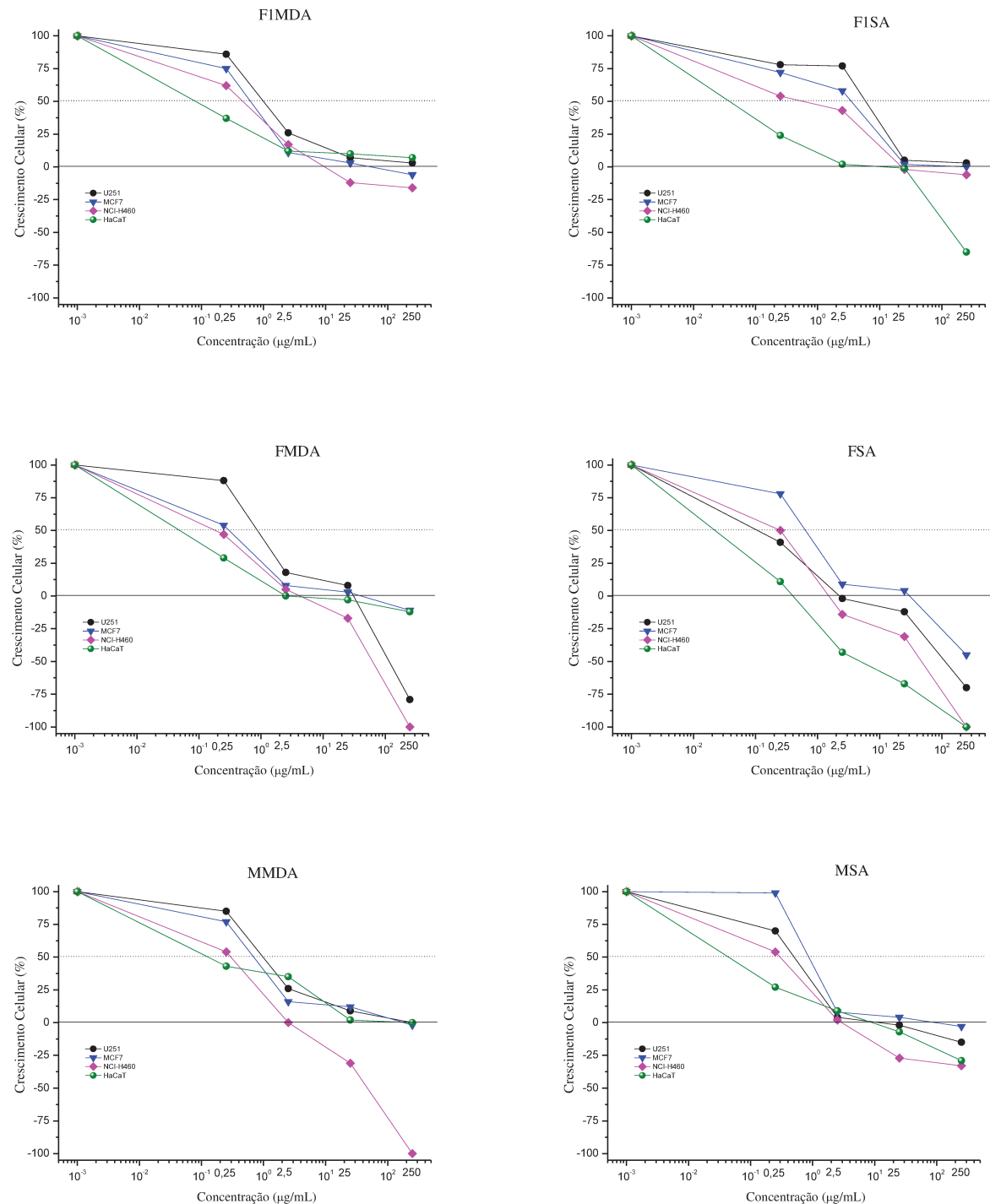
brutos aquosos extraídos pelo método de maceração dinâmica: F1MDA, FMDA, MMDA e pelo método de *soxhlet*: F1SA, FSA, MSA (Fig. 21), sendo que na Tabela 11 estão descritos os valores de concentração necessária dos extratos aquosos e de doxorrubicina para inibição total de crescimento (TGI,  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 20.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais *in vitro* da Doxorrubicina, quimioterápico de referência.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral.

**Figura 21.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* dos extratos brutos aquosos da *Boehmeria caudata*.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **FIMDA**: folhas maceração dinâmica água, **FMDA**: flores mais galho maceração dinâmica água, **MMDA**: mistura maceração dinâmica água, **FISA**: folhas *soxhlet* água, **FSA**: flores mais galho *soxhlet* água, **MSA**: mistura *soxhlet* água.

**Tabela 11.** Valores de TGI (inibição do crescimento total,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos brutos aquosos e da doxorubicina.

| Extratos     | Linhagens |        |       |        |
|--------------|-----------|--------|-------|--------|
|              | 2*        | M*     | 4*    | Cat*   |
| <b>F1MDA</b> | >250      | 55,08  | 27,79 | >250   |
| <b>F1SA</b>  | >250      | 120,19 | 75,31 | 3,42   |
| <b>FMDA</b>  | 13,30     | 37,97  | 3,60  | 14,89  |
| <b>FSA</b>   | 3,75      | 16,38  | 2,18  | 0,39   |
| <b>MMDA</b>  | 106,60    | 98,12  | 3,05  | 130,70 |
| <b>MSA</b>   | 27,73     | 63,57  | 6,67  | 7,94   |
| <b>DOXO</b>  | 9,75      | 1,01   | 0,46  | <0,25  |

\*Linhagens celulares tumorais humanas: **2** (U251, glioma), **M** (MCF-7, mama), **4** (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), **Cat** (HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral). **F1MDA**: folhas maceração dinâmica água, **FMDA**: flores mais galho maceração dinâmica água, **MMDA**: mistura maceração dinâmica água, **F1SA**: folhas *soxhlet* água, **FSA**: flores mais galho *soxhlet* água, **MSA**: mistura *soxhlet* água. **DOXO**: doxorubicina.

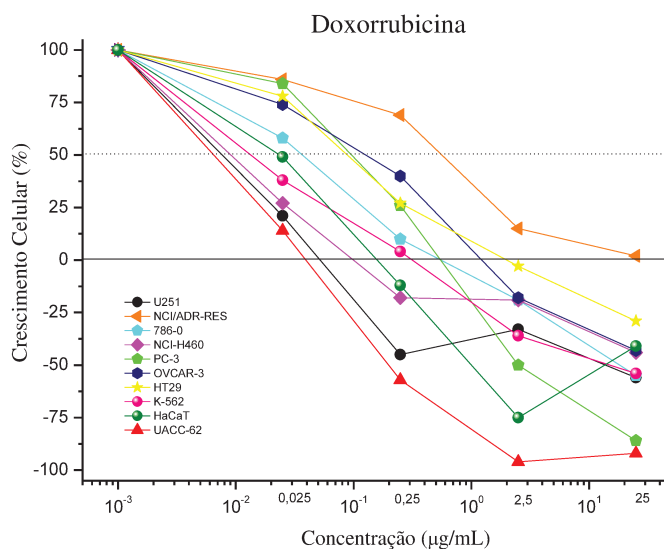
Em geral, os extratos de flor mais galho e mistura extraídos pelo método de *soxhlet* foram mais eficientes em relação aos mesmos extraídos por maceração dinâmica. Já para a folha a eficiência foi parecida para ambos os métodos. Por fim, a FSA apresentou maior potência em relação a todos os extratos. Comparativamente aos extratos brutos etanólicos (Tabela 10), os aquosos apresentaram menor potência (Tabela 11).

#### 4.2.1.2. Extrato bruto etanólico total versus extrato bruto obtido após a extração com o diclorometano

Como o extrato bruto etanólico apresentou o menor valor de TGI, foi avaliado se o extrato bruto etanólico total (EB1) e o extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2) apresentariam o mesmo perfil de atividade antiproliferativa *in vitro*.

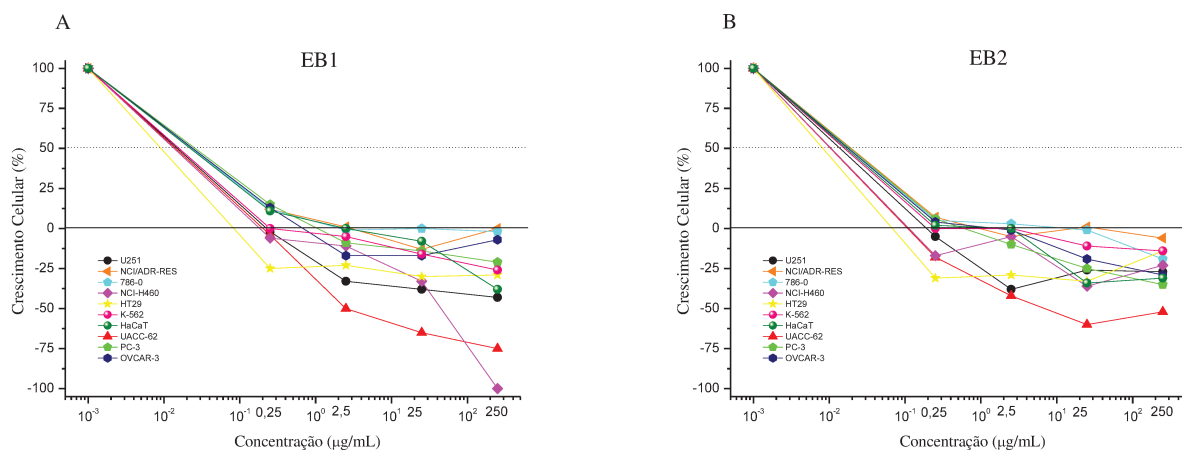
A seguir estão apresentados os gráficos da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da doxorubicina (Fig. 22), do EB1 (Fig. 23A) e EB2 (Fig. 23B). Na Tabela 12 estão descritas as concentrações necessárias dos extratos EB1 e EB2 e de doxorubicina para inibição total de crescimento (TGI,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Figura 22.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais *in vitro* da Doxorubicina, quimioterápico de referência.



U251: glioma; UACC-62: melanoma, NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colón; PC-3: próstata; K-562: leucemia; OVCAR-03: ovário; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral.

**Figura 23.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* do extrato bruto etanólico total (EB1) (A) e do extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano (EB2) (B).



U251: glioma; UACC-62: melanoma, NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colón; PC-3: próstata; K-562: leucemia; OVCAR-03: ovário; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **EB1**: extrato bruto etanólico total; **EB2**: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano.

**Tabela 12.** Valores de TGI (inibição do crescimento total) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos brutos etanólicos 1 e 2 e da doxorubicina.

| Extratos    | Linhagens |       |       |       |       |       |      |      |      |       |
|-------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|
|             | 2*        | U*    | A*    | 7*    | 4*    | H*    | P*   | O*   | K*   | Cat*  |
| <b>EB1</b>  | <0,25     | <0,25 | 7,85  | 27,97 | 0,41  | 3,04  | 1,78 | 0,54 | 0,38 | 2,14  |
| <b>EB2</b>  | <0,25     | <0,25 | 4,67  | 3,19  | <0,25 | <0,25 | 0,55 | 0,86 | 0,52 | 0,53  |
| <b>DOXO</b> | <0,25     | 0,71  | 17,07 | 0,69  | <0,25 | 2,67  | 0,54 | 1,68 | 0,31 | <0,25 |

\*Linhagens celulares tumorais humanas: 2 (U251, glioma), (UACC-62, melanoma), A (NCI-ADR/RES, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 7 (786-0, rim), 4 (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), H (HT-29, colón), P (PC-3, próstata), K (K-562, leucemia), O (OVCAR-03, ovário), Cat (HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral). **EB1**: extrato bruto etanólico total; **EB2**: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano. **DOXO**: doxorubicina.

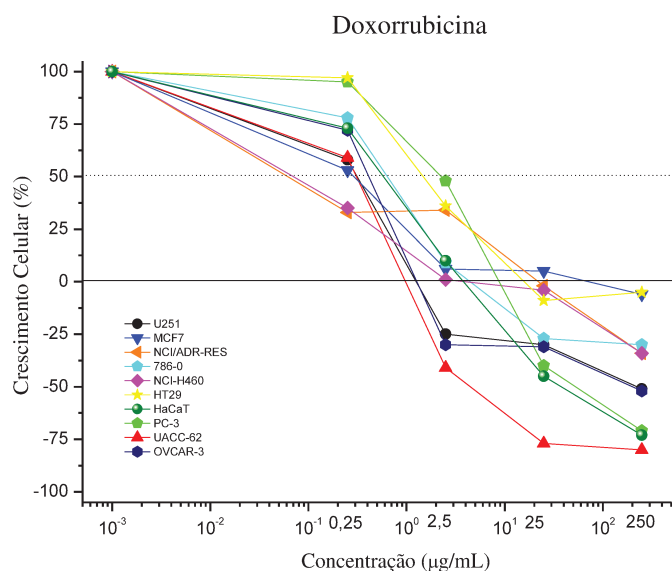
Como esperado pelo resultado da análise em CCD, na qual não foram observadas diferenças significativas entre EB1 e EB2, os resultados de TGI de EB1 e EB2 frente às linhagens avaliadas também não apresentaram grandes diferenças, com exceção para a linhagem tumoral de rim (786-0). Para essa linhagem o EB2 foi mais ativo ( $\text{TGI} = 3,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que o EB1 ( $\text{TGI} = 27,97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 12). Diante dos resultados, optou-se por

prosseguir os estudos *in vivo* com o EB2, pelo fato do diclorometano extrair substâncias de média a baixa polaridade, tornando EB2 menos complexo do que EB1.

#### 4.2.1.3. Frações obtidas por extração ácido-base

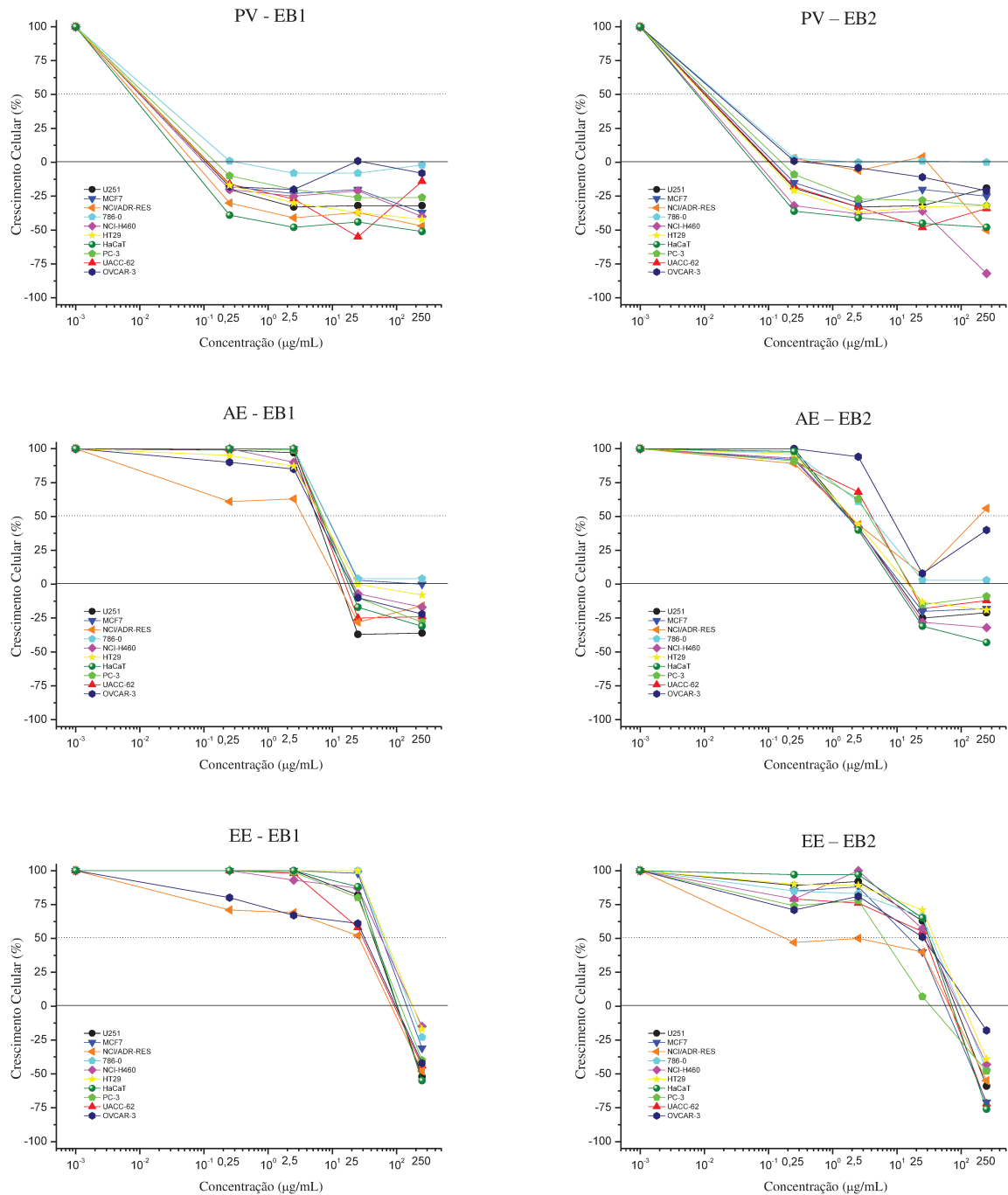
A seguir está apresentado o gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da doxorrubicina (Fig. 24) e das frações obtidas por extração ácido-base tanto do EB1 quanto do EB2 (Fig. 25 e 26). Em seguida está apresentada a Tabela 13 com os valores de concentração necessária das frações resultantes e de doxorrubicina para inibição total de crescimento (TGI,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Figura 24.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais *in vitro* da Doxorrubicina, quimioterápico de referência.



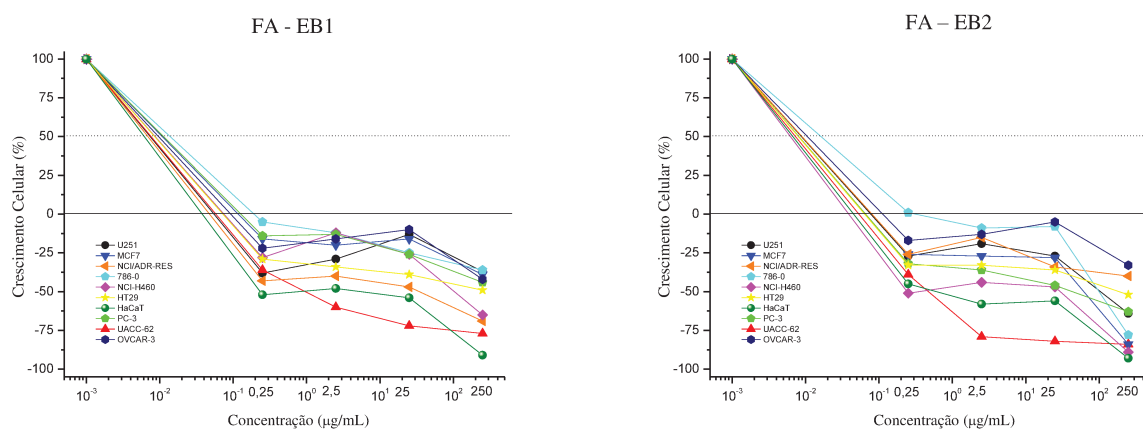
U251: glioma; UACC-62: melanoma, MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colón; PC-3: próstata; OVCAR-03: ovário; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral.

**Figura 25.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* das frações obtidas pela extração ácido-base.



U251: glioma; UACC-62: melanoma, MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colôn; PC-3: próstata; OVCAR-03: ovário; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **PV**: precipitado de coloração verde escura, **AE**: solução orgânica de acetate de etila, **EE**: solução orgânica de éter etílico, **EB1**: extrato bruto etanólico total; **EB2**: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano.

**Figura 26.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da fração rica em alcaloides obtida pela extração ácido-base.



U251: glioma; UACC-62: melanoma, MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colón; PC-3: próstata; OVCAR-03: ovário; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **FA**: fração rica em alcaloides, **EB1**: extrato bruto etanólico total; **EB2**: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano.

**Tabela 13.** Valores de TGI (inibição do crescimento total) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das frações obtidas por extração ácido-base tanto por EB1 quanto por EB2.

| Frações  | Linhagens |       |        |       |        |        |        |        |        |        |
|----------|-----------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|          | 2*        | U*    | M*     | A*    | 7*     | 4*     | H*     | P*     | O*     | Cat*   |
| PV – EB1 | <0,25     | <0,25 | <0,25  | <0,25 | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  |
| PV – EB2 | <0,25     | <0,25 | <0,25  | 1,16  | 140    | <0,25  | <0,25  | <0,25  | 0,50   | <0,25  |
| AE – EB1 | 23,05     | 39,62 | 127,42 | 31,94 | 148,36 | 62,75  | 90,66  | 47,89  | 50,84  | 39,60  |
| AE – EB2 | 26,48     | 49,92 | 30,82  | >250  | 126,20 | 19,04  | 36,76  | 55,65  | >250   | 14,65  |
| EE – EB1 | 116,30    | 96,48 | 188,56 | 75,18 | 238,92 | 197,04 | 242,06 | 131,72 | 94,40  | 122,43 |
| EE – EB2 | 82,65     | 62,41 | 52,13  | 41,28 | 98,93  | 96,74  | 118,82 | 38,19  | 149,78 | 68,44  |
| FA – EB1 | <0,25     | <0,25 | <0,25  | <0,25 | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  |
| FA – EB2 | <0,25     | <0,25 | <0,25  | <0,25 | 0,74   | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  | <0,25  |
| DOXO     | 0,28      | <0,25 | 5,26   | 1,77  | 1,12   | 0,74   | 5,72   | 0,98   | 0,32   | 0,44   |

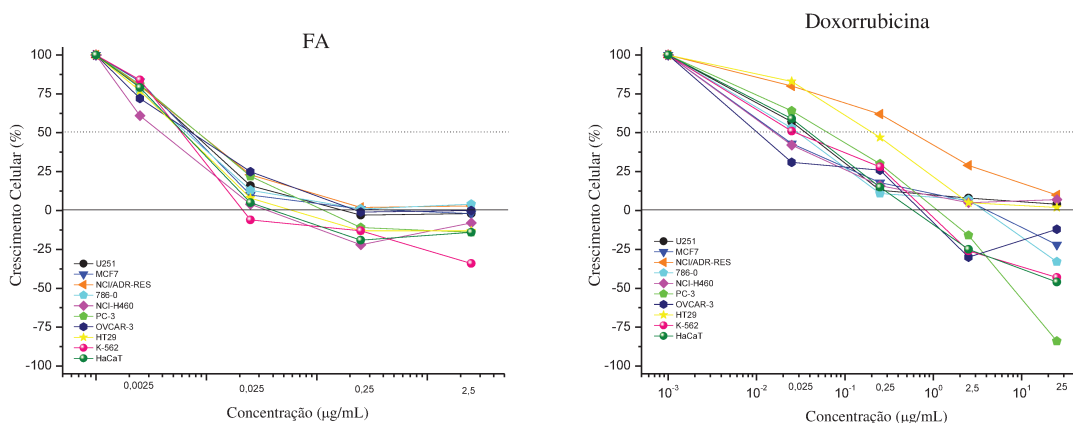
\*Linhagens celulares tumorais humanas: 2 (U251, glioma), U (UACC-62, melanoma), M (MCF-7, mama), A (NCI-ADR/RES, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 7 (786-0, rim), 4 (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), H (HT-29, colón), P (PC-3, próstata) e O (OVCAR-03, ovário). Linhagem não tumoral humana: Cat (HaCaT, queratinócito). **PV**: precipitado de coloração verde escura, **AE**: solução orgânica de acetate de etila, **EE**: solução orgânica de éter etílico, **FA**: fração rica em alcaloides, **EB1**: extrato bruto etanólico total; **EB2**: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano. **DOXO**: doxorubicina.



As frações mais potentes foram o PV e a FA, obtidas tanto de EB1 quanto de EB2. A fração PV obtida do extrato bruto EB1 foi levemente mais potente que aquela obtida do EB2; já as frações de AE obtidas por ambos os extratos brutos não apresentaram grandes diferenças entre si, sendo que para AE-EB1 as linhagens mais sensíveis foram glioma e ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, enquanto que para AE-EB2 as linhagens mais sensíveis foram glioma, mama, pulmão tipo não pequenas células e queratinócito. Já a fração EE obtida por EB2 foi mais potente do que a obtida a partir de EB1. A linhagem mais sensível à fração EE-EB2 foi a próstata (Tabela 13).

Por sua vez, as frações de FA obtidas a partir de ambos os extratos brutos não apresentaram diferenças entre si, com quase todos valores de TGI menores do que a menor concentração experimental ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir desses resultados as duas frações ricas em alcaloides (FA-EB1 e FA-EB2) foram reunidas em uma única fração, denominada FA, que foi novamente avaliada quanto à atividade antiproliferativa em uma faixa menor de concentração ( $0,0025$ ;  $0,025$ ;  $0,25$  e  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 27, Tabela 14).

**Figura 27.** Gráfico da atividade antiproliferativa em cultura de células humanas tumorais e não tumorais *in vitro* da fração rica em alcaloides e da doxorrubicina.



U251: glioma; MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colón; PC-3: próstata; OVCAR-03: ovário, K-562: leucemia; HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral. **FA:** fração rica em alcaloides

**Tabela 14.** Valores de TGI (inibição do crescimento total) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da fração rica em alcaloides.

| Extratos    | Linhagens |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|             | 2*        | M*   | A*   | 7*   | 4*   | H*   | P*   | O*   | K*   | Cat* |
| <b>FA</b>   | 0,59      | 0,61 | <2,5 | <2,5 | 0,17 | 0,24 | 0,32 | 0,79 | 0,11 | 0,19 |
| <b>DOXO</b> | <25       | 2,83 | <25  | 1,88 | <25  | <25  | 0,83 | 1,23 | 0,93 | 0,78 |

\*Linhagens celulares tumorais humanas: 2 (U251, glioma), A (NCI-ADR/RES, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 7 (786-0, rim), 4 (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), H (HT-29, colón), P (PC-3, próstata), K (K-562, leucemia), O\* (OVCAR-03, ovário), Cat (HaCaT, queratinócito humano – Linhagem não tumoral). FA: fração rica em alcaloides. Doxo: Doxorubicina.

O teste antiproliferativo em linhagem tumorais e não tumorais *in vitro* da FA, em concentrações mais baixas, mostrou que as linhagens tumorais celulares mais sensíveis foram a de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460) e a de leucemia (K-562) com valores de TGI de 0,17 e 0,11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Tendo em vista que uma atividade antiproliferativa sobre a linhagem tumoral NCI-H460 foi observada desde o EBE, que a potência dessa atividade foi aumentada com o fracionamento e obtenção da fração rica em alcaloides e que, segundo o INCA, no Brasil o câncer de pulmão, além de ser o mais letal, é a segunda maior incidência entre os homens e a quarta entre as mulheres (INCA, 2016), optou-se pela continuidade dos estudos de mecanismo de morte celular com a linhagem NCI-H460.

Com base no perfil de atividade antiproliferativa de FA em função da concentração (Figura 27), estabeleceu-se que, para as análises de citometria, as concentrações de 0,025; 0,25 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  seriam empregadas para os estudos de processo de morte celular enquanto as concentrações de 0,0025 e 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  seriam utilizadas para a análise do ciclo celular.

## 4.2.2. CITOMETRIA DE FLUXO

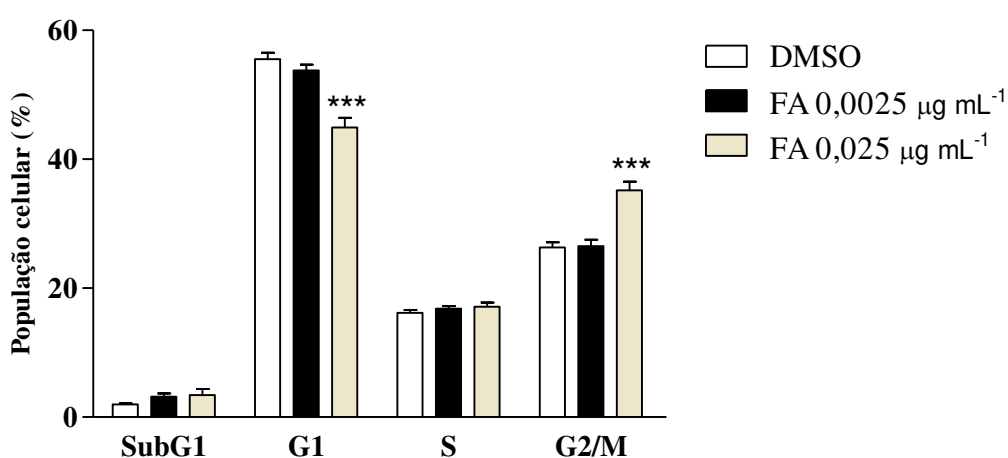
### 4.2.2.1. RESULTADO DA ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para investigar o possível mecanismo de ação da fração rica em alcaloides, primeiramente foi avaliado a sua ação nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

Células de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células tratadas com 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  por 24 e 48 horas, de uma forma geral quando comparadas às células tratadas

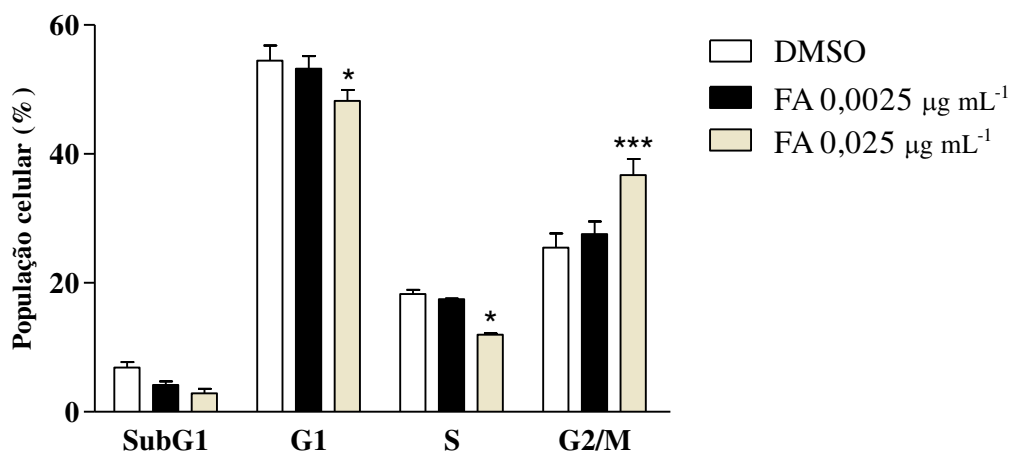
apenas com o diluente, apresentaram um aumento na subpopulação de células em fase G2/M com consequentemente diminuição na subpopulação de células em fase G1, para o tempo de 24 horas (Figura 28), e nas fases G1 e S, para o tempo de 48 horas de tratamento (Figura 29). Já células tratadas com  $0,0025 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em ambos tempos, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo. Para a fase sub-G1, não foram observadas diferenças significativas para nenhum tratamento e tempo (Tabela 15).

**Figura 28.** Análise das fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após 24 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides.



Experimentos realizados em triplicata; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes. Marcação com iodeto de propídio; DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluente). FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni)

**Figura 29.** Análise das fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após 48 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides.



Experimentos realizados em triplicata; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes. Marcação com iodeto de propídio; DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluyente). FA: fração rica em alcaloides. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

**Tabela 15.** Subpopulações celulares (em %) na análise de fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após tratamento com a fração rica em alcaloides.

| T    | Tratamento                    | Fases do ciclo  |                     |                   |                     |
|------|-------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|---------------------|
|      |                               | Sub-G1          | G1                  | S                 | G2/M                |
| 24hs | DMSO                          | 1,96 $\pm$ 0,36 | 55,53 $\pm$ 2,43    | 16,16 $\pm$ 1,18  | 26,33 $\pm$ 1,95    |
|      | FA 0,0025 µg mL <sup>-1</sup> | 3,19 $\pm$ 1,15 | 53,78 $\pm$ 2,18    | 16,81 $\pm$ 1,04  | 26,54 $\pm$ 2,47    |
|      | FA 0,025 µg mL <sup>-1</sup>  | 3,41 $\pm$ 2,17 | 44,91 $\pm$ 3,93*** | 17,12 $\pm$ 1,45  | 35,16 $\pm$ 3,04*** |
| 48hs | DMSO                          | 6,87 $\pm$ 2,10 | 54,45 $\pm$ 5,29    | 18,27 $\pm$ 1,49  | 25,46 $\pm$ 4,92    |
|      | FA 0,0025 µg mL <sup>-1</sup> | 4,17 $\pm$ 1,28 | 53,25 $\pm$ 4,71    | 17,49 $\pm$ 0,18  | 27,58 $\pm$ 4,79    |
|      | FA 0,025 µg mL <sup>-1</sup>  | 2,88 $\pm$ 1,72 | 48,24 $\pm$ 3,80*   | 11,96 $\pm$ 0,47* | 36,72 $\pm$ 5,65*** |

Experimentos realizados em triplicata, resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. DMSO: Controle negativo com 0,25 % de dimetilsulfóxido (diluyente). T: tempo, FA: fração rica em alcaloide. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

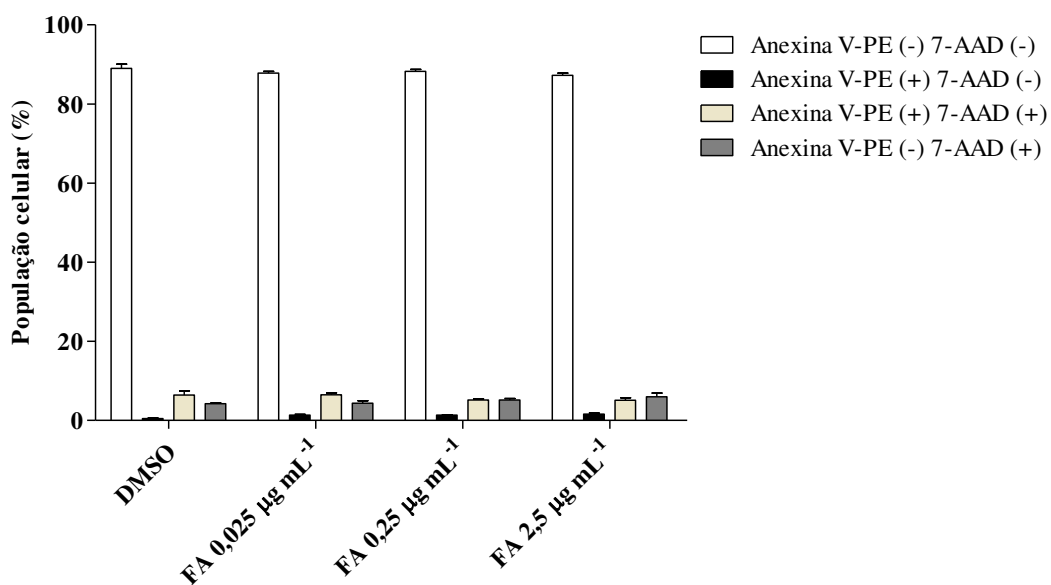
#### **4.2.2.2. RESULTADO DA ANÁLISE DE EXPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA E PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR**

Após observar que a FA tem ação sobre o ciclo celular, o seguinte passo foi investigar se as etapas iniciais do processo de morte celular desencadeado por FA envolveriam a exposição de resíduos de fosfatidilserina.

Iniciou-se a avaliação com um tempo de tratamento de 12 horas; no entanto, neste período não se observou diferença estatística das células tratadas em relação ao controle negativo, células sem tratamento (Fig. 30 e Tabela 16). Esse resultado combinado àquele obtido para a avaliação de ação sobre ciclo celular sugeriram que FA primeiro promoveria a parada do ciclo celular para então ativar um processo de morte celular. De fato, somente após 24 de exposição, foi possível observar um pequeno aumento na subpopulação de células com exposição de resíduos de fosfatidilserina para todas as concentrações utilizadas, sendo que na maior concentração ( $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  da FA) também foi possível observar um pequeno aumento na subpopulação de células duplamente marcadas com anexina V-PE e 7-AAD (Fig. 31 e Tabela 16).

