

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**ESTUDO SOBRE AÇÃO DE *Picrolemma sprucei* Hook. (Simaroubaceae)
CONTRA CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA E PRÓSTATA E SUA AÇÃO SOBRE
FENÓTIPO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS**

SINÁRIA REJANY NOGAIA DE SOUSA

SÃO PAULO

2018

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**ESTUDO SOBRE AÇÃO DE *Picrolemma sprucei* Hook. (Simaroubaceae)
CONTRA CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA E PRÓSTATA E SUA AÇÃO SOBRE
FENÓTIPO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em
Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista–UNIP, para a obtenção do título de Doutora
em Patologia Ambiental e Experimental.

SINÁRIA REJANY NOGAIA DE SOUSA

SÃO PAULO

2018

Sousa, Sinária Rejany Nogaia de.

Estudo sobre ação de *Picrolemma sprucei* Hook. (Simaroubaceae) contra células tumorais de mama e próstata e sua ação sobre fenótipo comportamental de camundongos / Sinária Rejany Nogaia de Sousa – 2018.

84 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Patologia ambiental e experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Sulffredini.

1. Floresta amazônica. 2. Citotoxicidade. 3. Comportamento. 4. Campo aberto. 5. *Picrolemma sprucei*. 6. Quassinoides. 7. Alcaloides. I. Sulffredini, Ivana Barbosa (Orientadora). II. Título.

SINÁRIA REJANY NOGAIA DE SOUSA

**ESTUDO SOBRE AÇÃO DE *Picrolemma sprucei* Hook. (Simaroubaceae)
CONTRA CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA E PRÓSTATA E SUA AÇÃO SOBRE
FENÓTIPO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista- UNIP

Prof.^a Dr^a Maria Martha Bernardi
Universidade Paulista- UNIP

Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira
Universidade de São Paulo- USP

Prof.^a Dr^a Elizabeth Cristina Pérez Hurtado
Universidade Paulista- UNIP

Prof.^a Dr^a Helena Onishi Ferraz
Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP

AGRADECIMENTOS

Minha querida orientadora, Prof. Dr^a Ivana Suffredini, que me incentiva com a sua incansável dedicação à pesquisa.

Aos meus queridos pais, Maria e Sebastião, que foram capazes de renunciar aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus amados filhos Gabriel e Carolina pelo silêncio, compreensão e amor nos momentos de estudo e pesquisa.

Ao meu esposo Ronaldo pelo incentivo, parceria e dedicação de sempre.

À Dr^a Ingrid Elida Collantes Díaz e ao Sérgio Alexandre Frana, que foram fundamentais na elaboração do trabalho.

A todos do Laboratório de Extração Do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade da UNIP, que direta ou indiretamente estiveram presentes. Sem vocês não seria possível essa conquista, que não é só minha, mas nossa.

Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Meu muito obrigada.

RESUMO

Picrolemma sprucei Hook. (Simaroubaceae), conhecida popularmente como caferana, é uma planta tradicional da Amazônia brasileira usada por nativos da região contra malária, parasitas intestinais e aborto. Embora seu uso seja popular em alguns países sul-americanos, há uma falta de informação relacionada à sua atividade contra células de tumores de mama e de próstata e à sua influência sobre o fenótipo comportamental. Os extratos EB1151 (orgânico) e EB1152 (aquoso), obtidos do caule de *P. sprucei*, foram quimicamente estudados quanto à presença de quassinoides e alcaloides através de técnicas cromatográficas e de partição e suas frações foram avaliadas quanto à ação citotóxica no modelo da sulforrodamina B, e obtidos os valores de concentração inibitória 50% (IC₅₀). A influência da administração intraperitoneal de EB1151 sobre o fenótipo comportamental de camundongos machos Balb-c foi verificada em gaiola moradia e aparelho de campo aberto (CA) com observação direta de 27 parâmetros para atividade geral e cinco parâmetros para CA, com doses variando de 2,500 mg/kg a 39,1 mg/kg no primeiro estágio, em que foram obtidas a dose não letal (DNL). A DNL foi usada no segundo estágio, em maior número de animais. EB1151 e EB1152 foram fracionados e as frações F1CHCl₃ e F2CHCl₃, e as frações derivadas de F1CHCl₃, denominadas UNIP343 e UNIP344, apresentaram IC₅₀ expressivos. As IC₅₀ de UNIP343 e UNIP344 contra células de tumor de mama foram de 0,093 µg/mL e 0,031 µg/mL, respectivamente e de 0,299 µg/mL e 0,158 µg/mL contra células de tumor de próstata, respectivamente. Da fração UNIP343, foram identificados os quassinoides sergeolídeo e 15-desacetilsergeolídeo, enquanto na fração UNIP344 foram identificados isobruceína B e sergeolídeo, substâncias responsáveis pela atividade citotóxica contra células de mama e de próstata observadas para *P. sprucei*. Foram também identificados estigmasterol, sitosterol, (14S,17S,20S)-14,17,20-trihidroxi-24-malabaricen-3-ona, (17R,20R,24R)-17,20,24,25-tetrahidroxi-14(18)-malabaricen-3-ona, e o alcaloide catin-6-ona. EB1151 apresentou DNL de 39,1 mg/kg. No primeiro estágio foram observados queda na resposta ao toque, no trem posterior, nos reflexos auricular e corneal e aumento de irritabilidade, ataxia, micção, piloereção, cianose e hipotermia. No segundo estágio, com a administração da DNL, houve uma queda na atividade geral dos animais, e na resposta ao toque. Os outros parâmetros não foram alterados. Esses dados mostram que, se usado em doses mais baixas, EB1151 é relativamente seguro para ser

avaliado em experimentos farmacológicos. Essas informações se confirmam nas observações da avaliação em CA, no primeiro estágio, em que se verifica somente nas doses maiores a diminuição da locomoção, mas é recuperada no decorrer do tempo de avaliação. Tanto a defecação quanto o *grooming* estão alterados no primeiro estágio, porém, todas as alterações não se confirmaram no segundo estágio, quando a DNL foi administrada. O potencial citotóxico de compostos identificados em *P. sprucei* foi significativo para células de tumor de mama e de próstata, e a influência sobre o fenótipo comportamental mostrou que a administração de EB1151 é segura, e suporta futuros experimentos farmacológicos em animais de laboratório.

Palavras-chave: Floresta amazônica; citotoxicidade; comportamento; campo aberto; quassinoides; alcaloides.

ABSTRACT

Picrolemma sprucei Hook. (Simaroubaceae), popularly known as caferana, is a traditional plant that occurs in the Brazilian Amazon. It is used by Amazon natives against malaria, intestinal parasites and abortion. Although its use is popular in some South American countries, there is a lack of information related to its activity against breast (MCF-7) and prostate (PC-3) cancer cell lines, as well as studies describing its influence on the behavioral phenotype (BP). The extracts EB1151 (organic) and EB1152 (aqueous), obtained from the stem of *P. sprucei*, were chemically studied by the use of chromatographic and partitioning techniques and their fractions were evaluated for the cytotoxic action in the sulforhodamine model B, with which 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were obtained. The influence of intraperitoneal administration of EB1151 on the behavioral phenotype of Balb-c male mice was verified in housing cage from which it was possible to evaluate 27 parameters related to general activity were accessed followed by a locomotion and anxiety evaluation in open field apparatus (CA), in which five parameters were analyzed, in a two-stage experiment. Doses varying from 2,500 mg/kg to 39,1 mg/kg in the first stage were administered to lab animals (n=3, n_{total}=21) and besides BP evaluations, the non-lethal dose (DNL) were obtained. DNL was used in the second stage of the experiment using a larger number of animals (n=10, n_{total}=40). EB1151 and EB1152 were fractionated and the fractions were tested in a cytotoxicity assay against MCF-7 and PC-3 cell lines, in the sulforhodamine B assay (SRB). Fractions F1CHCl₃ and F2CHCl₃, as well as fractions derived from F1CHCl₃, designated UNIP343 and UNIP344, were the most cytotoxic. IC₅₀ obtained for fractions UNIP343 and UNIP344 were 0,093 µg/mL and 0,031 µg/mL against breast cancer cells and 0,299 µg/mL and 0,158 µg/mL against prostate cancer cells. In the UNIP343 fraction, the quassinoids sergeolide and 15-deacetylsergeolide were identified, whereas in the fraction UNIP344, isobrucein B and sergeolide were identified, being these substances responsible for the cytotoxic activity against the cells of the breast and prostate observed for *P. sprucei*. Stigmasterol, sitosterol, (14S, 17S, 20S) -14,17,20-trihydroxy-24-malabaricen-3-one, (17R, 20R, 24R) -17,20,24,25-tetrahydroxy-14 (18) -malabarizone-3-one, and the alkaloid catin-6-one were also identified. EB1151 showed DNL of 39,1 mg / kg. In the first stage of the experiment, response to touch, hindquarter fall, auricular and corneal reflexes were impaired, whereas there was an increase in irritability, ataxia, micturition,

piloerection, cyanosis and hypothermia. In the second stage of the experiment, DNL was administered and there was a decrease in the general activity of the animals, as well as in the response to touch. The other parameters were not altered after treatment. These data show that EB1151 is relatively safe to be if used at lower doses and that opens possibilities of further studies in pharmacological issues related to antitumor activity. Information related to BP was again observed in CA, in the first stage, in which it was verified that only in the larger doses there was a decrease in locomotion, which was completely recovered by the end of the experiment period. Both defecation and grooming were altered in the first stage, however, all changes were not confirmed in the second stage when DNL was administered. The cytotoxic potential of compounds identified in *P. sprucei* was significant for both breast and prostate tumor cells, and the influence on the behavioral phenotype showed that administration of EB1151 is safe and supports future pharmacological experiments in laboratory animals.

Keywords: Amazonian forest; Behavior; Open field; alkaloids; cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico realizado com os extratos orgânico EB1151 e aquoso EB1152, obtidos dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*.....38
- Figura 2- Fluxograma relativo à extração de alcaloides totais feitas a partir dos extratos EB1151 e EB1152, obtidos dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*.....41
- Figura 3- Delineamento experimental realizado no experimento comportamental no primeiro e no segundo realizado com observações em gaiola moradia e em aparelho de campo aberto, após administração do EB1151.....46
- Figura 4- Moléculas identificadas das frações reunidas, obtidas do extrato EB1151, extraídas de órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*. Sitosterol, estigmasterol, (14S,17S,20S)-14,17,20-trihidroxi-24-malabaricen-3-ona, (17R,20R,24R)-17,20,24,25-tetrahidroxi-14(18)-malabaricen-3-ona, cathin-6-ona, sergeolídeo, 15-desacetilsergeolídeo e isobruceína B56
- Figura 5- Resultados obtidos do ensaio citotóxico feito com frações e isolados dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*. Citotoxicidade para linhas celulares MCF-7 a partir de frações EB1151; Citotoxicidade para linhas celulares PC-3 das frações EB1151; Citotoxicidade para linhas celulares MCF-7 a partir de isolados EB1151; Citotoxicidade para linhas celulares PC-3 de isolados EB1151; Citotoxicidade para linhas celulares MCF-7 a partir de frações EB1152; Citotoxicidade para linhas celulares PC-3 das frações EB1152.....61
- Figura 6- Alterações sobre o fenótipo comportamental após administração intraperitoneal de EB1151 a camundongos machos Balb-c. Atividade geral, resposta ao toque, trem posterior, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, no primeiro estágio do experimento. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($n = 3$; $N_{total} = 21$) foi usada para todos os parâmetros analisados. Diferenças entre as

medianas foi analisada pelo teste posterior de Dunn, com significância de $\alpha < 0.05$64

Figura 7- Alterações sobre o fenótipo comportamental após administração intraperitoneal de EB1151 a camundongos machos Balb-c. Ataxia, micção, ptose, piloereção, hipotermia, cianose, no primeiro estágio do experimento. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($n = 3$; $N_{total} = 21$) foi usada para todos os parâmetros analisados. Diferenças entre as medianas foi analisada pelo teste posterior de Dunn, com significância de $\alpha < 0.05$65

Figura 8- Alterações sobre o fenótipo comportamental após administração intraperitoneal de EB1151 a camundongos machos Balb-c. Atividade geral, resposta ao toque, no segundo estágio experimental. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($n = 3$; $N_{total} = 12$) foi usada para todos os parâmetros analisados. Diferenças entre as medianas foi analisada pelo teste posterior de Dunn, com significância de $\alpha < 0.05$. Resultados da atividade geral no segundo estágio do experimento.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produtos naturais ou fármacos utilizados na terapia do câncer segundo a literatura consultada.....	19
Tabela 2- Substâncias com atividade biológica segundo a literatura.....	25
Tabela 3- Parâmetros da atividade geral e sistema sensorial. Descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores.....	28
Tabela 4- Parâmetros psicomotores: descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores.....	30
Tabela 5- Parâmetros do sistema nervoso central e autônomo; descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores.....	32
Tabela 6- Deslocamentos que foram identificados de moléculas presentes nas frações purificadas, após o fracionamento do EB1151, extrato obtido das partes aéreas de <i>Picrolemma sprucei</i>	57
Tabela 7- Resultados obtidos de ensaio citotóxico feito com linhagens de células humanas de câncer de mama (MCF-7) e próstata (PC-3) após tratamentos com FCHCl ₃ , FBuOH, FH ₂ O, alcaloide e para frações isoladas de EB1151 denominadas UNIP324, UNIP328, UNIP335 , UNIP336, UNIP 343 e 344, expressa em IC ₅₀ , em µg/mL e drogas de referência, curcumina e doxorubicina, expressas em IC ₅₀ , em mM.....	60
Tabela 8- Resultados obtidos nos dois estágios do experimento no aparelho de campo aberto realizados em camundongos Balb-c machos através de aplicação de EB1151 intraperitoneal com DL aplicada em n=21 animais e a DNL aplicada em n=40 animais dividido em quatro grupos.....	67

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

INCA - Instituto Nacional de Câncer

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis

UNIP - Universidade Paulista

EB1151 - Extrato bruto orgânico de *Picrolemma sprucei*

EB1152 - Extrato bruto aquoso de *Picrolemma sprucei*

g - grama (s)

CHCl₃ - Clorofórmio

BuOH - Butanol

H₂O - Aquoso

F1CHCl₃ - Fração clorofórmica do extrato orgânico,

F1BuOH - fração butanólica do extrato orgânico

F1H₂O - fração aquosa do extrato orgânico

F2CHCl₃ - fração clorofórmica do extrato aquoso

F2BuOH - fração butanólica do extrato aquoso

F2H₂O - fração aquosa do extrato aquoso

Hex - Hexano

F1Hex- fração hexânica do extrato orgânico

F2Hex- fração hexânica do extrato aquoso

DCM - Diclorometano

F1DCM- fração diclorometânica do extrato orgânico

F2DCM- fração diclorometânica do extrato aquoso

MeOH - Metanol

F1MeOH - Fração metanólica do extrato orgânico

F2MeOH - Fração metanólica do extrato aquoso

CCDA - Cromatografia em camada delgada analítica

UNIP324 - Frações de F1Hex reunidas por semelhança

UNIP328 - Frações de F1Hex reunidas por semelhança

UNIP335 - Frações de F1Hex reunidas por semelhança

UNIP336 - Frações de F1Hex reunidas por semelhança

UNIP343- Frações de D1DCM reunidas por semelhança

UNIP344- Frações de D1DCM reunidas por semelhança

RMN ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de carbono

mL- mililitro (s)

H_3PO_4 - Ácido fosfórico

pH- potencial de hidrogênio

NH_4OH - Hidróxido de Amônio

M - molar

Na_2SO_4 - Sulfato de sódio anidro

MCF-7 - Células adenocarcinoma de mama

PC-3 - Células carcinoma de próstata

DOXO - doxorubicina

IC50- Concentração inibitória 50%

μL - microlitros

TCA - ácido tricloroacético

SRB - Sulforrodamina B

cm - centímetros

h- hora (s)

FC- fenótipo comportamental

CA- campo aberto

mg / kg - miligrama por quilo

IP - intraperitoneal

ADM - Administração

GM - Gaiola-moradia

$\mu\text{g/mL}$ - microgramas por mililitros

μM - micromolar

mM - milimolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Câncer de mama.....	15
1.2 Câncer de próstata.....	16
1.3 Tratamentos com moléculas extraídas de fontes naturais.....	17
1.4 Produtos naturais.....	21
1.4.1 Planta medicinal.....	21
1.4.2 Fitoterapia.....	22
1.5 Simaroubaceae.....	22
1.6 Quassinoides.....	23
1.7 <i>Picrolemma sprucei</i> Hook.....	26
1.8 Estudos Comportamentais.....	27
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Coleta de plantas e preparação de extratos.....	37
3.2 Fracionamento cromatográfico.....	37
3.3 Isolamento de alcaloides totais.....	40
3.4 Ensaio de citotoxicidade.....	42
3.4.1 Técnica de cultura celular.....	42
3.4.2 Ensaio SRB.....	42
3.5 Animais utilizados no experimento farmacológico.....	43
3.6 Preparação do extrato vegetal e composto de referência para os ensaios <i>in vivo</i>	43
3.7 Alterações fenotípicas comportamentais	44
3.8 Avaliação em aparelho de campo aberto.....	44
3.9 Delineamento experimental.....	45
3.10 Análise estatística.....	46
4. ARTIGO SUBMETIDO.....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

As mamas femininas são estruturas glandulares pares, situadas na parede anterior e superior do tórax à frente do músculo peitoral maior e serrátil anterior, entre a terceira e sétima costela e a borda do esterno com a linha axilar média, sendo separadas pelo sulco inter mamário. É formada por tecido glandular epitelial, tecido célula-adiposo e tecido fibroso (OLIVA e SALGADO, 2005).