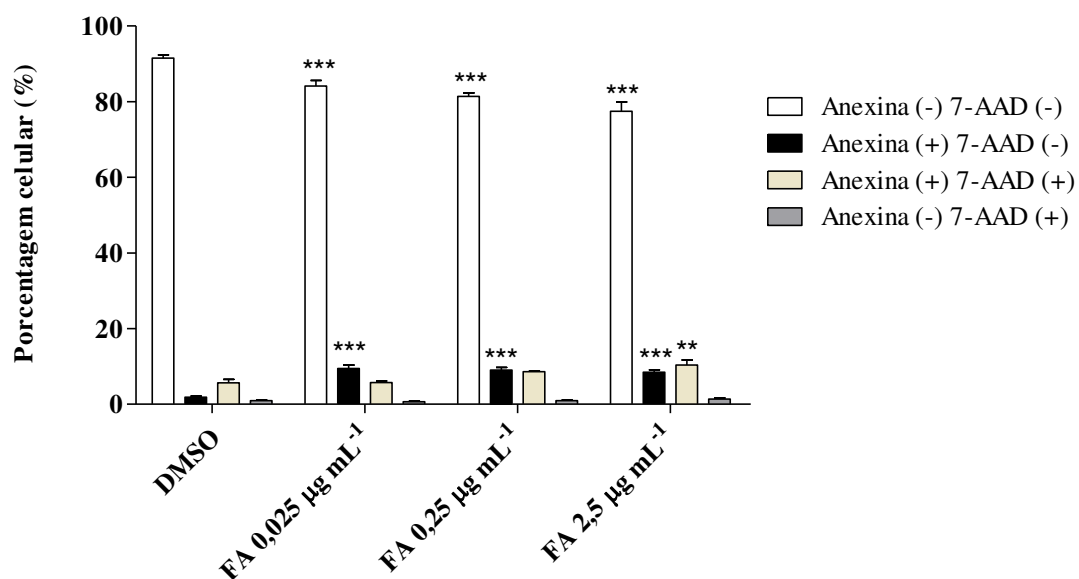
Aumentando-se o tempo de exposição (36 horas) da linhagem NCI-H460 à FA, foram observados, para as concentrações de 0,025; 0,25 e  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FA, uma redução na subpopulação de células viáveis de 87,37% (controle negativo) para 85,57%, 61,97% e 54,30% respectivamente, e um aumento na subpopulação de células marcadas com anexina V-PE de 2,60% (controle negativo) para 7,10%, 16,6% e 17,93% respectivamente. Com relação à subpopulação de células duplamente marcadas (anexina V-PE +, 7-AAD +), apenas as concentrações de 0,25 e  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  promoveram um aumento de 8,60% (controle negativo) para 20,37% e 25,73%, respectivamente; já a concentração de  $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$  promoveu uma redução nessa subpopulação (de 8,60% para 6,67%) (Fig. 32 e Tabela 16).

**Figura 30.** Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após 12 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides.



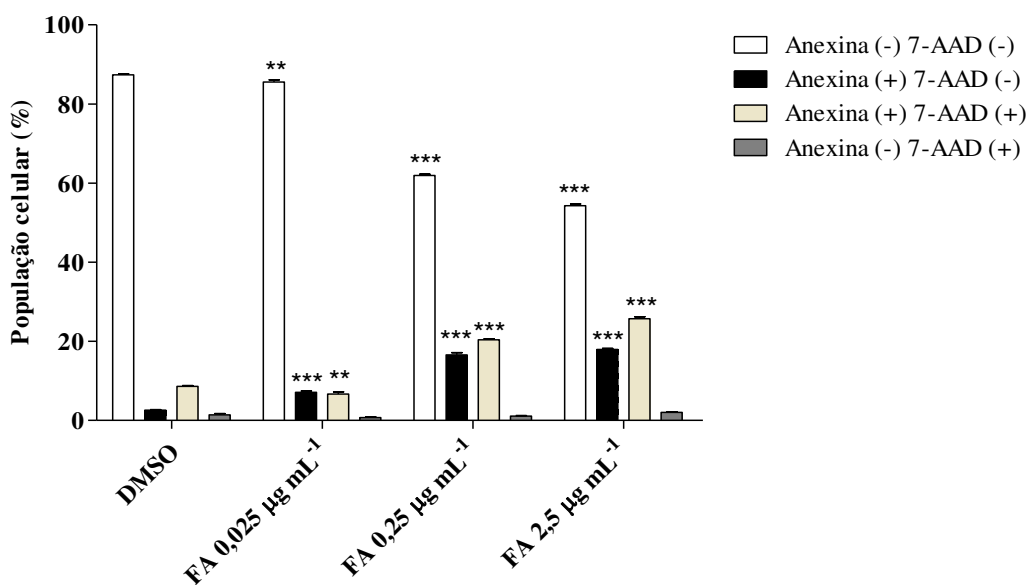
Experimentos realizados em triplicata, resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes. DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluyente). FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

**Figura 31.** Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após 24 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides.



Experimentos realizados em triplicata, resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes. DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluente). FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

**Figura 32.** Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após 36 horas de tratamento com a fração rica em alcaloides.



Experimentos realizados em triplicata, resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes. DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluyente). FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).



**Tabela 16.** Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina e de permeabilização de membrana de células NCI-H460 após tratamento com a fração rica em alcaloides.

| T   | Marcação             | Tratamento   |                              |                             |                            |
|-----|----------------------|--------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|     |                      | DMSO         | FA 0,025 µg mL <sup>-1</sup> | FA 0,25 µg mL <sup>-1</sup> | FA 2,5 µg mL <sup>-1</sup> |
| 12h | Anexina (-) 7AAD (-) | 89,00 ± 1,56 | 87,83 ± 0,78                 | 88,27 ± 0,83                | 87,27 ± 0,90               |
|     | Anexina (+) 7AAD (-) | 0,45 ± 0,21  | 1,33 ± 0,38                  | 1,37 ± 0,06                 | 1,60 ± 0,46                |
|     | Anexina (+) 7AAD (+) | 6,40 ± 1,56  | 6,50 ± 0,85                  | 5,20 ± 0,40                 | 5,13 ± 1,04                |
|     | Anexina (-) 7AAD (+) | 4,20 ± 0,28  | 4,37 ± 1,03                  | 5,20 ± 0,62                 | 6,00 ± 1,57                |
| 24h | Anexina (-) 7AAD (-) | 91,52 ± 2,10 | 84,17 ± 3,50***              | 81,43 ± 2,13***             | 77,47 ± 6,05***            |
|     | Anexina (+) 7AAD (-) | 1,88 ± 0,59  | 9,48 ± 2,18***               | 9,02 ± 1,72***              | 8,48 ± 1,60***             |
|     | Anexina (+) 7AAD (+) | 5,68 ± 2,10  | 5,70 ± 1,18                  | 8,62 ± 0,33                 | 10,40 ± 3,18**             |
|     | Anexina (-) 7AAD (+) | 0,93 ± 0,57  | 0,63 ± 0,45                  | 0,92 ± 0,45                 | 1,40 ± 0,60                |
| 36h | Anexina (-) 7AAD (-) | 87,37 ± 0,45 | 85,57 ± 0,97**               | 61,97 ± 0,49***             | 54,30 ± 0,79***            |
|     | Anexina (+) 7AAD (-) | 2,60 ± 0,20  | 7,10 ± 0,61***               | 16,60 ± 0,92***             | 17,93 ± 0,47***            |
|     | Anexina (+) 7AAD (+) | 8,60 ± 0,36  | 6,67 ± 0,99**                | 20,37 ± 0,47***             | 25,73 ± 0,80***            |
|     | Anexina (-) 7AAD (+) | 1,43 ± 0,49  | 0,70 ± 0,36                  | 1,10 ± 0,17                 | 2,03 ± 0,25                |

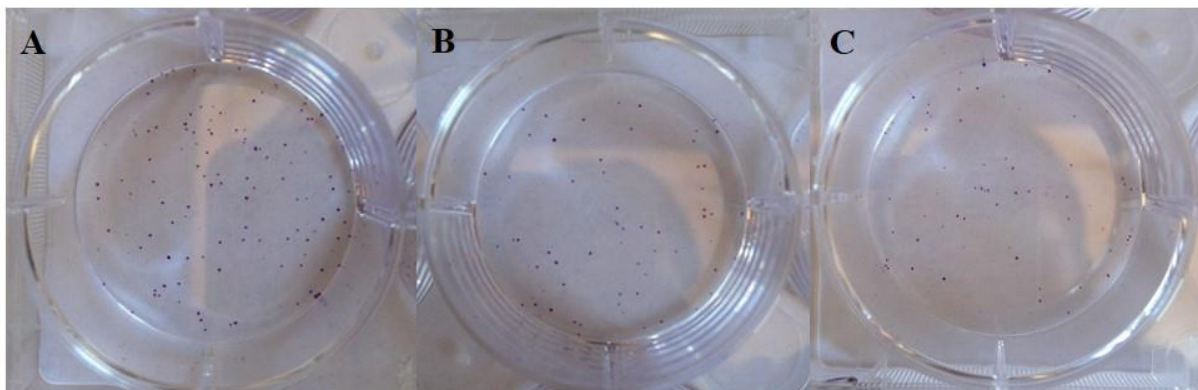
Experimentos realizados em triplicata, resultados expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. T: tempo de exposição ao tratamento; DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluente); FA: fração rica em alcaloide. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

#### 4.2.3. AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES NA REDUÇÃO DA CAPACIDADE PARA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Como os resultados anteriores demonstraram que FA foi citotóxica e teve ação sobre o ciclo celular, foi realizado o experimento de clonogenicidade para avaliar se, mesmo após a retirada do tratamento, as células recuperariam ou não a sua capacidade replicativa.

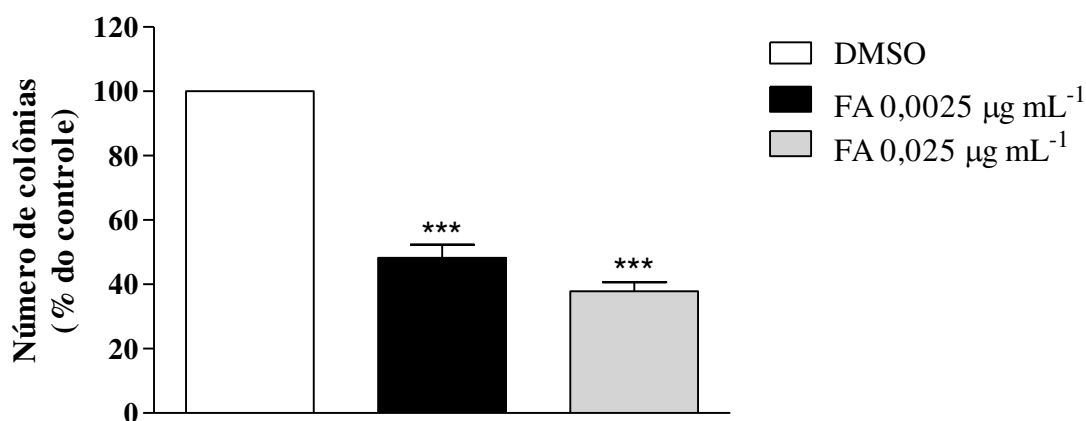
Assim, as células da linhagem NCI-H460 foram tratadas com as mesmas concentrações de FA utilizadas para análise do ciclo celular (0,0025 e 0,025 µg mL<sup>-1</sup>); nessas condições, as células tratadas com FA apresentaram uma redução de 51,80% e 62,11% na formação de colônias (Figuras 33 e 34).

**Figura 33.** Imagens representativas da formação de colônia das células NCI-H460 sem tratamento (A) com  $0,0025 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FA (B) e  $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FA (C), 5 dias após a retirada do tratamento.



FA: fração rica em alcaloides.

**Figura 34.** Número de colônias formadas pelas células NCI-H460 5 dias após a retirada do tratamento com FA.



Condições de incubação:  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ ; DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluyente). FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

### 4.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN SILICO*

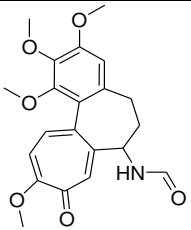
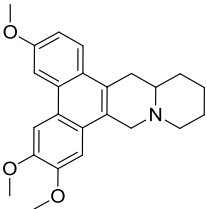
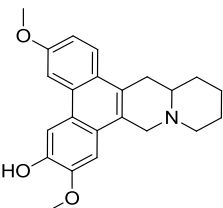
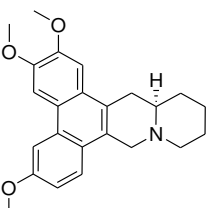
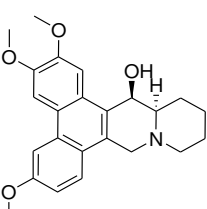
#### 4.3.1. RESULTADO DO TESTE DE DOCAGEM MOLECULAR

Antes de se iniciar os estudos de docagem propriamente ditos, os parâmetros ótimos para as simulações foram determinados através de comparações nas diferentes corridas da conformação, posição e orientação (as quais no conjunto são conhecidas como pose) do ligante docado com a pose correspondente do ligante co-cristalizado com o alvo farmacológico. Este processo, conhecido como redocagem ou *redocking*, é considerado um

requisito mínimo para determinar se os parâmetros de docagem selecionados são apropriados para a simulação com um determinado alvo ou não. Tal análise é efetuada pela comparação dos valores de desvio quadráticos médios (RMSD, do inglês *Root-Mean-Square Deviation*), uma medida da distância média entre os átomos do ligante cristalográfico de referência e do ligante docado. Para análise, utilizou-se o valor de RMSD de 2,0 Å como limite já que este é amplamente reconhecido como padrão na análise dos estudos de redocagem (Arooj et al., 2013).

Redocagem da colchicina no seu correspondente sítio de ligação na tubulina (PDB ID: 4O2B) utilizando-se a função de escore GoldScore do programa GOLD 5.3 com uma eficiência de busca de 100%, resultou em um valor de RMSD de redocagem = 0,44 Å, validando assim os parâmetros de docagem para os estudos com os demais compostos, cujos respectivos escores de docagem são apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Estruturas químicas e os respectivos escores de docagem calculados pela função de escore GoldScore do programa Gold 5.3 para a colchicina e demais compostos envolvidos nos estudos de docagem molecular.

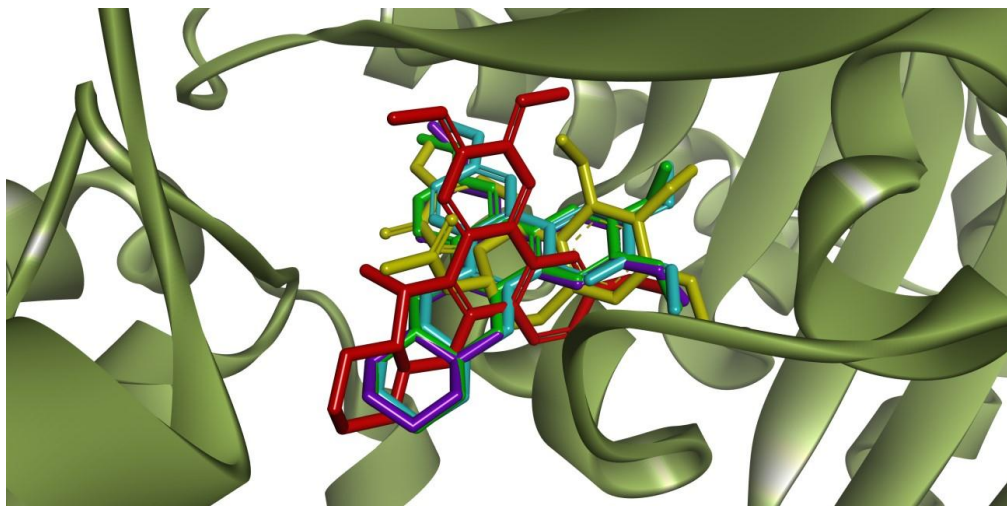
| Composto                             | Estrutura                                                                           | Escore de docagem |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Colchicina                           |    | 80,13             |
| <i>R</i> -Boemeriasina A             |    | 51,34             |
| <i>R</i> -Boemeriasina B             |   | 46,58             |
| <i>R</i> -Criptopleurina             |  | 38,69             |
| (15 <i>R</i> )-Hidróxicriptopleurina |  | 47,68             |

Segundo os valores de escore obtidos, a colchicina teria o maior potencial de interação com o subsítio da tubulina, seguida da *R*-boemeriasina A, (15*R*)-hidróxicriptopleurina, *R*-boemeriasina B e *R*-criptopleurina.

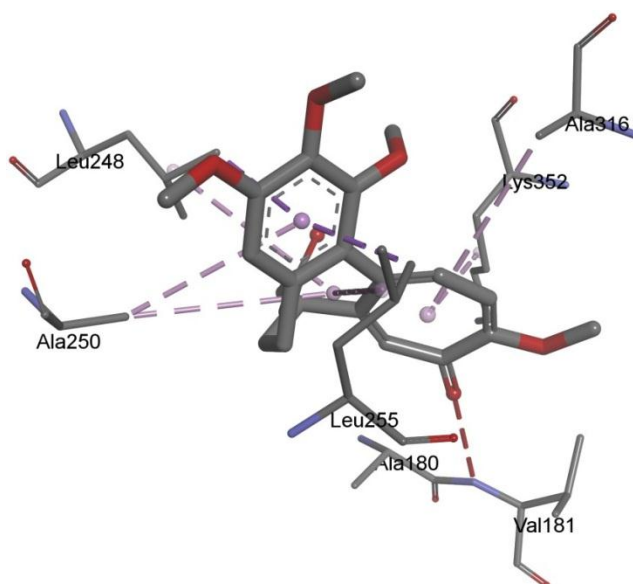
Em seguida foi realizada a sobreposição da pose cristalográfica da colchicina com as poses de docagem dos alcaloides fenantroquinolizidínicos (Figura 35) e para cada composto avaliado: colchicina (Figura 36), *R*-boehmeriasina A (Figura 37), *R*-boehmeriasina A (Figura 38), *R*-criptopleurina (Figura 39) e *R*- (15*R*)-hidróxicriptopleurina (Figura 40) foram analisados as principais interações intermoleculares realizadas entre a pose

cristalográfica dos compostos avaliados e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina.

**Figura 35.** Sobreposição da estrutura cristalográfica da colchicina (em amarelo) em seu respectivo sítio de interação da tubulina junto às poses de docagem dos compostos *R*-boehmeriasina A (verde), *R*-boehmeriasina B (violeta), *R*-criptopleurina (ciano) e (15*R*)-hidróxicriptopleurina (vermelho).

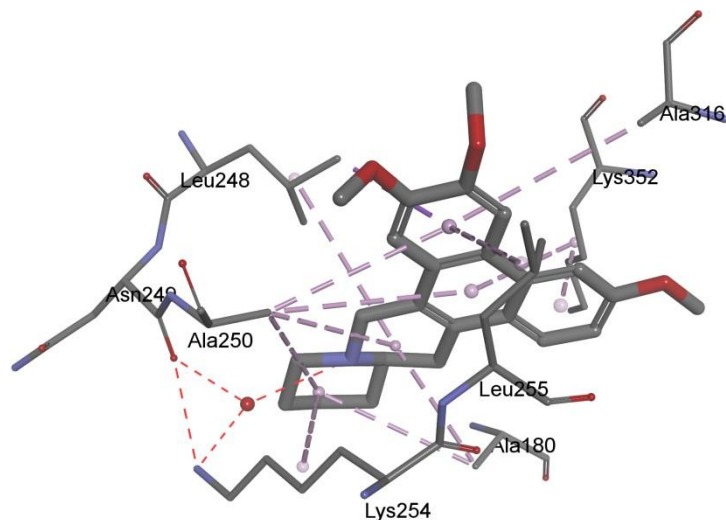


**Figura 36.** Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose cristalográfica da colchicina e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina.



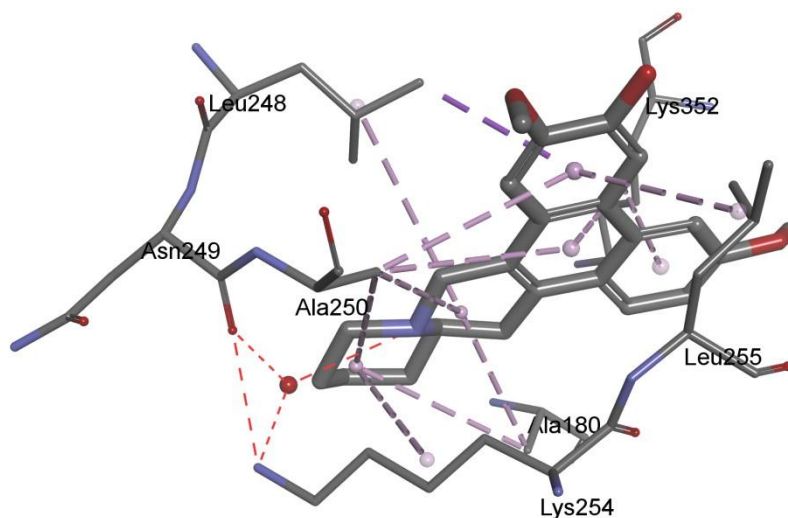
Oxigênio da carbonila/Val<sub>181</sub> (ligação de hidrogênio; 3,05 Å), anel ligado à carbonila/Ala<sub>316</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,45 Å), anel ligado à carbonila/Lys<sub>352</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,20 Å), anel central/Leu<sub>248</sub> (hidrofóbica; 5,37 Å), anel central/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 4,86 Å), anel central/Leu<sub>255</sub> (hidrofóbica; 5,00 Å), anel trimetóxi-benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,78 Å), anel trimetóxi-benzeno/Ala<sub>250</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,70 Å).

**Figura 37.** Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da *R*-boehmeriasina A e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina.



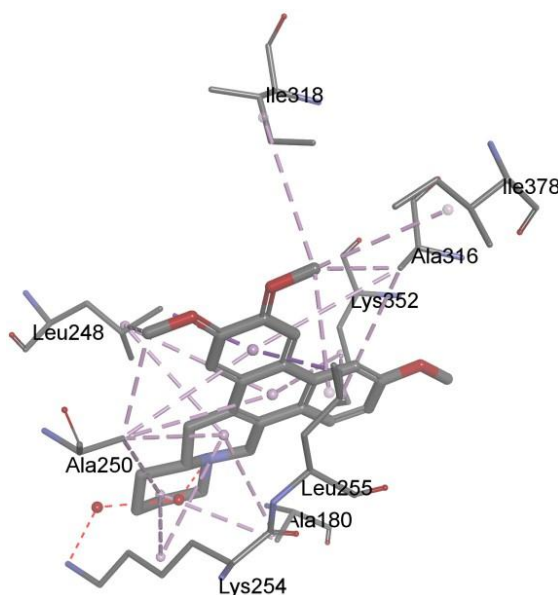
Nitrogênio da guinolizidina/água/Asn<sub>249</sub> (ligação de hidrogênio indireta; 3,08 Å, 2,92 Å), nitrogênio da guinolizidina/água/Lys<sub>254</sub> (ligação de hidrogênio indireta; 3,08 Å, 2,58 Å), anel guinolizidínico periférico/Ala<sub>180</sub> (hidrofóbica; 4,80 Å), anel guinolizidínico periférico/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 5,28 Å), anel guinolizidínico periférico/Lys<sub>254</sub> (hidrofóbica; 5,33 Å), anel guinolizidínico central/Ala<sub>180</sub> (hidrofóbica; 4,61 Å), anel guinolizidínico central/Leu<sub>248</sub> (hidrofóbica; 5,12 Å), anel guinolizidínico central/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 4,80 Å), anel aromático central/Ala<sub>250</sub> (CH/π; 5,48 Å), anel aromático central/Lys<sub>352</sub> (CH/π; 5,26 Å), anel metóxi-benzeno/Lys<sub>352</sub> (CH/π; 3,95 Å), anel dimetóxi-benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/π; 3,82 Å), anel dimetóxi-benzeno/Ala<sub>250</sub> (CH/π; 4,95 Å), anel dimetóxi-benzeno/Leu<sub>255</sub> (CH/π; 4,59 Å).

**Figura 38.** Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da *R*-boemeriasina B e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina.



Nitrogênio da guinolizidina/água/Asn<sub>249</sub> (ligação de hidrogênio indireta; 3,02 Å, 2,92 Å), nitrogênio da guinolizidina/água/Lys<sub>254</sub> (ligação de hidrogênio indireta; 3,02 Å, 2,58 Å), anel guinolizidínico periférico/Ala<sub>180</sub> (hidrofóbica; 4,81 Å), anel guinolizidínico periférico/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 5,37 Å), anel guinolizidínico periférico/Lys<sub>254</sub> (hidrofóbica; 5,45 Å), anel guinolizidínico central/Ala<sub>180</sub> (hidrofóbica; 4,34 Å), anel guinolizidínico central/Leu<sub>248</sub> (hidrofóbica; 5,23 Å), anel guinolizidínico central/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 5,38 Å), anel aromático central/Lys<sub>250</sub> (CH/π; 5,38 Å), anel aromático central/Lys<sub>352</sub> (CH/π; 5,39 Å), anel metóxi benzeno/Lys<sub>352</sub> (CH/π; 4,19 Å), anel hidróximetóxi benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/π; 3,83 Å), anel hidróxi metóxi benzeno/Ala<sub>250</sub> (CH/π; 4,83 Å), anel hidróximetóxi benzeno/Leu<sub>255</sub> (CH/π; 4,54 Å).

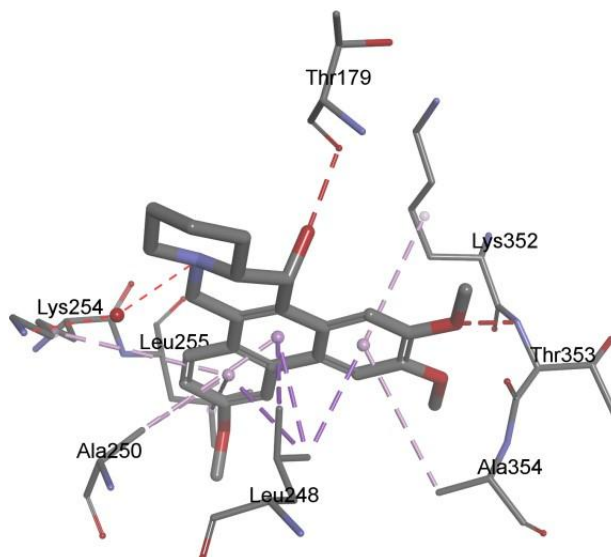
**Figura 39.** Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da *R*-criptopleurina e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina.



Nitrogênio da guinolizidina/água/água/Lys<sub>254</sub> (ligação de hidrogênio indireta; 1,71 Å, 2,83 Å, 2,58 Å), anel guinolizidínico periférico/Ala<sub>180</sub> (hidrofóbica; 4,53 Å), anel guinolizidínico periférico/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 5,14 Å), anel guinolizidínico periférico/Lys<sub>254</sub> (hidrofóbica; 5,05 Å), anel guinolizidínico central/Ala<sub>180</sub> (hidrofóbica; 5,08 Å), anel guinolizidínico central/Leu<sub>248</sub> (hidrofóbica; 4,85 Å), anel guinolizidínico central/Ala<sub>250</sub> (hidrofóbica; 4,38 Å), anel guinolizidínico central/Lys<sub>254</sub> (hidrofóbica; 5,27 Å), anel aromático central/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,34 Å), anel aromático central/Ala<sub>250</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,39 Å), anel aromático central/Lys<sub>352</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,43 Å), anel metóxi-benzeno/Ala<sub>346</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,97 Å), anel metóxi-benzeno/Lys<sub>352</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,03 Å), anel dimetóxi-benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,71 Å), anel dimetóxi-benzeno/Ala<sub>250</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,94 Å), anel dimetóxi-benzeno/Leu<sub>255</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,58 Å), metila do anel dimetóxi-benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,23 Å), metila do anel dimetóxi-benzeno/Ala<sub>250</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,68 Å), metila do anel dimetóxi-benzeno/Ala<sub>346</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,80 Å), metila do anel dimetóxi-benzeno/Ile<sub>318</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,23 Å), metila do anel dimetóxi-benzeno/Ile<sub>378</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,49 Å).



**Figura 40.** Principais interações intermoleculares realizadas entre a pose de docagem da *R*-(15*R*)-hidróxicriptopleurina e os principais resíduos de aminoácido do subsítio colchicina da tubulina.



Nitrogênio da guinolizidina/água/Lys<sub>254</sub> (ligação de hidrogênio indireta; 2,88 Å, 2,58 Å), hidroxila do anel guinolizidínico/Thr<sub>179</sub> (ligação de hidrogênio; 2,56 Å), anel aromático central/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,14 Å, 3,14 Å, 3,52 Å), anel aromático central/Ala<sub>250</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,65 Å), anel metóxi-benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,92 Å), anel metóxi-benzeno/Ala<sub>250</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,48 Å), anel metóxi-benzeno/Lys<sub>254</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,24 Å), anel metóxi-benzeno/Leu<sub>255</sub> (CH/ $\pi$ ; 5,24 Å), anel dimetóxi-benzeno/Leu<sub>248</sub> (CH/ $\pi$ ; 3,61 Å), anel dimetóxi-benzeno/Lys<sub>352</sub> (CH/ $\pi$ ; 4,32 Å), grupo metóxi do anel dimetóxi-benzeno/Thr<sub>353</sub> (ligação de hidrogênio; 2,48 Å).

#### 4.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

##### 4.4.1. RESULTADO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO*

##### 4.4.1.1. Extrato bruto etanólico (EB2) pelas vias oral e intraperitoneal

A avaliação da toxicidade aguda do EB2 foi inicialmente realizada pela via de administração intraperitoneal (i.p) com as doses de 1000 e 500 mg Kg<sup>-1</sup>.

Após a administração da dose de 1000 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2 no primeiro camundongo observou-se que o animal apresentou diminuição do comportamento exploratório e sinais sugestivos de depressão do sistema nervoso central, comparativamente ao animal tratado apenas com veículo, além de piloereção, taquipneia (aumento da frequência respiratória) e ptose palpebral. Após o período de observação de 4 horas, o animal ainda apresentava sinais de depressão do sistema nervoso central e, após 24 horas, este animal veio a óbito.

No dia seguinte, apesar do protocolo da OECD preconizar a possibilidade de confirmação da toxicidade da dose de  $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ , optou-se pela avaliação de uma dose menor. Assim, um camundongo recebeu a dose de  $500 \text{ mg Kg}^{-1}$  de EB2, por via i.p., e foi observado por 4 horas. Durante a observação, o animal apresentou sinais sugestivos de depressão do sistema nervoso central e diminuição da atividade locomotora/exploratória comparativamente ao animal tratado apenas com veículo, além de piloereção e taquipneia. Após 4 horas de observação, o animal ainda apresentava sinais sugestivos de depressão do sistema nervoso central sendo que, ao final de 24 horas, o animal apresentava o comportamento normal para a espécie (Lapa et al., 2008).

Com esse resultado, mais dois animais foram tratados com  $500 \text{ mg Kg}^{-1}$  de EB2, por via i.p., e foram observadas as mesmas alterações comportamentais do primeiro animal tratado com essa dose. Durante o período de 14 dias, não foram observadas alterações comportamentais, sinais de toxicidade e alteração do peso corpóreo. Em cada um dos dias de tratamento, um animal foi tratado com veículo (controle negativo,  $10 \text{ mL Kg}^{-1}$ , i.p.) e esses animais ( $n = 3$  camundongos) apresentaram o comportamento padrão para a espécie durante todo o experimento (Lapa et al., 2008).

Em seguida, avaliou-se a toxicidade aguda de EB2 pela via oral (v.o.). O primeiro camundongo recebeu a dose de  $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$  e, durante a observação inicial de 4 horas, o animal apresentou diminuição do comportamento exploratório em comparação com o animal tratado apenas com veículo, além de piloereção, taquipneia e ptose palpebral. Após 24 horas, o animal apresentava o comportamento normal para a espécie (Lapa et al., 2008) e assim, mais dois animais foram administrados com  $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$  apresentando os mesmos sinais observados para o primeiro animal. Durante o período de 14 dias, não foram observadas alterações comportamentais, sinais de toxicidade e alteração do peso corpóreo. Em cada um dos dias de experimento, um animal foi tratado com veículo (controle negativo,  $10 \text{ mL Kg}^{-1}$ , v.o.) e esses animais ( $n = 2$  camundongos) apresentaram o comportamento padrão para a espécie durante todo o experimento (Lapa et al., 2008).

#### **4.4.1.2. Fração rica em alcaloides**

Os testes de toxicidade aguda da fração rica em alcaloides foram iniciados através da administração pela via intraperitoneal. Assim, o primeiro camundongo recebeu a dose de  $300 \text{ mg Kg}^{-1}$  via i.p. e, após 7 minutos da administração de FA, o animal apresentou

sialorreia, convulsão e morte por parada respiratória. Um segundo animal recebeu a mesma dose e veio a óbito com as mesmas características.

Com esses resultados, um terceiro animal foi então tratado com a metade da dose, ( $150 \text{ mg Kg}^{-1}$ , i.p.). Durante as quatro horas iniciais de observação, esse animal apresentou piloereção nas primeiras 2 horas, seguido de sinais sugestivos de depressão do sistema nervoso central e diminuição do comportamento exploratório, em comparação com o animal que foi tratado apenas com veículo, além de ptose palpebral e taquipneia. Ao final das primeiras 24 horas, o animal voltou a apresentar o comportamento normal para a espécie (Lapa et al., 2008). Desta forma, mais três animais receberam a dose de  $150 \text{ mg Kg}^{-1}$  pela via i.p. apresentando as mesmas alterações descritas para o primeiro animal da dose de  $150 \text{ mg Kg}^{-1}$  de FA; apenas um animal apresentou um quadro de diarreia. Durante o período de 14 dias, não foram observadas quaisquer alterações comportamentais, sinais de toxicidade ou alteração do peso corpóreo. Em cada um dos dias de experimento, um animal foi tratado com veículo (controle negativo,  $10 \text{ mL Kg}^{-1}$ , i.p.) e esses animais ( $n = 3$  camundongos) apresentaram o comportamento padrão para a espécie durante todo o experimento (Lapa et al., 2008).

Finalmente, a toxicidade aguda da FA foi determinada pela via oral, com a dose de  $300 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Um animal foi tratado com  $300 \text{ mg Kg}^{-1}$  e foi observado por 4 horas. Após as primeiras 2 horas, o animal começou a apresentar as alterações como piloereção e sinais sugestivos de depressão do sistema nervoso central, comparativamente ao animal tratado apenas com veículo, sinais estes que persistiram até o final das 4 horas. Antes de completar 24h do tratamento, o animal apresentava tremor e diarreia hemorrágica e após 24h o animal veio a óbito. O camundongo tratado com veículo apresentou o comportamento padrão para a espécie durante todo o experimento (Lapa et al., 2008).

Com esses resultados e visando priorizar os estudos farmacológicos em função da quantidade disponível da fração rica em alcaloides, optou-se por não prosseguir a avaliação de toxicidade aguda pela via oral de FA. Assim os testes farmacológicos com esta fração utilizaram, como dose máxima,  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$ , portanto 10x menor do que a dose tóxica.

#### 4.4.2. RESULTADO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO (EB2) E DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES (FA) EM MODELOS DE TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

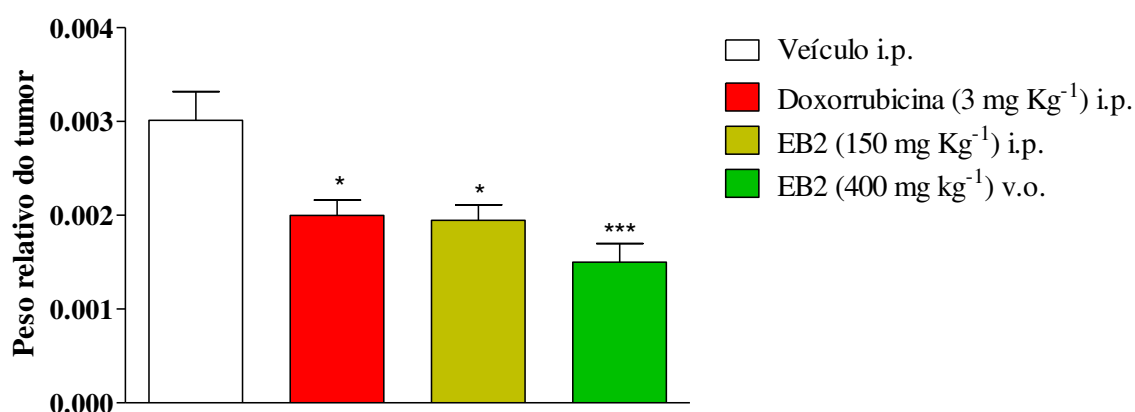
##### 4.4.2.1. Avaliação de EB2 em de tumor sólido de Ehrlich no flanco de camundongos

###### 4.4.2.1.1. Atividade antitumoral

Com relação ao peso do tumor, avaliado no final do experimento, os tratamentos com doxorrubicina ( $3 \text{ mg Kg}^{-1}$  - via i.p.) e EB2 ( $150 \text{ mg Kg}^{-1}$  - via i.p.;  $400 \text{ mg Kg}^{-1}$  - v.o.) diminuíram significativamente o crescimento tumoral em 38,51% ( $0,0415\text{g} \pm 0,009$ ), 38,07% ( $0,0418\text{g} \pm 0,01$ ) e 57,62% ( $0,0286\text{g} \pm 0,011$ ), respectivamente, em relação ao grupo tratado com o veículo ( $0,0675\text{g} \pm 0,019$ ).

Em concordância com esses dados, o peso relativo das massas tumorais (razão do peso da massa do tumor/peso animal) também foi inibido em 33,88% ( $0,00199 \pm 0,0003$ ) para o quimioterápico doxorrubicina ( $p < 0,05$ ), 35,5% ( $0,00194 \pm 0,0004$ ) para o grupo tratado com  $150 \text{ mg Kg}^{-1}$  EB2 por via i.p. ( $p < 0,05$ ) e 50,2% ( $0,00150 \pm 0,0004$ ) para a dose de  $400 \text{ mg Kg}^{-1}$  de EB2 por via oral ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com o veículo ( $0,00301 \pm 0,0007$ ) (Fig. 41). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados.

**Figura 41.** Peso relativo do tumor sólido de Ehrlich no flanco ao final de dez dias de tratamento.



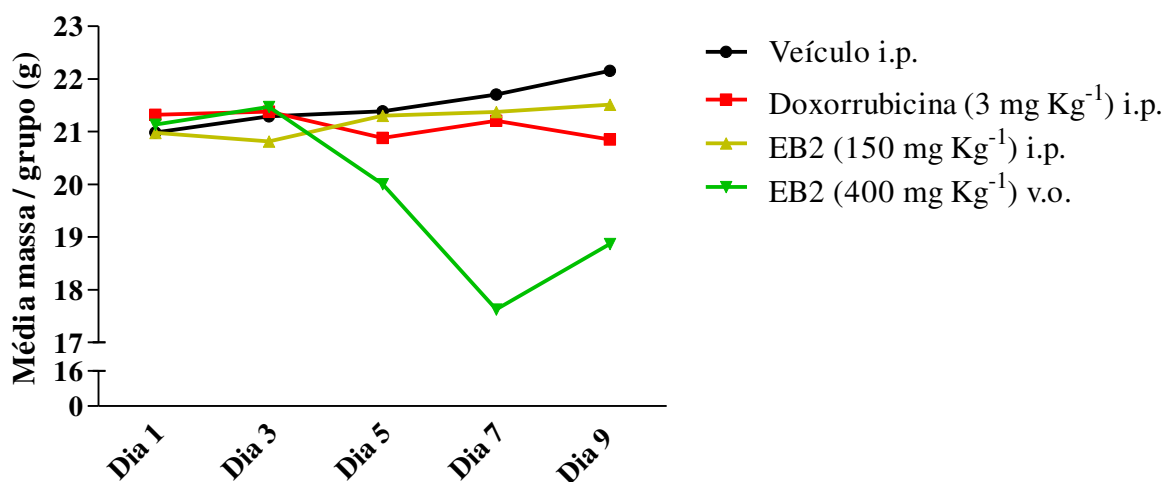
Peso relativo das massas tumorais calculadas através da razão entre o peso do tumor e o peso corporal; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 6$  animais/grupo). Controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%); Controle positivo: doxorrubicina; EB2: extrato bruto etanólico das partes aéreas de *B. caudata* obtido após a extração com o diclorometano. v.o.: via oral; i.p.: via intraperitoneal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

#### 4.4.2.1.2. Evolução do peso corporal, parâmetros sanguíneos e biometria dos órgãos

##### *Evolução do peso corporal*

Durante o experimento, os animais foram pesados, em dias alternados, e observados quanto a possíveis sinais de toxicidade (Fig. 42). Os animais tratados com a dose de 400 mg Kg<sup>-1</sup> (i.p.) de EB2 apresentaram a partir do 5º dia de experimento uma perda de peso corporal (Figura 42), chegando a 3,5 g/animal (16,6%) no 7º dia, associada, a partir do 6º dia de tratamento, a sinais de toxicidade (piloereção e diarreia com um animal apresentando prolapso retal). Em função desses sinais, os animais deste grupo (400 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p.) não foram tratados entre os 7º - 9º dia; essa interrupção de tratamento foi acompanhada por um ganho de peso corporal (em média 1,2 g/animal em três dias) sugerindo a reversibilidade dos sinais de toxicidade.

**Figura 42.** Evolução do peso corporal durante o experimento de tumor sólido de Ehrlich no flanco em função dos tratamentos.



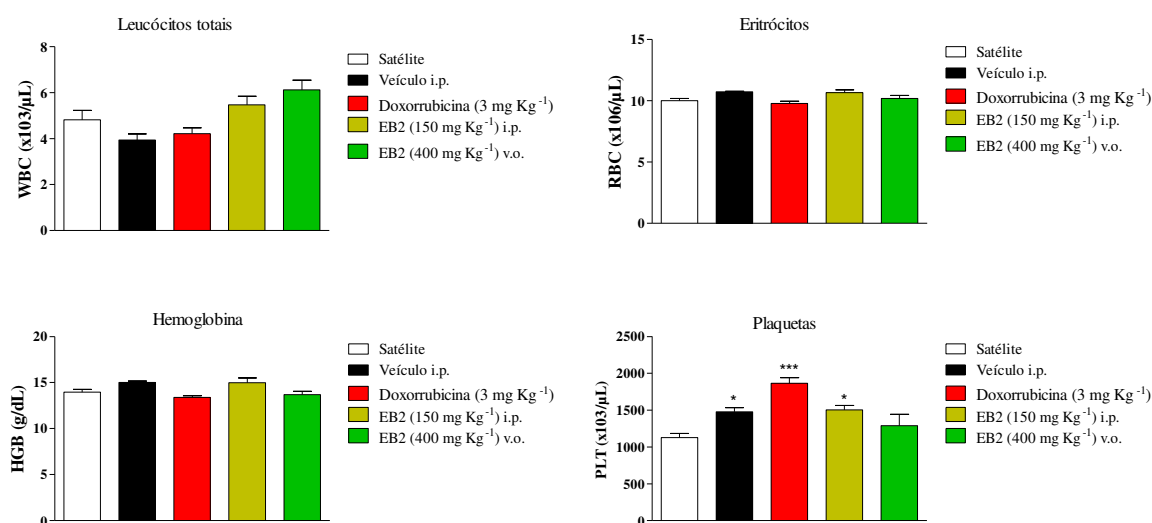
Evolução do peso da massa corporal durante os 10 dias de tratamento; resultados expressos como média de cada grupo experimental (n = 6 animais/grupo). Controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%); Controle positivo: doxorrubicina; EB2: extrato bruto etanólico das partes aéreas de *B. caudata* obtido após a extração com o diclorometano. v.o.: via oral; i.p.: via intraperitoneal.

##### *Parâmetros sanguíneos*

Os valores de leucócitos totais, eritrócitos e hemoglobina não apresentaram diferenças significativas entre todos os grupos experimentais (veículo, doxorrubicina e EB2, nas doses de 150 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p., e 400 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.) comparados entre si e em relação ao grupo satélite (Fig. 43).

No entanto, em relação às plaquetas, os animais do grupo controle negativo (veículo) e tratado com a dose de 150 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2 apresentaram um pequeno aumento na quantidade de plaquetas ( $p < 0,05$ ) enquanto os animais tratados com doxorubicina apresentaram aumento mais significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo satélite.

**Figura 43.** Parâmetros sanguíneos dos camundongos Balb/c fêmeas ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich no flanco em função dos tratamentos e em comparação com o grupo satélite.



Hemograma do sangue total na presença de EDTA: Leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hgb) e plaquetas (Plt). Grupos = controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%), controle positivo: doxorubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup> i.p.); grupos experimentais: EB2 (150 mg Kg<sup>-1</sup> i.p. e 400 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.); i.p.: via intraperitoneal, v.o.: via oral, EB2: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano. \*  $p < 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo satélite (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

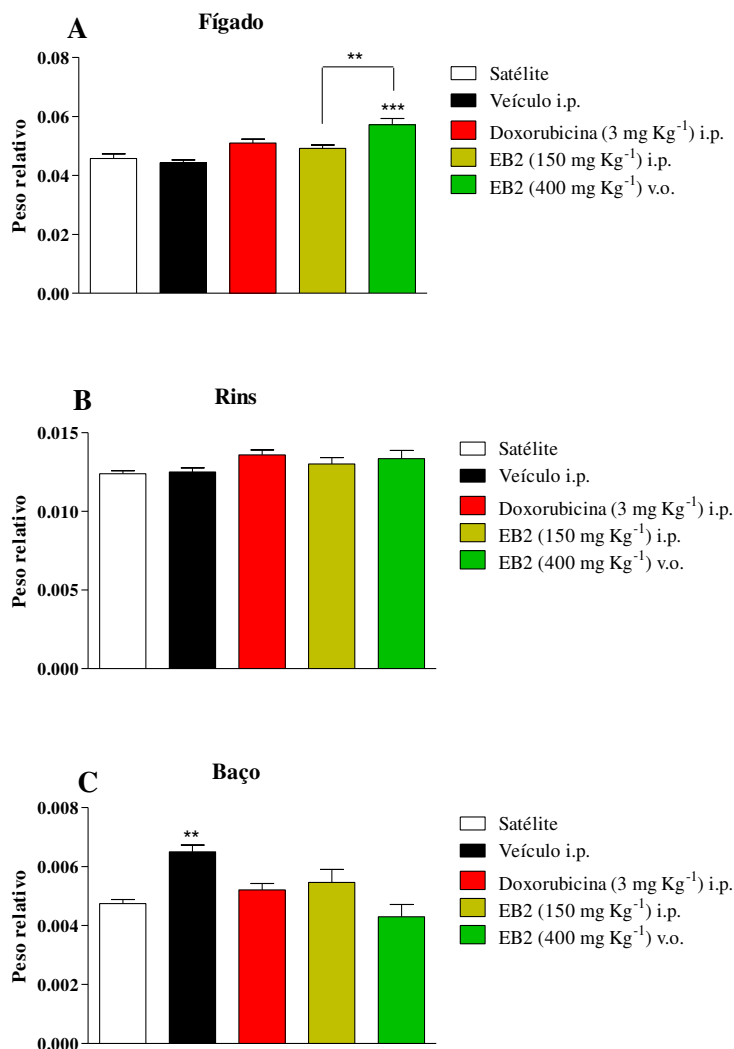
### *Biometria dos órgãos*

No final do experimento, após a eutanásia dos camundongos, os órgãos (fígado, rins e baço) foram retirados e avaliados macroscopicamente a fim de evidenciar possíveis sinais de toxicidade; não foram observadas quaisquer alterações macroscópicas em nenhum dos órgãos avaliados. De maneira semelhante, o peso relativo dos rins não indicou variações significativas entre os grupos tratados (veículo, doxorubicina e EB2) em relação ao grupo satélite (Fig. 44).

Em relação ao fígado, somente o tratamento com EB2 por via oral (400 mg Kg<sup>-1</sup>) promoveu um aumento no peso relativo estatisticamente significativo em relação aos animais

do grupo satélite ( $p < 0,001$ ) e do grupo EB2 i.p. ( $150 \text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ) (Fig. 44). Por fim, apenas o grupo tratado com veículo apresentou um aumento significativo no peso relativo do baço, quando comparado ao grupo satélite ( $P < 0,01$ ) (Fig. 44).

**Figura 44.** Avaliação do peso relativo dos órgãos dos camundongos Balb/c fêmeas ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich no flanco em função dos tratamentos e em comparação com o grupo satélite.



Peso relativo dos órgãos = peso do órgão dividido pelo peso do animal. (A) Peso relativo do fígado. (B) Peso relativo do rim. (C) Peso relativo do baço. Grupos = controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%), controle positivo: doxorubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup> i.p.); grupos experimentais: EB2 (150 mg Kg<sup>-1</sup> i.p. e 400 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.); i.p.: via intraperitoneal, v.o.: via oral, EB2: extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano. \* p<0,05, \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo satélite (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

#### 4.4.2.2. Avaliação de FA no modelo de tumor sólido de Ehrlich na pata

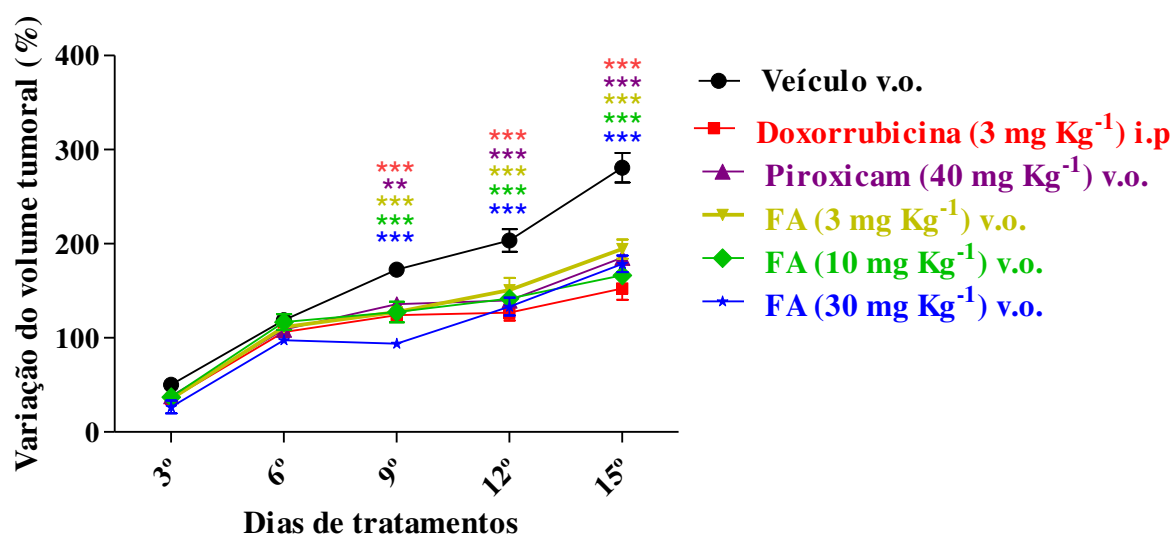
##### 4.4.2.2.1. Atividade antitumoral

Após a obtenção de resultados promissores do tratamento dos animais com o extrato bruto etanólico foi realizado estudo para avaliar a atividade antitumoral da fração rica em alcaloides.



A variação do volume tumoral (%) dos grupos (controles negativo, positivos e grupos experimentais) foi avaliada a cada 3 dias, até o final do tratamento no 15º dia. Todos os grupos tratados apresentaram uma redução, estatisticamente significativa, na variação do volume tumoral, em relação ao controle negativo, a partir do 9º dia ( $p < 0,001$ ) (Fig. 45).

**Figura 45.** Variação do volume tumoral no modelo de tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos.

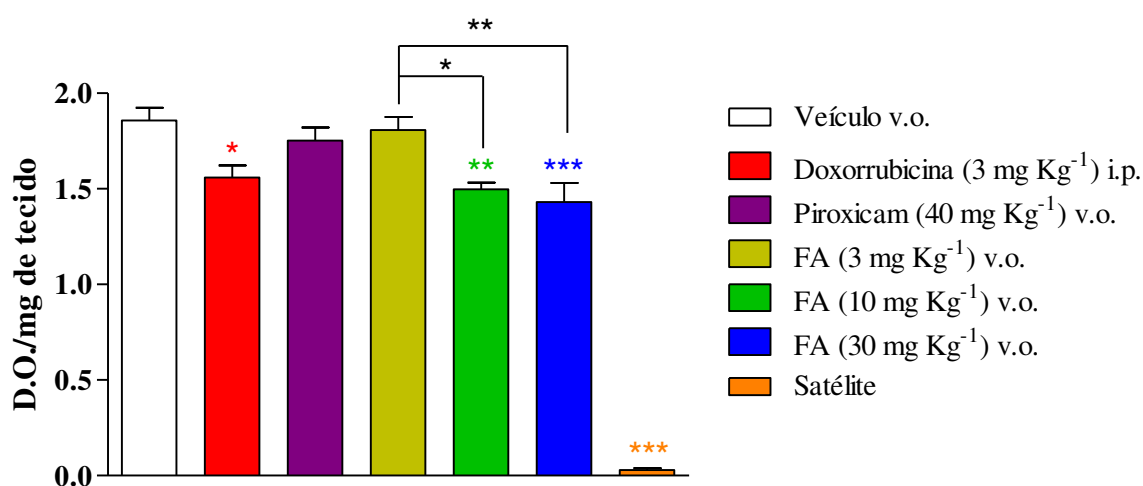


A progressão do tumor sólido de Ehrlich foi avaliada pelo cálculo da variação do volume tumoral, expressa em porcentagem. Grupos = controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%), controles positivos: doxorrubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup> i.p.) e piroxicam (40 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.); grupos experimentais: FA (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.); i.p.: via intraperitoneal; v.o.: via oral, FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

Considerando-se a variação do volume tumoral medida no último dia do experimento, a doxorrubicina inibiu a progressão tumoral em 45,67% ( $152,62 \pm 31,84$ ) enquanto o piroxicam inibiu o tumor em 34,13% ( $185,03 \pm 7,56$ ), quando comparados com o grupo tratado com o veículo. Por sua vez, FA inibiu a progressão tumoral de 30 a 40%, de maneira independente da dose (não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes entre as três doses de FA); assim a dose de 3 mg Kg<sup>-1</sup> inibiu o tumor em 30,82% ( $194,34 \pm 24,59$ ), a dose de 10 mg Kg<sup>-1</sup> inibiu o tumor em 40,71% ( $166,56 \pm 9,85$ ) e por fim, a dose de 30 mg Kg<sup>-1</sup> inibiu o tumor em 36,41% ( $178,64 \pm 21,91$ ) em relação ao grupo veículo ( $280,91 \pm 38,27$ ).

Além da variação do volume tumoral, foi avaliada a ação da FA sobre a migração e/ou ativação dos neutrófilos, através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Esta medida fornece um indicativo indireto da presença dos neutrófilos no microambiente tumoral, uma vez que esta enzima se encontra nos granulócitos presentes nos neutrófilos (Figura 46).

**Figura 46.** Dosagem de mieloperoxidase da pata de camundongos 15 dias após a inoculação de células tumorais de Ehrlich em função dos tratamentos.



Atividade de MPO expressa como D.O. (densidade óptica) por miligrama de tecido da pata com (grupos veículo, controles positivos e FA) ou sem (grupo satélite) tumor sólido de Ehrlich. Grupos = controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%), controles positivos: doxorubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup> i.p.) e piroxicam (40 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.); grupos experimentais: FA (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> v.o.), satélite: animais sem inóculo das células tumorais e sem tratamento. i.p.: via intraperitoneal; v.o.: via oral, FA: fração rica em alcaloides. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

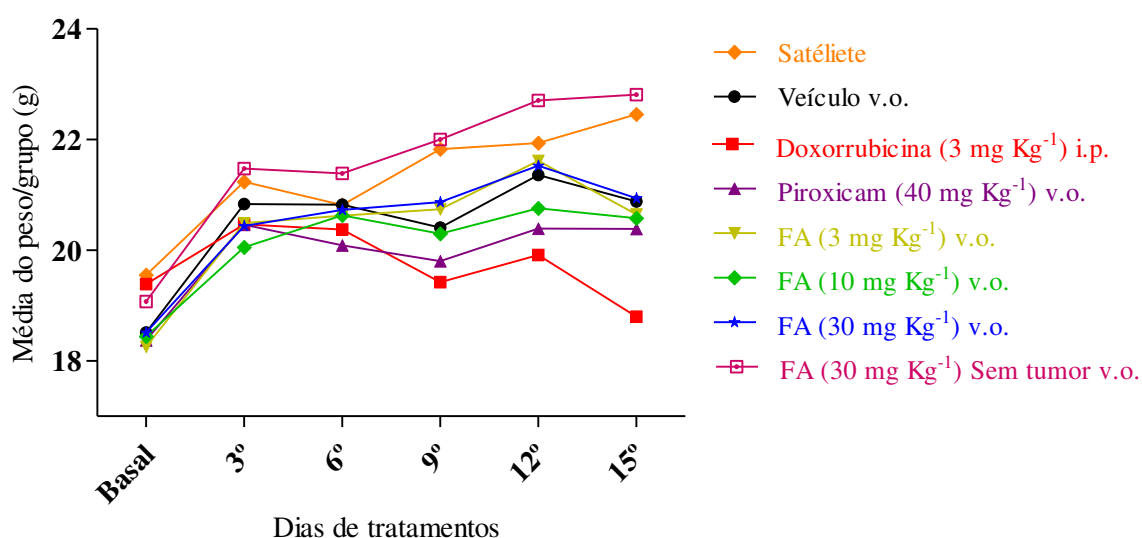
Nesse experimento o tumor de Ehrlich promoveu uma grande migração e infiltração de neutrófilos para o microambiente, uma vez que os animais do grupo veículo apresentaram cerca de 10x mais MPO do que o grupo satélite. Com relação aos controles positivos, os animais tratados com doxorubicina apresentaram uma redução de 16,03% na dosagem de MPO em relação ao grupo veículo, enquanto os animais tratados com piroxicam não apresentaram redução estatisticamente significativa (Figura 46). Finalmente, as duas maiores doses de FA (10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>) promoveram redução na dosagem de MPO na pata com tumor de Ehrlich (19,35%, p<0,05, e 22,90%, p<0,01, respectivamente, figura 46) caracterizando um perfil diferente daquele observado para a variação do tumor na pata, no qual não foram observadas diferenças entre as três doses avaliadas (Figura 45).

#### 4.4.2.2.2. Evolução do peso corporal, parâmetros sanguíneos, análise bioquímica e biometria dos órgãos

##### *Evolução do peso corporal*

Durante todo experimento, os animais tratados com piroxicam e os grupos experimentais (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA) não tiveram perda de peso corporal, no entanto, o grupo tratado com doxorrubicina apresentou a partir do 9º dia de tratamento, perda de massa que atingiu 3,09% no 15º dia de tratamento (Figura 47).

**Figura 47.** Variação do peso corporal de camundongos durante 15 dias de experimento do tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos.



Controle negativo: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%). Controles positivos: Doxorrubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup>) e Piroxicam (40 mg Kg<sup>-1</sup>), grupos experimentais: 3,10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA. i.p.: via intraperitoneal, v.o.: via oral, FA: fração rica em alcaloides.

##### *Parâmetros sanguíneos*

Os parâmetros sanguíneos foram avaliados estatisticamente, sendo os grupos veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%), os controles positivos (doxorrubicina e piroxicam) e grupos experimentais (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA) comparados aos animais do grupo satélite (Fig. 48).

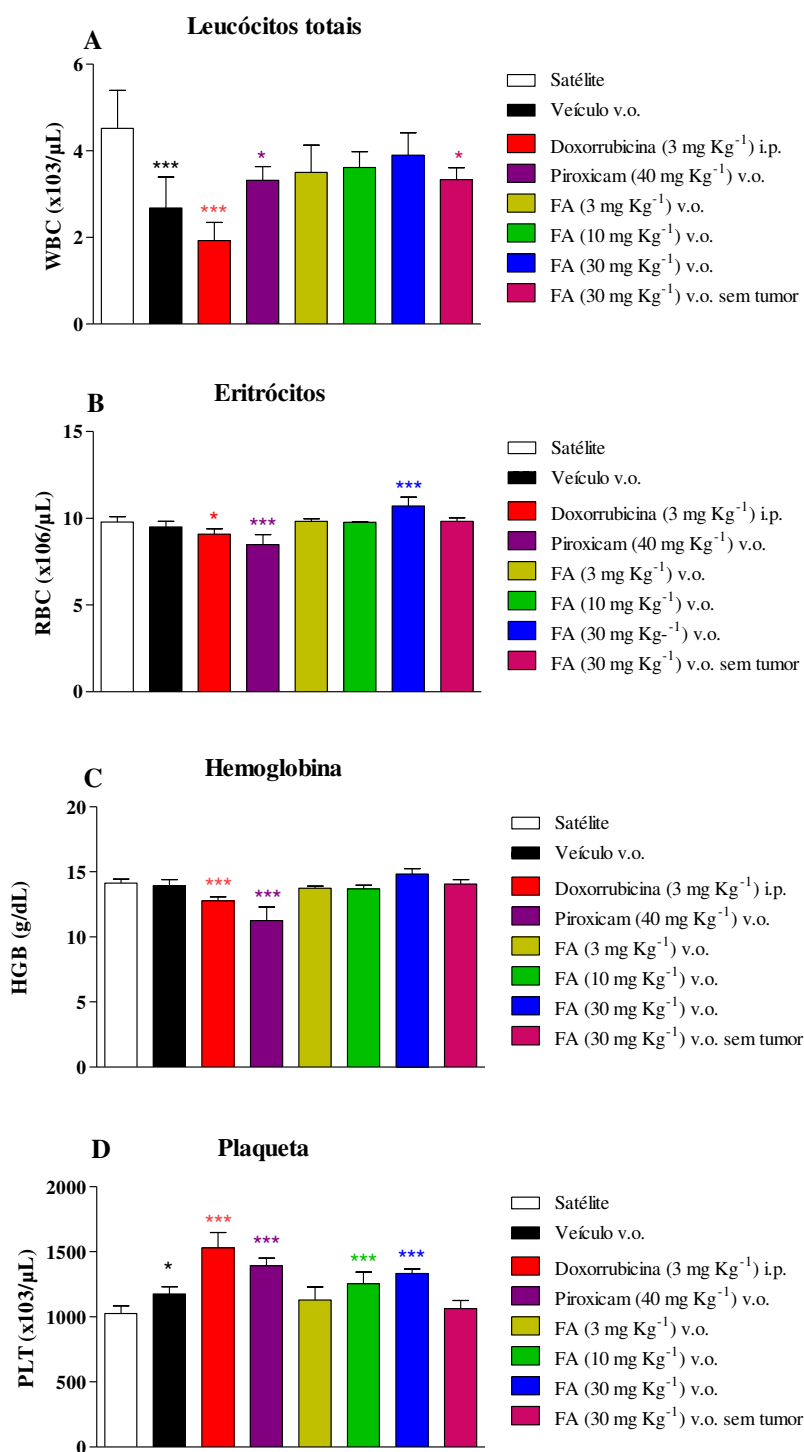
Em relação à contagem total de leucócitos (WBC), os animais tratados com veículo e aqueles tratados com doxorrubicina apresentaram leucopenia ( $p < 0,001$ ) em relação aos animais do grupo satélite, enquanto os animais tratados com piroxicam e os tratados com 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA sem tumor (Fig. 48A) apresentaram uma pequena diminuição em WBC em

relação ao satélite ( $p<0,05$ ). Para os eritrócitos (RBC), os tratamentos com doxorubicina ( $p<0,05$ ) e piroxicam ( $p<0,001$ ) promoveram uma pequena diminuição no número total de eritrócitos enquanto os animais com tumor de Ehrlich tratados com FA na maior dose ( $30 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) apresentaram um pequeno aumento em RBC ( $p<0,05$ ) (Fig. 48B). Em relação à hemoglobina, somente os grupos controle positivo tiveram uma diminuição ( $p<0,001$ ) (Fig. 48C). Por fim, para as plaquetas, houve um aumento no número das plaquetas para os grupos veículo ( $p<0,05$ ), doxorubicina, piroxicam e experimentais ( $10$  e  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$  de FA) ( $p<0,001$ ) (Figura 48D).

#### *Análise bioquímica*

Em relação à análise bioquímica foi realizada a análise estatística entre os grupos: controle negativo os controles positivos: doxorubicina e piroxicam e grupos experimentais ( $3,10$  e  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$  de FA) em relação ao grupo satélite para os parâmetros: gamaglutamiltransferase e da creatinina. Não houve diferença estatística para nenhum grupo.

**Figura 48.** Avaliação dos parâmetros sanguíneos de camundongos ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos.



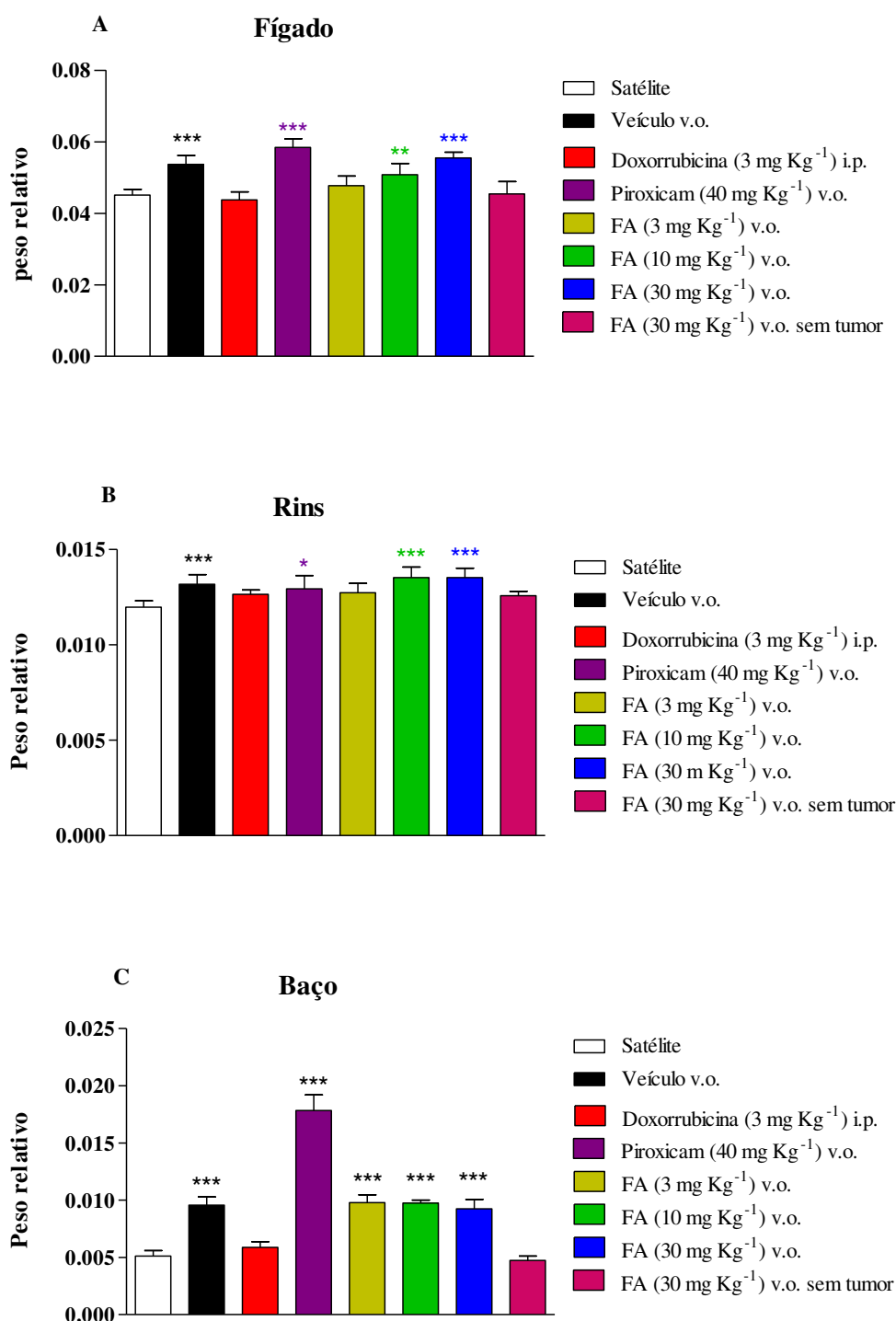
Hemograma do sangue total: Leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hgb) e plaquetas (Ptl), resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%), controles positivos: Doxorubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup>) e Piroxicam (40 mg Kg<sup>-1</sup>), grupos experimentais: 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA. i.p.: via intraperitoneal, v.o.: via oral, FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo satélite (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

*Biometria dos órgãos*

A biometria dos órgãos dos animais dos grupos veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%), controles positivos (doxorrubicina 3 mg Kg<sup>-1</sup> e piroxicam 40 mg Kg<sup>-1</sup>) e experimentais (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA) foram avaliados estatisticamente em relação ao grupo satélite (Fig. 49).

Em relação ao fígado, houve um aumento no peso relativo do órgão para os grupos veículo, tratado com piroxicam e tratados com 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA ( $p < 0,001$ ) e com 10 mg Kg<sup>-1</sup> de FA ( $p < 0,01$ ) (Fig. 49A). Em relação ao rim, houve um pequeno aumento no peso relativo para os grupos veículo, tratados com 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA ( $p < 0,001$ ) e com piroxicam ( $p < 0,05$ ) (Fig. 49B). Por fim, observou-se um aumento no peso relativo do baço nos animais tratados com piroxicam, veículo e FA (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>) ( $p < 0,001$ ) (Fig. 49C).

**Figura 49.** Avaliação do peso relativo dos órgãos de camundongos ao final do experimento de tumor sólido de Ehrlich na pata em função dos tratamentos.



Peso relativo dos órgãos = peso do órgão dividido pelo peso do animal, resultados expressos como média ± erro padrão. (A) Peso relativo do fígado. (B) Peso relativo do rim. (C) Peso relativo do baço. Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%), controles positivos: Doxorubicina (3 mg Kg<sup>-1</sup>) e Piroxicam (40 mg Kg<sup>-1</sup>), grupos experimentais: 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA. i.p.: via intraperitoneal, v.o.: via oral, FA: fração rica em alcaloides. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo satélite (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

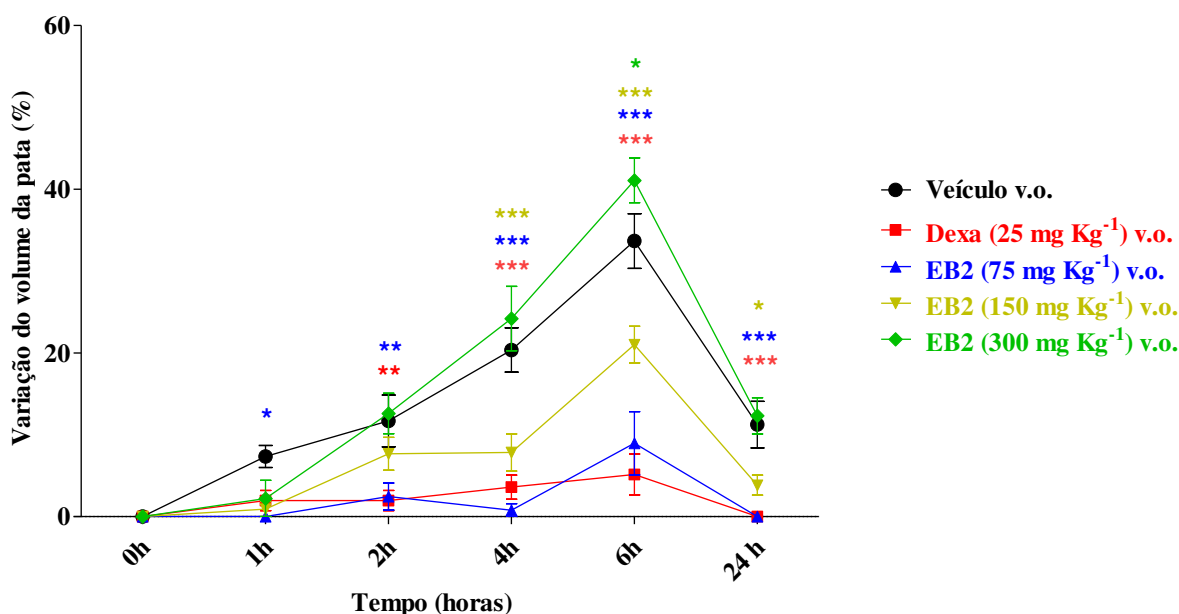
### 4.4.3. RESULTADO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO (EB2) E DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES (FA) EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO

#### 4.4.3.1. Edema de pata induzido por carragenina

##### 4.4.3.1.1. Extrato bruto etanólico

A variação do edema de pata induzido por carragenina (Figura 50) e a inibição do edema (Tabela 18) para os grupos veículo, dexametasona e experimentais tratados com EB2 foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

**Figura 50.** Avaliação do extrato bruto etanólico (EB2) de *Boehmeria caudata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina.



Edema de pata induzida por carragenina representado pela variação do edema (%), resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%, v.o.), controle positivo: Dexametasona (Dexa - 25 mg Kg<sup>-1</sup>, v.o.), grupos experimentais: 75, 150 e 300 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2, v.o.: via oral, EB2 extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (Two way ANOVA – seguido pelo teste de Bonferroni).



**Tabela 18.** Avaliação da variação do edema e da taxa de inibição (%) promovida por EB2 no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

| Grupo          | Dose                   | 1 h <sup>a</sup> |       | 2 h <sup>a</sup> |         | 4 h <sup>a</sup> |           | 6 h <sup>a</sup> |          |
|----------------|------------------------|------------------|-------|------------------|---------|------------------|-----------|------------------|----------|
|                |                        | MV ±DP           | %     | MV ±DP           | %       | MV ±DP           | %         | MV ±DP           | %        |
| <b>Veículo</b> | <b>10<sup>b</sup></b>  | 7,35 ± 3,29      | -     | 11,69 ± 7,72     | -       | 20,36 ± 6,05     | -         | 33,68 ± 7,47     | -        |
| <b>Dexa</b>    | <b>25<sup>c</sup></b>  | 1,96 ± 3,04      | 73,33 | 1,96 ± 3,04      | 83,23** | 3,60 ± 3,29      | 82,31***  | 5,15 ± 6,13      | 84,70*** |
|                | <b>75<sup>c</sup></b>  | 0,00 ± 0,00      | 100*  | 2,46 ± 4,05      | 78,95** | 0,79 ± 1,94      | 96,11***  | 8,97 ± 8,63      | 73,36*** |
| <b>EB2</b>     | <b>150<sup>c</sup></b> | 0,93 ± 2,27      | 87,34 | 7,69 ± 4,90      | 34,21   | 7,83 ± 5,09      | 61,54 *** | 21,02 ± 5,50     | 37,58*** |
|                | <b>300<sup>c</sup></b> | 2,22 ± 4,97      | 69,79 | 12,60 ± 4,93     | -7,78   | 23,30 ± 9,87     | -14,44    | 41,09 ± 6,70     | 22,00*   |

a) tempo após a indução do edema, b) dose expressa em mL Kg<sup>-1</sup>, c) dose expressa em mg Kg<sup>-1</sup>. Variação do edema (%): resultados expressos como média ± desvio padrão (MV ± DP), MV: média da variação do edema, DP: desvio padrão; taxa de inibição do edema (%): diferença da variação do edema dos grupos tratados em relação à variação do edema do grupo veículo dividido pela variação do edema do grupo veículo multiplicado por cem. Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%, v.o.), controle positivo: Dexametasona (Dexa - 25 mg Kg<sup>-1</sup>, v.o.), grupos experimentais: 75, 150 e 300 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2, v.o.: via oral, EB2 extrato bruto etanólico obtido após a extração com o diclorometano. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (Two way ANOVA – seguido pelo teste de Bonferroni).