A glândula mamária é composta por um conjunto de 15 a 20 lobos, subdivididos em lóbulos. São constituídos por alvéolos formadores de leite, drenado através de ductos finos que se juntam em um ducto principal chamado de ducto lactífero, estes dirigindo-se ao centro da mama e desembocando na abertura do mamilo que apresenta cerca de 15 a 20 orifícios (MATUHARA e NAGANUMA, 2006).

O câncer de mama é o segundo tipo de tumor maligno que mais atinge as mulheres e em casos raros os homens, representa a terceira causa de morte no mundo, seja em países em desenvolvimento ou em países desenvolvidos (FERREIRA et al., 2016; HUGUET et al., 2009; TESHIMA et al., 2016). Esse tumor corresponde a cerca de 25% dos novos casos de câncer em mulheres no mundo (COSTA et al., 2012; ARAUJO e FERNANDES, 2008). Segundo Instituto Nacional de Câncer (INCA) cerca de 59.700 novos casos devem ser diagnosticados no ano de 2018.

Dentre os fatores de risco estão idade acima de 50 anos (INCA, 2018), menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeiro parto tardio, história de câncer na família antes dos 40 anos, presença dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (BATISTON et al., 2011), exposição à radiação ionizante, sobrepeso, obesidade, ingestão de álcool e uso de contraceptivos orais (FERREIRA et al., 2016; KAMEO et al., 2016; MARSICANO et al., 2014).

Quando diagnosticado precocemente o câncer de mama é considerado de bom prognóstico, no Brasil 60% dos diagnósticos são em estágios avançados (III e IV), o que aumenta o número de realização de mastectomias e provoca maiores comprometimentos nos tratamentos, perdas na qualidade de vida e diminui as chances de sobrevida (SILVA, 2008).

O tratamento pode ser realizado por cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser isolados ou combinados entre si (COSTA et al., 2012). Segundo KAMEO et al., (2016) a promoção da saúde, prevenção e diagnóstico precoce são as melhores armas para controlar a incidência da doença.

1.2 Câncer de Próstata

A próstata é uma pequena glândula localizada abaixo da bexiga e a frente do reto envolvendo a porção inicial da uretra, pesa aproximadamente 30g é responsável por produzir 40% dos fluidos seminais (TONON e SCHOFFEN, 2009).

O câncer de próstata é a neoplasia maligna mais comum entre os homens no Brasil e desde a década de 1960 tem aumentando a incidência (MOSCHETA e SANTOS, 2012; SILVA, NETO e LIMA, 2010). Segundo INCA (2018), cerca de 68.220 novos casos serão diagnosticados esse ano.

A taxa de incidência no Brasil é 6 vezes maior do que em países desenvolvidos, o que pode estar associado a procura tardia por auxílio médico (avanço da doença) (SILVA, NETO e LIMA, 2010) e o aumento na expectativa de vida que também tende a aumentar a incidência (NASSIF e TAMBATA-FILHO, 2010).

O câncer de próstata afeta área responsável pelas funções sexuais o que desencadeia uma série de conflitos ligados à sexualidade, como a diminuição da libido, impotência sexual e incontinência urinária (MOSCHETA e SANTOS, 2012).

O rastreamento do câncer de próstata é realizado por meio do toque retal, (MIGOWSKI e SILVA, 2010; NASSIF e TAMBATA-FILHO, 2010; SOUZA, SILVA, PINHEIRO 2011), e dosagem do antígeno específico prostático (PSA), (MIGOWSKI e SILVA, 2010; NASSIF e TAMBATA-FILHO, 2010). Outros exames como fosfatase ácida, ultrassonografia trans-retal e biópsia também auxiliam no diagnóstico (TONON e SCHOFFEN, 2009).

Dentre os fatores de risco há idade acima de 60 anos, raça/etnia, histórico familiar (AMORIM et al., 2011), influências ambientais e alimentares (PAIVA, MOTTA, GRIEP, 2010 e 2011).

O tratamento pode ser realizado através de radioterapia, se o tumor prostático for localizado (GONNELLI et al., 2016), por ressecção cirúrgica (prostatectomia radical), (INCA, 2018) e se ocorreu metástase, a orquiectomia (retirada dos testículos) também pode ser utilizada, como uma metodologia para controle de secreção hormonal, ou simplesmente o bloqueio hormonal é realizado (TONON e SCHOFFEN, 2009).

A quimioterapia não apresenta resultados animadores para o CP, já que a utilização de apenas uma droga ou a associação de várias drogas vem sendo proposta, entretanto, até o momento não se pode concluir quanto sua eficácia (TONON e SCHOFFEN, 2009).

1.3 Tratamentos com moléculas extraídas de fontes naturais.

O acesso às fontes naturais comprova que a natureza é praticamente insuperável e a evolução tecnológica auxilia na descoberta de novas moléculas e novas estratégias terapêuticas. A natureza está disponível em abundância e oferece as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivado direta ou indiretamente de fontes naturais que são utilizados para o tratamento de inúmeras doenças há muitos anos, esse fator tem incentivado as pesquisas nessa área (NEWMAN e CRAGG, 2016). Uma média de 48% dos medicamentos usados advém de produtos naturais capazes de curar, prevenir ou aliviar doenças (BARBOSA, 2012).

Como exemplo, há a *Catharanthus roseus* (vinca) utilizada em Madagascar para o tratamento de diabetes, quando durante os testes hipoglicemiantes, foi observada granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais testados. Esse resultado sugeriu uma avaliação em modelos de leucemias e

linfomas e levou ao isolamento de alcaloides como a vimblastina e vincristina que são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010).

Espécies do gênero *Podophyllum*, *P. peltatum* e *P. emodii* são utilizadas no tratamento do câncer de pele e verrugas na América e Ásia. A partir da podofilotoxina, obtiveram-se os derivados semi-sintéticos etoposídeo e o teniposídeo, utilizados no tratamento do câncer (BRANDÃO et al., 2010).

De *Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt., foi descoberto o paclitaxel, em 1971 (BRANDÃO et al., 2010), que é um dos fármacos usados no tratamento de diversos tumores, como o de mama, pulmão e ovário (MARTINS et al., 2014).

O fungo *Pisolithus tinctorius*, pertencente à classe dos Basidiomicetos, presente na Sclerodermateaceae forma ectomicorrizas, e na natureza tem a função de proteger pinheiros e/ou eucaliptos contra doenças causadas por micro-organismos e estimulam o crescimento da planta, pela produção de fito hormônios (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Ensaio microbiológico do extrato bruto de *P. tinctorius* demonstraram atividade microbiciada. Desse extrato, foi isolado o pisosterol, que apresentou atividade citotóxica em células tumorais *in vitro*. Estudos com sarcoma 180 demonstraram que o pisosterol também inibe o crescimento tumoral *in vivo*. Concomitantemente, foi observado que o pisosterol é um potente indutor de diferenciação celular que leva as células leucêmicas HL-60 à diferenciação monocítica, sendo esse um dos seus prováveis mecanismos de ação (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Novas fontes de agentes quimioterápicos estão sendo exploradas, como actinomicetos marinhos, cianobactérias e fungos endofíticos, além de uma grande quantidade de moléculas com atividade antineoplásica derivadas de plantas, micro-organismos e organismos marinhos (COSTA-LOTUFO et al., 2010). A tabela 1 apresenta diversos compostos isolados ou fármacos que vêm sendo utilizados pela medicina como ativo contra diversos tipos de tumores.

Tabela 1- Produtos naturais ou fármacos utilizados na terapia do câncer segundo a literatura consultada.

Fonte	Fármaco	Alvo Molecular	Indicação Terapêutica	Referência Bibliográfica
<i>Catharanthus roseus</i>	Vimblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; Câncer de testículo; Doença de Hodking	COSTA-LOTUFO et al., 2010; NEWMAN e CRAGG, 2016; BALANDRIN et al., 1985.
<i>Epotilona</i>	Ixabepilona		Câncer de Próstata	LIU et al.; 2012; HUSSAIN et al., 2005.
<i>Sarcodictyon roseum</i> <i>Eleutherobia</i> <i>Discodermia dissoluta</i>	Sarcodictina e eleuterobina Discodermolida Laulimalida		Diversos tumores	SOUZA, 2004.
<i>Wikstroemia indica</i>	Tricina, canferol-3- O - β - D- glucopirosídeo e a lignana nortraquelogenina;		Leucemia	LEE, 2010.
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofilotoxina		Diversos tumores	LEE, 2010.
<i>Dolabella auricularia</i> <i>S. peuceius</i>	Dolastatinas Daunorrubicina	Topoisomerase I	Linfomas e mielomas Leucemia mielóide aguda, neuroblastoma.	KUNDU et al., 2015.
<i>Camptotheca accuminata</i> <i>Streptomyces</i>	Camptotecina Topotecano Irinotecano. Doxorrubicina		Câncer de colón	COSTA-LOTUFO et al., 2010; NEWMAN e CRAGG, 2016; BALANDRIN et al., 1985. KUNDU et al., 2015.