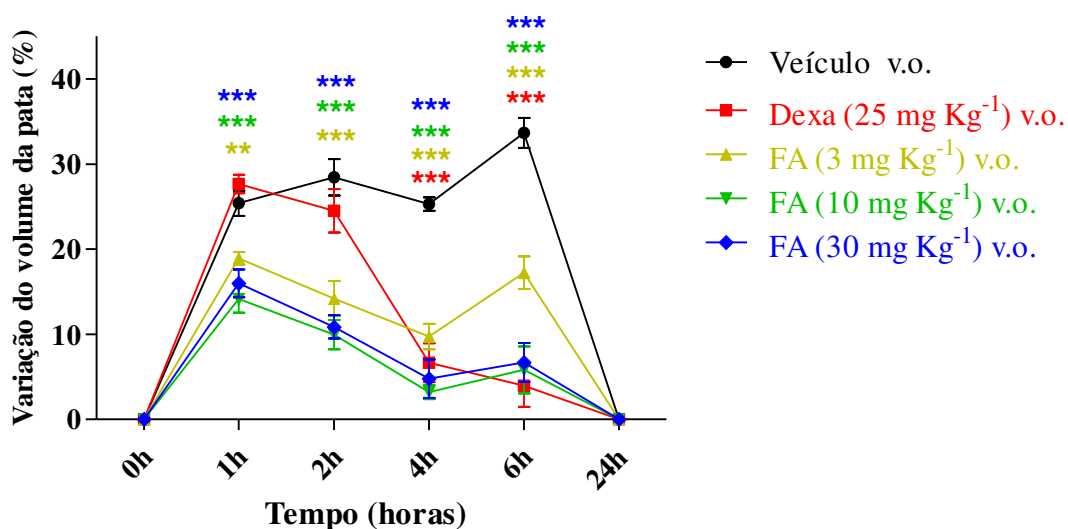
Observou-se neste experimento (Figura 50 e Tabela 18) que o efeito inibitório de EB2 sobre o edema induzido por carragenina teve uma relação inversamente proporcional entre a dose e o efeito, com a menor dose ( $75 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) de EB2 apresentando o maior efeito inibitório, com início do efeito já a partir da primeira hora de indução do edema pela carragenina ( $p < 0,001$ ). Para a dose de  $150 \text{ mg Kg}^{-1}$  de EB2, o efeito inibitório só foi significativo após 4 horas da indução do edema. No entanto, a maior dose ( $300 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) de EB2, além de não apresentar efeito inibitório sobre o edema induzido por carragenina, promoveu um pequeno aumento na variação do edema ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo veículo, após 6 horas da indução da carragenina. Por sua vez, a dexametasona (controle positivo) inibiu o desenvolvimento do edema, de maneira significativa em relação ao grupo veículo, após 2 horas da indução do edema pela carragenina.

#### 4.4.3.1.2. Fração rica em alcaloides

Dando sequência ao estudo da possível atividade anti-inflamatória, a fração rica em alcaloides foi avaliada em edema de pata induzido por carragenina em camundongos (Figura 51, Tabela 19).

Pode-se observar que o efeito antiedematogênico da FA não foi dependente dose administrada, pois os grupos tratados com as doses de 10 e  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$  de FA apresentaram perfil similar de variação do volume do edema ao longo do experimento (Figura 51). Já os animais tratados com dexametasona ( $25 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) apresentaram diminuição da variação do volume do edema a partir da quarta hora após a indução por carragenina (Figura 51).

**Figura 51.** Avaliação da fração rica em alcaloides no modelo de edema de pata induzido por carragenina.



Edema de pata induzida por carragenina representado pela variação do edema (%), resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%, v.o.), controle positivo: Dexametasona (Dexa - 25 mg Kg<sup>-1</sup>, v.o.), grupos experimentais: 3,10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA, v.o.: via oral, FA: fração rica em alcaloides. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (Two way ANOVA – seguido pelo teste de Bonferroni).

**Tabela 19.** Avaliação da variação do edema e da taxa de inibição (%) promovida por FA no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

| Grupo          | Dose                  | 1 hora              |       | 2 horas             |       | 4 horas            |       | 6 horas             |       |
|----------------|-----------------------|---------------------|-------|---------------------|-------|--------------------|-------|---------------------|-------|
|                |                       | MV $\pm$ DP         | %     | MV $\pm$ DP         | %     | MV $\pm$ DP        | %     | MV $\pm$ DP         | %     |
| <b>Veículo</b> | <b>10<sup>b</sup></b> | 25,39 $\pm$ 4,2     | -     | 28,44 $\pm$ 5,6     | -     | 25,30 $\pm$ 2,2    | -     | 33,66 $\pm$ 4,3     | -     |
| <b>Dexa</b>    | <b>25<sup>c</sup></b> | 27,67 $\pm$ 3,3     | -8,97 | 24,51 $\pm$ 6,3     | 13,81 | 6,66 $\pm$ 6,5**** | 73,67 | 3,95 $\pm$ 6,5****  | 88,26 |
|                | <b>3<sup>c</sup></b>  | 18,93 $\pm$ 2,1**   | 25,44 | 14,18 $\pm$ 5,5**** | 50,28 | 9,73 $\pm$ 4,3 *** | 61,54 | 17,23 $\pm$ 5,4**** | 48,81 |
| <b>FA</b>      | <b>10<sup>c</sup></b> | 14,14 $\pm$ 4,2**** | 44,36 | 9,96 $\pm$ 4,5****  | 64,97 | 3,19 $\pm$ 2,2 *** | 87,39 | 5,81 $\pm$ 7,3 ***  | 82,73 |
|                | <b>30<sup>c</sup></b> | 15,99 $\pm$ 4,6 *** | 37,02 | 10,87 $\pm$ 3,6**** | 61,77 | 4,77 $\pm$ 5,5**** | 81,14 | 6,69 $\pm$ 6,1****  | 80,72 |

a) tempo após a indução do edema, b) dose expressa em mL Kg<sup>-1</sup>, c) dose expressa em mg Kg<sup>-1</sup>. Variação do edema (%): resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (MV  $\pm$  DP), MV: média da variação do edema, DP: desvio padrão; taxa de inibição do edema (%): diferença da variação do edema dos grupos tratados em relação à variação do edema do grupo veículo dividido pela variação do edema do grupo veículo multiplicado por cem. Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%, v.o.), controle positivo: Dexametasona (Dexa - 25 mg Kg<sup>-1</sup>, v.o.), grupos experimentais: 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA, v.o.: via oral, EB2: fração rica em alcaloides. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (Two way ANOVA – seguido pelo teste de Bonferroni).

#### **4.4.3.2. Edema de orelha induzido por óleo de cróton**

##### **4.4.3.2.1. Administração do extrato bruto etanólico avaliado pelas vias tópica, intraperitoneal e oral**

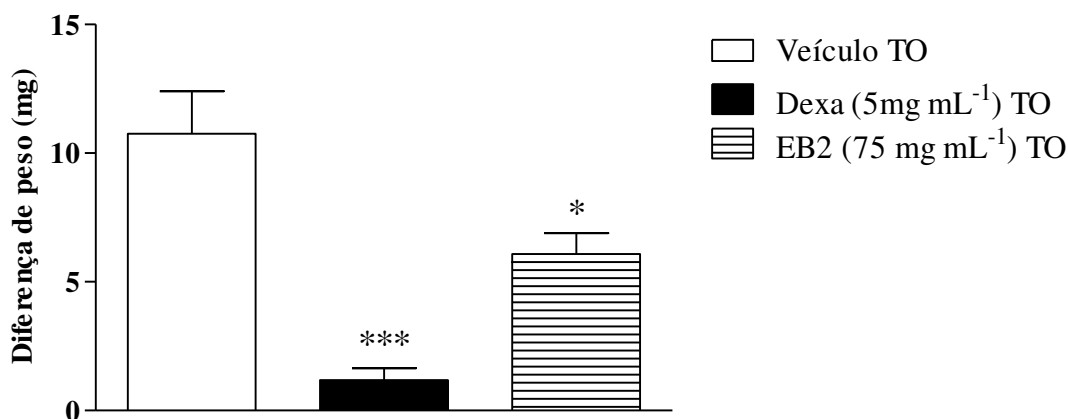
Neste experimento, a atividade do EB2 foi avaliada por três vias de administração (v.o., i.p. e TO, Figuras 52 - 54). Os resultados foram expressos com a média  $\pm$  erro padrão das diferenças dos pesos de porções iguais obtidas das orelhas (tratada e não tratada) dos animais de cada grupo experimental. Como no teste de edema de pata induzido por carragenina a dose mais eficiente do extrato bruto etanólico (EB2) foi a de 75 mg Kg<sup>-1</sup>, essa foi a dose escolhida para o teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Os tratamentos por via tópica com EB2 (75 mg mL<sup>-1</sup>) e com dexametasona (5 mg mL<sup>-1</sup>) produziram redução do edema [41,39% (6,3 mg  $\pm$  1,7) e 88,55% (1,23 mg  $\pm$  1,07), respectivamente] induzido por óleo de cróton, aplicado sobre a orelha dos camundongos, em relação com grupo veículo (10,75 mg  $\pm$  3,31) (Fig. 52).

De modo similar, o tratamento por via intraperitoneal com EB2 (75 mg Kg<sup>-1</sup>) e com dexametasona (5 mg Kg<sup>-1</sup>) produziram redução do edema [57,48% (4,2 mg  $\pm$  1,34) e 88,05% (1,18 mg  $\pm$  1,13), respectivamente] induzido por óleo de cróton, aplicado sobre a orelha dos camundongos, em relação ao grupo veículo (9,88 mg  $\pm$  1,78) (Fig. 53).

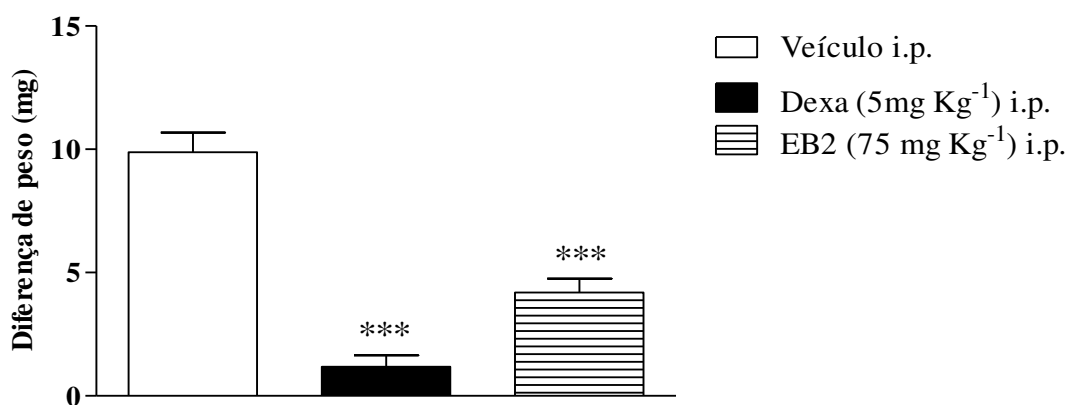
Finalmente, o tratamento por via oral com EB2 (75 mg Kg<sup>-1</sup>) e com dexametasona (5 mg Kg<sup>-1</sup>) reduziu o edema [62,02% (4,31 mg  $\pm$  0,71) e 88,89% (1,26 mg  $\pm$  1,04), respectivamente] induzido por óleo de cróton, aplicado sobre a orelha dos camundongos, em relação ao grupo veículo (11,35 mg  $\pm$  2,8) (Fig. 54).

**Figura 52.** Efeito da aplicação tópica de EB2 da *Boehmeria caudata* no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.).



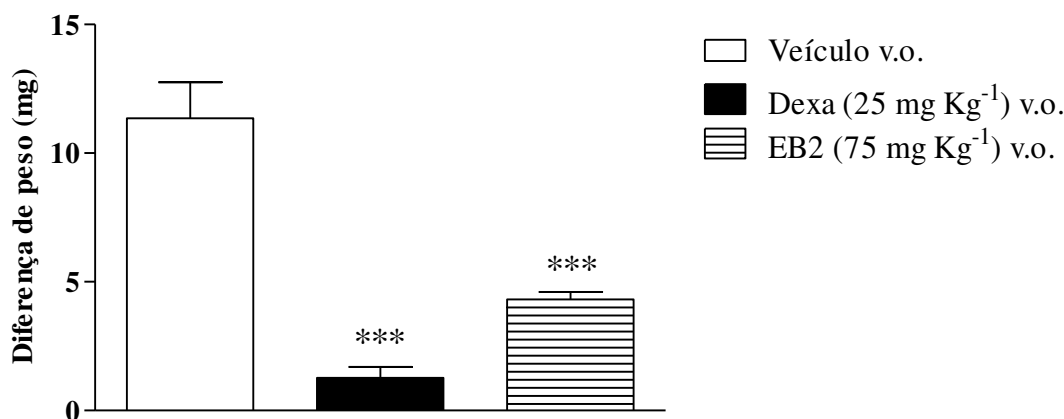
Edema de orelha induzido por óleo de cróton = diferença entre peso da orelha com inflamação induzida e o peso da orelha não inflamada; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; Grupos: veículo (controle negativo, acetona 70%, TO), controle positivo: Dexametasona (Dexta - 5 mg mL<sup>-1</sup>, TO), grupo experimental: 75 mg mL<sup>-1</sup> de EB2 TO: via tópica; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo. (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 53.** Efeito da administração intraperitoneal do EB2 de *Boehmeria caudata* no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.).



Edema de orelha induzido por óleo de cróton = diferença entre peso da orelha com inflamação induzida e o peso da orelha não inflamada; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%; i.p.), controle positivo: Dexametasona (Dexta - 5 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo experimental: 75 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2, i.p.: via intraperitoneal; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo. (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 54.** Efeito da administração por via oral do EB2 de *Boehmeria caudata* no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.).



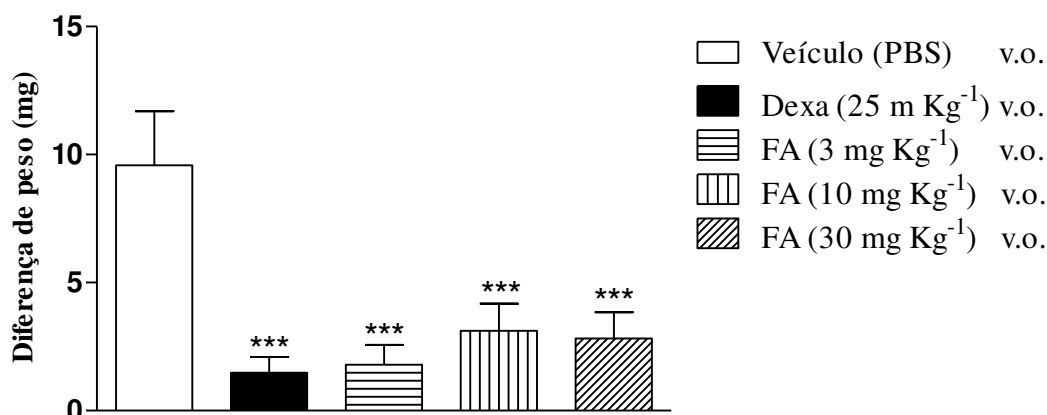
Edema de orelha induzido por óleo de cróton = diferença entre peso da orelha com inflamação induzida e o peso da orelha não inflamada; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%; v.o.), controle positivo: Dexametasona (Dexta - 25 mg Kg<sup>-1</sup>, v.o.), grupo experimental: 75 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2, v.o.: via oral; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo. (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

#### 4.4.3.2.2. Fração rica em alcaloides

No experimento de edema de orelha induzido por óleo de cróton foi avaliada a administração de FA em três doses (3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>) empregando-se duas vias de administração diferentes, as vias tópica e oral. Os resultados, expressos como média  $\pm$  erro padrão, refletiram a variação do edema de orelha (medido como diferença de peso), a taxa de inibição do edema (%) e dosagem de mieloperoxidase (expressa em D.O. por miligrama de tecido).

Assim, os tratamentos por via oral com FA e com dexametasona (controle positivo) reduziram o processo inflamatório produzido pelo óleo no cróton significativamente (Fig. 55); enquanto a dexametasona reduziu o edema em 84,55% ( $1,48 \pm 0,61$  mg), a FA promoveu uma redução de 81,21% ( $1,8 \pm 0,76$ ; 3 mg Kg<sup>-1</sup>), 67,43% ( $3,12 \pm 1,07$  mg; 10 mg Kg<sup>-1</sup>) e 70,56% ( $2,82 \pm 1,03$  mg; 30 mg Kg<sup>-1</sup>) em relação ao grupo veículo ( $9,58 \pm 2,11$  mg) e sem diferença significativa entre as doses.

**Figura 55.** Avaliação do efeito da administração por via oral de FA de *Boehmeria caudata* no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.).

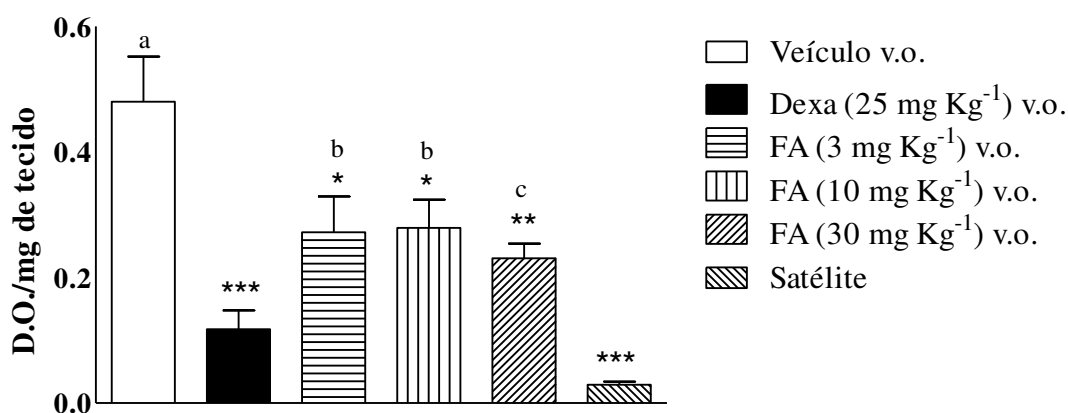


Edema de orelha induzido por óleo de cróton = diferença entre peso da orelha com inflamação induzida e o peso da orelha não inflamada; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%; v.o.), controle positivo: Dexametasona (Dexa - 25 mg Kg<sup>-1</sup>, v.o.), grupo experimental: 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA; v.o.: via oral; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo. (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

Além da avaliação do edema, realizou-se o doseamento da MPO no fragmento de orelha coletado ao final do experimento. Assim, a dexametasona inibiu a ativação e/ou migração dos neutrófilos em 75,41% ( $0,118 \pm 0,07$  D.O.), promovendo um retorno a uma atividade similar àquela observada em animais que não receberam óleo de cróton (grupo satélite) (Fig. 56). Já o tratamento com a FA promoveu a inibição da ativação e/ou migração dos neutrófilos, de maneira independente da dose empregada, em 43,55% ( $0,272 \pm 0,13$  D.O., 3 mg Kg<sup>-1</sup>), 41,87% ( $0,279 \pm 0,09$  D.O., 10 mg Kg<sup>-1</sup>) e 51,87% ( $0,231 \pm 0,05$  D.O., 30 mg Kg<sup>-1</sup>) em relação aos animais tratados com veículo ( $0,480 \pm 0,16$  D.O.) sem atingir níveis estatisticamente semelhantes àqueles observado para os animais do grupo satélite (Fig. 56).



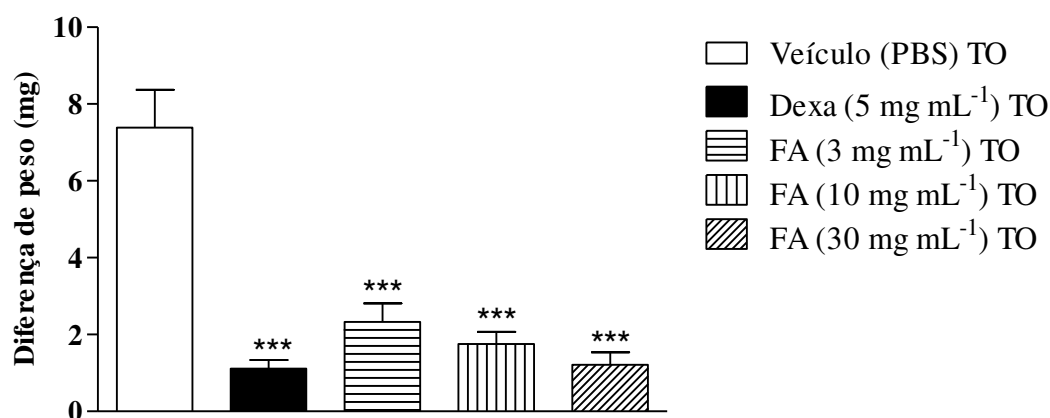
**Figura 56.** Dosagem de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) em função do tratamento com FA por via oral.



Amostra de tecido avaliada: fragmento de orelha após exposição a óleo de cróton; atividade de mieloperoxidase expressa como D.O (densidade óptica) por miligrama da orelha. Grupos: veículo (PBS pH 7+ tween 80 5%, controle negativo), dexa (dexametasona, 25 mg Kg<sup>-1</sup>, controle positivo), FA (fração rica em alcaloides, 3, 10, 30 mg Kg<sup>-1</sup>, experimentais), Satélite (animal sem indução de edema com óleo de cróton). v.o.: via oral. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo. a: p<0,001 e b: p<0,01, c: p<0,05, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo satélite (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

A troca de via de administração de via oral para via tópica não interferiu na atividade antiedematogênica de FA. Assim, a dexametasona reduziu o edema em 84,97% ( $1,11 \pm 0,58$  mg, 5 mg mL<sup>-1</sup>), enquanto FA promoveu uma inibição, independente da concentração empregada, de 68,47% ( $1,76 \pm 1,27$  mg; 3 mg mL<sup>-1</sup>), 76,18% ( $1,76 \pm 0,84$  mg; 10 mg mL<sup>-1</sup>) e 83,62% ( $1,21 \pm 0,86$  mg; 30 mg mL<sup>-1</sup>) em relação ao grupo veículo ( $9,58$  mg  $\pm$  2,11) (Fig. 57).

**Figura 57.** Avaliação do efeito tópico de FA de *Boehmeria caudata* no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.).

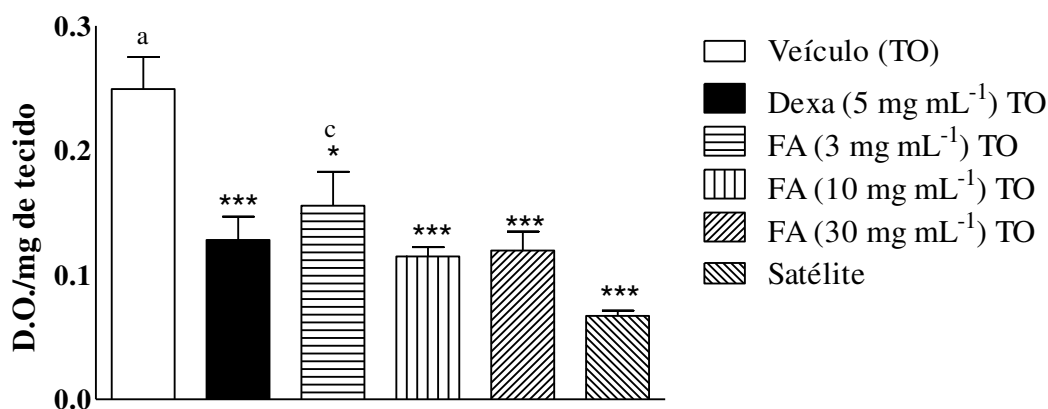


Edema de orelha induzido por óleo de cróton = diferença entre peso da orelha com inflamação induzida e o peso da orelha não inflamada; resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; Grupos: veículo (controle negativo, PBS pH 7+ tween 80 5%; TO), controle positivo: Dexametasona (5 mg mL<sup>-1</sup>, t.o.), grupo experimental: 3, 10 e 30 mg mL<sup>-1</sup> de FA, TO: via tópica; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

Neste experimento também foi avaliada a ação da FA sobre a ativação de neutrófilos e consequente migração, através dos níveis da enzima mieloperoxidase (Fig. 58).

Com relação à dosagem de MPO, observou-se que a dexametasona inibiu a ativação e/ou migração dos neutrófilos em 48,59% ( $0,128 \pm 0,05$  D.O.) em comparação ao grupo veículo sem diferença significativa em relação à atividade observada para os animais do grupo satélite. Por sua vez, FA também inibiu, sem diferença significativa entre as concentrações avaliadas, em 37,34% ( $0,156 \pm 0,06$  D.O.; 3 mg mL<sup>-1</sup>), 53,81% ( $0,115 \pm 0,02$ , D.O.; 10 mg mL<sup>-1</sup>) e 51,80% ( $0,120 \pm 0,04$  D.O.; 30 mg mL<sup>-1</sup>) em relação ao grupo veículo ( $0,249 \pm 0,06$  D.O.). Apenas a menor concentração de FA (3 mg mL<sup>-1</sup>) apresentou uma atividade de MPO significativamente maior do que aquela observada para os animais do grupo satélite (Fig. 58).

**Figura 58.** Dosagem de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) em função do tratamento com FA por via tópica.



Amostra de tecido avaliada: fragmento de orelha após exposição a óleo de cróton; atividade de mieloperoxidase expressa como D.O (densidade óptica) por miligrama da orelha. Grupos: veículo (acetona 70%, controle negativo), dexta (dexametasona, 5 mg mL<sup>-1</sup>, controle positivo), FA (fração rica em alcaloides, 3, 10, 30 mg mL<sup>-1</sup>, experimentais), Satélite (animal sem indução de edema com óleo de cróton). TO: via tópica. \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo. a: p<0,001 e b: p<0,01, c: p<0,05, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo satélite (One way ANOVA – seguido pelo teste de Tukey).

Assim, comparando as duas vias de administração no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, observou-se que em ambos os testes a fração enriquecida de alcaloides reduziu aproximadamente entre 70 e 80% o edema, sendo esses valores muito próximos àqueles observados para a dexametasona; além disso, não foram observadas diferenças significativas entre as doses/concentrações empregadas de FA. Em relação à análise do MPO, em ambas vias de administração, a inibição da ativação e/ou inibição da migração de neutrófilos promovida por FA foi de aproximadamente 40 e 50%, não havendo diferenças significativas entre as doses/concentrações testadas.

## 5. DISCUSSÃO

Um dos maiores traumas para o ser humano é o diagnóstico de câncer, isso porque esta doença tornou-se um estigma de mortalidade e dor (Almeida et al., 2005b). Além disso, o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo (Carvalho et al., 2015) sendo que, a cada oito pessoas mortas, uma é devido ao câncer (Khazir et al., 2014). Deste modo, estas estatísticas têm instruído os cientistas de múltiplas áreas a trabalharem juntos na busca de drogas antitumorais mais efetivas (Chabner e Roberts Jr, 2005) e com o mínimo de efeitos colaterais (Khazir et al., 2014).

Assim, uma fonte alternativa para o tratamento do câncer são os produtos originários da natureza, que podem ser mais efetivos e/ou resultarem em modelos para novos alvos (Zhou et al., 2014). Dentro dos produtos naturais, as plantas têm uma longa história no tratamento do câncer (Khazir et al., 2014), tanto que, na década de 60, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos iniciou um programa de triagem em larga escala para a descoberta de agentes antitumorais derivados de plantas (Nobili et al, 2009). Dentre os agentes tumorais descobertos na triagem com elevado potencial, pode-se citar aqueles derivados de alcaloides, como por exemplo, alcaloides da vinca, taxol, camptotecinas e colchicina (Khazir et al., 2014) que ilustram o potencial dos alcaloides como agentes antitumorais (Qiu et al., 2014).

Durante uma triagem de compostos isolados a partir de espécies vegetais coletadas na APA da Mantiqueira, do projeto BIOPROSPECTA - FAPESP (04/15410-0) sob responsabilidade do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, os extratos das folhas de *Boehmeria caudata* apresentaram resultados promissores nos testes de atividade antiproliferativa, inibindo totalmente a proliferação *in vitro* de células tumorais e não tumorais em concentrações muito baixas. Além disso, o extrato bruto etanólico, quando analisado em CCD revelada com dragendorff, apresentou resultado positivo para a presença de alcaloides (Pais, 2011). Esses resultados iniciais estimularam a continuidade dos estudos como objetivo de identificar as substâncias ativas e compreender melhor sua atividade farmacológica.

Assim, dando início aos estudos sobre a atividade anticâncer dos extratos e frações obtidos da *B. caudata* desenvolvidos neste projeto, avaliou-se a influência do método de extração com o objetivo de selecionar o que combinasse rendimento com a atividade farmacológica. Os resultados (Tabelas 5, 9, 10 e 11) obtidos da extração sucessiva com diclorometano, etanol e água, variando-se o método de extração, demonstraram que, apesar da extração por maceração dinâmica ter apresentado maior rendimento, o extrato bruto etanólico

produzido em sistema *soxhlet* apresentou maior potência sobre a inibição do crescimento das células tumorais.

Como o espécime de *B. caudata* cultivado no campo experimental do CPQBA apresentava escassas folhas por galho e flores quase o ano todo, decidiu-se avaliar se haveria diferenças entre os extratos preparados com as diversas partes da planta (folhas, flores, galhos) e a mistura destes empregando-se extração sucessiva com diclorometano, etanol e água nas duas técnicas de extração, quanto à atividade antiproliferativa *in vitro*. A comparação dos resultados obtidos (Tabelas 9, 10 e 11) demonstrou que não houve diferenças expressivas de atividade entre os extratos das diversas partes da planta e, portanto, a mistura (galhos, folhas e flores) de *Boehmeria caudata* foi selecionada para a sequência do trabalho.

Avaliando-se somente a mistura das partes aéreas de *B. caudata* obtida pelo método de *soxhlet*, observou-se que os valores de TGI do EBEs (Tabela 10) foram bem menores (menor que  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que os obtidos pelo EBDs (Tabela 9) e EBAs (Tabela 11). Essa maior atividade do EBEs poderia ser explicada em parte pela presença de alcaloides, que foram identificados nesse extrato pela triagem fitoquímica (Fig. 11).

Finalmente, como o extrato etanólico de *B. caudata* obtido após a extração com o diclorometano (EB2) foi o mais potente dentre os extratos brutos obtidos, decidiu-se verificar se o extrato bruto etanólico total (EB1), obtido diretamente das partes aéreas, apresentaria diferenças fitoquímicas ou antiproliferativas significativas em relação ao EB2. Os resultados obtidos (Figuras 13, 23 e Tabelas 12) demonstraram que não houve diferenças significativas entre eles, podendo trabalhar com ambos extratos.

Na literatura, há somente relato de atividade citotóxica do extrato etanólico do caule com casca da *Boehmeria caudata* para o carcinoma epidermóide humano de nasofaringe (KB); onde também foi isolado o alcaloide criptopleurina, que foi citotóxico em células KB (Hoffmann et al., 1977). Além disso, esses autores também destacaram a presença de alcaloides no gênero *Boehmeria sp.* como uma característica do gênero. Isso também pode ser ilustrado pelo estudo do extrato etanólico da planta inteira de *B. siamenis* Craib do qual foram isolados dois novos alcaloides do grupo fenantroquinolizidínicos, denominados de boehmeriasina A e B. Ambos alcaloides apresentaram atividade antiproliferativa sendo que boehmeriasina A foi citotóxica contra 12 linhagens de células humanas incluindo câncer de pulmão, cólon, mama, próstata, rim e leucemia, enquanto que a boehmeriasina B apresentou baixa atividade (Luo et al., 2003).

Com base nesses dados da literatura e nos resultados positivos para presença de alcaloides, o EB2 foi submetido à extração ácido-base para obtenção da fração rica em

alcaloides. Através de análise por espectrometria de massas de alta resolução foi possível identificar cinco alcaloides da família dos fenantroquinolizidínicos, um quinolizidínico (3- (4-hidroxifenil)-4-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3, 4-dehidroquinolizidina) e uma acetofenona (3,4-Dimetoxi- $\omega$ - (2'-piperidil) acetofenona) (Tabela 8 e Fig. 15). Com exceção do alcaloide criptopleurina, os outros seis alcaloides são descritos pela primeira vez para *Boehmeria caudata*.

Em relação ao alcaloide quinolizidínico, isolado de *Boehmeria siamensis* (Luo et al., 2001), e o alcaloide acetofenona, isolado de *Boehmeria platyphylla* (Hart et al. 1968), ambos não apresentam relato de atividade biológica até o momento.

Os alcaloides da família fenantroquinolizidínicos são um pequeno grupo de alcaloides existentes na família das Lauraceae, Vitaceae e Urticaceae (Cui e Wang, 2009; Wang et al., 2012a). A seguir são descritos os alcaloides deste grupo e de qual espécie ocorreu o primeiro isolamento: (-)-criptopleurina, isolado da casca de *Cryptocarya pleurosperma* (Lande, 1947); criptopleuridina, isolado da folha de *Cryptocarya pleurosperma* (Johns et al., 1969); (-)-julandina, isolado *Boehmeria patyphylla* (Hart, 1968); boehmeriasina A, boehmeriasina B, isolados de *Boehmeria siamensis* (Luo et al., 2003) e por fim (-)-15R-hidróxicriptopleurina, isolado de raiz de *Boehmeria pannosa* (Cai et al., 2006). Em relação as suas propriedades farmacológicas, já foram descritas para esses alcaloides as atividades antimicrobiana (Al-Shamma, 1982), antiviral (Krmptic et al., 1972; Yang et al., 2010), anti-inflamatória (Jin et al., 2012) e antitumoral (Jin et al., 2012; Wang et al., 2012a, Pereira et al., 2015). Até o momento, a maioria dos estudos tem focado na atividade antitumoral visando à utilização medicinal dos mesmos (Wang et al., 2012b).

Corroborando com esses dados de literatura, nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro* a fração rica em alcaloides apresentou valores de TGI menores que  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  para quase todas as linhagens avaliadas (Tabelas 13 e 14). Em particular, a boehmeriasina A já foi descrita como mais potente ( $\text{GI}_{50}$  na faixa de  $0,2\text{-}5 \text{ ng mL}^{-1}$  para todas as linhagens celulares avaliadas) do que o Taxol (agente antitumoral derivado da planta, *Taxus brevifolia*), que apresentou  $\text{GI}_{50}$  de  $20 \text{ a } 100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Vale ressaltar aqui que a linhagem NCI-H460 foi uma das linhagens mais sensíveis para boehmeriasina A (Luo et al., 2003).

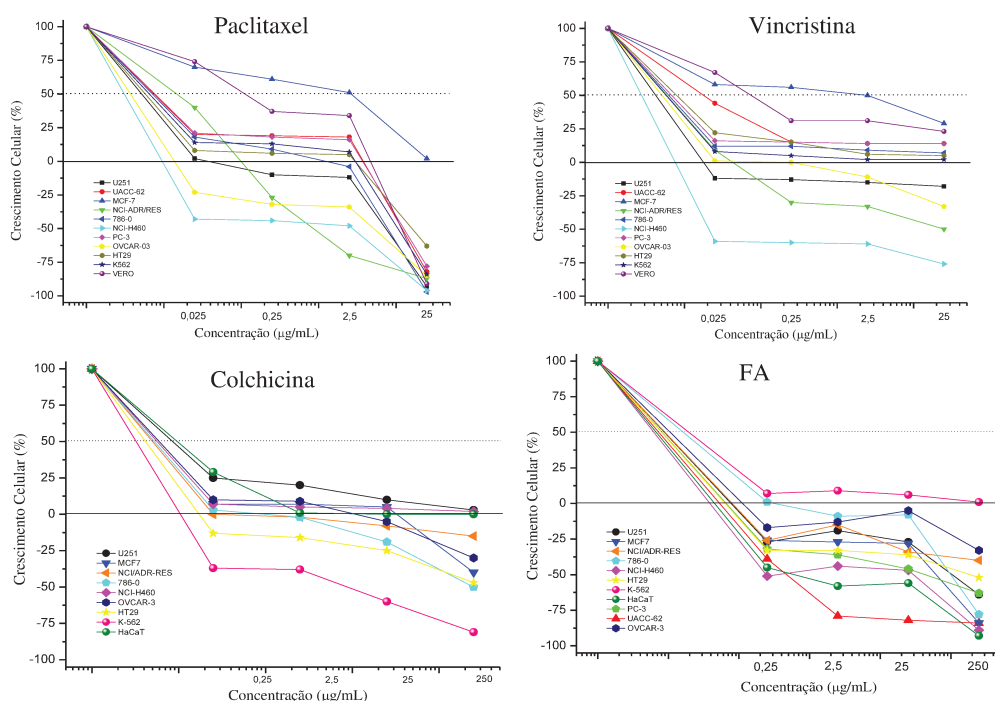
Por conta dessa atividade antiproliferativa promissora, existem diversos estudos descrevendo rotas de síntese para os alcaloides fenantroquinolizidínicos e seus análogos, associados à avaliação de citotoxicidade em linhagens de células tumorais (Yang et al., 2011; Yang et al., 2012; Wang, et al., 2012b). Apesar do grande potencial antiproliferativo dos

alcaloides fenantroquinolizidínicos, os seus específicos alvos biológicos assim como seu mecanismo de ação ainda não foram claramente estabelecidos (Jin et al., 2012; Pereira et al., 2015).

Assim, a partir do modelo desenvolvido pelo NCI, o painel NCI60, e com o acúmulo de dados a respeito das mais diversas substâncias, os pesquisadores do NCI começaram a observar que substâncias com perfil de atividade antiproliferativa semelhante na maioria das vezes compartilhavam o mesmo mecanismo de ação (Zaharevitz et al., 2002).