Continuação tabela 1- Produtos naturais ou fármacos utilizados na terapia do câncer segundo a literatura consultada.

Fonte	Fármaco	Alvo Molecular	Indicação Terapêutica	Referência Bibliográfica
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofilotoxina Etoposídeo Teniposídeo	Topoisomerase II. Epipodofitoxinas.	Câncer de Pulmão, Ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda.	COSTA-LOTUFO et al., 2010; NEWMAN e CRAGG, 2016; BALANDRIN et al., 1985.
<i>Taxus brevifolia</i>	Paclitaxel Docetaxel	Antimitóticos	Câncer de mama	COSTA-LOTUFO et al., 2010; NEWMAN e CRAGG, 2016; BALANDRIN et al., 1985.
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofilotoxina		Diversos tumores	LEE, 2010.
<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Trabectedina	Alquilante de DNA	Diversos tumores	DAVID, WOLFENDER e DIAS, 2014.
<i>Piper nigrum</i>	Piperina	Inibição MAPK, AKT, NF, MMP 9.	Mama, sarcoma, cólon e próstata.	KUNDU et al., 2015.
<i>Lentinula edodes</i>	Lentinano	Aumenta a produção de IFN, Células T CD4 +; reduz a IL-4 e Células CD4 + produtoras de IL-6.	Linfoma e câncer do trato digestivo e oral.	KUNDU et al., 2015.
<i>Betula pubescens, Ziziphus mauritiana, Prunella vulgaris, Chaenomeles sinensis, Pulsatilla chinensi.</i>	Ácido betulinico	Apoptose	Diversos tumores	KUNDU et al., 2015.
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina	Degradação do receptor de andrógeno	Câncer de próstata	LEE, 2010.

1.4 Produtos Naturais

Produtos naturais são fontes de moléculas bioativas, produzidos por micro-organismos, animais e plantas (FERREIRA, 2016). O estudo de produtos naturais é baseado em isolar compostos ativos com constituintes químicos de potencial farmacológico (POHLIT et al., 2009; VIEIRA et al., 2014) e fornecer conhecimentos com capacidade de tratamento e cura (ANDRADE-NETO et al., 2007). O uso de plantas e produtos naturais na área da saúde já é algo inserido na sociedade brasileira (NASCIMENTO, SALES e CAYANA, 2005).

O Brasil é o país com maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta com grande vocação para pesquisa de produtos naturais (PINTO et al., 2002), detém aproximadamente 20% do número total de espécies vegetais do planeta, o que promove grande aceitação quanto ao uso de plantas (BARBOSA, 2012; OZI et al., 2011). Segundo FERREIRA (2016), existe uma estimativa de que 375 fármacos possam ser encontrados em florestas tropicais do mundo e apenas 10% já foram descobertos.

1.4.1 Planta Medicinal

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016), “Planta medicinal é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósito terapêutico”, tem capacidade de aliviar ou curar enfermidades, é utilizada como medicamento pela população normalmente em forma de chás ou infusões. Para o uso é necessário conhecer a planta e saber como preparar adequadamente (ANVISA, 2018).

Em 1587, Gabriel Soares de Souza já relatava o uso das plantas medicinais pelos índios através de seu livro “Tratado Descritivo do Brasil”. Em 1808, com a chegada da corte Real, D. João VI marcou a história da ciência brasileira, através de expedições científicas, que deu conhecimento aos europeus da exuberância de fauna e flora brasileira, com coletas de espécimes de animais e de plantas para os museus europeus. Em 1826, chega ao Brasil o médico Bernardino António Gomes que fez valiosas observações botânico-médicas sobre plantas locais e isolou a cinchonina, foi

o primeiro alcaloide natural sob a forma de base pura, na história da Química (PINTO et al., 2002).

1.4.2 Fitoterapia

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016) relata que “Fitoterapia é a terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal”. A palavra se define em grego *phyton* (plantas) e *therapeia* (tratamento).

O uso ocorre com preparações padronizadas de uma mistura complexa de uma ou mais substâncias presentes na planta. É necessário que se tenha conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização e documentação tecnocientífica (NASCIMENTO et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; ANVISA, 2018). Fitoterápicos podem ser utilizados como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidro-alcoólicas e infusões (MACHADO e OLIVEIRA, 2014).

1.5 Simaroubaceae

Espécies de Simaroubaceae são árvores ou arbustos com folhas alternas ou raramente opostas, compostas pinadas ou raramente simples, sem estípulas, margem inteira ou serrada, apresenta inflorescência geralmente cimosa, as flores são pouco vistosas, unicelulares e poucas vezes bissexuadas, actinomorfas, diclamídeas ou dificilmente monoclamídeas (BARBOSA, 2012; SOUSA, OLIVEIRA e CHAVES, 2016).

A família é constituída por aproximadamente 15 gêneros e 118 espécies (PIRANI e TOMAS 2015; FLORA DO BRASIL, 2018). No Brasil, Simaroubaceae é representada pelos gêneros *Castela* Turpin, *Homalolepis* Turcz., *Picrasma* Blume, *Picrolemma* Hook.f., *Quassia* L., *Simaba* Aubl., *Simarouba* Aubl., (PIRANI e TOMAS, 2015; FLORA DO BRASIL, 2018).

A distribuição geográfica brasileira ocorre no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (FLORA DO BRASIL, 2018). *Quassia* e *Picrolemma* são encontradas na Amazônia, *Castela* e *Picrasma* no Sul e *Simaba*, *Simarouba* e *Picrolemma* estão distribuídas em todo o país (ALVES et al., 2014).

Em termos botânicos, Simaroubaceae está relacionada com a Rutaceae, Meliaceae e Burseraceae, estando mais próxima da primeira pela semelhança anatômica (madeira), na composição química e pela ausência de vasos condutores de resina na casca do caule e presença de estames livres em suas flores. Apresentam diferenças pela ausência de óleos aromáticos nas suas folhas e flores e pela presença de quassinoides, propriedade exclusiva da família (ALVES et al., 2014).

Desde 1930, estudos vêm sendo realizados sobre sua constituição química, e numerosos compostos foram isolados e sua estrutura foi elucidada, citando-se quassinoides, alcaloides, triterpenos, esteróides, cumarinas, antraquinonas, flavonóides e outros metabólitos, sendo os quassinoides um marcador taxonômico da Simaroubaceae, por ser o grupo mais abundante de substâncias naturais e sua quase exclusiva (ALVES et al., 2014; ALMEIDA et al., 2007).

Espécies de Simaroubaceae apresentam os metabólitos secundários com várias atividades farmacológicas (ANDRADE-NETO et al., 2007), como antitumoral, antimalárica, antiviral, inseticida, antiparasitária, anorexígena, anti-inflamatória e herbicida (DEWICK, 2002; SOUSA, OLIVEIRA e CHAVES, 2016).

1.6 Quassinoides

Os quassinóides constituem uma classe de substâncias caracterizada pelo sabor amargo na madeira, encontradas quase que exclusivamente em plantas de Simaroubaceae. Em 1760, apareceram os primeiros relatos sobre a história dos quassinoides após a descoberta das propriedades febrífugas de espécies dessa

família (HOUE et al., 2013). Em 1937, foi isolado o primeiro quassinóide somente em 1950, Robertson e colaboradores elucidaram os constituintes químicos majoritários quassina e neoquassina de *Quassia amara* (ALMEIDA, 2007).

Quassinoides consistem em produtos de degradação triterpênica, altamente oxigenados e estruturalmente complexos. São classificados em cinco grupos: C-18, C-19, C-20, C-22 e C-25, a maioria dos quais possui um esqueleto de vinte carbonos (ALVES et al., 2014). Os quassinoides são produzidos por várias plantas de Simaroubaceae, principalmente *Quassia*, cujo composto quassina, isolado de *Q. amara*, foi estudado pelo seu potencial citotóxico antimalárico e amebicida (DEWICK 2002).

Segundo ALMEIDA (2007), na década de 1970, ensaios biológicos com quassinóides revelaram acentuada atividade antileucêmica, permitindo na década seguinte o uso clínico do quassinóide bruceantina como quimioterápico, fato esse que incentivou inúmeras pesquisas nas áreas de química e farmacologia com plantas da Simaroubaceae.

Esses compostos são ativos em testes *in vivo* e *in vitro*, favorecendo o uso comercial da planta pela atividade biológica (ALMEIDA et al., 2007; AMORIM, 2009; BARBOSA, 2012; OLIVEIRA, 2011; SARAIVA et al., 2003; SILVA et al., 2009). Os quassinoides apresentam ações contra tumor, malária, inflamação, úlcera, tuberculose, entre outras (ALMEIDA et al., 2007; BARBOSA, 2012; ANDRADE-NETO et al., 2007). A tabela 2 cita alguns quassinoides descritos na literatura que apresentam atividade biológica.

Tabela 2- Quassinoides que apresentam atividade biológica segundo a literatura.

Espécie	Nome da substância	Atividade biológica	Referência bibliográfica
<i>Hannoa klaineana</i>	15-Desacetilundulatona	Leucemia (P388) Adenocarcinoma de cólon	LUMONADIO et al., 1991.
<i>Simaba inocensis</i> <i>Simaba orinocensis</i>	Neosergeolídeo	Antimálarico	CALDERON et al., 2009.
<i>Picrolemma sprucei</i>	Neosergeolídeo	Antimalárico	MENEGUETTI et al., 2014; AMORIN et al., 2013; ANDRADE-NETO et al., 2007; CALDERON et al., 2009.
	Isobruceína B	Antimalárico Antileucêmico P388.	AMORIN et al., 2013; BERO e QUETIN-LECLERCQ, 2011; POLONSKY, BHATNAGAR e MORETTI, 1984.
	Sergeolídeo	Antimalárico, antitumoral, antileucêmico	FANDEUR, MORETTI e POLONSKY, 1985; HOUE et al., 2013.
	15-Desacetilsergeolídeo	Antileucêmico	POLONSKY, BHATNAGAR e MORETTI, 1984.
<i>Quassia amara</i>	Simalicalactona	Antimalárico, antitumoral	LUYEN LE et al., 2015; CALDERON et al., 2009.
	Quassimarina	Antitumoral	HOUE et al., 2013.
	Picrasina	Antimalárico	BERO e QUETIN-LECLERCQ, 2011.
	Neosergeolídeo	Antimalárico	BERTANI et al., 2005.
<i>Simaba cedron</i> ; <i>S. cuneata</i> ; <i>S. insignis</i> <i>S. berteriana</i> ; <i>S. glauca</i> ; <i>S. tulae</i> .	Quassinósídeos	Antimalárico	HOUE et al., 2013.
<i>Simarouba amara</i>	Triterpenos e Quassinósídeos	Antimalárico Transtornos Hepáticos	MARANHÃO et al., 2014; HOUE et al., 2013.

1.7 *Picrolemma sprucei* Hook.

O gênero *Picrolemma* foi descrito em 1862 por J. D. Hooker no “*Genera Plantarum*” (AMORIM, 2009). Segundo PIRANI e TOMAS (2015), no Brasil estão presentes as espécies *Picrolemma huberi* Ducke e *Picrolemma sprucei* Hook.f. (sinonímia *Picrolemma pseudocoffea*), tendo sua distribuição geográfica confirmada no Norte do país, nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia (BARBOSA, 2012).

É descrita como uma árvore ou arbusto baixo, que atinge até 2,5 m de altura, com folíolos cartáceos simétricos, verde-escuros e brilhantes. Quando em inflorescência apresentam flores de pétalas alaranjadas e estames amarelos, seus caules são ocos, os frutos são apocárpicos e quando maduros, são de cor alaranjada (BARBOSA, 2012; OLIVEIRA, 2011; POHLIT et al., 2009; SARAIVA et al., 2003; NUNOMURA et al., 2006).

Estudos anatômicos de folhas e caules demonstraram que as epidermes das folhas são glabras, com células de paredes onduladas e estômatos anomocíticos, o mesofilo é dorsiventral com uma camada de células em paliçada e um parênquima lacunoso, feixes vasculares são bicolaterais e apresentam idioblastos escuros de conteúdo tânico, o caule evidencia um parênquima cortical desenvolvido, com células de natureza esclerenquimática, isoladas ou reunidas em pequenos grupos de paredes espessas. Região vascular internamente com vasos xilemáticos isolados ou em grupos imersos em tecido fibroso, sendo o parênquima do tipo paratraqueal, vasicêntrico, na região central encontra-se uma medula desenvolvida (SARAIVA et al., 2003).

Na região amazônica brasileira, *Picrolemma sprucei* é uma das plantas medicinais mais conhecidas, chamada popularmente de caferana, que significa "falso-café", o que deu origem ao pseudônimo *P. pseudocoffea* Ducke pela semelhança com o cafeeiro, (AMORIM, 2009; AMORIM et al., 2013; BARBOSA, 2012; NUNOMURA et al., 2006; POHLIT et al., 2009; SARAIVA et al., 2003; SILVA et al., 2009a e 2009b).

É usada por nativos da região amazônica como chá medicinal antimalárico, no tratamento de alterações gastrointestinais e vermes intestinais. As partes usadas da

planta são as raízes, caules e infusões de plantas inteiras. A ingestão em doses elevadas de infusão pode apresentar efeitos tóxicos notáveis e são usados para provocar abortos (BARBOSA, 2012; NUNOMURA et al., 2006; POHLIT et al., 2009; VIEIRA et al., 2014).

Os quassinoides de *P. sprucei* apresentam atividades citotóxica, antiplasmódicas e larvicida *in vitro* (SILVA et al., 2009). Estudos de NUNOMURA et al., (2006) demonstraram que os quassinóides neosergeolideo e isobruceína B produzem mortalidade nos vermes, evidenciando atividade anti-helmíntica. No estudo de ANDRADE-NETO et al., (2007), os mesmos quassinoides apresentaram atividade antimalárica *in vitro*.

1.8 Estudos comportamentais

Embora estudos prévios reportem citotoxicidade contra células de tumor de cabeça e pescoço de extrato orgânico de *P. sprucei* (OZI et al., 2011) e contra células leucêmicas (SILVA et al., 2009b), nenhum estudo que relate a toxicidade do extrato vegetal ou mesmo dos compostos isolados é encontrado na literatura. Por esse motivo, dados que se referem a alterações comportamentais em animais de laboratório são imprescindíveis para que futuros estudos farmacológicos sejam delineados com produtos dessa espécie vegetal. Estudos realizados anteriormente (ESTORK et al., 2014 e 2016; GUSMÃO et al., 2013a e 2013b; SUFFREDINI et al., 2017) foram feitos com base em um modelo desenvolvido para se obter informações iniciais a respeito de alterações gerais causadas pelos extratos vegetais nos sistemas sensorial e psicomotor, sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo dos quais 27 parâmetros são analisados e quantificados, segundo escores relacionados nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Parâmetros da atividade geral e sistema sensorial (BRITO, 1994). Descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo ESTORK et al., (2016). O valor base é dado pelo animal do grupo controle.

Função	Parâmetro	Descrição dos sinais de toxicidade.	Escores atribuídos
Atividade			
	Atividade geral	Verificar a atividade geral do animal na gaiola moradia após estímulo. Entende-se, como atividade geral, dentre outros comportamentos a presença de locomoção, levantar, farejar e/ ou parado.	0- não se move 1- animal dá um passo. 2- animal dá meia volta na caixa de observação. 3- animal dá duas voltas na caixa (base) 4- animal andando com agilidade
Sistema sensorial			
	Frêmito vocal	Observar se há emissão de som sem nenhuma estimulação ou toque.	0- ausente 4- presente
	Irritabilidade	Assoprar o animal e tocá-lo levemente para examinar reação.	0- ausente 4- presente
	Reflexo auricular	Observar a posição da orelha, quanto mais próxima da cabeça, menor é o reflexo. Estalar dos dedos uma vez e analisar reflexo. Logo após estalar várias vezes seguidas e observar reflexos	0- ausente – orelha colada à cabeça. 1- orelha colada ligeiramente na cabeça. 2- orelha metade em pé. 3- orelha um pouco mais em pé (base). 4- orelha totalmente em pé.
	Aperto de cauda	Apertar com uma pinça a região próxima a ponta da cauda com bastante intensidade.	0- sem reação. 1- move-se ligeiramente 2- se move mais rápido. 3- se move e pula (base). 4- se move, pula e corre.

Continuação tabela 3- Parâmetros da atividade geral e sistema sensorial (BRITO, 1994). Descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo ESTORK et al., (2016). O valor base é dado pelo animal do grupo controle.

<i>Função</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição dos sinais de toxicidade.</i>	<i>Escore atribuído</i>
<i>Sistema sensorial</i>	Reflexo Corneal	Aproximar uma pinça, lentamente, até os olhos do animal, sem encostá-la, e verificar se o animal tem o reflexo de fechá-los.	0- olhos permanecem abertos. 1- quase não se move. 2- se move um pouco. 3- fecha os olhos pela metade na aproximação da pinça. 4- fecha os olhos totalmente na aproximação da pinça (base).
	Resposta ao toque	Tocar o animal com uma pinça num intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e examinar as respostas	0- não se move. 1- apresenta pouco movimento. 2- animal dá um passo. 3- anda com dificuldade. 4- anda com agilidade (base)

Tabela 4. Parâmetros psicomotores: descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo BRITO (1994) e ESTORK et al., (2016). O valor base é dado pelo animal do grupo controle.