Desta forma, quando se comparou o perfil de atividade antiproliferativa obtido da FA com os obtidos em nosso grupo de pesquisa para vincristina, paclitaxel e colchicina (Figura 59), observou-se uma grande semelhança entre esses perfis, o que parecia sugerir uma ação dos alcaloides de *B. caudata* sobre o fuso mitótico. A fim de verificar essa hipótese, o primeiro mecanismo de ação avaliado para FA foi a ação sobre o ciclo celular, sendo a linhagem tumoral de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460) escolhida por ter tido o menor valor de TGI ( $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Figura 59.** Perfil de atividade antiproliferativa de vincristina, paclitaxel e colchicina (inibidores mitóticos) e da fração rica em alcaloides obtida das partes aéreas de *B. caudata*.



Linhagens tumorais humanas = U251: glioma; UACC-62: melanoma, MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão tipo não pequenas células; HT-29: colón; PC-3: próstata; OVCAR-03: ovário, K-562: leucemia. Linhagens não tumorais: HaCaT (queratinócito humano), VERO (célula epitelial renal, macaco verde); FA: fração rica em alcaloide.

Vale ressaltar que o câncer de pulmão é a neoplasia maligna de maior incidência no mundo (1,8 milhão) (Estimativa 2016 – INCA 2016); sendo que tanto para os homens quanto para as mulheres, o câncer de pulmão é o câncer que mais leva a óbito nos Estados Unidos (Siegel et al., 2016). Em relação ao Brasil, com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer de pulmão é a segunda neoplasia mais incidente no sexo masculino e a quarta no sexo feminino, sendo que essa elevada incidência para o desenvolvimento do câncer de pulmão está principalmente relacionada ao tabagismo (Estimativa 2016 – INCA 2016). Além disso, os tratamentos existentes, tais como cirurgia, radioterapia e até mesmo a quimioterapia, não têm sido eficientes para o tratamento do câncer de pulmão, o que torna fundamental a busca de novos medicamentos (Yang, et al., 2015; Choi et al., 2015). Por fim, o adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células é o tipo celular mais comum nesta neoplasia e é frequentemente encontrado em estágios avançados de câncer de pulmão (Yang et al., 2003b).

Para a análise da ação de FA sobre o ciclo celular foi utilizado o citômetro de fluxo, que têm como princípio básico aspirar células ou partículas microscópicas suspensas em meio líquido e forçá-las a passar por uma câmara de fluxo, uma célula atrás da outra, de modo que uma única partícula seja interceptada pelo laser de cada vez. Uma vez interceptada pelo laser, dois tipos de informações são fornecidos sobre a partícula. Primeiro, são fornecidas características morfológicas e estruturais da mesma e em segundo, são adquiridas informações sobre aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células que foram previamente coradas por fluorocromos e, após excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com as características fluorescentes do marcador empregado (Bertho, 2015).

Desta forma, compostos que apresentam autofluorescência poderiam também ser excitados pelo laser levando a resultados falso-positivo ou falso-negativo. Assim, uma análise preliminar de FA foi realizada para avaliar sua autofluorescência (dados apresentados em apêndice). A amostra não apresentou autofluorescência nas condições empregadas (concentração, laser de excitação e filtro de emissão) no estudo do mecanismo de ação, possibilitando a sequência dos estudos, que evidenciaram que o tratamento das células NCI-H460 com a fração rica em alcaloides resultou em parada do ciclo em fase G2/M, corroborando a hipótese de que os alcaloides presentes em *Boehmeria caudata* poderiam atuar como inibidores mitóticos.

Há poucos estudos na literatura sobre a ação dos alcaloides fenantroquinolizidínicos no ciclo celular. Dentre eles, há um artigo descrevendo a ação do alcaloide criptopleurina em mitose de raiz de cebola; nesse estudo foi observada ação c-

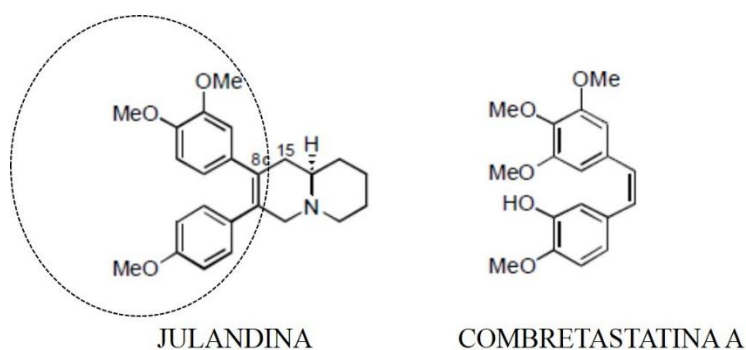


mitótica desse alcaloide sendo inclusive sugerido que o alcaloide criptopleurina poderia ser um substituto da colchicina em análises citológicas (Barnard, 1949).

A colchicina, isolada da *Colchicum autumnale*, foi o primeiro agente anti-mitótico identificado. Ao ligar-se na interface entre os dois monômeros  $\alpha$  e  $\beta$  da tubulina livre no citosol, a colchicina impede a formação do microtúbulo (efeito desestabilizador de microtúbulo). Clinicamente, este alcaloide é utilizado para o tratamento da gota e na febre familiar do mediterrâneo; no entanto, devido a sua toxicidade (neutropenia, desconforto gastrointestinal, dano na medula óssea e anemia) esta substância ainda não foi incluída na terapia do câncer (Stanton et al., 2011; Lu et al., 2012). No entanto, derivados semissintéticos têm sido avaliados visando contornar os efeitos tóxicos da colchicina (Brandão, 2010).

Os autores Banwell et al. (2005) compararam a fórmula estrutural da combretastatina A, um estilbeno que tem ação sobre as tubulinas, com o alcaloide julandina, pois estes autores relatam que os compostos apresentam algumas semelhanças estruturais como destacado na Figura 60. Reforçando a hipótese de que estes alcaloides fenantroquinolizidínicos possam ter ação sobre a tubulina.

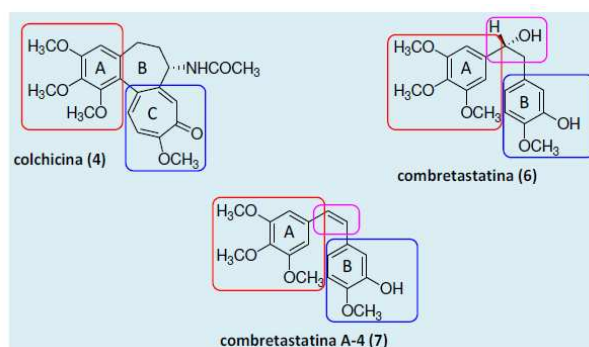
**Figura 60.** Fórmula estrutural do alcaloide fenantroquinolizidínico julandina e da combretastatina A.



Fonte: Banwell et al., 2005

A combretastatina atua como inibidor da polimerização da tubulina, ligando-se no mesmo sítio de ligação da colchicina (Mahal et al., 2015). Esse compartilhamento de sítio de ligação pode ser explicado pelas semelhanças estruturais encontradas entre a combretastatina e a colchicina; ambas possuem um anel trimetoxifenila (destacado em vermelho) e um anel (anel tropolônico na colchicina e benzênico na combretastatina) com substituintes oxigenados vicinais (destacado em azul) (Fig. 61) (Fraga, 2015).

**Figura 61.** Semelhança estrutural entre as subunidades da colchicina (4), combretastatina (6) e combretastatina A (4).



Fonte: Fraga, 2015

Por analogia, é possível evidenciar certa semelhança estrutural entre a colchicina e os alcaloides fenantroquinolizidínicos **1** a **5** (Figura 15) identificados na fração rica em alcaloides de *B. caudata*. Essa semelhança estrutural também poderia explicar a maior similaridade observada no teste da atividade antiproliferativa entre o perfil obtido para colchicina e aquele de FA, em células tumorais e não tumorais humanas, em relação aos perfis de paclitaxel e vincristina (Fig. 59). Portanto, frente a esta possibilidade da FA interagir com as tubulinas, foi avaliado se os alcaloides fenantroquinilizidínicos (criptopleurina, hidróxicriptopleurina, boehmeriasina A, boehmeriasina B) interagem com o sítio ativo da colchicina nas unidades da tubulina, através do teste de docagem (*docking*) molecular *in silico*.

A abordagem de docagem molecular pode ser usada para modelar a interação entre uma molécula pequena (ligante) e uma proteína em nível atômico, o que permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação de proteínas-alvo, bem como para elucidar seus processos bioquímicos fundamentais. Do ponto de vista metodológico, três grandes categorias de métodos de docagem podem ser estabelecidas: docagem com ligantes e receptores rígidos, docagem com ligantes flexíveis e receptores rígidos e docagem com ligantes e receptores flexíveis. O terceiro caso geralmente corresponde ao melhor modelo para se representar o que ocorre em meio biológico já que o ligante e a macromolécula são tratados como entidades flexíveis, capazes de alterar suas conformações para um encaixe perfeito, formando assim o complexo ligante-macromolécula de menor energia. A grande desvantagem da docagem flexível diz respeito ao alto custo computacional, que se reflete num maior tempo necessário para cada análise quando comparado à docagem rígida, na qual o espaço de busca conformacional é muito mais limitado (Meng et al., 2011).

Neste sentido, foram empregados nas simulações de docagem da colchicina e demais compostos, com métodos que trabalham com ligantes flexíveis e receptor rígido, através do programa GOLD. Esta abordagem apresenta uma boa relação entre precisão e custo computacional. Os programas de docagem utilizam os chamados algoritmos de amostragem para testar apenas as conformações mais importantes de um ligante no sítio ativo do alvo molecular em lugar de analisar todas as conformações possíveis, o que seria muito demorado e demandaria um enorme custo computacional (Meng et al., 2011).

No caso do GOLD estes algoritmos de amostragem são baseados nos chamados algoritmos genéticos, os quais se baseiam na teoria da evolução de Darwin. Neste sistema, os diferentes graus de liberdade do ligante são codificados como números binários chamados “genes”. Estes genes são agrupados para formar um “cromossomo” que representa uma pose de um dado ligante no sítio ativo da proteína. Mutações e *crossover* entre cromossomos são realizadas para gerar novos genes e uma função de escore estabelece quais seriam os cromossomos mais aptos a sobreviver enquanto os demais seriam descartados. Em outras palavras esta função de escore determina quais as conformações do ligante seriam mais prováveis dentro do sítio ativo da proteína (Rodrigues et al., 2015).

A análise de escore de docagem da colchicina e dos alcaloides avaliados (Tabela 17) demonstrou que a colchicina teria o maior potencial de interação com o subsítio da tubulina, seguida da *R*-boehmeriasina A, (15*R*)-hidróxicriptopleurina, *R*-boehmeriasina B e *R*-criptopleurina. Contudo, deve-se ressaltar que estes valores servem apenas para fornecer um panorama geral das interações realizadas entre os compostos e os resíduos de aminoácido da tubulina, não devendo ser utilizados para prever, de modo quantitativo, o perfil de interação que seria esperado se estas substâncias fossem ensaiadas experimentalmente. Uma análise extensiva de dez dentre os principais programas utilizados em docagem molecular demonstrou que estes são de fato eficientes em prever a conformação do ligante e sua posição/orientação no sítio ativo das proteínas (ou seja, possuem algoritmos de amostragem precisos), mas geralmente falham na tentativa de ranquear os compostos mais ativos (Warren et al., 2006). Isso ocorre porque as chamadas funções de escore, nas quais estes programas se baseiam para prever a afinidade de ligação, são planejadas para funcionarem em um vasto conjunto de alvos moleculares e podem não ser tão precisas para um determinado alvo em específico (Kroemer, 2007).

A sobreposição da pose cristalográfica da colchicina com as poses de docagem dos demais compostos sugere que *R*-boehmeriasina A, *R*-boehmeriasina B e *R*-criptopleurina adotam uma orientação muito semelhante à colchicina, havendo uma quase perfeita

sobreposição entre os anéis aromáticos destes compostos com o sistema de anéis da colchicina. Apenas a (15*R*)-hidróxicriptopleurina apresenta uma pose de docagem divergente, orientando-se quase que perpendicularmente aos demais compostos (Fig. 35). Inspeção visual das interações realizadas pela colchicina evidencia apenas uma única interação por ligação de hidrogênio (oxigênio da carbonila com Val181), sendo as demais interações de natureza hidrofóbica ou aromática e, portanto, comparativamente mais fracas (Fig. 36). Tal padrão de interação parece ser relevante para uma boa afinidade com o sítio de ligação, uma vez que, uma ligação de hidrogênio adjacente a grupos hidrofóbicos apresenta um efeito sinérgico sobre a interação e desta forma, a ligação de hidrogênio irá manter a cadeia lateral hidrofóbica mais firmemente aderida ao bolsão hidrofóbico e a cadeia hidrofóbica também aumentará a força da ligação de hidrogênio ao estabilizar sua geometria (Muley et al., 2010).

Padrões similares de interações semelhantes são preditos nas simulações de docagem para a *R*-boehmeriasina A (Fig. 37), *R*-boehmeriasina B (Fig. 38) e *R*-criptopleurina (Fig. 39), onde o número de interações hidrofóbicas ou aromáticas comparativamente maior do que o observado para a própria colchicina. Contudo, nestes casos as ligações de hidrogênio preditas seriam indiretas, ou seja, o grupo do ligante envolvido na ligação de hidrogênio utiliza uma molécula de água como ponte para interagir com o resíduo de aminoácido. Neste caso, a ligação seria mais lábil e, portanto, menor seria o efeito sinérgico observado entre estas ligações de hidrogênio e as demais ligações hidrofóbicas ou aromáticas realizadas.

Já para a (15*R*)-hidróxicriptopleurina, a simples inserção de uma hidroxila no anel quinolizidínico em comparação à *R*-criptopleurina promoveria, segundo as simulações de docagem, uma orientação diferente dos demais compostos de modo a permitir a interação desta hidroxila com o resíduo Thr<sub>179</sub> através de uma ligação de hidrogênio (Fig. 40). Além disso, prevê-se a formação de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio de um dos grupos metóxi do anel dimetóxi-benzeno e o nitrogênio da Thr<sub>353</sub>, além da manutenção de uma ligação de hidrogênio indireta entre o nitrogênio da quinolizidina com o resíduo Lys<sub>254</sub>. Neste sentido, apesar da redução do número de ligações hidrofóbicas/aromáticas quando comparado aos três outros compostos docados, a (15*R*)-hidróxicriptopleurina apresentaria um bom perfil de interação junto ao sítio colchicina da tubulina.

Assim, outros estudos com o objetivo de comprovar a ligação dos alcaloides identificados em FA nas unidades de tubulina no sítio ativo da colchicina serão importantes para comprovação do mecanismo de ação de FA.

Dos alcaloides identificados na FA, pesquisas foram realizadas sobre o efeito da boehmeriasina A sobre o ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 (tumor de

mama, linhagem representativa de tumores triplo negativo). Quando as células foram tratadas por 24 h com boehmeriasina A ( $0.007 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), observou-se uma parada do ciclo celular em fase G1 e a diminuição da regulação (*down-regulation*) de expressão gênica para as ciclinas D1 e E2, que são fatores chaves na regulação da progressão da fase G1. Nessas mesmas condições experimentais, foram observadas poucas células em apoptose e a maioria apresentava características de diferenciação celular, tais como, acúmulo de lipídios e aumento da expressão da proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos humanos (Yan et al., 2006). Além disso, em um estudo subsequente analisando a expressão gênica de 328 genes relacionados com diferenciação celular e com a morte celular na MDA-MB-231, observou-se que a boehmeriasina A diminui a expressão de genes envolvidos na apoptose associado a aumento da expressão de alguns genes relacionados à diferenciação celular; desta forma, provavelmente, este alcaloide inibe a proliferação das células de câncer de mama através da indução da diferenciação, podendo ser uma possível candidata para o tratamento do câncer de mama (Wei et al., 2009).

Vale ressaltar que Yan e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da boehmeriasina A após 24 horas de tratamento, sendo que o tempo de duplicação da linhagem MDA-MB-231 é de 41,9 horas (CellMiner™, 2016); ou seja, após 24 horas as células ainda não haviam completado um ciclo celular. Além disso, as diferenças observadas entre o presente trabalho e o resultado obtido por Yan e colaboradores (2006) podem ser resultantes, em parte, da presença dos outros 4 alcaloides fenantraquinolizidínicos em combinação com a boehmeriasina A na fração rica em alcaloides, obtida das partes aéreas de *B. caudata*.

Esses resultados diferentes em relação a ação sobre o ciclo celular (parada em fase G2/M, no presente trabalho, e em fase G1, no do trabalho de Yan e colaboradores, 2006) pode também, em parte, estarem relacionados com diferenças genéticas que há entre as duas linhagens estudadas, NCI-H460 e MDA-MB-231, como por exemplo: a linhagem NCI-H460 apresenta a p53 funcionalmente ativa (selvagem – *wild-type*), enquanto que a linhagem de mama MDA-MB-231 não apresenta (CellMiner, 2016).

A proteína p53 conhecida como “guardião do genoma”, tem a função de monitorar a integridade do genoma impedindo a proliferação de células com o DNA mutado. Resumidamente, quando ocorre lesão no DNA por agentes mutagênicos, o gene da p53 é ativado e a transcrição da proteína p53 é iniciada; esta proteína pode então ativar diversas vias relacionadas ao ciclo celular. Uma delas é a ativação da síntese de proteína p21, que inibe a ação de quinases dependentes de ciclina (ciclinas D-Cdk4, D-Cdk6 e E-Cdk2) fazendo com que as células parem no início da fase G1 do ciclo celular (Cavalcanti Junior et al., 2002;

Alberts et al., 2010). Por outro lado, a ativação de p53 pode resultar em inibição do complexo de Cdc2/ciclina B e/ou inibição da topoisomerase II resultando em parada do ciclo celular em fase G2 (Taylor e Stark, 2001). Desta forma, estudos futuros poderão avaliar a expressão da proteína p53 na linhagem NCI-H460 tratada com FA, nas mesmas condições empregadas neste trabalho, visando uma melhor compreensão do mecanismo de parada do ciclo celular em fase G2/M.

Complementando, a boehmeriasina A já foi avaliada quanto à sua ação sobre topoisomerases (Christodoulou et al., 2015). Topoisomerases são enzimas nucleares que reduzem o estresse na hélice do DNA, permitindo que regiões selecionadas do DNA se tornem suficientemente desenroladas e relaxadas para permitir a replicação, recombinação, transcrição e reparo do DNA (Nobili et al., 2009).

Assim, Christodoulou e colaboradores (2015) avaliaram os dois enantiômeros da boehmeriasina A ((*R*) – boehmeriasina A, (*S*) - boehmeriasina A), bem como a sua mistura racêmica, sobre as topoisomerase I e II (TOPOI e TOPOII, respectivamente) *in vitro* e *in silico*. Em relação à análise de relaxamento da dupla hélice de DNA plasmídico, ambos enantiômeros da boehmeriasina A inibiram o relaxamento do DNA mediado pelas duas enzimas, sendo que a inibição foi mais potente para TOPO I do que para TOPO II; já sobre o complexo de clivagem DNA-topoisomerase, ambos os enantiômeros não apresentaram inibição. E por fim, a análise computacional (docagem molecular) das possíveis ligações entre os enantiômeros e as duas topoisomerases evidenciou que, apesar de uma ligeira preferência de afinidade pela TOPO II, os resultados de interação dos enantiômeros com as topoisomerases não foram significativos, sugerindo que os enantiômeros interagem principalmente com a cadeia de DNA através de interações de empilhamento (Christodoulou et al., 2015).

Dando sequência a análise do mecanismo de ação de FA, o processo de morte celular foi avaliado pela análise da exposição de resíduos de fosfatidilserina. A fosfatidilserina é um fosfolípídeo, localizado na camada interna da membrana plasmática, mas se desloca para a camada externa nas células em processo inicial de morte celular, servindo como um sinalizador para as células vizinhas e macrófagos a fagocitarem (Alberts et al., 2010). Apesar de originalmente a detecção de fosfatidilserina através da ligação com anexina V marcada por um fluoróforo ter sido descrita como um método para avaliação do início do processo de apoptose, os avanços nos estudos dos processos de morte celular demonstraram que a exposição de fosfatidilserina ocorre em processos de apoptose programada, partanatos e netosis (Galluzzi et al, 2012), bem como de necroptose e piroptoses (Nagata et al., 2016).

A apoptose é o tipo de morte celular geneticamente programada, controlada por proteínas antiapoptóticas, pró-apoptóticas e caspases (caspases iniciadoras: 1, 8, 9, 10 e caspases efetoras: 3, 6 e 7). A morte celular por necroptose é considerada uma necrose programada, sendo ativada por receptores de morte e é regulada pelas proteínas RIP1 e/ou RIP3-dependente (Galluzzi et al., 2012). Partenatos é um tipo de morte celular independente de caspase, sendo ainda considerada um subtipo de morte celular por necroptose (Vural et al., 2013). E por fim, a piroptose é dependente da ativação do complexo da caspase-1 estando geralmente associada a um estado altamente inflamatório, frequentemente devido à infecção por patógeno facultativo intracelular (Paiva-Oliveira et al., 2012).

Assim, o tratamento de células NCI-H460 por 24 h com FA resultou em exposição da fosfatidilserina (Fig. 31), não sendo observada exposição em tempos menores (Fig. 30). Como foi também após 24 horas que se observou parada do ciclo celular na fase G2/M, pode-se sugerir que FA primeiro induziu a parada do ciclo celular, o que poderia ter desencadeado o processo de morte celular evidenciado pela externalização de resíduos de fosfatidilserina.

Com esse teste foi possível evidenciar que FA desencadeou um processo de morte nas células NCI-H460 iniciado pela exposição de fosfatidilserina, mas não foi possível afirmar qual o tipo de processo de morte celular está ocorrendo. Em relação aos processos de morte celular supracitados, pode-se excluir somente o processo de morte celular por netosis, por se tratar de um mecanismo de morte restrito a granulócitos (Galluzzi et al, 2012).

Na literatura são bem escassas publicações que avaliem o mecanismo de morte celular induzido pelos alcaloides fenantroquinolizidínicos. Dentre esses trabalhos, pode-se citar o estudo de Yan e colaboradores (2006) que observaram um aumento significativo de células MDA-MB-231 em fase sub-G1 do ciclo celular, após 48 horas de tratamento com boehmeriasina A ( $0,007 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Segundo alguns autores, a fase sub-G1 corresponde a uma subpopulação celular com conteúdo nuclear menor que  $2n$ , o que representaria células em processo de morte celular com DNA fragmentado (Kajstura et al., 2007).

Em outro estudo, um derivado sintético do alcaloide criptopleurina, nomeado como YXM-110, foi avaliado em células tumorais de colo retal (HCT116), na concentração de  $1\mu\text{M}$ . Nessas condições, YXM-110 induziu um aumento significativo na subpopulação de células em fase sub-G1, após 96 h, associado à ativação da sinalização do mecanismo intrínseco da apoptose, por ativação da caspase-9 (72 h de tratamento) e da sua caspase efetora, a caspase-3 (96 h de tratamento) (Lai et al., 2013). Além disso, este estudo também evidenciou que o composto YXM-110 ativou vias de sinalização relacionadas ao mecanismo

de autofagia, tais como, acúmulo do autofagossomo por depleção da proteína Mcl-1, além do aumento da expressão das proteínas Atg2-1-Atg5, LC3-II e GFP-LC3 (Lai et al., 2013).

No presente trabalho, o tratamento com FA, nas concentrações empregadas, não resultou em aumento na subpopulação de células em fase sub-G1 (Figuras 28 e 29); isso está coerente com os resultados do teste de atividade antiproliferativa *in vitro* (Fig. 27), onde as concentrações empregadas (0,0025 e 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) no estudo de ciclo celular apresentaram resultado citostático e não citotóxico.

Além da análise por citometria de fluxo, a FA também foi avaliada no teste de clonogenicidade para complementar o resultado do ciclo celular e morte celular. Este teste baseia-se na análise de um agente, radioativo ou quimioterápico, que cause morte celular por falência reprodutiva, ou seja, células após o tratamento com estes agentes podem manter ou não a capacidade de produzir células progenitoras (Franken et al., 2006).

Dentre os mecanismos descritos para morte celular, a perda de integridade reprodutiva e inabilidade para proliferar indefinidamente são as características mais comuns. Assim, uma célula que mantém a sua habilidade de sintetizar proteínas e DNA, que passa por uma ou duas mitoses, mas que é incapaz de dividir e produzir um grande número de células progenitoras é considerada uma célula morta. Este resultado é referido como perda de integridade reprodutiva (morte reprodutiva) (Munshi et al., 2005) ou morte celular mitótica (Shinomiya, 2001).

Um dos mecanismos da morte reprodutiva é a lesão no DNA, estudos feitos com radioterapia em teste clonogênico observaram que o principal mecanismo de morte celular que ocorre nas células é a mitose catastrófica (Woodward e Bristow, 2009). A mitose castrófica é definida como uma mitose aberrante, que pode levar a célula à senescência ou a morte celular por apoptose ou necrose (Galluzzi et al., 2012).

O resultado do teste de clonogenicidade mostrou que FA tem a capacidade de diminuir a formação de colônias (Fig. 34), levando as células à morte por falência reprodutiva. As células presentes após o tratamento poderiam apresentar danos no DNA que as levaram a um estado de senescência, e que apesar de vivas, perderam a capacidade de se dividir e formar colônias (Gewirtz et al. 2008; Bertollo, 2010).

Além de dano no DNA, a perda da capacidade reprodutiva também pode estar relacionada com o comprometimento da síntese de proteínas. Uma vez que células tumorais apresentam elevada taxa de síntese proteica, que é requerida para manter as células em proliferação, drogas com alvo na síntese de proteínas poderiam diminuir a proliferação celular, bem como levar as células à morte (Lai et al., 2013).



Neste contexto, vários trabalhos na literatura relatam que o alcaloide criptopleurina inibe a síntese proteica (Donaldson et al. 1968; Haslam et al., 1968; Bucher e Skogerson, 1976; Yang et al., 2011). Donaldson et al. (1968) observaram que o criptopleurina inibiu em 50% a incorporação de leucina radioativa em células eucarióticas sem afetar as células procarióticas, sugerindo um mecanismo de ação semelhante ao da cicloheximida, um inibidor de síntese proteica em eucariotos, produzida pela bactéria *Streptomyces griseus*. Outro estudo demonstrou que criptopleurina, também inibiu a síntese de proteína citoplasmática e mitocondrial de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, sem afetar a síntese de proteína citoplasmática da bactéria *Escherichia coli* (Haslam et al., 1968).

Além disso, baixas concentrações de criptopleurina são capazes de bloquear a translocação do peptidil-RNAt do sítio A para o sítio P do ribossomo, a qual é dependente do fator de elongação EF-2 e de GTP (trifosfato de guanosina). O criptopleurina não inibiu o fator de elongação, porém a inibição da translocação foi inversamente proporcional à concentração de GTP, sugerindo desta forma uma inibição competitiva pelo sítio de ligação entre o GTP e o alcaloide (Barbacid et al., 1975; Bucher e Skogerson, 1976).

Assim, além do possível dano ao DNA, o comprometimento com a síntese de proteínas poderia também estar relacionada com a diminuição da capacidade de formação de colônia em células de pulmão tratadas previamente com FA.

Os resultados de atividade antiproliferativa de EBE e FA e a ação sobre o ciclo celular de FA, avaliados *in vitro*, encorajaram a avaliação *in vivo*, uma vez que esses modelos permitem a obtenção de informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica dos compostos testados (Vendramini-Costa, 2012). Portanto, testes *in vivo* foram realizados com o extrato bruto etanólico (EB2) e com a fração rica em alcaloides.

Inicialmente, foi realizado o teste de toxicidade aguda para avaliar os efeitos colaterais, toxicidade e a possível letalidade, permitindo a seleção das doses seguras para os estudos em modelos experimentais de câncer e inflamação. Assim, na dose de 1000 mg Kg<sup>-1</sup>, o EB2 levou o animal a óbito em 24 horas, quando empregou-se a via intraperitoneal para a administração; mas não levou a óbito quando a mesma dose foi administrada pela via oral. Estes resultados sugeriram que as substâncias tóxicas presentes no EB2 tem baixa biodisponibilidade por via oral, não atingindo concentração sistêmica suficiente para desencadear as alterações fisiológicas que levaram à morte quando a administração aconteceu por via intraperitoneal. Quando os animais foram tratados por via intraperitoneal com a fração rica em alcaloides, os animais tratados com 300 mg Kg<sup>-1</sup> de FA sofreram convulsão e morte por parada respiratória logo após a administração; a redução da dose pela metade (150 mg Kg<sup>-1</sup>

<sup>1)</sup> promoveu a redução das alterações comportamentais, as quais não foram mais observadas nos animais após 24 h da administração. Mais ainda, diferente do observado para o EB2, quando se realizou a administração de 300 mg Kg<sup>-1</sup> por via oral, o animal tratado com FA apresentou tremor e diarreia 24 h após a administração, evoluindo para óbito.

Os efeitos colaterais observados para FA são muito semelhantes ao alcaloide pilocarpina, extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus* (Castro et al., 2016), um agonista colinérgico que estimula a produção de saliva, utilizado atualmente para tratar xerostomia (Yang et al., 2016); e também o seu uso constitui um dos modelos mais utilizados no estudo da epilepsia (Furtado et al., 2012).

Em relação ao alcaloide criptopleurina, os seus efeitos tóxicos já foram comparados àqueles desencadeados pela estricnina (Fridrichsons e Mathieson, 1954). A estricnina é um alcaloide indólico que atua bloqueando o funcionamento dos neurônios inibitórios por ligar-se competitivamente nos receptores de GABA e glicina. Quando a estricnina se liga a esses receptores inibitórios, ela bloqueia a sua ação resultando em aumento do estímulo nervoso e, conseqüentemente, grande contração muscular, convulsão e morte por asfixia, já que ocorre forte rigidez tônica nos músculos respiratórios (Melo et al., 2002; Marrs e Maynard, 2013).

Além disso, o alcaloide criptopleurina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e causar toxicidade no sistema nervoso central (SNC) (Yang et al., 2011; Lai et al., 2013; Pereira et al., 2015), o que limita seu potencial uso clínico. Com isso, uma série de derivados do alcaloide criptopleurina contendo estruturas mais hidrofílicas tem sido desenvolvida para impedir a sua passagem pela barreira hematoencefálica e, por conseguinte, diminuir a toxicidade no SNC (Wang, 2012b; Yang et al., 2012; Lai et al., 2013; Kwon et al., 2015). Alguns desses novos derivados têm apresentado resultados positivos tanto em relação à sua ação antitumoral quanto em relação a menores efeitos colaterais (Yang, 2010b; Yang et al., 2011).

No entanto, apesar do conhecimento sobre a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, ainda não há estudos aprofundados sobre o mecanismo de ação da criptopleurina sobre o sistema nervoso central *in vivo*. A este respeito, um estudo avaliou o efeito das frações do extrato bruto metanólico de raiz, de caule e de folhas de *Boehmeria nivea* na atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase *in vitro* (Sancheti et al., 2010); assim, a enzima butirilcolinesterase foi inibida pelas frações diclorometânica (74%), proveniente do extrato bruto metanólico do caule, e hexânica (66%), proveniente do

extrato bruto metanólico da raiz, enquanto a enzima acetilcolinesterase foi moderadamente inibida (50%) apenas pela fração hexânica da raiz.

A inibição dessas enzimas poderia estar relacionada com o comportamento de tremor e convulsão observados nos animais tratados com a fração rica em alcaloides, pois a inibição das colinesterases provoca um acúmulo do neurotransmissor acetilcolina, o que leva a um excesso de estímulo nos receptores muscarínicos e nicotínicos causando disfunções em vários sistemas (Brito, 1988), como ocorre, por exemplo, com o alcaloide fisostigmina (eserina), extraído de *Physostigma venenosum*, que também inibe as colinesterases e apresenta os mesmos efeitos colaterais observados pela FA (Dawson e Buckley, 2016).

Somado a isso, estudos de triagem virtual dos possíveis mecanismos de ação dos enantiômeros da boehmeriasina A demonstraram que o enantiômero (*S*)-boehmeriasina A apresentou afinidade pelos sítios ativos das enzimas acetilcolinesterase e colinesterase, além da afinidade pelo receptor 2a de serotonina (5-HT<sub>2a</sub>), receptor este no qual se liga o neurotransmissor GABA (Christodoulou et al., 2015). Assim, o efeito combinado da criptopleurina e da boehmeriasina A poderiam explicar, em parte, os sinais e sintomas de toxicidade observados para FA; além disso, como os demais alcaloides identificados apresentam grande semelhança estrutural com esses dois alcaloides, eles também poderiam contribuir para os efeitos promovidos por FA. Assim, estudos mais aprofundados sobre a ação destes alcaloides sobre os neurotransmissores, bem como seus receptores e até mesmo testes *in vivo*, se fazem necessários.

Uma vez determinada à dose máxima tolerada pelos animais, foi realizado um teste preliminar para avaliar a ação antitumoral do extrato bruto etanólico. Desta forma, as doses foram definidas de acordo com Mi e colaboradores (2009), que sugerem o uso de 40% da dose máxima tolerada (DMT) estabelecida no teste de toxicidade aguda para o estabelecimento da maior dose a ser usada em esquemas de doses repetidas. Como pela via oral, a DMT para EB2 foi de 1000 mg Kg<sup>-1</sup>, a dose máxima estabelecida para o grupo tratado por via oral foi de 400 mg Kg<sup>-1</sup>. Já para a via intraperitoneal, a DMT foi de 500 mg Kg<sup>-1</sup>, assim 40% desta dose corresponderia a 200 mg Kg<sup>-1</sup>, mas devido às alterações comportamentais apresentadas para a dose de 500 mg Kg<sup>-1</sup>, foi decidido o uso de uma dose um pouco menor, de 150 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2.

O teste realizado foi o tumor sólido de Ehrlich inoculado no flanco do camundongo. Este tumor tem sido utilizado como uma modelo de tumor transplantável para investigar efeitos antitumorais para vários agentes farmacológicos (Fernandes et al., 2011). Assim, o tumor de Ehrlich é derivado de adenocarcinoma de mama murino, com

características agressivas e de rápido crescimento, podendo se desenvolver nas formas ascítica e sólida, dependendo do local de inoculação (Gomes et al., 2008; Sakai et al., 2010). Além disso, o tumor de Ehrlich é indiferenciado, transplantável, com hiperdiploidia e sem antígeno específico de tumor. Assemelha-se aos tumores humanos, que são os mais sensíveis à quimioterapia, por ser indiferenciado e ter uma taxa de crescimento rápida (Ozaslan et al., 2011).

Em relação ao teste que avaliou o EB2 das partes aéreas de *B. caudata* sobre o tumor sólido de Ehrlich, observou-se que o extrato reduziu o tumor tanto pela via oral (57,62%) quanto pela via intraperitoneal (38,07%). Porém, os animais tratados por via oral apresentaram sinais de toxicidade, tais como: piloereção, diarreia e perda de peso corporal, a partir do 6º dia de tratamento o que resultou em interrupção do mesmo, que a partir dessa interrupção, os animais começaram a se recuperar demonstrando que as alterações tóxicas observadas eram reversíveis (Fig. 42). Assim, apesar dos sinais de toxicidade, o tratamento por via oral apresentou a melhor resposta antitumoral e esta foi a via selecionada para tratamento dos demais experimentos, tomando-se o cuidado de reduzir as doses utilizadas e/ou aumentar o intervalo entre tratamentos.

Os parâmetros sanguíneos e a biometria dos órgãos foram avaliados em relação ao grupo satélite. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo satélite para a maioria dos parâmetros hematológicos avaliados. Com relação ao número de plaquetas, observou-se que o grupo controle negativo apresentou uma pequena elevação no número de plaquetas em relação ao grupo satélite, muito provavelmente devido à presença do tumor de Ehrlich. Nos animais tratados com EB2, observou-se que o tratamento por via intraperitoneal (150 mg Kg<sup>-1</sup> de EB2) não foi capaz de reverter esse pequeno aumento (Fig. 43). Em relação à biometria dos órgãos, somente os fígados dos animais tratados com EB2 por via oral apresentaram um pequeno aumento de peso relativo em relação ao grupo satélite (Fig. 44); mais ainda, esse aumento foi significativamente diferente em relação ao grupo tratado com EB2 por via i.p.. Esse resultado pareceu sugerir um efeito tóxico de EB2 sobre o fígado provavelmente por causa do metabolismo de primeira passagem de compostos administrados pela via oral. No entanto, somente estudos padronizados de toxicidade, utilizando animais saudáveis, poderão melhor avaliar os efeitos adversos que esse extrato pode produzir.

Para a fração rica em alcaloides, o modelo utilizado para a análise foi o tumor sólido de Ehrlich inoculado na pata direita traseira dos camundongos. Este modelo foi escolhido por permitir a avaliação da progressão do tumor durante todo o experimento.

Além disso, as células do tumor de Ehrlich geram uma resposta inflamatória local caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, edema, migração celular e recrutamento de resposta imune (Stewart, 1959, Iwamoto et al., 2015), além de um aumento nos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub>, mas não de tromboxanos (Fecchio et al., 1990). Por estas características, decidiu-se incluir neste modelo experimental, como segundo controle positivo, o anti-inflamatório não esteroideal (AINES) piroxicam. Assim, observou-se que todos os grupos experimentais (doxorrubicina, piroxicam e FA: 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>) apresentaram redução significativas ( $p < 0,001$ ) na variação do volume tumoral (%) já a partir do 9º dia de tratamento, em relação ao grupo veículo (Fig. 45). Assim, em relação aos grupos tratados com FA, a atividade antitumoral não foi dependente da dose empregada, ou seja, os valores foram bem próximos entre os grupos tratados com FA, apresentando um efeito platô. Esse efeito também foi observado no teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais *in vitro* (Fig. 26).