<i>Psicomotor</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição dos sinais de toxicidade.</i>	<i>Escore atribuído</i>
	Contorção	Movimento vermiforme do corpo.	0- ausência (base). 4- presente.
	Trem Posterior	Verificar se o animal está com a postura normal ou se o trem posterior está caído (intensidade, modo de andar).	0- ausente (base). 1- queda do trem posterior pouco visível. 2- queda do trem posterior visível. Animal andando com dificuldade. 3- trem posterior visivelmente caído. Animal andando com dificuldade. 4- trem totalmente caído. Animal andando com dificuldade, arrastando o trem posterior.
	Reflexo de Endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que o animal volta à sua posição normal em até 15 segundos.	0- não se move. 1- volta lentamente com dificuldade. 2- volta lentamente 3- volta mais rápido. 4- volta imediatamente com agilidade (base).
	Tônus Corporal	Verificar sua presença ou não e o grau do mesmo.	0- ausente. 4- presente(base).
	Força de agarrar	Colocar animal em cima de uma grade e avaliar intensidade em que se segura na mesma.	0- não se agarra a grade. 1- segura inicialmente e larga a barra. 2- segura por um tempo mais prolongado, mas solta a barra. 3- segura firmemente a barra mas solta a barra. 4- segura firmemente a barra e não a solta(base).

Continuação tabela 4. Parâmetros psicomotores: descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo BRITO (1994) e ESTORK et al., (2016). O valor base é dado pelo animal do grupo controle.

<i>Psicomotor</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição dos sinais de toxicidade.</i>	<i>Escores atribuídos</i>
	Ataxia	Movimentos incoordenados devido à dismetria (distúrbio de coordenação dos movimentos por estados de inconsciência e consciência compensatória).	0- ausente(base). 4- presente.

Tabela 5- Parâmetros do sistema nervoso central e autônomo; descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo BRITO (1994) e ESTORK et al., (2016). O valor base é dado pelo animal do grupo controle.

Sistema nervoso central	Parâmetros	Descrição do parâmetro	Escores atribuídos
	Tremores	Observar se estão presentes ou não e qual a intensidade.	0- ausente (base). 4- presente.
	Convulsões	Observar a presença ou não (0 – ausência, 1- presença).	0- ausente (base). 4- presente.
	<i>Straube Tail</i>	Verificar se a cauda está normal ou ereta;	0- normal (base). 4- ereta.
	Hipnose	Animal quieto, sem movimento mas se tocado responde ao estímulo e abre os olhos.	0- ausente (base). 4- presente.
	Anestesia	A ausência de resposta a estímulo doloroso com perda do reflexo de endireitamento.	0- ausente (base). 4- presente.
Sistema Nervoso autônomo			
	Ptose	Olho fechado ou semi fechado mesmo após um estímulo. O animal se locomove ou não mas continua com as pálpebras caídas.	0- ausente (base). 1- olho pouco fechado. 2- olho ligeiramente fechado. 3- olho fechado pela metade. 4- olho quase totalmente fechado.
	Lacrimação	Presença e grau	0- ausente (base). 4- presente.
	Micção	Número de micções	Número de poças de urina.
	Defecação	Número de bolos fecais	Número de cíbalas.

Continuação tabela 5- Parâmetros do sistema nervoso central e autônomo; descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo BRITO (1994) e ESTORK et al., (2016). O valor base é dado pelo animal do grupo controle.

Sistema Nervoso autônomo	Parâmetros	Descrição dos parâmetros	Escores atribuídos
	Piloereção	Presença ou não e sua intensidade	0- ausente (base). 1- pouca ereção dos pelos. 2- grau ligeiramente maior que o anterior. 3- grau visível mas não totalmente ereto. 4- grau totalmente ereto.
	Hipotermia	Presença ou não e sua intensidade. Observado pelo contato com o animal.	0- ausente (base). 1- animal ligeiramente frio. 2- animal frio. 3- animal gelado. 4- animal gelado e com cianose.
	Respiração	Normo, hipo e hiperventilação.	0- normal (base). 1- pouco acelerado. 2- mais acelerado. 3- muito acelerado. 4- animal ofegante.
	Cianose	Presença ou não e sua intensidade	0- ausente (base). 1- pés, patas e focinhos esbranquiçados. 2- pés, patas e focinhos ligeiramente azulado. 3- pés, patas e focinhos ligeiramente arroxeados. 4- pés, patas e focinhos totalmente arroxeados.

Após a avaliação das alterações gerais causadas pela administração de EB1151, a adição de outra análise referente a mudanças na locomoção e na ansiedade dos animais de laboratório também é feita, pelo emprego do aparelho do campo aberto (LAPIZ-BLUHM et al., 2008). O campo aberto é um aparato que consiste em uma arena que se apresenta com o assoalho arredondado ou quadricular, com tamanho específico ao animal a ser analisado (BROADHURST, 1960). O assoalho do aparato de campo aberto adaptado para camundongos apresenta 19 divisões quadriculares, que são usadas para medir o deslocamento do animal durante um tempo determinado, em geral, 5 minutos, o que permite quantificar a atividade locomotora do animal, o teste sugere que a defecação, micção e a atividade motora no campo aberto indicam o estado emocional do animal de acordo com o comportamento exploratório (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2018). O aparelho apresenta uma parede, com altura suficiente para o animal não escapar, e não apresenta cobertura, ou teto, permitindo a necessária entrada de luz (100W). Esse teste foi desenvolvido por Hall em 1934.

O animal é colocado no centro da arena do campo aberto, sob luz forte, ou seja, em uma situação que é antagônica àquela de um ambiente protetor e escuro ao que está adaptado. Com isso, o animal permanece em uma situação paradoxal, em que ele está sob ansiedade por se encontrar em um ambiente aberto e iluminado, mas ao mesmo tempo seu instinto exploratório é revelado e ele se vê impulsionado a reconhecer o local em que se encontra. Com essa situação, é possível verificar o quanto o tratamento, no caso deste trabalho, o EB1151 influenciou a capacidade do animal se deslocar durante o processo exploratório, o quanto o tratamento proporcionou as alterações nos níveis de ansiedade, o quanto o tratamento apresentou alterações na exploração espacial e na capacidade do animal de realizar a auto-limpeza. Portanto, com essa análise, outros cinco parâmetros são avaliados, como frequência de locomoção (deslocamento medido pelo número de quadrados que os animais colocaram as quatro patas), tempo de imobilidade (tempo que o animal não apresentou movimentos, incluindo movimentos das vibrissas, em segundos), frequência de levantar (animal se coloca elevado, apoiado em suas patas posteriores), auto-limpeza (*grooming*, em inglês, refere-se aos movimentos ritmados executados segundo uma sequência própria, que se inicia com a limpeza com as patas dianteiras) e defecação (número de bolos fecais durante o tempo de análise).

A partir dos dados obtidos dessas análises, é possível obter informações relevantes para se delinear futuros experimentos em farmacologia, inclusive por se ter estabelecidos os principais efeitos adversos que o tratamento pode apresentar, como bases para se fundamentar as primeiras doses a serem avaliadas *in vivo*, de modo a delinear o experimento segundo as recomendações éticas pertinentes ao emprego dos 3Rs (redução, substituição e aprimoramento das técnicas que utilizam animais de laboratório).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificação da atividade citotóxica contra células de tumor de mama e de próstata humanas de extratos de *Picrolemma sprucei* Hook. e a influência de seu extrato orgânico sobre o fenótipo comportamental de camundongos.

2.2 Objetivo Específico

Avaliar a citotoxicidade das frações obtidas dos extratos orgânico e aquoso e das frações purificadas do extrato orgânico contra células tumorais de mama MCF-7 e próstata PC-3.

Identificar compostos de frações ativas.