Além disso, a redução promovida pelo piroxicam (34,13%,  $p < 0,001$ ), em relação ao controle negativo, corroborou o papel importante da inflamação para o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich e que compostos com ação anti-inflamatória também podem reduzir a progressão do tumor. Pensando nessa relação câncer-inflamação, foi avaliado indiretamente o efeito dos tratamentos na migração e/ou ativação de neutrófilos para o local de inoculação do tumor através da dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO).

Esta análise é importante pela infiltração de neutrófilos observada em muitos tipos de tumores, sendo, portanto, denominados de neutrófilos associados aos tumores. Este quadro é também frequentemente observado em câncer associado com inflamação, onde a persistência de células tumorais alteradas geneticamente, hipóxia e morte celular criam um ambiente inflamatório com contínuo recrutamento de leucócitos (Dumitru et al., 2013; Liang e Ferrara, 2016; Moses e Brandau, 2016).

O papel do neutrófilo na tumorigênese tem sido debatido na literatura, podendo ter ação tanto como supressor quanto como promotor do tumor. Porém, um número cada vez maior de observações clínicas e estudos em laboratórios tem demonstrado que a presença de neutrófilos em tumores está correlacionada com um prognóstico pobre para vários tipos de câncer, tais como, carcinoma broncoalveolar, melanoma, carcinoma hepatocelular, glioma, câncer de colón, carcinoma renal e carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (Brandau et al., 2013; Urubi-Querol e Rosales, 2015). Assim, muitos estudos têm identificado mecanismos de progressão do tumor mediados por neutrófilos (Moses e Brandau, 2016).

Neste sentido, muitos estudos demonstram que os neutrófilos podem promover a progressão do tumor através da angiogênese, metástase e remodelação da matriz extracelular. As metaloproteinases, ROS, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), arginase 1 e várias citocinas têm sido identificadas como grandes mediadores deste processo. Desta forma, a relevância clínica dos neutrófilos na oncologia humana faz dessas células um alvo atrativo para intervenções terapêuticas (Tecchio et al., 2013; Urubi-Querol e Rosales, 2015; Moses e Brandau, 2016).

Como esperado, a presença das células tumorais de Ehrlich promoveu uma grande migração de neutrófilos para a pata do animal, que teve a atividade da MPO diminuída pelos tratamentos com doxorubicina e por FA, nas doses de 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>, enquanto a menor dose de FA e o piroxicam não promoveram redução significativa na dosagem de MPO. Assim, esses resultados sugerem que apesar do efeito anti-inflamatório do piroxicam promover uma redução significativa da variação de volume do tumor, muito provavelmente, apenas a redução efetiva de proliferação das células de Ehrlich resulte em uma diminuição significativa da infiltração de neutrófilos no tecido.

Em relação à evolução do peso corporal, somente os animais tratados pela doxorubicina apresentaram perda de 3,09% no 15º dia de tratamento. De fato, a doxorubicina, apesar de ser um potente agente antitumoral e uma das drogas antineoplásicas mais utilizadas até o momento, a sua aplicação é limitada por seus efeitos colaterais, que incluem toxicidade à medula óssea, distúrbios gastrointestinais, estomatite, alopecia, edema, cardiotoxicidade aguda e cumulativa (Graeser et al., 2010).

A toxicidade apresentada pela maioria das drogas disponíveis na quimioterapia oncológica, bem como pela radioterapia, é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novas drogas, que visam maiores índices terapêuticos com maior seletividade para as linhagens tumorais (Weinberg, 2008). Dessa forma, a ausência de sinais visíveis de toxicidade nas doses efetivas da FA representa um indicativo positivo para a continuidade dos estudos.

Em relação aos parâmetros sanguíneos, observou-se que, para o parâmetro de leucócitos totais, houve uma diminuição no número destas células para os grupos veículo, e controles positivos. Mas, não houve diferença estatística para os grupos experimentais. Porém, o grupo tratado com FA sem tumor, apresentou diferença estatística em relação ao grupo satélite (Fig. 48).

Não há até o momento descrito na literatura um valor de referência para os parâmetros sanguíneos para a espécie de BALB/c. Contudo há um trabalho que realizou estudos comparativos de valores hematológicos entre sexo e categorias de camundongos

C57BL/6 e BALB/c. Neste trabalho os autores indicam que para o parâmetro de leucócitos para BALB/c fêmea, os valores variam de  $4,33 \pm 3,98 \times 10^3$  mm (Spinelli et al., 2012). Portanto, a diferença estatística entre o grupo tratado com FA sem tumor e o grupo veículo provavelmente não representam uma toxicidade em relação aos leucócitos.

Houve somente diferença estatística para as maiores doses de FA nos parâmetros sanguíneos de eritrócitos e plaquetas, o que pode estar relacionado com o fato de os animais estarem doentes e não com a amostra testada, pois o controle negativo também teve um leve aumento no número das plaquetas. Portanto, estudos de toxicidade específicos em animais saudáveis deverão ser realizados futuramente.

Na literatura é descrito que o tumor ascítico de Ehrlich apresenta um efeito de mielossupressão, ou seja, ocorre um declínio no número de células progenitoras, em particular nas linhagens de macrófagos e granulócitos da medula óssea (Pessina et al., 1982; Queiroz et al., 2004; Queiroz et al., 2008). Além disso, é geralmente aceito que a diminuição das células progenitoras na medula óssea está associada à maciça migração destas células para o baço, ocasionando a esplenomegalia. Muitos estudos com novas terapias são realizados para reverter esse quadro de mielossupressão da medula óssea e a mieloestimulação do baço induzido por esse tumor (Valadares e Queiroz, 2002; Queiroz et al., 2008).

Assim, sugere-se que o comportamento observado no parâmetro sanguíneo em modelo de tumor sólido pode ser o mesmo do modelo de tumor ascítico de Ehrlich, já que estudos com tumor sólido de Ehrlich em camundongos mostraram que este tumor também induz a esplenomegalia (Rivenson et al., 1980). Desta forma, podemos sugerir que a amostra de FA testada melhorou o efeito de mielossupressão produzido pelo tumor, já que não houve diferença estatística em relação ao satélite.

Na análise do peso relativo dos órgãos, também não houve diferença estatística entre o grupo satélite e o grupo tratado com a maior dose sem tumor, o que corrobora com os resultados anteriores, mostrando que a FA não apresenta toxicidade neste modelo experimental. No entanto, nos animais com tumor e tratados com as maiores doses de FA (10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup>) houve diferenças estatísticas em relação ao grupo satélite, principalmente para o baço. Essa esplenomegalia, como já supracitado, pode estar sendo estimulada pela mielossupressão ocasionada pelo tumor de Ehrlich, o que pode justificar a presença de alterações somente nos animais que foram inoculados com o tumor e não no grupo tratado com a maior dose sem tumor.

Apesar de a FA ter diminuído a supressão dos leucócitos, não houve diminuição da esplenomegalia. Foram observados também aumentos leves no peso relativo de outros

órgãos dos animais tratados com a dose mais elevada. A biotransformação de drogas geralmente afeta os órgãos de detoxificação, como o fígado e o rim, e às vezes, esse efeito da droga nos órgãos de detoxificação pode também levar a esplenomegalia (Petroianu, 2011).

No entanto, vale ressaltar novamente que não houve diferença estatística entre o satélite e o grupo tratado com 30 mg Kg<sup>-1</sup> de FA sem tumor, reforçando a ideia de que muitas das alterações observadas tanto pelos parâmetros sanguíneos quanto pelo peso relativo do órgão podem ser consequência das ações produzidas pelo tumor sólido de Ehrlich e não da amostra propriamente dita.

E por fim, é sabido que um dos efeitos colaterais do piroxicam é a esplenomegalia (Petroianu, 2011), e que sua administração junto com a presença do tumor pode ter potencializado a sua ação neste efeito colateral.

Até o momento, não há na literatura trabalhos com o gênero *Boehmeria* no modelo de tumor sólido de Ehrlich. Há relatos de que o alcaloide criptopleurina (3µM Kg<sup>-1</sup>) inibiu em 50% o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, em camundongos Swiss fêmeas, quando administrado por via i.p., duas vezes ao dia, durante 10 dias (Donaldson et al., 1968). Ainda, o derivado sintético (*S*)-13-Oxa-criptopleurina (20 mg Kg<sup>-1</sup>, via i.p.) reduziu o desenvolvimento do tumor xenográfico de adenocarcinoma de cólon-retal (HT-29) em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), sem efeitos colaterais durante o tratamento (Yang et al., 2011), resultado similar ao reportado para o derivado de criptopleurina YXM-110 (10 mg Kg<sup>-1</sup>, via i.p.) no mesmo modelo experimental (Lai et al., 2011).

Com base nos resultados obtidos até o momento e na relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento do tumor foi proposto o estudo de EB2 e FA em modelos de inflamação.

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação *in vivo* bem estabelecido e tem sido comumente utilizado para avaliar a atividade antiedematogênica de produtos naturais (Fabri et al., 2013). Carragenina é o nome genérico para uma família de polissacarídeos sulfatados de elevado peso molecular, obtidos pela extração de certas espécies de algas vermelhas da família Rhodophyceae (*Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina* e *Hypnea*) (Campo et al., 2009; Jiao et al., 2011). Estes polissacarídeos são compostos por unidades de galactose e de anidrogallactose unidas por ligação glicosídica (Jiao et al., 2011; Li et al., 2014).

Quando injetada, a carragenina induz o edema inflamatório induzido como resultado de uma ação sequencial e integrada de vários mediadores inflamatórios; após 2 horas da injeção da carragenina, a resposta inflamatória observada é resultado da liberação de



histamina, 5-hidroxitriptamina, bradicinina, serotonina, fator ativador de plaquetas, substância P e prostaglandinas, dentre outras substâncias (Di Rosa et al., 1971; Lapa et al., 2008). Na sequência o edema é mantido principalmente pela produção de prostaglandinas (Di Rosa e Willoghby, 1971; Williams, 1979; Lapa et al., 2008), ocorrendo também a mobilização de monócitos, aumento da expressão da cicloxigenase-2 (COX-2), diminuição de óxido nítrico (NO) e migração de macrófagos (Fröde et al., 2001; Nunes et al., 2007; Pedernera et al., 2010), sendo o pico do edema observado entre 4-6 horas após a aplicação do agente flogístico (Lapa et al., 2008).

O emprego desse modelo mostrou que EB2 possui efeito antiedematogênico inversamente proporcional à dose, ou seja, a menor dose ( $75 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) apresentou efeito anti-inflamatório já a partir de 1 hora após a indução do edema, a dose intermediária ( $150 \text{ mg Kg}^{-1}$  do EB2) apresentou o efeito anti-inflamatório significativo somente após 4 horas da injeção da carragenina, enquanto a maior dose ( $300 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) apresentou um efeito pró-inflamatório. Esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, às propriedades vesicantes do alcaloide criptopleurina, as quais se assemelham às daquelas da mostarda nitrogenada (Lande, 1947; Fridrichsons e Mathieson, 1954) um agente alquilante utilizado como quimioterápico (Almeida et al., 2005b). Assim, em baixas doses (portanto, menor concentração de criptopleurina), o EB2 teria uma ação anti-inflamatória e à medida que a dose foi aumentada, aumentando-se consequentemente a concentração do alcaloide criptopleurina, prevaleceria o efeito vesicante (inflamatório).

Outros alcaloides utilizados na terapia do câncer também têm propriedades vesicantes, tais como os alcaloides da vinca e do taxol, os quais podem causar irritação severa com formação de vesículas, edema e destruição tecidual quando em contato com a pele íntegra (Brunherotti, 2007).

Por sua vez, a FA apresentou atividade antiedematogênica independente da dose avaliada (3, 10 e  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), com todos os tratamentos com FA desde a primeira hora até o tempo de 6 h. Assim, pelo fato das primeiras duas horas após a indução da carragenina não serem inibidas por AINES, como indometacina e aspirina (Prajapati et al., 2014), sugere-se que a atividade da FA seja, em partes, similar a dos anti-inflamatórios esteroidais.

Na literatura, há somente um trabalho que avaliou o efeito anti-inflamatório *in vivo* do gênero *Boehmeria* no modelo de edema de pata induzido por carragenina. O extrato bruto aquoso da raiz de *B. nivea* ( $100, 300$  e  $500 \text{ mg Kg}^{-1}$ , v.o., em ratos) apresentou efeito antiedematogênico significativo já a partir da primeira hora após a injeção da carragenina para todas as doses testadas, enquanto que o extrato bruto aquoso da raiz de *B. nivea* subsp.

*nippononivea* foi ativo apenas duas horas após a injeção da carragenina, para todas as doses testadas (100, 300 e 500 mg Kg<sup>-1</sup>, VO, em ratos) (Lin et al., 1997).

Além dos resultados referirem-se a duas espécies diferentes de *B. caudata*, eles referem-se aos extratos aquosos das raízes, enquanto os estudos realizados no presente projeto empregaram o extrato etanólico das partes aéreas. Essas diferenças resultaram muito provavelmente em grandes diferenças na composição química desses extratos e podem explicar porque os extratos de *B. nivea* e *B. nivea* subsp. *nippononivea* apresentaram efeito anti-inflamatório na dose de 500 mg Kg<sup>-1</sup> enquanto o extrato de *B. caudata* foi pró-inflamatório na dose de 300 mg Kg<sup>-1</sup>.

Um derivado sintético do criptopleurina, o 7-metoxicriptopleurina (3 mg Kg<sup>-1</sup>, via i.p.) reduziu o edema de pata induzido por carragenina em ratos já a partir da primeira hora após a injeção da carragenina, com efeito antiedematogênico similar à indometacina na quinta hora após a carragenina (Yang et al., 2007).

Desta forma, os resultados *in vivo* encontrados na literatura em modelo de edema induzido por carragenina, corroboram com os resultados obtidos pela FA, sendo que a ação anti-inflamatória ocorre já a partir da primeira hora após a injeção da carragenina e se mantém até o pico das 6 horas.

Além do edema de pata induzido por carragenina, o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos também tem sido utilizado como triagem de substâncias com potencial ação anti-inflamatória (Murakawa et al., 2006), tanto por via tópica quanto por via sistêmica, de anti-inflamatórios esteroidais (Tubaro et al., 1986; Lapa et al., 2008) e não esteroidais (Tubaro et al., 1986).

O agente flogístico empregado é o óleo obtido das sementes de cróton (*Croton tiglium* L.), que apresenta uma grande quantidade de ésteres de forbol, sendo o 12-O-tetracanoilphorbol-13-acetato (TPA) o composto majoritário. O TPA induz o edema a partir do metabolismo do ácido araquidônico (Carlson et al., 1985; Otuki et al., 2005); assim, substâncias com efeito inibidor sobre cicloxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (LOX) podem ser avaliadas neste modelo (Carlson et al., 1985). Duas horas após a aplicação de óleo de cróton na orelha do animal já é possível observar vasodilatação e, a partir das 3 horas após a aplicação, observa-se a presença de células inflamatórias no interstício celular, com o pico máximo do edema ocorrendo 6 horas após a aplicação (Young et al., 1983).

Assim, na primeira avaliação do EB2 nesse modelo de inflamação, empregou-se uma dose única (75 mg Kg<sup>-1</sup>), escolhida com base no resultado do teste de edema de pata induzido por carragenina, nas três vias de administração (i.p., v.o. e TO).

Através dos resultados com o EB2 observamos que as amostras administradas pela via sistêmica se mostraram mais efetivas do que pela via tópica. No entanto, para a fração rica em alcaloides não foi observado diferença entre as duas vias.

Segundo Carlson et al. (1985), em geral, as drogas inibidoras de COX, como indometacina, aspirina e piroxicam não apresentaram efeito anti-inflamatório quando administradas oralmente no teste de edema de orelha induzido por TPA e ácido araquidônico. No entanto, drogas inibidoras mistas de COX/LOX são mais efetivas pela via oral, bem como os anti-inflamatórios esteroidais.

Assim, como tanto EB2 quanto FA foram efetivos na redução do edema induzido por óleo de cróton tanto por via tópica quanto por via sistêmica, seria possível sugerir que o mecanismo de ação anti-inflamatória de FA envolveria uma capacidade inibitória mista (inibição de LOX e COX) ou uma atividade como dos esteroidais (inibe as fosfolipases), corroborando com o resultado de edema de pata induzido por carragenina.

Pensando no fato de que o ácido araquidônico pode ser metabolizado por três diferentes mecanismos, é concebível que apenas a inibição de COX-2 poderia não levar a um resultado anti-inflamatório, uma vez que o ácido araquidônico ainda poderia ser metabolizado através de LOX ou de citocromo P450 induzindo, desta forma, fatores pró-tumorigênicos, como por exemplo, os HETEs (Schneider e Pozzi, 2011). Desta forma, o bloqueio das duas maiores vias (as vias da COX e LOX) poderia ser uma abordagem plausível, inclusive para a inibição da progressão do tumor. Isso porque, em estudos *in vitro*, a inibição simultânea das duas vias tem apresentado resultados mais eficientes na indução da morte de células tumorais quando comparada com tratamentos que inibem uma única via (Schneider e Pozzi, 2011).

No entanto, a administração simultânea de dois inibidores, um para via COX e outro para a via LOX, poderia aumentar o risco de efeitos colaterais; assim, uma boa alternativa seria a pesquisa de fármacos com alvo nas duas vias (Schneider e Pozzi, 2011). Vários exemplos são descritos na literatura, tais como vários híbridos de ácido caféico com o heterocíclico diaril-1,2,4-triazolam, os quais apresentaram atividades antiproliferativa e inibitória para COX-2/5-LOX *in vitro* e a licofelona que por inibir COX/5-LOX promoveu diminuição dos níveis de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> sem apresentar os efeitos gastrointestinais causados pelos AINES (Schneider e Pozzi, 2011).

Assim, pelos resultados obtidos no teste de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, a fração rica em alcaloides poderia ter ação como inibidor misto de COX/LOX. Em estudo *in vitro* com a linhagem de mama (MDA-MB231) induzida com TNF- $\alpha$ , o alcaloide criptopleurina suprimiu a expressão da COX-2 induzida pelo TNF-  $\alpha$  (Jin et al., 2012). Porém,

como discutido na introdução, os trabalhos dão pouco enfoque para o papel da LOX na progressão do tumor; assim, mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo de ação como inibidor nas vias de COX e LOX da FA, bem como dos seus alcaloides isolados.

Complementando o estudo de atividade anti-inflamatória de FA no modelo de edema induzido por óleo de cróton, foi realizado uma análise do efeito de FA sobre a atividade da enzima mieloperoxidase como uma forma indireta de avaliação da ativação e/ou migração dos neutrófilos para o edema localizado na orelha. Os resultados obtidos, para as duas vias de administração, demonstraram que a FA também inibiu a ativação e/ou migração de neutrófilos para o local inflamado desencadeada pela aplicação do óleo de cróton. Efeito também observado para o alcaloide colchicina, que é considerado um inibidor da quimiotaxia dos neutrófilos (Queiroz et al., 2012).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é milenar, inclusive para o câncer e doenças inflamatórias. O Brasil é considerado o país de maior biodiversidade no mundo, contudo grande parte das plantas nativas ainda não apresentam estudos sobre o seu potencial farmacológico. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. O presente estudo tenta sanar esta lacuna entre o elevado número de plantas e pouco conhecimento científico. Portanto, os resultados até o momento mostraram que as partes aéreas de *Boehmeria caudata* apresentam grande potencial como fonte de novas terapias para câncer e inflamação. Estudos futuros poderão aprofundar ainda mais a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos assim como avaliação de segurança de uso.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

- Com relação à seleção das partes empregadas e ao método de preparação dos extratos de *Boehmeria caudata* avaliados, o extrato bruto etanólico (EBE) obtido das partes aéreas, através da extração em *soxhlet*, apresentou o melhor efeito antiproliferativo em linhagens tumorais humanas *in vitro*, com concentração efetiva menor do que  $0,25\mu\text{g mL}^{-1}$ , não tendo sido observadas diferenças significativas entre o extrato bruto etanólico total (EB1) e o extrato bruto etanólico obtido após a extração com diclorometano (EB2), podendo-se desta forma trabalhar com os dois extratos;

- A extração ácido-base resultou em uma fração rica em alcaloides (FA) a qual, após avaliação de atividade antiproliferativa *in vitro* foi mais potente as linhagens de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460), e de leucemia (K-562);

- Sete alcaloides (cinco fenantroquinolizidínicos) foram identificados pela espectrometria de massas de alta resolução na FA sendo que, com exceção do alcaloide criptopleurina, os demais são descritos pela primeira vez em *B. caudata*;
- FA induziu a parada do ciclo celular de células de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460) em fase G2/M, sugerindo uma ação sobre fuso mitótico;
- Em função dos tempos de tratamentos empregados, muito provavelmente FA promoveu inicialmente a parada do ciclo celular para então ativar um processo de morte celular, o qual é iniciado pela exposição de resíduos de fosfatidilserina sem praticamente alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática de células de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460);
- Os danos produzidos por FA em células NCI-H460 não são totalmente reversíveis, uma vez que a retirada do tratamento com FA diminui a capacidade de recuperação e de replicação das células;
- As simulações de docagem dos compostos: boehmeriasina A, boehmeriasina B, criptopleurina sugerem tanto pela análise visual das interações quanto pelos valores de escore de docagem que estes compostos provavelmente atuam no sítio da colchicina, mas seriam inibidores menos potentes do que a própria colchicina. Já para a (15*R*)-hidróxicriptopleurina, embora os valores de escore de docagem sugiram que este composto é menos potente do que a própria colchicina, a análise visual das interações realizadas sugerem a existência de duas ligações de hidrogênio diretas entre os grupos químicos deste composto e os resíduos de aminoácido da tubulina, além de uma ligação de hidrogênio indireta também observada para os três compostos anteriormente citados. Neste sentido, considerando-se que as ligações de hidrogênio são comparativamente mais fortes do que ligações hidrofóbicas e aromáticas, é possível que este composto apresente um padrão de interação superior aos demais alcaloides fenantroquinolizidínicos e, possivelmente, comparável ao da própria colchicina;
- A atividade antiproliferativa observada *in vitro* se reproduziu em modelo *in vivo* através da redução do crescimento tumoral do tumor sólido de Ehrlich quando tratado tanto com EB2 quanto com FA;
- Nos modelos de inflamação *in vivo*, EB2 apresentou efeito anti-inflamatório nas menores doses avaliadas enquanto para FA não houve diferença significativa entre as doses;

- FA apresentou efeito anti-inflamatório tanto pela via oral quanto pela via tópica, no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, sugerindo um provável mecanismo de ação por inibição inespecífica de LOX/COX;
- FA reduziu o acúmulo de MPO, tanto no modelo de tumor sólido de Ehrlich quanto nos modelos de edema, sugerindo que a ação de FA resultou em diminuição da infiltração de neutrófilos no tecido;
- Em todos os estudos de doses repetidas, EB2 e FA não apresentaram sinais clínicos de toxicidade nas doses empregadas. No entanto estudos específicos de toxicidade com animais saudáveis devem ser realizados;
- Esses resultados indicam o potencial uso de FA na terapia anti-inflamatória e antitumoral, e novos estudos poderão aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação para as atividades farmacológicas evidenciadas no presente estudo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accelrys software inc. Discovery Studio Visualizer Version 4.0, Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA, 2013.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. Biologia molecular da célula. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 1396p.
- Almeida DCG. Ciclo celular. In: Peres CM, Curi R, editores. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A; 2005a. 283p.
- Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e a agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução. Quim Nova. 2005b Sep; 28(1): 118-29;
- Al-Shamma A, Drake SD, Guagliardi LE, Mitscher LA, Swayze JK. Antimicrobial alkaloids from *Boehmeria cylindrical*. Phytochemistry. 1982; 21(2): 485-87. doi:10.1016/S0031-9422(00)95304-4
- Aravindaram K, Yang N-S. Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy. Planta Med. 2010 Aug; 76(11): 1103–17. doi: 10.1055/s-0030-1249859
- Arooj M, Kim S, Sakiah S Cao GP, Lee Y, Lee KW. Molecular modeling study for inhibition mechanism of human chymase and its application in inhibitor design. PLoS One. 2013 Apr; 8(4): e62740. doi: 10.1371/journal.pone.0062740.
- ATCC – The Global Bioresource Center. [acesso em 02/10/2014] Disponível em: <https://www.atcc.org/>
- Banwell MG, Bezos A, Burns C, Kruszelnicki I, Parish CR, Su S, Sydnese MO. C8c-C15 monoseco-analogues of the phenanthroquinolizidine alkaloids julandine and cryptopleurine exhibiting potent anti-angiogenic properties. Bioorg Med Chem Lett. 2006 Jan; 16(1): 181-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.09.032.
- Barbacid M, Fresno M, Vazquez D. Inhibitors of polypeptide elongation on yeast polysomes. J Antibiot (Tokyo). 1975 Jun; 28(6): 453-62.
- Barcelos RC, Pelizzaro-Rocha KJ, Pastre JC, Dias MP, Ferreira-Halder CV, Pilli RA. A new goniothalamin N-acylated aza derivative strongly downregulates mediators of signaling transduction associated with pancreatic cancer aggressiveness. Eur J Med Chem. 2014 Nov; 87: 745-58. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.09.085.
- Barnard, C. The c-mitotic activity of cryptopleurine. Aust J Sci. 1949: 12: 30.
- Bertho AL. Citometria de fluxo. [acesso em 10/05/2016]. Disponível em: <http://www.tecinmed.com/artigos/fisbioqui/4-citometros-de-fluxo-fluorocromos.pdf>.

- Bertollo CM. Mecanismos de morte celular induzida pela radiação  $\gamma$  e expressão de proteínas nas novas linhagens de câncer de mama humano macl-1 e mgso-3. [Tese]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- Bezerra DP, Castro FO, Alves APNN, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. Braz J Med Biol Res. 2006 jun; 39(6): 801-07. doi: /S0100-879X2006000600014.
- Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. Nat Med. 2011 Mar; 17(3): 320-329. doi: 10.1038/nm.2328.
- Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate. 2003 Nov; 57(3): 205-25. doi: 10.1002/pros.10290.
- Brandão HN. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Quim Nova. 2010 Jun; 33(6): 1359-1369. doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026.
- Brandau S, Dumitru CA, Lang S. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. Semin Immunopathol. 2013 Mar; 35(2): 163-76. doi: 10.1007/s00281-012-0344-6.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol. 1982 Mar; 78(3): 206-9.
- Brito DF. Toxicologia Humana Geral. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ateneu; 1988. p. 291-93.
- Brunherotti MR. Intervenções no extravasamento de quimioterápicos vesicantes: revisão integrativa da literatura. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007.
- Bucher K, Skogerson L. Cryptopleurine-an inhibitor of translocation. Biochemistry. 1976 Nov; 15(22): 4755-9.
- Butler MS. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. Nat Prod Rep. 2008 Jun; 25(3): 475-516. doi: 10.1039/b514294f.
- Cai XF, Jin X, Lee D, Yang YT, Lee K, Hong YS, Lee JH, Lee JJ. Phenanthroquinolizidine alkaloids from roots of *Boehmeria pinnosa* potently inhibit hypoxia-inducible factor-1 in AGS human gastric cancer cells. J. Nat. prod. 2006 Jul; 69(7): 1095-97. doi: 10.1021/np060081y.



- Campo VL, Kawano DF, Silva DB, Jr, Carvalho DI. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. *Carbohydrate Polymers*. 2009 Jun; 77: 167–80. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.01.020
- Carlson RP, O'Neill-Davis L, Chang J, Lewis A. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1985 Dec; 17(2): 197-206.
- Carvalho JR, Nascimento ESM, Xavier JG, Bonamin LV, Hurtado ECP. Papel do microambiente tumoral no desenvolvimento do melanoma. *Vet Not*. 2015 Aug; 21(2): 39-49. doi.org/10.14393/VTv21n2a2015.29673.
- Castro KN, Lima DF, Wolschick D, Andrade IM, Santos RC, Santos FJ<sup>1</sup>, et al. In vitro effects of *Pilocarpus microphyllus* extracts and pilocarpine hydrochloride on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016 Jun; 25(2): 248-53. doi: 10.1590/S1984-29612016032.
- Cavalcanti Junior GB, Klumb CE, Maia RG. p53 e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002 Jul; 48(3): 419-27.
- Cellminer™. Genomics and bioinformatics group. [acesso em 15 maio 2016]. Disponível em: <http://discover.nci.nih.gov/cellminer/>
- Cen XN, Zhu P, Shi YJ, Ren YL, Ma MX, Yu JR. Cytokine-induced killer cells induce apoptosis of K562 cells expressed bcr-abl. *J Exp Hemat / Chinese Association of Pathophysiology*. 2002 Jun; 10 (3): 201-04.
- Chabner BA, Roberts Jr TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan; 5(1): 65-72. doi: 10.1038/nrc1529.
- Chang JM, Huang KL, Yuan TT, Lai YK, Huang LM. The Anti-hepatitis B virus activity of *Boehmeria nivea* extract in HBV-viremia SCID mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Jun; 7(2): 189-95. doi: 10.1093/ecam/nem180.
- Christodoulou MS, Calogero F, Baumann M, García-Argáez AN, Pieraccini S, Sironi M, et al. Boehmeriasin A as new lead compound for the inhibition of topoisomerase and SIRT2. *Eur J Med Chem*. 2015 Mar; 92:766-75. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.038.
- Choi JY, Hong WG, Cho JH, Kim EM, Kim J, Jung CH, et al. Podophyllotoxin acetate triggers anticancer effects against non-small cell lung cancer cells by promoting cell death via cell cycle arrest, ER stress and autophagy. *Int J Oncol*. 2015 Oct; 47(4):1257-65. doi: 10.3892/ijo.2015.3123.
- Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v. 1. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984.

- Cui MB, Wang QM. Total synthesis of phenanthro-quinolizidine alkaloids: (±)-Cryptopleurine, (±)-Boehmeriasin A, (±)-Boehmeriasin B and (±)-Hydroxycryptopleurine. *Eur J Org Chem.* 2009 31: 5445–5451, 2009. doi: 10.1002/ejoc.200900834.
- Dawson AH, Buckley NA. Pharmacological management of anticholinergic delirium - theory, evidence and practice. *Br J Clin Pharmacol.* 2016 Mar; 81(3): 516-24. doi: 10.1111/bcp.12839.
- de Oliveira JF, da Silva AL, Vendramini-Costa DB, da Cruz Amorim CA, Jiao s JF, Ribeiro AG, et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. *Eur J Med Chem.* 2015 Nov;104:148-56. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.09.036.
- Della Torre A. Óleo essencial de *baccharis trimera* (less.) Dc.: estudo fitoquímico e avaliação *in vitro* das atividades antiproliferativa e mutagênica. [Dissertação]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- Di Rosa M, Willoughby DA, Giroud JP. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 1971 May; 104 (1): 15-29. doi: 10.1002/path.1711040103
- Di Rosa M, Willoughby DA. Screens for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol.* 1971 Apr; 23(4): 297-98.
- Donaldson GR, Atkinson MR, Murray AW. Inhibition of protein synthesis in Ehrlich ascites-tumour cells by the phenanthrene alkaloids tylophorine, tylocrebrine and cryptopleurine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968 Apr; 31(1): 104-9.
- Dumitru CA, Lang S, Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 2013 Jun; 23(3): 141–48. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.005.
- Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure line with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.* 1954 Feb; 167-82.
- Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro; INCA. 2016 122 p.
- Fabri RL, Garcia RA, Florêncio JR, Pinto CCN, de Oliveira LG, Aguiar JA. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. *J Pharm Pharmacol.* 2014 May; 66(5): 722-32. doi: 10.1111/jphp.12189.
- Farnsworth NR, Hart NK, Johns SR, Lanberton JA, Messmer W. Alkaloids of *Boehmeria cylindrica* (family Urticaceae): Identification of a cytotoxic agent, highly active against

- Eagle's 9KB carcinoma of the nasopharynx in cell culture, as cryptopleurine. *Aust J Chem.* 1969 Apr; 22: 1805–07.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation.* 1990 Feb; 14(1): 125-32.
- Fernandes PD, Gomes N de M, Sirois P. The bradykinin B1 receptor antagonist R-954 inhibits Ehrlich tumor growth in rodents. *Peptides.* 2011 Sep; 32(9):1849-54. doi: 10.1016/j.peptides.2011.07.023.
- Fraga AGM. Combretastatinas e seus análogos: a natureza como fonte alternativa para a terapia do câncer. *Rev. Virtual Quim.* 2015 Mar; 7 (2), 765-90. doi: 10.5935/1984-6835.20150036.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc.* 2006 Dec;1(5):2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
- Freshney I. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*, 6 ed. Hoboken: Copyright<sup>©</sup> John Wiley & Sons, Inc. 2010. p. 365-81.
- Fridrichsons J, Mathieson AMCL. Structure of a Derivative of Cryptopleurine. *Nature.* 1954 Apr; 173: 732-33. doi: 10.1038/173732a0.
- Fröde TS, Souza GE, Calixto JB. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 2001 Feb; 13(3): 162–68. doi: 10.1006/cyto.2000.0816.
- Furtado MA, Rossetti F, Chanda S, Yourick D. Exposure to nerve agents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy. *Neurotoxicology.* 2012 Dec; 33(6): 1476-90. doi: 10.1016/j.neuro.2012.09.00.
- Gaglioti AL. *Urticaceae Juss. no Estado de São Paulo, Brasil. [Dissertação].* São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012 Jan; 19(1): 107-20. doi: 10.1038/cdd.2011.96.
- Gao S, Scott RE. Stable overexpression of specific segments of the P2PR protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis. *J Cell Physiol.* 2003 Dec; 97(3): 445-52. doi: 10.1002/jcp.10381.
- Gasteiger J, Rudolph C, Sadowski J. Automatic generation of 3D-atomic coordinates for organic molecules. *Tetrahedron Comput Methodol.* 1990 Feb; 3(6): 537-47. doi:10.1016/0898-5529(90)90156-3.

- Generalic, Eni. "Vacuum filtration." *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. 31 July 2014. KTF-Split. 14 Nov. 2014. [acesso em 30/09/2014]. Disponível em: <http://glossary.periodni.com/>
- Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW. Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem Pharmacol*. 2008 Oct; 76(8): 947-57. doi: 10.1016/j.bcp.2008.06.024.
- Gibbons S. An introduction to planar chromatography and its application to natural products isolation. In: Sarker SD, Nahar L, editores. *Natural products isolation – Methods e Protocols*. 3 ed. New York: Humana Press (Springer); 2012. 557p. 117-54.
- Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Hovell AM, Landgraf RG, Matheus ME, et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich. *J Ethnopharmacol*. 2008 Sep; 119(1): 179-84. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.033.
- Gorjão R. Contagem de células. In: Peres CM, Curi R, editores. *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A; 2005. 283p.
- Graeser R, Esser N, Unger H, Fichtner I, Zhu A, Unger C, et al. INNO-206, the (6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin), shows superior antitumor efficacy compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest New Drugs*. 2010 Feb; 28(1): 14-19. doi: 10.1007/s10637-008-9208-2.
- Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins other Lipid Mediat*. 2011 Nov; 96: 27–36. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2011.08.004.
- Groot DJ, Vries EG, Groen HJ, de Jong S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Jan; 61:52–69. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.001.
- Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, DuBois RN. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003 Mar; 63:906–911.
- Hagerling C, Werb Z. Neutrophils: Critical components in experimental animal models of cancer. *Semin Immunol*. 2016 Apr; 28(2):197-204. doi: 10.1016/j.smim.2016.02.003.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan; 100(1): 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar; 144(5): 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

- Hart NK, Johns SR, Lambert JA. Alkaloids of the sapotaceae: trans- $\beta$ -methylthioacrylate and tiglate esters of (-).isoretronecanol from a *Planchonella* species. Aust J Chem. 1968 Jan; 21(5): 1393-5.
- Haslam JM, Davey PJ, Linnane AW, Atkinson MR. Differentiation in vitro by phenanthrene alkaloids of yeast mitochondrial protein synthesis from ribosomal systems of both yeast and bacteria. Biochem Biophys Res Commun. 1968 Nov; 33(3):368-73.
- His LC, Back SJ, Eling TE. Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. Exp Cell Res. 2000 May; 256(2): 563-570. doi: 10.1006/excr.2000.4863.
- Hoffmann JJ, Luzbetak DJ, Torrance SJ, Cole JR. Cryptopleurine, cytotoxic agent from *Boehmeria caudata* (Urtiaceae) and *Cryptocarya laevigata* (Lauraceae). Phytochemistry. 1977 Dec; 17: 1448. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94617-X
- Huang KL, Lai YK, Lin CC, Chang JM. Inhibition of hepatitis B virus production by *Boehmeria nivea* root extract in HepG2 2.2.15 cells. World J Gastroenterol. 2006 Sep; 12(35): 5721-5.
- Huang KL, Lai YK, Lin CC, Chang JM. Involvement of GRP78 in inhibition of HBV secretion by *Boehmeria nivea* extract in human HepG2 2.2.15 cells. J Viral Hepat. 2009 May; 16(5): 367-75. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01072.x.
- Hulspas R, O'Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2009 Nov; 76(6):355-64. doi: 10.1002/cyto.b.20485.
- Hussain M, Javeed A, Ashraf M, Al-Zaubai N, Stewart A, Mukhtar MM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy. Pharmacol Res. 2012 Jul; 66(1): 7-18. doi: 10.1016/j.phrs.2012.02.003
- Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. Nat Med. 1995 Aug; 1(8): 822-6.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. [acesso: 11 maio 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
- Iwamoto LH, Vendramini-Costa DB, Monteiro PA, Ruiz AL, Sousa IM, Foglio MA, et al. Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. Evid Based Complement Alternat Med. 2015; ID: 948737. doi: 10.1155/2015/948737.
- Jin HR, Jin SZ, Cai XF, Li D, Wu X Nan et al. Cryptopleurine Targets NF- $\kappa$ B pathway, leading to inhibition of gene products associated with cell survival, proliferation, invasion and angiogenesis. PloS one. 2012 Jun; 7(6): e40355. doi: 10.1371/journal.pone.0040355.

- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs*. 2011 Feb; 9(2): 196–223. doi: 10.3390/md9020196.
- Johns SR, Lambertona A, Simoumis A, Willing RI. New alkaloids from *Cryptocarya pleurosperma* (Lauraceae): the structures of cryptopleuridine and cryptopleurospermine. *Aust J Chem*. 1970 Sep, 23: 353-61.
- Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev cancer*. 2004 Apr; 4(4): 253-65. doi: 10.1038/nrc1317.
- Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytometry A*. 2007 Mar; 71(3): 125-31.
- Khazir J, Mir BA, Pilcher L, Riley DL. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*. 2014 Jan; 7: 173–181. doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.010.
- Kingston DG. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J Nat Prod*. 2009 Mar; 72(3): 507-15. doi: 10.1021/np800568j.
- Kim SH, Sung MJ, Park JH, Yang HJ, Hwang JT. *Boehmeria nivea* stimulates glucose uptake by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma in C2C12 cells and improves glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013 Mar. doi: 10.1155/2013/867893.
- Kwon Y, Song J, Lee H, Kim EY, Lee K, Lee SK, et al. Design, synthesis, and biological activity of sulfonamide analogues of antofine and cryptopleurine as potent and orally active Antitumor Agents. *J Med Chem*. 2015 Oct; 58(19): 7749-62. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00764.
- Krmpotic E, Farnsworth NR, Messmer WM. Cryptopleurine, an active antiviral alkaloid from *Boehmeria cylindrical* (L.) Sw. (Urticaceae). *J Pharm Sci*. 1972 Sep; 61(9): 1508-09.
- Kroemer RT. Structure-based drug design: docking and scoring. *Curr Protein Pept Sci*. 2007 Aug; 8(4): 312-28.
- Lai CY<sup>1</sup>, Pan SL, Yang XM, Chang LH, Chang YL, Yang PC, et al. Depletion of 4E-BP1 and regulation of autophagy lead to YXM110-induced anticancer effects. *Carcinogenesis*. 2013 Sep; 34(9):2050-60. doi: 10.1093/carcin/bgt146.
- Lande DE. The alkaloids of *Cryptocarya pleurosperma*. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1948 Mar; 26(2): 181–87.
- Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MAS, Lima TCM. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5ª. ed. Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2008.

- Lee AY, Wang X, Lee DG, Kim Y-M, Jung Y-S, Kim HB, et al. Various Biological Activities of Ramie (*Boehmeria nivea*). Appl Biol Chem. 2014 Sep; 57(3): 279–86. doi.org/10.3839/jabc.2014.044.
- Li L, Ni R, Shao Y, Mao S. Carrageenan and its applications in drug delivery. Carbohydr Polym. 2014 Mar; 103: 1-11. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.008.
- Liang W, Ferrara N. The complex role of neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis. Cancer Immunol Res. 2016 Feb; 4(2): 83–91. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0313.
- Lin CC, Yen MH, Lo TS, Lin CF. The anti-inflammatory and liver protective effects of *Boehmeria nivea* and *B. nivea* subsp. *Nippononivea* in rats. Phytomedicine. 1997 Dec; 4(4): 301-308. doi: 10.1016/S0944-7113(97)80037-2.
- Lin CC, Yen MH, Lo TS, Lin JM. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activity of *Boehmeria nivea* var. *nivea* and *B. nivea* var. *tenacissima*. J ethnopharmacol. 1998 Feb; 60(1): 9-17.
- Litchfield Jr. JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Ther. 1949 Jun; 96 (2): 99-113.
- Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. Mol Cancer Res. 2006 Apr; 4(4): 221- 23. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0261.
- Lu Y, Chen J, Xiao M, Li W, Miller DD. An overview of tubulin inhibitors that Interact with the colchicine binding site. Pharm Res. 2012 Nov; 29(11): 2943-71. doi: 10.1007/s11095-012-0828-z.
- Luo YG, Li BG, Zhang, GL. A new quinolizidine alkaloid from *Boehmeria siamensis*. Chinese Chemical Letters. 2001 Mar; 12(4): 337 – 38.
- Luo Y, Liu Y, Luo D, Gao X, Li B, Zhang G. Cytotoxic alkaloids from *Boehmeria siamensis*. Planta med. 2003 Sep; 69(9): 842-45. doi: 10.1055/s-2003-43215
- Mahal K, Biersack B, Caysa H, Schobert R, Mueller T. Combretastatin A-4 derived imidazoles show cytotoxic, antivascular, and antimetastatic effects based on cytoskeletal reorganisation. Invest New Drugs. 2015 Jun; 33(3):541-54. doi: 10.1007/s10637-015-0215-9.
- Marchetti GM. Atividade antitumoral do arucanolídeo, germacranolídeo isolado de *Calea pinnatifida*. [Tese]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- Marrs TC, Maynard RL. Neurotransmission systems as targets for toxicants: a review. Cell Biol Toxicol. 2013 Dec; 29(6): 381-96. doi: 10.1007/s10565-013-9259-9.

- Maxwell SA, Rivera A. Proline oxidase induces apoptosis in tumor cells and its expression is frequently absent or reduced in renal carcinomas. *J Biol Chem*. 2003 Mar; 278 (4): 9784–89. doi: 10.1074/jbc.M210012200
- Médioni J, Di Palma M, Guillot A, Spaeth D, Théodore C. Efficacy and safety of Vinflunine for advanced or metastatic urothelial carcinoma in routine practice based on the French multi-centre CURVE study. *BMC Cancer*. 2016 Mar 14;16(1):217. doi: 10.1186/s12885-016-2262-9.
- Melo MM, Oliveira NF, Lago LA. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte 11: amitraz, estricnina, fluoracetado de sódio e fluoracetamida, rodenticidas anticoagulantes e avermectinas. *Rev Educo Contin*. 2002; 5(3): 259 - 67.
- Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, Kennedy TJ, Ding XZ, Strouch M, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin Cancer Res*. 2008 Out; 14(20):6525–6530. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4631.
- Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2011 Jun; 7(2):146-57.
- Mi Q, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Wani MC, Kinghorn AD, Swanson SM. 2009. Use of the *in vivo* Hollow Fiber assay in natural products anticancer drug discovery. *J Nat Prod*. 2009 Mar; 72(3): 573-580. doi: 10.1021/np800767a.
- Miettinen S, Ahonen MH, Lou Y-R, Manninen T, Tuohimaa P, Syvala H, et al. Role of 24-hydroxylase in vitamin D3 growth response of OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. 2004 Jan; 108(3): 367–373. doi: 10.1002/ijc.11520.
- Miquel FAG. Urticineae. In: Martius CFP (editor). *Flora brasiliensis*. Typographia Regia, Monachii, Lipsiae, v. 4, pt. 1, pp. 77-222, t. 62-70, 1853.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Jun; 83(11): 757-766.
- Moses K, Brandau S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin Immunol*. 2016 Apr; 28(2):187-96. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.018.
- Muley L, Baum B, Smolinski M, Freindorf M, Heine A, Klebe G, et al. Enhancement of hydrophobic interactions and hydrogen bond strength by cooperativity: synthesis, modeling, and molecular dynamics simulations of a congeneric series of thrombin inhibitors. *J Med Chem*. 2010 Mar; 53(5): 2126-35. doi: 10.1021/jm9016416.



- Munshi A, Hobbs M, Meyn R. Clonogenic cell survival assay. Blumenthal RD, editor. Chemosensitivity: Vol. 1: *In vitro* assays. Totowa: ©Humana Press Inc. 2005. 231p.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka, Y, Fukuda, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol.* 2006 Apr; 71(9): 1331-36. doi: 10.1016/j.bcp.2006.01.005.
- Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* 2016 Jun; 23(6):952-61. doi: 10.1038/cdd.2016.7.
- Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol.* 2013 Mar; 35(2): 123–137. doi:10.1007/s00281-012-0342-8.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012 Mar; 75(3): 311-335. doi: 10.1021/np200906s.
- NCI-EUA, Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. [acesso em 04/03/2016] Disponível em: <http://www.cancer.gov>.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnicini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res.* 2009 Jun; 59(6): 365-78. doi: 10.1016/j.phrs.2009.01.017
- Nunes FP, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa-e-Silva MC. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon.* 2007 Jun; 49(8): 1090-98. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.01.017.
- Oloris SCS, Dagli MLZ, Guerra JL. Effect of beta-Carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sci.* 2002 Jun; 71(6): 717-24.
- Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med (São Paulo).* 2010 jan-mar; 89(1):21-31.
- Otuki MF, Vieira-Lima FV, Lima FV, Malheiros A, Ynunes RA, Calixto JB. Topical antiinflammatory effects of the extract from *Portulaca kleinii* and  $\alpha$ -amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan; 507(1-3): 253-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.11.012
- Ozaslan M, Karagoz ID, Kilic IH, Guldur ME. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr J Biotechnol.* 2011 Mar; 10(3): 2375–78. doi: 10.5897/AJBx10.017
- Pais V.A.A. Avaliação de atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* de plantas medicinais provenientes da Serra da Mantiqueira Paulista [dissertação]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, 2011.

- Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM, Sevenini LA, Melo HA, Lagrota-Candido J, et al. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *R Ci med biol*. 2012 Apr; 11(1): 96-102.
- Pansare SV, Dyapa R. Enantioselective approach to functionalized quinolizidines: synthesis of (+)-julandine and (+)-cryptopleurine. *Org Biomol Chem*. 2012 Sep; 10(33):6776-84. doi: 10.1039/c2ob25689d.
- Pedernera AM, Guardia T, Calderón CEG, Rotelli AE, de la Rocha NE, Saad J R, López et al. Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. *Inflammopharmacology*. 2010 Out; 18(5): 253-60. doi: 10.1007/s10787-009-0028-6.
- Pereira MF, Rochais C, Dallemagne P. Recent Advances in Phenanthroindolizidine and Phenanthroquinolizidine Derivatives with AnticancerActivities. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015 May; 15(9):1080-91.
- Pessina A, Brambilla P, Villa S, Marocchi A, Mocarelli P. Factors produced by macrophages and tumour cells: influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour-bearing mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 1982; 102(3): 235–44.
- Petroianu A. Esplenomegalia induzida por drogas. *Acta Med Port*. 2011; 24(S4): 977-82.
- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer Biol*. 2004 Dec; 14(6): 433 - 9. doi: 10.1016/j.semcancer.2004.06.006.
- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, et al. Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Bri J Pharmacol*. 2004 May; 142(2): 331-38. doi: 10.1038/sj.bjp.0705650.
- Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydr Polym*. 2014 May; 105: 97-112. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.067.
- Queiroz M., Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2004 Aug; 26 (4): 511–25. doi: 10.1081/IPH-200042289.
- Queiroz ML, Valadares MC, Torello CO, Ramos AL, Oliveira AB, Rocha FD, et al. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avallanadae* bark extract and beta-lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. *J Ethnopharmacol*. 2008 May; 117(2): 228-35. doi: 10.1016/j.jep.2008.01.034.
- Queiroz RF, Jordão AK, Cunha AC, Ferreira VF, Brigagão MR, Malvezzi A, et al. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration

- and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. *Free Radic Biol Med*. 2012 Nov; 53(10): 1942-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.001.
- Qiu S, Sun H, Zhang AH, Xu HY, Yan GL, Han Y, et al. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin J Nat Med*. 2014 Jun; 12 (6): 401-6. doi: 10.1016/S1875-5364(14)60063-7.
- Rauh LK. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos. [Dissertação]. Paraná: Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná; 2008.
- Retz M, Geeter P, Goebell PJ, Matz U, Schultz W, Hegele A. Vinflunine in routine clinical practice for the treatment of advanced or metastatic urothelial cell carcinoma – data from a prospective, multicenter experience. *BMC Cancer*. 2015 Jun; 4(15): 455. doi: 10.1186/s12885-015-1434-3.
- Rivenson A, Schnelle V, Moroson H, Madden R, Herp A. V. Variable response of spleen to Ehrlich's tumor according to the physical form (ascitic or solid) of the tumor. *Experientia*. 1981 Feb; 37(2): 195-7.
- Robbins SL, Contran, RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 8ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 2010, 1616p.
- Rodrigues RP, Andrade SF, Mantoani SP, Eifler-Lima VL, Silva VB, Kawano DF. Using free computational resources to illustrate the drug design process in an undergraduate medicinal chemistry course. *Journal of Chemical Education*. 2015 Feb; 92(5): 827-35. doi: 10.1021/ed500195d.
- Romaniuc Neto S., Gaglioti A.L. Urticaceae. In: R.C. Forzza, J.F.A. Baumgratz, C.E.M. Bicudo, A.A. Carvalho Jr., A. Costa, D.P. Costa, M. Hopkins, et al. (editores.). *Catálogo de fungos e plantas do Brasil*. Andréa Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 2, p. 1662-1665, 2010.
- Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, et al. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jul; 82(13): 1113-18.
- Sancheti S, Sancheti S, Seo SY. Evaluation of antiglycosidase and anticholinesterase activities of *Boehmeria nivea*. *Pak J Pharm Sci*. 2010 Apr; 23(2): 236-40.
- Sancheti S, Sancheti S, Bafna M, Kim H-R, You Y-H, Seo S-Y. Evaluation of antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidante effects of *Boehmeria nivea* root extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Pharmacogn*. 2011 Feb; 21(1): 146-54. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000021.

- Santos RN. Planejamento de moduladores de polimerização de microtúbulos com propriedades anticancer, análise estrutural de macromoléculas e geração de uma base virtual de produtos naturais [tese]. São Carlos: Instituto de Física, Universidade de São Paulo; 2015.
- Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quinteiro-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli ML, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. Translocator protein (18kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells *in vivo*. Eur J Pharmacol. 2010 Jan; 626(2-3): 131–138. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.036.
- Schneider C, Pozzi A. Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. Cancer Metastasis Rev. 2011 Dec; 30(0): 277–94. doi:10.1007/s10555-011-9310-3.
- Schinella G, Neyret E, Cónsole G, Tournier H, Prieto JM, Ríos JL, et al. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. Planta Med. 2014 Aug; 80(12): 961-8. doi: 10.1055/s-0034-1382876.
- Schmidt I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. Cytometry. 1992 Oct; 13(2):204-8.
- Schüller HM, Falzon M, Gazdar AF, Hegedus T. Cell type-specific differences in metabolic activation of N-nitrosodiethylamine by human lung cancer cell lines. IARC Sci Publ. 1987; 84: 138-40.
- Semwal DK, Rawat U, Semwal R, Singh R, Krishan P, Singh M, Singh GJ. Chemical constituents from the leaves of *Boehmeria rugulosa* with antidiabetic and antimicrobial activities. J Asian Nat Prod Res. 2009 Dec; 11(12): 1045-55. doi: 10.1080/10286020903352526.
- Sgambato A, Cittadini A. Inflammation and cancer: a multifaceted link. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2010 Apr; 14(4): 263-68.
- Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. J Cell Mol Med. 2001 Aug; 5(3): 240-53.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016 Jan-Feb; 66(1): 7-30. doi: 10.3322/caac.21332.
- Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. IUBMB Life. 2008 Jun; 60(6):368-75. doi: 10.1002/iub.42.
- Shanmugam MK, Lee JH, Chai EZP, Kanchi MM, Kar S, Arfuso F, et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural

- compounds. *Semin Cancer Biol.* 2016 Mar; pii: S1044-579X(16)30009-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.03.005
- Shin EJ, Sung MJ, Yang HJ, Kim MS, Hwang JT. *Boehmeria nivea* attenuates the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Mediators Inflamm.* 2014 jun. doi: 10.1155/2014/231942.
- Shoemaker RH. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct; 6(10): 813-23.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Jul; 82: 1107-18.
- Slide Kit Servier medical art-chemistry. [acesso em 30/09/2014] Disponível em: <http://www.servier.com/slidekit/?item=28>.
- Spinelli MO, Cruz RJ, Godoy MSC, Junqueira MS, Motta MC, Bortolatto J. Estudo comparativo dos valores hematológicos entre sexo e categorias sanitárias de camundongos c57bl/6 e Balb/c. *Resbcal.* 2012 Jan-Mar; 1(1): 64-70.
- Souto AL, Tavares JF, da Silva MS, Diniz Mde F, de Athayde-Filho PF, Barbosa Filho JM. Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules.* 2011 Oct; 11; 16(10):8515-34. doi: 10.3390/molecules16108515.
- Souza MVN. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Quim. Nova.* 2004 Out; 27(2): 308-12.
- Sung MJ, Davaatseren M, Kim SH, Kim MJ, Hwang JT. *Boehmeria nivea* attenuates LPS-induced inflammatory markers by inhibiting p38 and JNK phosphorylations in RAW264.7 macrophages. *Pharm Biol.* 2013 Sep; 51(9): 1131–36. doi: 10.3109/13880209.2013.781196.
- Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev.* 2011 May; 31(3): 443-81. doi: 10.1002/med.20242.
- Stewart HL. The cancer investigator. *Cancer Research.* 1959 Apr; 19: 804–18.
- Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Achiwa H, Hida T. Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers. *J Environm Pathol Toxicol Oncol.* 2002; 21(2): 177-81.
- Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 2001 Apr 5; 20(15): 1803-15. doi: 10.1038/sj.onc.1204252.

- Tecchio C, Scapini P, Pizzolo G, Cassatella MA. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin Cancer Biol.* 2013 Jun; 23(3): 159–70. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.004.
- Telford WG, Komoriya A, Packard BZ, Bagwell CB. Multiparametric analysis of apoptosis by flow cytometry. In: Howley TS, Hawley RG, editores. *Flow cytometry protocols, methods in molecular biology.* 2 ed. Totowa: Springer Science, LLC, vol. 699, 2011. 483p.
- Tian XY, Xu M, Deng B, Leung KS, Cheng KF, Zhao ZZ, et al. The effects of *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. On embryonic development: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Ethnopharmacol.* 2011 Mar; 134(2): 393-8. doi: 10.1016/j.jep.2010.12.034.
- Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M and Rodan GA. Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormonelike peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul; 85(13): 4605-4609.
- Thompson MA. Molecular docking using Argus Lab: An efficient shape-based search algorithm and an enhanced XScore scoring function. 228<sup>th</sup> ACS National Meeting, 2004, Philadelphia, PA, CINF 42.
- Trigo GG, Gálvez, Söllhuber MM. Synthesis and conformational analysis of 7,8-diphenyl-1,3,4,6,9,9a-hexahydro-2*H*-quinolizines. *J Heterocyclic Chem.* 1979 Jun; 16: 1625-30.
- Tubaro A, Dri P, Melato M, Mulas G, Bianchi P, Del Negro P, et al. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions.* 1996 Dec; 19(5-6): 371- 73.
- Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. *J Immunol Res.* 2015 Dec; ID:983698. doi: 10.1155/2015/983698.
- Valadares MC, Queiroz MLS. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> NCS<sub>2</sub>, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. *Eur J Pharmacol.* 2002 Mar; 439(1-3): 35-42.
- Vendramini-Costa DB. Goniotalamina: atividade antitumoral e anti-inflamatória [tese]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 2012.
- Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm. Des.* 2012 18(26): 3831–52.
- Vuuren RJ, Visagie MH, Theron AE, Joubert AM. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Dec; 76 (6):1101-12. doi: 10.1007/s00280-015-2903-8.

- Vural F, Cebesoy S, Karakas M. Classification of Cell Death. J Entomol Zool Stud. 2013 Sep; 1(5): 120-26.
- Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. Nat. Rev. Cancer. 2010 Mar; 10(3): 181-93.
- Wang Z, Feng A, Cui M, Liu Y, Wang L, Wang Q. First discovery and structure-activity relationship study of phenanthroquinolizidines as novel antiviral agents against tobacco mosaic virus (TMV). PLoS One. 2012a Dec; 7(12): e52933. doi: 10.1371/journal.pone.0052933
- Wang ZW, Wu M, Wang Y, Li Z, Wang L, Han G, Chen F, Liu Y, Wang K, Zhang A, Meng L, Wang Q. Synthesis and SAR studies of phenanthroindolizidine and phenanthroquinolizidine alkaloids as potent antitumor agents. Eur J Med Chem. 2012b May; 51: 250–8. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.02.048.
- Wang H, Yin Y, Wang P, Xiong C, Huang L, Li S, et al. Current situation and future usage of anticancer drug databases. Apoptosis. 2016 Jul; 21(7):778-94. doi: 10.1007/s10495-016-1250-5.
- Wardihan, Rusdi M, Alam G, Lukman, Manggau MA. Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of *Boehmeria virgata* (Forst) guill leaves to several human cell lines: Hela, Widr, T47D and Vero. Dhaka Univ J Pharm Sci. 2013 Dec; 12(2): 87-90.
- Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, Clarke B, Lalonde J, Lambert MH, et al. Critical assessment of docking programs and scoring functions. J Med Chem. 2006 Oct; 49(20): 5912-31. doi: 10.1021/jm050362n.
- Wasilewicz MP, Kolodziej B, Bojulko T, Kaczmarczyk M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. Int J Colorectal Dis. 2010 Sep; 25:1079–1085. doi: 10.1007/s00384-010-0980-z
- Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. Surg Oncol. 2012 Sep; 21(3):172-7. doi: 10.1016/j.suronc.2011.09.001.
- Wei H, Yan J, Liu J, Luo D, Zhang J, Gao X. Genes involved in the anti-cancer effect of a potent new compound boehmeriasin A on breast cancer cell. J Med Plants Res. 2009 Jan; 3(1): 35-44.
- Weinberg RA. A biologia do câncer. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Wei J, Lin L, Su X, Qin S, Xu Q, Tang Z, et al. Anti-hepatitis B virus activity of *Boehmeria nivea* leaf extracts in human HepG2 2.2.15 cells. Biomed Rep. 2014 Jan; 2(1): 147-51. doi: 10.3892/br.2013.205.
- Williams TJ. Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes of inflammation. Br J Pharmacol. 1979 Mar; 65(3): 517-24.

- Williams LA, Igietseme JU, Whittaker JA, Smikle MF, Bailey-Shaw YA, Barton EN. Immunological evidence supporting the use of extracts from *Boehmeria jamaicensis* Urb for treating the common cold and sinus infections. *West Indian Med J*. 2007 Dec; 56(6): 487-90.
- Wilmot-Dear CM, Friis I. The New World species of *Boehmeria* and *Pouzolzia* (Urticaceae, tribus Boehmerieae). A taxonomic revision. Copenhagen: Opera Botanica. 1996 Dec; 129: 1-103.
- Wilmot-Dear CM, Friis I. The Old World species of *Boehmeria* (Urticaceae, tribus Boehmerieae). A taxonomic revision. *Blumea* 58, 2013 Sep: 85–216. doi.org/10.3767/000651913X674116
- Weinstein-Opppenheimer CR, Burrows C, Steelman LS, McCubrey JA. The effects of beta-estradiol on Raf activity cell cycle progression and growth factor synthesis in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Biol Ther*. 2002 May-Jun; 1(3): 256-62.
- Woodward WA, Bristow RG. Radiosensitivity of cancer-initiating cells and normal stem cells (or what the Heisenberg uncertainly principle has to do with biology). *Semin Radiat Oncol*. 2009 Apr; 19(2): 87-95. doi: 10.1016/j.semradonc.2008.11.003.
- Xu D, Ye D, Fisher M, Juliano RL. Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *J Pharmacol. Exp Ther*. 2002 Sep; 302(3): 963-71. doi: 10.1124/jpet.102.033639
- Xu QM, Liu YL, Li XR, Li X, Yang SL. Three new fatty acids from the roots of *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich and Their antifungal activities. *Nat Prod Res*. 2011 Mar; 25(6): 640-7. doi: 10.1080/14786419.2010.488230.
- Yan J, Luo D, Luo Y, Gao X, Zhang G. Induction of G1 arrest and differentiation in MDA-MB-231 breast cancer cell by boehmeriasin A, a novel compound from plant. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Jan-Feb; 16(1): 165-70. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00291.x.
- Yang LX, Zhu J, Wang HJ, Holton RA. Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2003a Jul-Aug; 23(4): 3295-301.
- Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, et al. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*. 2003b Feb 15; 63(4):831-7.
- Yang CW, Chuang TH, Wu PL, Huang WH, Lee SJ. Anti-inflammatory effects of 7-methoxycryptopleurine and structure-activity relations of phenanthroindolizidines and



- phenanthroquinolizidines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar; 354(4): 942-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.065.
- Yang CW, Lee YZ, Kang IJ, Barnard DL, Jan JT, Lin D, et al. Identification of phenanthroindolizines and phenanthroquinolizidines as novel potent anticoronaviral agents for porcine enteropathogenic coronavirus transmissible gastroenteritis virus and human severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Antivir Res*. 2010a Nov; 88(2): 160–68. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.08.009.
- Yang P, Sun Z, Chan D, Cartwright CA, Vijjeswarapu M, Ding J, et al. Zyflamend reduces LTB4 formation and prevents oral carcinogenesis in a 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene (DMBA)-induced hamster cheek pouch model. *Carcinogenesis*. 2008 Nov; 29(11): 2182–89. doi: 10.1093/carcin/bgn181.
- Yang ST, Huang AC, Tang NY, Liu HC, Liao CL, Ji BC, et al. Bisdemethoxycurcumin-induced S phase arrest through the inhibition of cyclin A and E and induction of apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human lung cancer NCIH460 cells. *Environ Toxicol*. 2015 Sep 15: 1-10. doi: 10.1002/tox.22191.
- Yang X. Design, Synthesis, and Biological Studies of New Phenanthroindolizidine and Phenanthroquinolizidine Analogs as Anticancer Agents. [Tese]. Raleigh: School of Pharmacy, University of North Carolina, 2010b.
- Yang X, Shi Q, Yang SC, Chen CY, Yu SL, Bastow KF, et al. Antitumor agents 288: design, synthesis, SAR, and biological studies of novel heteroatom-incorporated antofine and cryptopleurine analogues as potent and selective antitumor agents. *J Med Chem*. 2011 Jul; 54(14): 5097-107. doi: 10.1021/jm200330s.
- Yang X, Shi Q, Lai CY, Chen CY, Ohkoshi E, Yang SC, et al. Antitumor agents 295. E-ring hydroxylated antofine and cryptopleurine analogues as antiproliferative agents: design, synthesis, and mechanistic studies. *J Med Chem*. 2012 Aug; 55(15): 6751-61. doi: 10.1021/jm3001218.
- Yang WF, Liao GQ, Hakim SG, Ouyang DQ, Ringash J, Su YX. Is pilocarpine effective in preventing radiation-induced xerostomia? A systematic review and meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016 Mar; 94(3): 503-11. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.11.012.
- Yarla NS, Bishayee A, Sethi G, Reddanna P, Kalle AM, Dhananya BL, et al. Targeting arachidonic acid pathway by natural products for cancer prevention and therapy. *Semin Cancer Biol*. 2016 Feb; 4. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.02.001.
- Young JM, Wagner B, Spires DA. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. *J Invest Dermatol*. 1983 Jan; 80(1): 48-52.

- Zaharevitz DW, Holbeck SL, Bowerman C, Svetlik PA. COMPARE: a web accessible tool for investigating mechanisms of cell growth inhibition. *J Mol Graph Model*. 2002 Jan; 20(4): 297–303.
- Zanusso-Junior G, Melo JO, Romero AL, Dantas JA, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores. *Rev Bras Plantas Med*. 2011 Out; 13(1): 17-23. doi.org/10.1590/S1516-05722011000100003.
- Zhao Y, Mu X, Du G. Microtubule-stabilizing agents: New drug Discovery and cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2016 Jun; 162:134-43. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.12.006.
- Zhou L, Xu N, Sun Y, Liu XM. Targeted biopharmaceuticals for cancer treatment. *Cancer Lett*. 2014 Oct; 352(2):145-51. doi: 10.1016/j.canlet.2014.06.020.

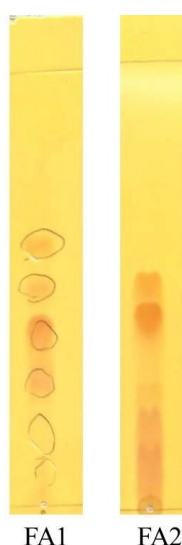
## 8. APÊNDICE

### 8.1. FRACIONAMENTOS

#### 8.1.1. Purificação da fração rica em alcaloide pelo método de extração em fase sólida (SPE)

Antes de dar início ao processo de purificação foram realizadas duas análises de CCDs para avaliar possíveis eluentes para o seu fracionamento. Assim, a FA foi avaliada em cromatofolha RP-18 F254s (MERCK 1.05559) e os eluentes utilizados foram: a mistura de isopropanol: ácido fórmico: água (90:1:9) e a mistura de metanol: água (1:1). Neste tipo de análise é necessário condicionar primeiramente a cromatofolha com o eluente para depois aplicar as amostras e, em seguida correr a placa com o eluente. As cromatofolhas de RP-18 foram reveladas por Dragendorff (Fig. 62)

**Figura 62.** Fração rica em alcaloide foi avaliada por cromatofolha de sílica RP-18.



**FA1** é a fração rica em alcaloide utilizando o eluente: isopropanol: ácido fórmico: água (90:1:9) e **FA2** é a fração rica em alcaloide utilizando o eluente: metanol: água (1:1). Ambas cromatofolhas foram reveladas por Dragendorff.

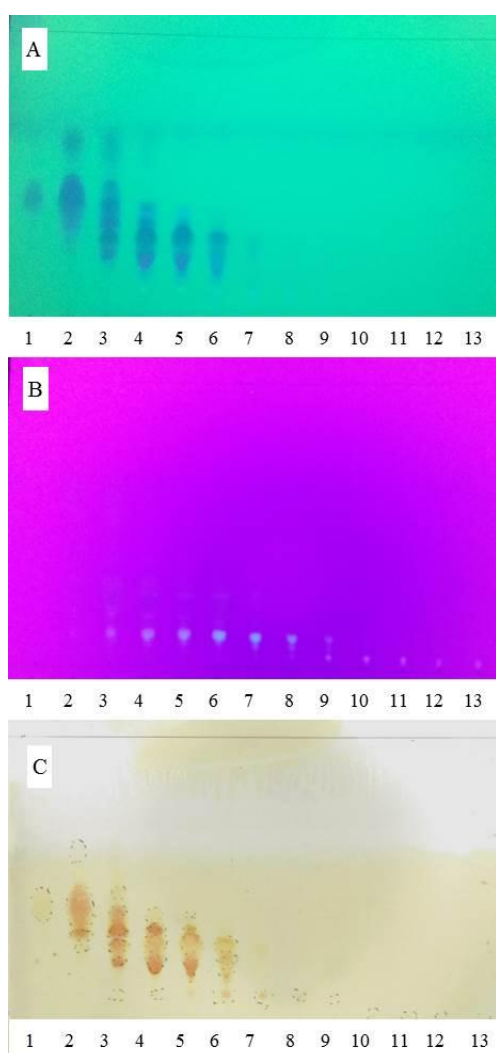
A análise das CCDs revelou que o eluente: isopropanol: ácido fórmico: água (90:1:9) foi a melhor fase móvel, pois permitiu uma melhor separação entre os alcaloides.

Desta forma, para a purificação da FA foi utilizado cartuchos de Strata C18-E<sup>®</sup> (55µm, 70A) (8B-S001-Leg Allcrom), que foram conectados ao Manifold<sup>®</sup> a vácuo e condicionados inicialmente com 10 mL de água destilada e a seguir com 10 mL de isopropanol. Em seguida introduziu-se a fração rica em alcaloide (129 mg) e esta foi eluída

com 10 mL da mistura de isopropanol: ácido fórmico: água (90:1:9). Em seguida as frações foram coletadas.

Foram obtidas 13 frações após a purificação da FA por SPE e estas foram analisadas por CCD. A fase móvel utilizada foi BAW. As cromatofolhas foram reveladas na câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm (Fig. 63A) e 366 nm (Fig. 63B) e a seguir foi revelada por Dragendorff (Fig. 63C).

**Figura 63.** Cromatofolha de CCD das 13 frações obtidas após a purificação da fração rica em alcaloides por SPE avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



(A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Na Figura 63A observou-se a presença de manchas fluorescentes, observadas sob a luz de UV, em tom de azul da fração 1 até a fração 7. Na figura 63B observou-se a presença de manchas fluorescentes, observadas sob a luz de UV. As manchas fluorescentes em tom de

azul foi observada da fração 3 até a fração 9 e as manchas fluorescentes em tom de rosa, foi observada da fração 10 até a 13. Na figura 63C observou-se a presença de alcaloides nas frações de 1 a 7, onde o dragendorff revelou manchas em tom alaranjado. Assim, após a análise da CCD as frações 8 e 9 foram reunidas, assim como as de 10 a 13. Foi calculado o rendimento de cada fração e frações (Tabela 20).

**Tabela 20.** Cálculo do rendimento (%) das frações obtidas após a purificação da fração rica em alcaloide pelo método de extração em fase sólida.

| Frações | Rendimento (%) |
|---------|----------------|
| F1      | 5,42           |
| F2      | 16,74          |
| F3      | 12,86          |
| F4      | 17,9           |
| F5      | 19,06          |
| F6      | 6,66           |
| F7      | 1,62           |
| F8-9    | 2,09           |
| F10-13  | 3,02           |

A avaliação em CCD revelou que não houve uma separação satisfatória desses alcaloides, o que pode ser atribuído ao fato de os alcaloides fenantroquinolizidínicos já descritos para *Boehmeria caudata* apresentar grande semelhança estrutural entre si, o que dificulta sua separação.

### 8.1.2. Fracionamento da fração rica em alcaloides por cromatografia de coluna clássica

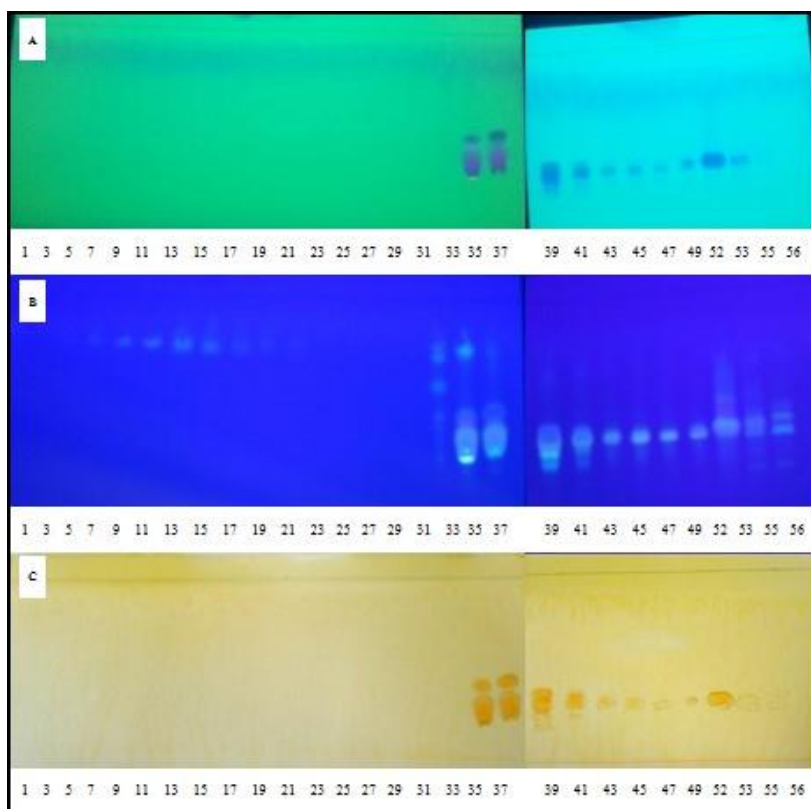
Este fracionamento foi baseado no artigo de Luo et al. (2003), com algumas modificações.

Nesta metodologia foi usada uma coluna de vidro (1 cm de diâmetro por 25 cm de altura), sendo a fase estacionária silicagel (14 g, Merck Millipore, Germany), onde no seu topo foi aplicado a fração rica em alcaloide (massa = 181,8mg). A coluna foi eluída com os gradientes de diclorometano/acetona (50:1, 25:1, 10:1, 5:1) até a fração 21, em seguida a coluna foi eluída com diclorometano/metanol 2% até a fração 31 e em seguida a coluna foi

eluída com diclorometano/metanol 5% até a fração 50 e por fim, utilizou-se o eluente metanol puro até a fração 57.

Em seguida as frações ímpares foram analisadas em CCD. A fase móvel utilizada foi BAW. As cromatofolhas foram reveladas sob a luz de UV no comprimento de onda de 254 nm (Fig. 64A) e 366 nm (Fig. 64B) e a seguir foi revelada por Dragendorff (Fig. 64C).