Avaliar a influência do extrato orgânico sobre o fenótipo comportamental de camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de plantas e preparação de extratos

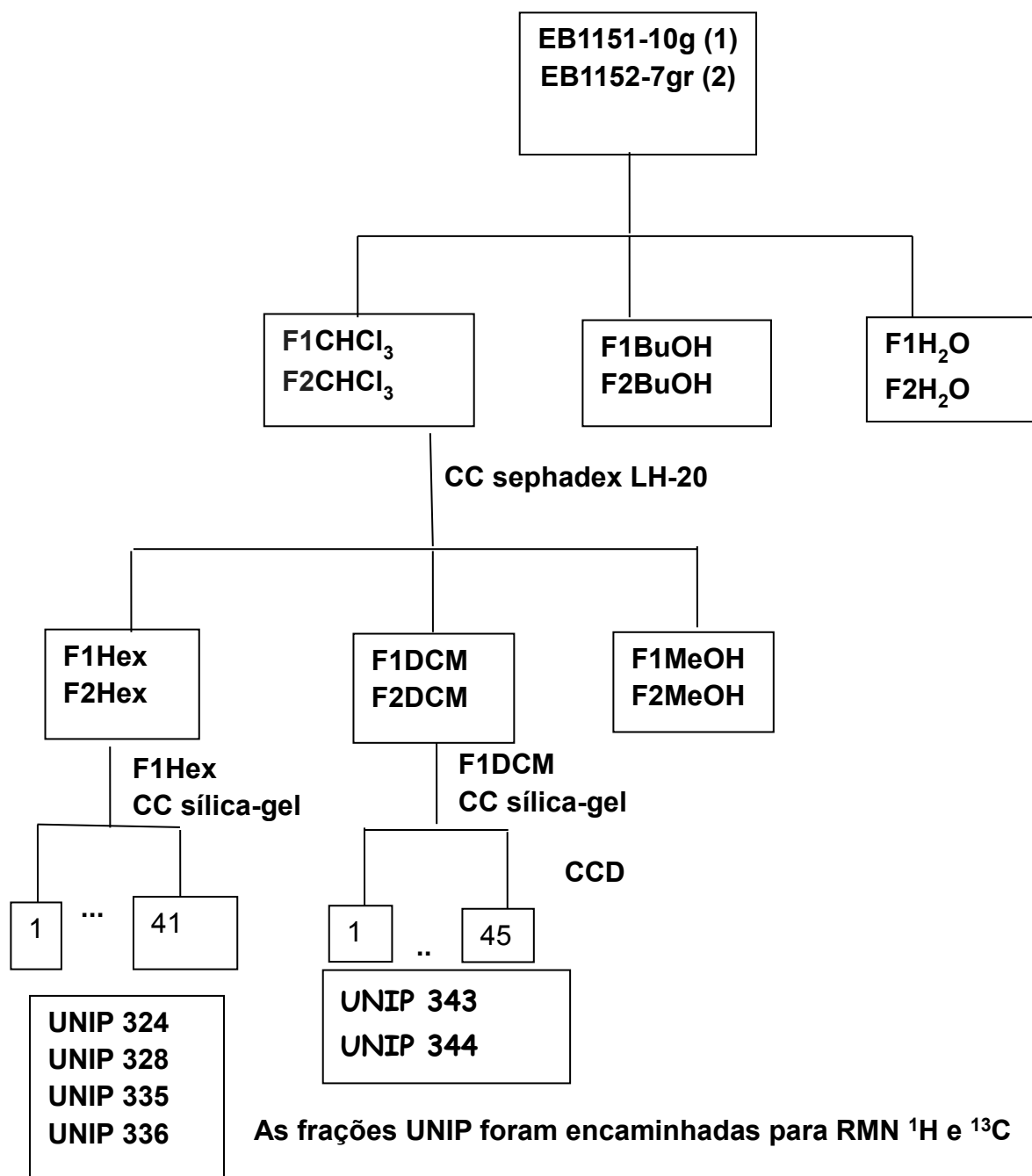
A planta foi coletada na floresta amazônica brasileira, sob as licenças do IBAMA / CGen / MMA (12-A / 2008). As espécies estudadas foram coletadas no entorno da cidade de Manaus, estado do Amazonas, em uma floresta sazonalmente inundada da Bacia do Rio Negro (floresta de igapó). A excisata está depositada no Herbário da Universidade Paulista [A.A.Oliveira, 3582 (UNIP)].

Órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei* Hook. (Simaroubaceae) foram utilizados para obtenção do extrato bruto utilizado nos ensaios atuais, sendo a preparação descrita em outro trabalho (CASTILHO et al., 2013 e 2014). Resumidamente, 202,0 g das partes aéreas da planta foram trituradas em moinho de martelos (Holmes), o pó passou por duas macerações sendo a primeira com diclorometano e metanol (1: 1) durante 24 horas. O macerado foi drenado e os solventes removidos por rota-vaporização (Buchi). Uma segunda maceração feita com o mesmo material botânico de 24 horas foi realizada com água Milli-q e depois a água foi liofilizada. Extratos orgânicos e aquosos foram denominados EB1151 e EB1152, respectivamente.

3.2 Fracionamento cromatográfico

O fracionamento cromatográfico foi realizado a partir da partição líquido-líquido dos extratos EB1151 e EB1152, conforme fluxograma a baixo.

Figura 1- Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico realizado com os extratos orgânico EB1151 e aquoso EB1152, obtidos dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*.



Dez gramas de EB1151 e sete gramas de EB1152 foram pesados e uma partição líquido-líquido em uma coluna de vidro foi realizada para cada um dos extratos, como descrito anteriormente (ESTORK et al., 2014) e será descrito brevemente. EB1151 foi particionado com clorofórmio (CHCl_3), butanol (BuOH) e água (H_2O), resultando em frações clorofórmio (F1CHCl_3), butanol (F1BuOH) e aquoso ($\text{F1H}_2\text{O}$), que foram obtidos da água remanescente, após a evaporação dos solventes (figura 1). O EB1152 foi particionado com os mesmos solventes, resultando nas mesmas frações, denominadas F2CHCl_3 , F2BuOH e $\text{F2H}_2\text{O}$. (Figura 1).

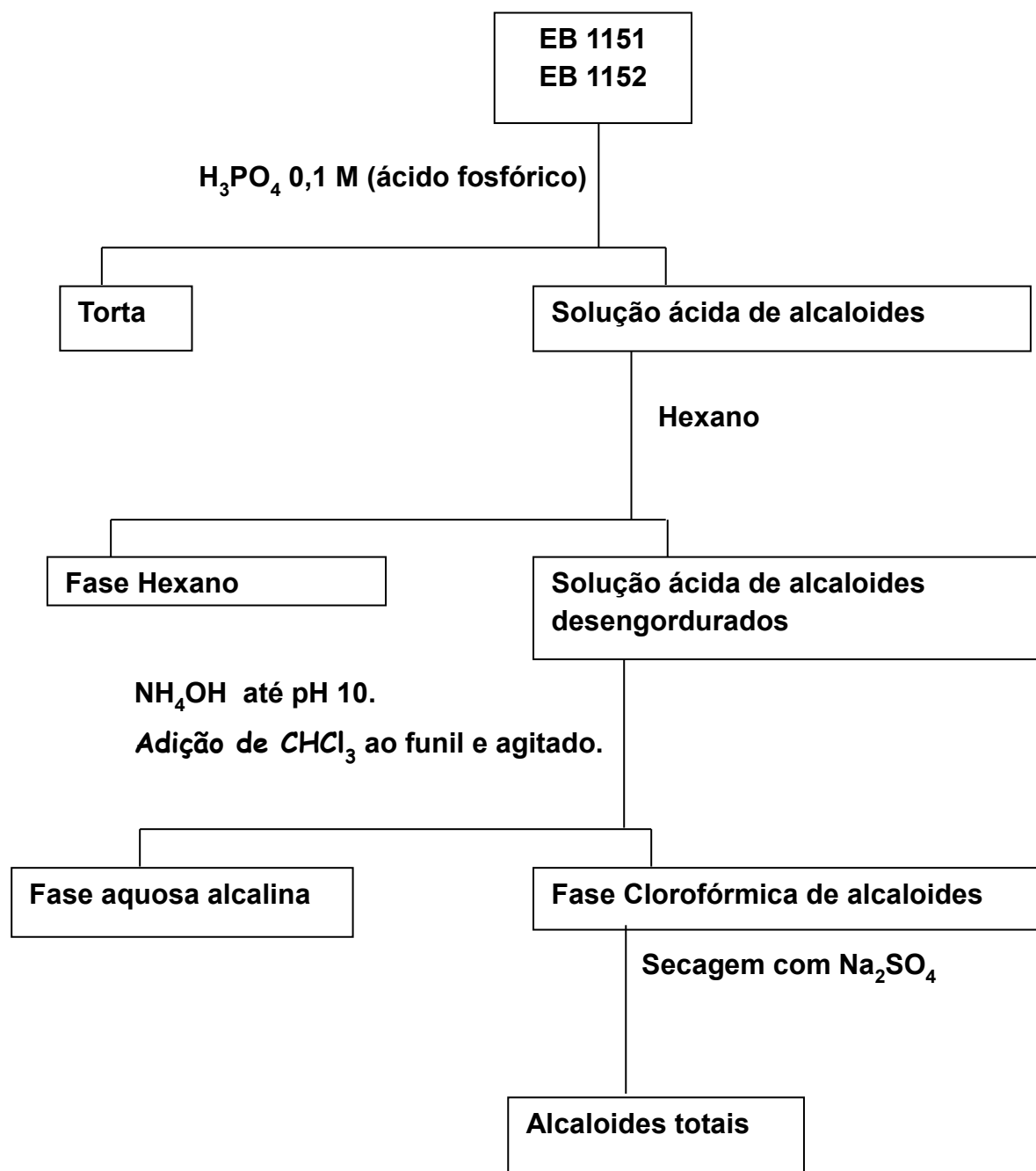
Tanto a F1CHCl_3 quanto a F2CHCl_3 foram fracionadas em coluna cromatográfica preparada com Sephadex LH-20. Cada uma das duas frações foram solubilizadas em hexano (Hex), que também foi o solvente utilizado na primeira eluição (200 mL), resultando nas frações F1Hex e F2Hex , respectivamente. Em seguida, 200 mL de diclorometano (DCM) foram utilizados como o segundo solvente na eluição, resultando nas frações F1DCM e F2DCM , respectivamente. O metanol (MeOH , 150 mL) foi o terceiro solvente a ser usado na eluição, o que resultou nas frações F1MeOH e F2MeOH , respectivamente. A fração de hexano (F1Hex) foi fracionada em coluna aberta com fase estacionária sílica-gel e como fase móvel hexano resultando em 41 frações. Fração diclorometano (F1DCM) foi submetida à cromatografia em coluna em sílica-gel, resultando em 45 frações.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCD), para serem avaliadas quanto às semelhanças entre si. Frações de F1Hex que se mostraram semelhantes foram reunidas, resultando nas frações denominadas UNIP324, UNIP328, UNIP335 e UNIP336. As frações obtidas de F1DCM , que se mostraram semelhantes pela análise por CCD foram reunidas e resultaram nas frações UNIP343 e UNIP344. As frações UNIP foram enviadas para serem analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($\text{RMN } ^1\text{H}$) e de carbono ($\text{RMN } ^{13}\text{C}$) (500 MHz e 125 MHz NMR, Bruker, CDCl_3).