**Figura 64.** Cromatofolha de CCD das frações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).

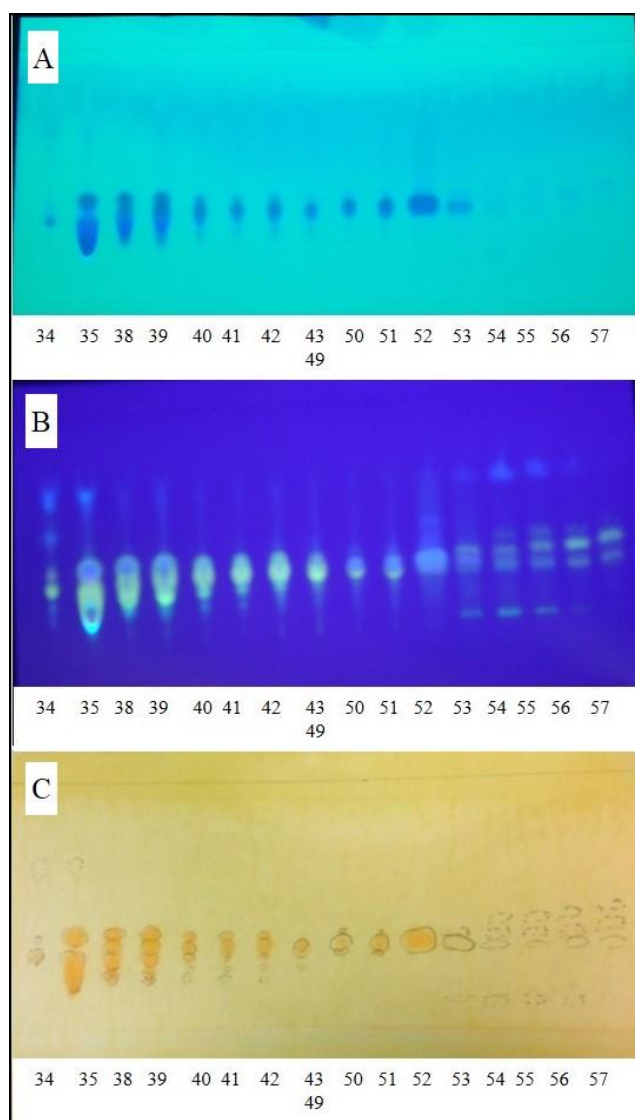


Fase móvel: BAW. (A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Entre as frações 1 a 21, que foram eluídas com o gradiente de diclorometano/acetona (50:1, 25:1, 10:1, 5:1), não foram observadas a presença de manchas acastanhadas depois de reveladas com o reagente Dragendorff. Entre as frações 23 a 33, as quais foram eluídas com diclorometano/metanol 2%, também não foram observadas tais manchas. Entretanto, após a eluição com diclorometano/metanol 5% (a partir da fração 31), observou-se a presença de manchas acastanhadas com diferentes fatores de retenção.

Assim, após a análise da CCD, as frações de 43 a 49 foram reunidas e outra CCD foi realizada, nas mesmas condições que a anterior, entres as frações 34 a 57 (Fig. 65).

**Figura 65.** Cromatofolha de CCD das subfrações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



(A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Após a análise desta CCD as frações que continham Rf próximos foram reunidas em 7 subfrações (SF): subfração 1: 34 a 37; subfração 2: 38 a 42; subfração 3: 43 a 49; subfração 4: 50 e 51; subfração 5: 52; subfração 6: 53; subfração 7: 54 a 57.

A subfração 5: 52 por apresentar somente uma mancha e consequentemente um possível isolamento, esta subfração foi submetida a análise de espectrometria de massas de alta resolução. O resultado da subfração 5 por HRESI-MS mostrou que não havia somente um alcaloide e sim os 7 alcaloides já descritos neste trabalho.

O rendimento das subfrações foi calculado (Tabela 21).

**Tabela 21.** Cálculo do rendimento (%) das frações reunidas após o fracionamento da fração rica em alcaloide em coluna clássica.

| Subfrações | Massa (mg) | Rendimentos (%) |
|------------|------------|-----------------|
| <b>SF1</b> | 34,1       | 18,83           |
| <b>SF2</b> | 15,0       | 8,28            |
| <b>SF3</b> | 7,0        | 3,86            |
| <b>SF4</b> | 3,6        | 1,98            |
| <b>SF5</b> | 26,1       | 14,41           |
| <b>SF6</b> | 2,8        | 1,54            |
| <b>SF7</b> | 3,0        | 1,65            |

**SF1:** 34 a 37; **SF2:** 38 a 42; **SF3:** 43 a 49; **SF4:** 50 e 51; **SF5:** 52; **SF6:** 53; **SF7:** 54 a 57

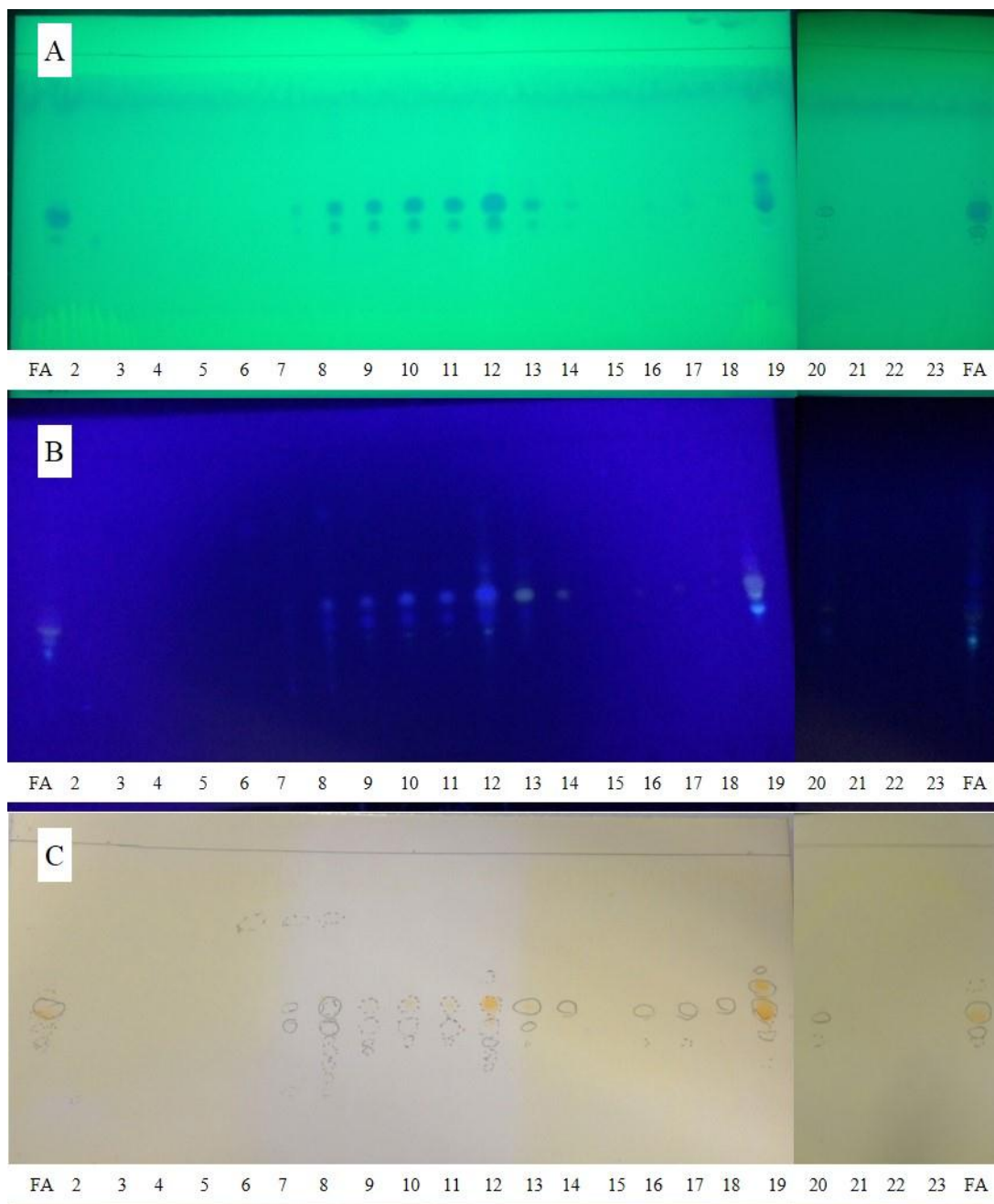
### 8.1.3. Fracionamento da fração rica em alcaloides por fase-reversa

Para o fracionamento da FA foi utilizado um cartucho de Strata-X/Strata-XL<sup>®</sup> (Neutral-Reversed Phase), que foi conectado ao Manifold<sup>®</sup> a vácuo e condicionados inicialmente com 10 mL de metanol p.a. e a seguir com 10 mL de água destilada. Em sequência introduziu-se a fração rica em alcaloide (50 mg) e esta foi eluída com diferentes gradientes da mistura de água:metanol (10 mL). Para a mistura água:metanol 5% foi coletado as frações 1, 2 e 3, para a mistura água:metanol 10% foi coletado as frações 4 e 5, para a mistura água:metanol 20% foi coletado as frações 6 e 7, para a mistura água:metanol 30% foi coletado as frações 8 e 9, para a mistura água:metanol 40% foi coletado as frações 10 e 11, para a mistura água:metanol 50% foi coletado as frações 12, 13, 14 e 15 e para a mistura água:metanol 60% foi coletado as frações 16, 17 e 18. Para finalizar utilizou-se a mistura metanol:ácido fórmico 2% e coletou as frações 19, 20, 21 e 22.

Em seguida as frações foram analisadas em CCD. A fase móvel utilizada foi BAW. As cromatofolhas foram reveladas sob a luz de UV no comprimento de onda de 254 nm (Fig. 66A) e 366 nm (Fig. 66B) e a seguir foi revelada por Dragendorff (Fig. 66C).



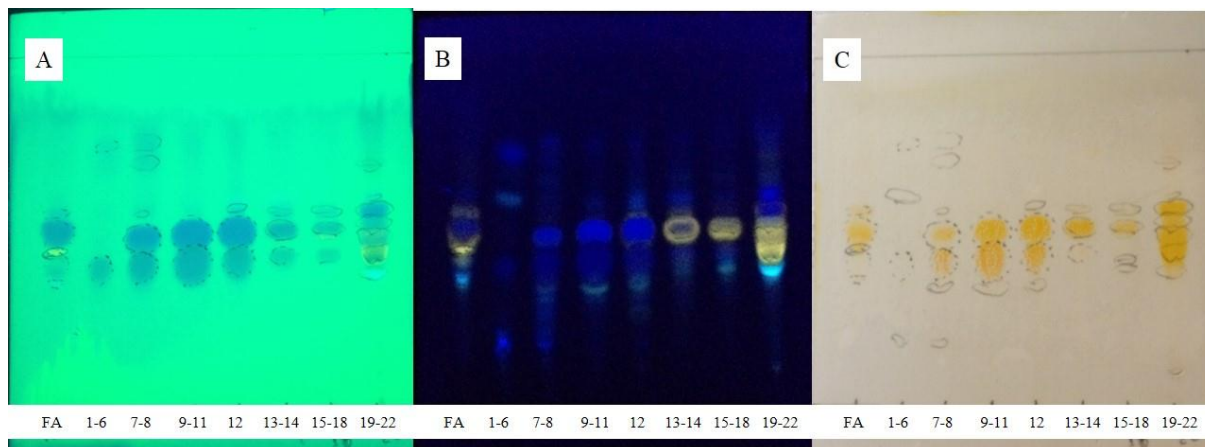
**Figura 66.** Cromatofolha de CCD das frações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide em fase reversa avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



(A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Após a análise desta CCD as frações que continham Rf próximos foram reunidas em 7 subfrações (SF): subfração a: 1 a 6; subfração b: 7 e 8; subfração c: 9 a 11; subfração d: 12; subfração f: 13 e 14; subfração g 16 a 18; subfração h: 19 a 22. E em seguida outra CCD foi realizada nas mesmas condições que a anterior (Fig. 67).

**Figura 67.** Cromatofolha de CCD das subfrações obtidas após fracionamento da fração rica em alcaloide em fase reversa avaliada pela fase móvel BAW (butanol/ácido acético/água 4:1:5).



Fase móvel: BAW. (A) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 254 nm. (B) Placa revelada em câmera de UV no comprimento de onda de 366 nm. (C) Revelada com Dragendorff.

Foi realizado o cálculo do rendimento destas subfrações e estão representados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Cálculo do rendimento (%) das frações reunidas após o fracionamento da fração rica em alcaloide em fase reversa.

| Subfrações | Massa (mg) | Rendimentos (%) |
|------------|------------|-----------------|
| <b>SFa</b> | 4,4        | 8,8             |
| <b>SFb</b> | 7,0        | 14,0            |
| <b>SFc</b> | 12,8       | 25,6            |
| <b>SFd</b> | 13,2       | 26,4            |
| <b>SFe</b> | 2,1        | 4,2             |
| <b>SFf</b> | 2,3        | 4,6             |
| <b>SFg</b> | 7,0        | 14,0            |

**SFa:** 1 a 6; **SFb:** 7 e 8; **SFc:** 9 a 11; **SFd:** 12; **SFf:** 13 e 14; **SFg:** 15-18; **SFh:** 19 a 22

Este fracionamento ainda está sob análise.

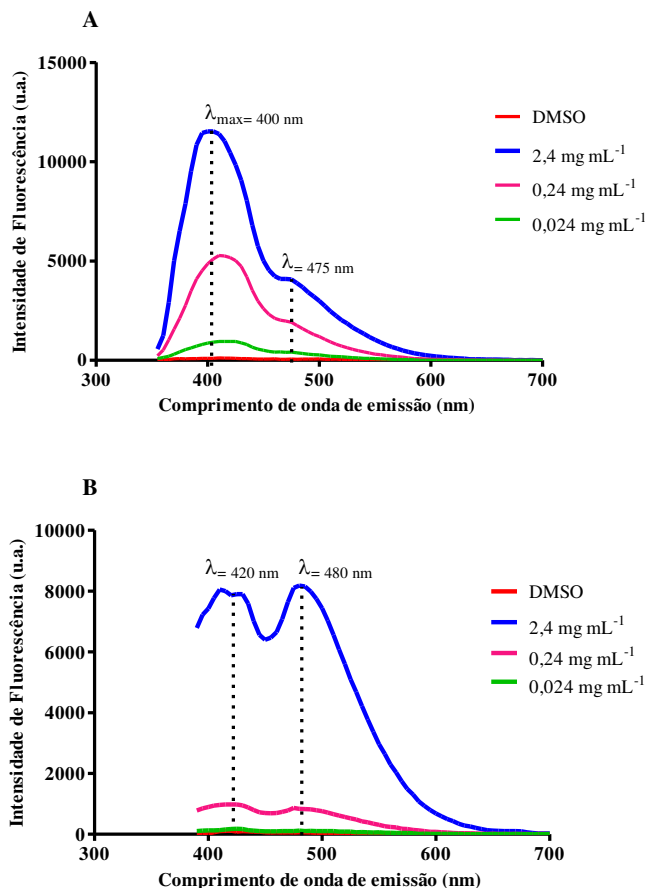
## 8.2. ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES POR ESPECTROFOTOMETRIA

A análise da autofluorescência da FA foi avaliada através de espectrofotometria, em colaboração com à Professora Dra. Anita Jocelyne Marsaioli e à Pós-Doutoranda Bruna Zucoloto da Costa, do Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica do Instituto de Química, UNICAMP.

Foi analisado o diluente dimetilsulfóxido (DMSO) e a FA nas concentrações de 0,024; 0,24 e 2,4 mg mL<sup>-1</sup> em espectrofotômetro leitor de placas Enspire (Perkin-Elmer). Os comprimentos de ondas de excitação e emissão para fluorescência foram avaliados através de varreduras espectrais.

Pensando na análise da amostra em citometria de fluxo, foi avaliado espectro de fluorescência da fração rica em alcaloides para saber se sua fluorescência poderia atrapalhar a análise do mecanismo de ação da FA em citometria de fluxo. Assim, foram avaliados diferentes comprimentos de onda de excitação previamente otimizados (dados não apresentados) e os seus respectivos comprimentos de onda de emissão para cada uma das condições avaliadas como representados nas figuras 68 A e B.

**Figura 68.** Espectro de emissão de fluorescência do DMSO (diluente) e de 0,024; 0,24 e 2,4 mg mL<sup>-1</sup> da fração rica em alcaloides, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 355 nm (A) e 370 nm (B).



O resultado do espectro de fluorescência da FA apresentou um pico de fluorescência próximo do comprimento de onda de 400 nm e um segundo pico menor próximo do comprimento de onda de 480 nm. Além disso, por esta análise é possível observar que conforme a concentração da amostra diminui, menor é a sua fluorescência, sendo que na concentração de 0,024 mg mL<sup>-1</sup> praticamente não há fluorescência. Desta forma, é possível trabalhar com concentrações baixas de FA sem apresentar um falso positivo.

### 8.3. ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOIDES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Pelo fato de que compostos que apresentam autofluorescência podem ser excitados pelo laser e apresentarem resultados falso-positivo ou falso-negativo. Foi realizado uma análise preliminar da FA para avaliar sua autofluorescência

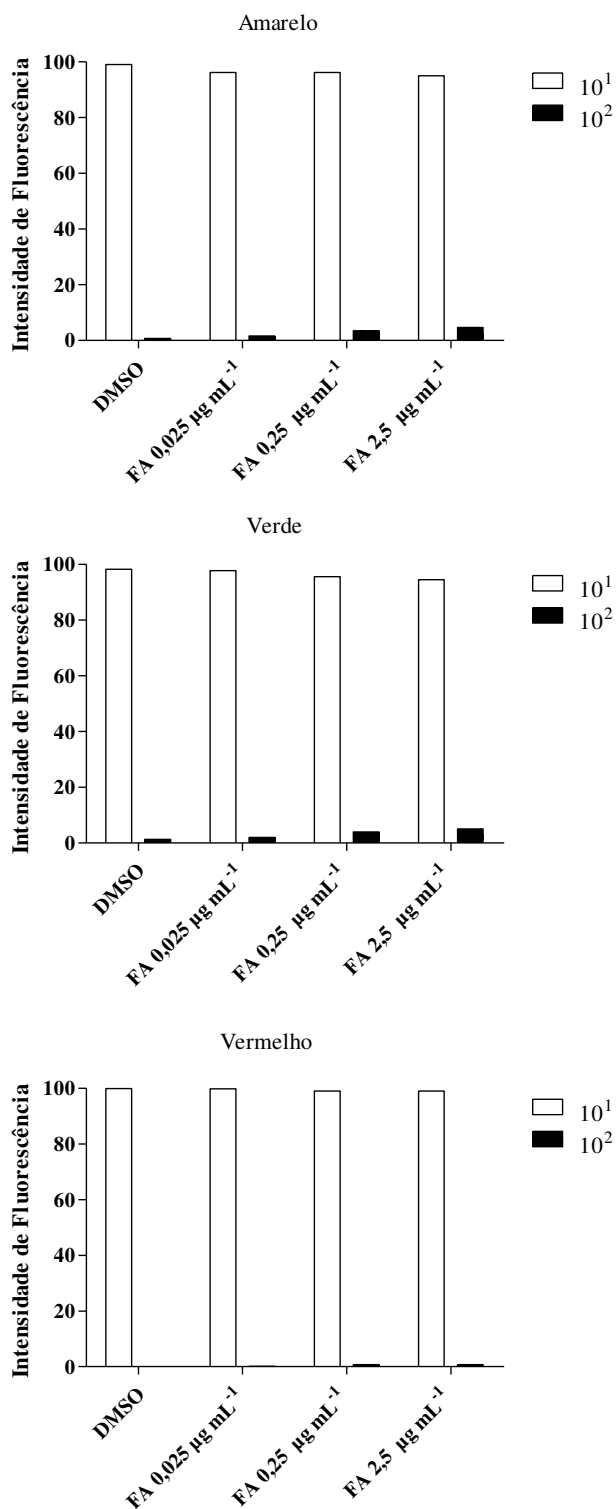
A linhagem celular tumoral, NCI-H460, foi inoculada (1mL por compartimento) em placas de 12 compartimentos, em uma densidade de inoculação de  $5 \times 10^4$  céls mL<sup>-1</sup> em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/streptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, o meio foi aspirado e foram adicionados 1 mL/compartimento da FA nas concentrações 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg mL<sup>-1</sup>. Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0,25% de DMSO, diluente dos compostos.

A leitura em citômetro de fluxo foi realizada no tempo de 24 horas após a adição da FA. Após este período de tratamento, o meio foi coletado em tubo de centrifuga com tampa de 15 mL, os compartimentos foram lavados com PBS e as células aderidas foram desprendidas com auxílio de 200 µL de tripsina, sendo posteriormente inibidas com 1000 µL de meio. As células soltas foram coletadas e o tubo levado à centrifuga por 5 min. a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e 200 µL do pellet celular foi analisado em citômetro de fluxo (2000 eventos adquiridos).

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm. A fluorescência foi avaliada em gráfico de dotplot para os comprimentos de onda do verde (525/30 nm) amarelo (583/26 nm) e vermelho (680/30 nm).

A autofluorescência das concentrações de 0,025; 0,25 e 2,5 de FA no período de 24 horas estão representadas na figura 69.

**Figura 69.** Gráficos da análise da autofluorescência da fração rica em alcaloide nas concentrações de 0,025; 0,25 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  na linhagem de NCI-H460 por 24 horas.



DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluyente). FA: fração rica em alcaloide. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , grupo tratado estatisticamente diferente do grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni)

Até a intensidade de fluorescência até  $10^1$  HLog corresponde a autofluorescência das próprias células (Hulspas et al., 2009). Acima de  $10^1$  é considerado autofluorescência da amostra. Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o controle negativo para nenhum dos comprimentos de onda analisados.

#### 8.4. PROTOCOLO DA SOLUÇÃO DE TAMPÃO FOSFATO EM SALINA DE DULBECCO (D-PBS)

A solução de tampão fosfato em salina de Dulbecco foi realizada conforme o protocolo descrito por Dulbecco e Vogt (1954) e está apresentado na Tabela a seguir (Tabela 23):

**Tabela 23.** Solução de tampão fosfato em salina de Dulbecco.

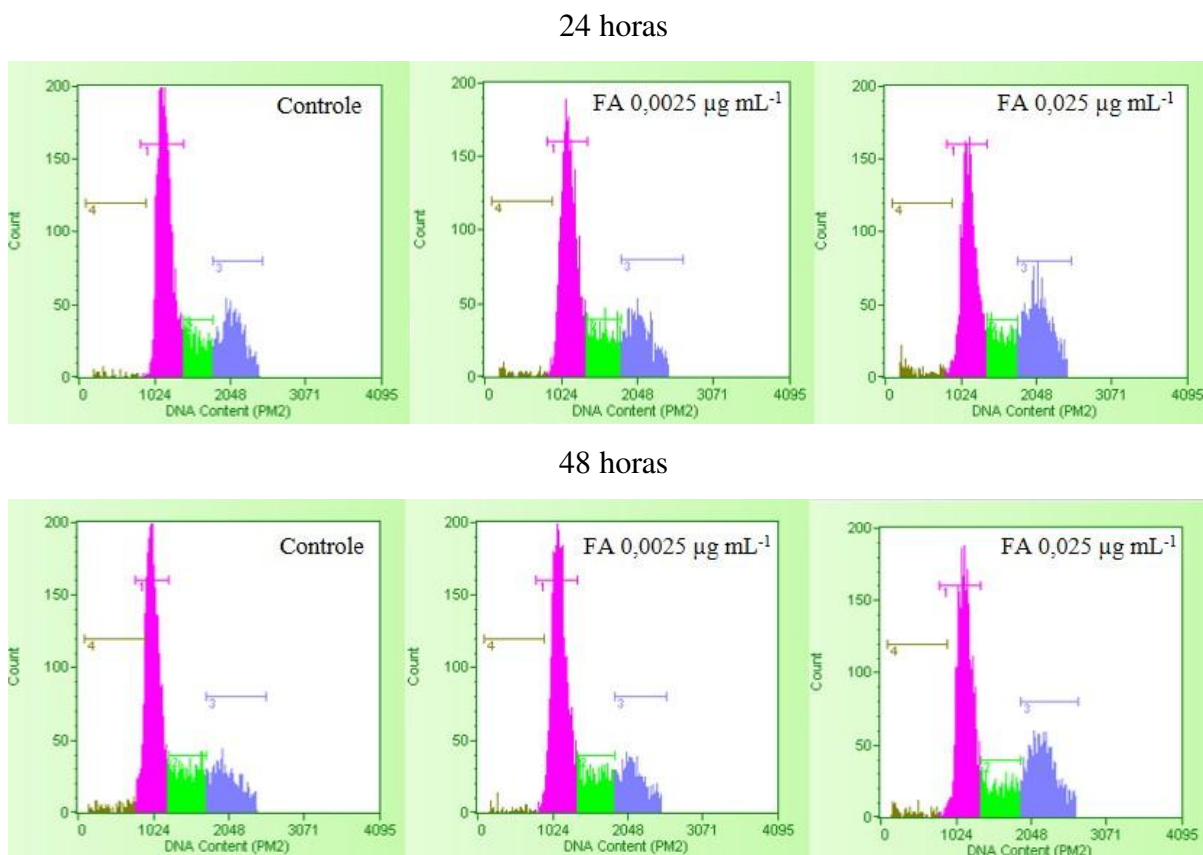
| Sais (P.A.)                                                                                  | Gramas | Volume                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------|
| Cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>a</sup>     | 0,133  | Dissolver a em 100 ml       |
| Cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>b</sup> | 0,1    | Dissolver b em 100 ml       |
| Cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ) <sup>c</sup>                                            | 0,2    | Dissolver todos c em 800 ml |
| Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) <sup>c</sup>                     | 0,2    |                             |
| Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) <sup>c</sup>                                              | 8,0    |                             |
| Fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) <sup>c</sup>                         | 1,15   |                             |

As soluções a, b e c foram autoclavadas em frascos separados à 121°C por 30 minutos e em seguida as soluções foram unidas em um único frasco e armazenadas a 4°C

#### 8.5. HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DO CONTEÚDO DE DNA EM CÉLULAS NCI-H460

A seguir encontra-se a figura 70 com o histograma representativo das fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células tratadas com DMSO (0,25%) e 0,0025 e 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de FA nos tempos de 24 e 48 horas.

**Figura 70.** Histograma representativos do conteúdo de DNA em células NCI-H460 marcadas com iodeto de propídeo.



DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluente). FA: fração rica em alcaloide. Marrom: Sub-G1, rosa: G1, verde: S, azul: G2/M.

## 8.6. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DE CÉLULAS NCI-H460 MARCADAS COM ANEXINA-PE E 7-AAD

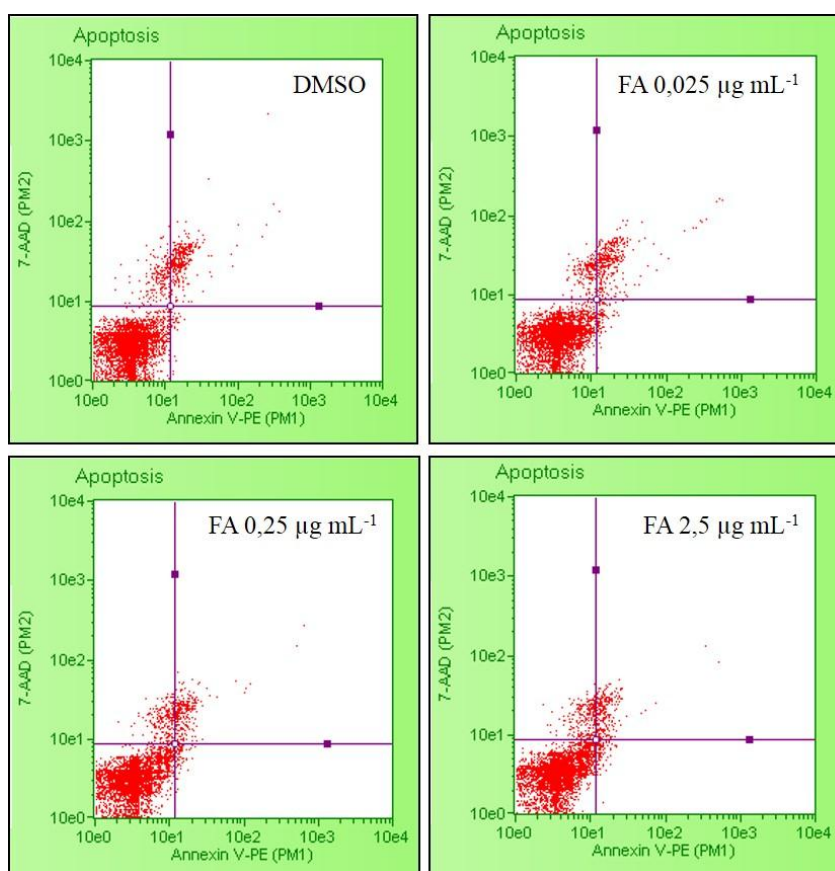
A marcação das células por Anexina V-PE e 7-AAD permite a obtenção de quatro diferentes resultados representados na figura 71. As figuras 72, 73 e 74 apresentam os resultados obtidos após o tratamento com DMSO (0,25%) e 0,025; 0,25 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de FA em células de adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-NH460), nos tempos de tratamento de 12, 24 e 36 horas, respectivamente.



**Figura 71.** Representação esquemática dos quadrantes do gráfico de apoptose.

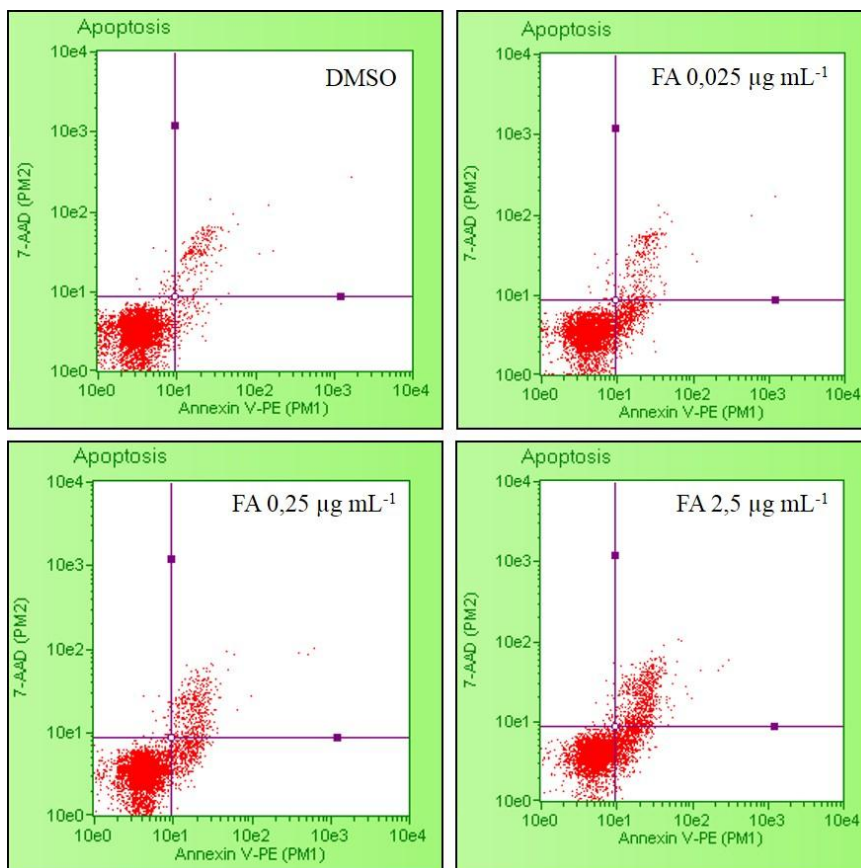
|                    |                             |                             |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 7AAD (PM2)         | Anexina-PE (-)<br>7-AAD (+) | Anexina-PE (+)<br>7-AAD (+) |
|                    | Anexina-PE (-)<br>7-AAD (-) | Anexina-PE (+)<br>7-AAD (-) |
| Anexina V-PE (PM1) |                             |                             |

**Anexina-PE (-) 7-AAD (-):** células não marcadas que indicam as células viáveis; **Anexina-PE (+) 7-AAD (-):** células marcadas por anexina V-PE que indicam exposição de fosfatidilserina no início do processo de morte celular programada com integridade de membrana; **Anexina-PE (+) 7-AAD (+):** células duplamente marcadas indicam marcação da fosfatidilserina com permeação da membrana plasmática; **Anexina-PE (-) 7-AAD (+):** células marcadas por 7-AAD indicam células não viáveis.

**Figura 72.** Histograma representativo de células NCI-H460 marcadas com anexina-PE e 7-AAD no tempo de 12 horas de tratamento.

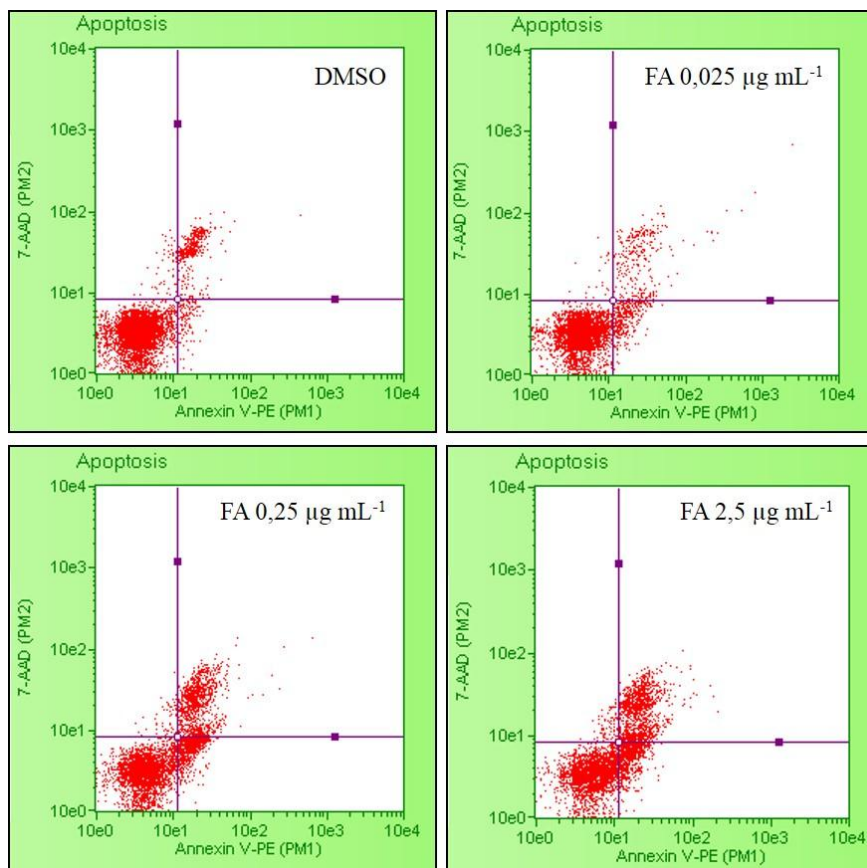
DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluente). FA: fração rica em alcaloide.

**Figura 73.** Histograma representativo de células NCI-H460 marcadas com anexina-PE e 7-AAD no tempo de 24 horas de tratamento.



DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluente). FA: fração rica em alcaloide.

**Figura 74.** Histograma representativo de células NCI-H460 marcadas com anexina-PE e 7-AAD no tempo de 36 horas de tratamento.



DMSO: Controle negativo com 0,25% de dimetilsulfóxido (diluyente). FA: fração rica em alcaloide.

## 9. ANEXO

### 9.1. Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético - CNPq

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p><b>Autorização de Acesso e de Remessa de<br/>Componente do Patrimônio Genético</b></p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 05 de Dezembro de 2012</p> <p>Paulo Sergio Lacerda Beirao<br/>Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde<br/>PO 161/2010</p> | <p>Processo: 010672/2012-5<br/>Validade: 05/12/2012 a 20/11/2015<br/>Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS<br/>CNPJ: 460.684.250/0001-33<br/>Pesquisador: João Ernesto de Carvalho<br/>CPF: 012.410.818-08<br/>RG: 4335875 - SSP / SP</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <a href="http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/">http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/</a> e informar o número do protocolo 9398587880866452 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### 9.2. Comitês de ética



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

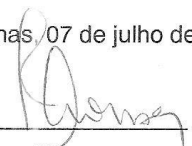
Certificamos que o projeto "Teste de toxicidade aguda dos extratos brutos, frações e princípios ativos da Boehmeria caudata via oral e intraperitoneal" (protocolo nº 3440-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Pereira de Paiva, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de julho de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Campinas, 07 de julho de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

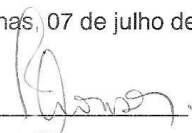
Certificamos que o projeto "Avaliação da atividade anticâncer dos extratos brutos, frações e princípios ativos da *Boehmeria caudata* Sw. sobre o modelo de Tumor Sólido de Ehrlich" (protocolo nº 3441-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Pereira de Paiva, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 3 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de julho de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Campinas, 07 de julho de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

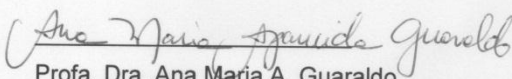
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

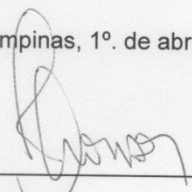
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da atividade anticâncer das frações e princípios ativos da *Boehmeria caudata* Sw. sobre o modelo de Tumor Sólido de Erlich. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural" (protocolo nº 3036-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Pereira De Paiva, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 1º. de abril de 2013.

Campinas, 1º. de abril de 2013.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Atividade antiinflamatória dos extratos brutos, frações e princípios ativos da Boehmeria caudata Sw. em modelo de edema de pata por carragenina" (protocolo nº 3390-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Pereira De Paiva, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 28 de agosto de 2014.

Campinas, 28 de agosto de 2014.

Prof. Dr/ Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva





CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação do potencial antiinflamatório dos extratos brutos, frações e princípios ativos de *Boehmeria caudata* Sw. em modelo de edema de orelha induzida por óleo de crôton" (protocolo nº 3391-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Pereira De Paiva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - **28 de agosto de 2014**.

Campinas, 28 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

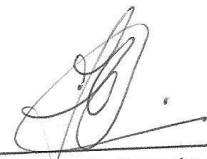
**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos de Boehmeria caudata Sw**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas,

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Paula Pereira de Paiva**  
RG n.º 42096191-4

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **João Ernesto de carvalho**  
RG n.º 4335875