3.3 Isolamento de alcaloides totais

Para separação dos alcaloides totais foi utilizado um grama de cada extrato bruto, EB1151 e EB1152 conforme fluxograma de extração representado na figura 2. Foram adicionados duas alíquotas de 20 mL e 40 mL de ácido fosfórico 1% (H_3PO_4) ao extrato bruto, sendo filtrado na sequência, originando à torta e à solução ácida de alcaloides. O filtrado foi levado ao funil de separação e lavado com hexano para retirada de compostos de baixa polaridade. Esse processo gerou duas fases: a fase hexânica (retirada do funil) e a fase ácida de alcaloides “desengordurados”. A fase ácida foi alcalinizada até pH 10 com hidróxido de amônio (NH_4OH). Clorofórmio (CHCl_3) foi adicionado ao funil de separação que foi agitado. A fase aquosa alcalina foi filtrada e levada para o liofilizador, a fase clorofórmica foi retirada do funil de separação e levada para a finalização de secagem pela adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e à capela de exaustão para completa evaporação do solvente. Ambas as fases, clorofórmio e aquosa alcalina, foram analisadas quanto à presença de alcaloides pelo uso do reagente de Dragendorff.

Figura 2- Fluxograma relativo à extração de alcaloides totais feitas a partir dos extratos EB1151 e EB1152, obtidos dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*.



3.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

3.4.1 Técnica de cultura celular

Linhagens celulares tumorais (adenocarcinoma de mama MCF-7 e carcinoma de próstata PC-3) foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos (Coastar), suplementadas com RPMI-1640 mais 5% de soro bovino fetal (ambos Cambras) e 1% de glutamina (Sigma), mantidos em incubadora (Forma) a 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. As linhagens celulares aderentes foram passadas semanalmente (Trypsina-EDTA, Cambras). A contagem das células foi feita com hemocítômetro, utilizando o método de exclusão do azul de tripano. Com os valores obtidos, as densidades celulares foram ajustadas para o experimento, segundo os valores que seguem MCF-7 (10.000) e PC-3 (7.500) (MONKS et al., 1991). As células foram incubadas por 24 h antes da adição do fármaco / extrato, e o fármaco / extrato permanece em contato com as células por 48 h, no ensaio de microcultura. Depois disso, os resultados são obtidos pelo ensaio SRB.

A doxorrubicina (DOXO) e a curcumina foram usadas como drogas de referência padrão no ensaio. A concentração mais alta de DOXO e curcumina no teste foi de $2,5 \times 10^{-5}$ M e de 100 µg/mL para os extratos vegetais. Cinco diluições logarítmicas foram feitas. Para se obter a concentração inibitória 50% (IC₅₀) para as drogas de referência e para os extratos.

3.4.2 Ensaio SRB

As células viáveis foram fixadas às microplacas de 96 poços com soluções de ácido tricloroacético (TCA) a frio (50 µL / poço de 50% de TCA para células aderentes e 80% de TCA para células não aderentes). As microplacas foram lavadas com água cinco vezes até completar a remoção de células não viáveis. 100 µL de sulforrodamina B a 0,4% em ácido acético foram adicionados a cada poço e mantidos em contato com as células durante 10 minutos. Depois, a sulforrodamina B não ligada (SRB liga-se a proteínas de células viáveis) foi removida da placa por lavagem de

quatro vezes com solução de ácido acético 0,1%. O corante remanescente foi então ressuspensionado com a adição de 100 µl de tampão Trisma. A variação na quantidade de proteínas remanescentes ligadas ao corante foi medida pela obtenção das densidades ópticas dos poços num leitor de espectrofotômetro a 515 nm (SKEHAN et al., 1990).

3.5 Animais utilizados no experimento farmacológico

No experimento foram utilizados vinte e um camundongos Balb-C machos pesando entre 25-30 g. Após a chegada ao laboratório, os animais foram alojados em grupos de cinco em gaiolas de polipropileno (38x32x16cm) com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$), umidade (65-70%), iluminação artificial (12h claro / 12h ciclo escuro, luzes acesas às 8:00 da manhã), livre acesso à ração para roedores Nuvilab® (Empresa Nuvital, São Paulo, Brasil) e água filtrada.

Os experimentos começaram uma semana depois que os animais chegaram ao laboratório e estavam habituados às novas condições. Todos os experimentos realizados com camundongos foram submetidos ao Comitê de Ética e pesquisa da universidade (CEP / ICS / UNIP 025/08 e CaPPesq 1109/090).

3.6 Preparação do extrato vegetal e composto de referência para os ensaios *in vivo*

O extrato bruto (EB1151) foi suspenso em óleo de amêndoa e as doses utilizadas foram de 2,500, 1,250, 625,0, 312,5, 156,3, 78,1 e 39,1 mg/kg. Foram administradas por via intraperitoneal. O óleo de amêndoa foi usado na preparação do extrato por causa de sua origem não polar e pela ausência de toxicidade, o que o torna totalmente compatível com organismos de mamíferos. A via intraperitoneal foi escolhida devido à ausência de perda de biodisponibilidade.

Diazepam foi utilizado como composto de referência. Diazepam é um fármaco do grupo das benzodiazepinas que produz um efeito ansiolítico, que pode ser utilizado

nos casos de estresse agudo, entre outros empregos não relacionados ao presente experimento. Para este ensaio, foi utilizada dose de 1 mg/kg (Hipolabor; lote n°AO011/11; concentração: 5,0 mg/mL; medicamento injetável), administrada intraperitonealmente (IP), assim como o EB1151.

3.7 Alterações fenotípicas comportamentais

O fenótipo comportamental (FC) foi avaliado com base em BRITO (1994), com modificações (ESTORK et al., 2016 e 2014; GUSMÃO et al., 2013a e 2013b).

Os parâmetros avaliados estavam relacionados à atividade geral, ao sistema sensorial como a presença de tremor vocal, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, aperto da cauda, resposta ao toque. No sistema psicomotor com contorção, queda do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal e reflexo de agarrar. No sistema nervoso central com convulsões, ataxia, anestesia, hipnose, *straub tail*, tremor, estimulação e sedação e no sistema nervoso autônomo lacrimação, respiração, ptose, piloereção, micção, defecação, hipotermia e cianose.

Os parâmetros foram avaliados por determinação de escores que variavam de 0 a 4, dada para cada parâmetro, exceto para micção e defecação, cujos números foram contados. As descrições dos significados dos escores para cada um dos parâmetros estão nas tabelas 3, 4 e 5, apresentadas anteriormente.

3.8 Avaliação em aparelho de campo aberto

O teste de campo aberto (CA) foi realizado após a observação de cada animal em gaiola moradia. Cada animal permaneceu por cinco minutos no aparelho, após ter sido colocado no centro da caixa. Os 27 parâmetros foram medidos ao longo de cinco sessões em diferentes tempos tendo o início entre 7-10 minutos, 25-30, 55-60, 115-120 e 175-180 minutos após a administração do extrato. O teste foi utilizado como ferramenta para avaliar a influência do extrato bruto (EB1151) sobre a locomoção e a ansiedade do animal (ESTORK et al., 2016 e 2014; GUSMÃO et al., 2013a e 2013b).

Os cinco parâmetros avaliados foram frequência de locomoção, imobilidade, frequência de levantar, *grooming* e bolos fecais. Para a frequência de locomoção, o número de quadrados cruzados com as quatro patas pelo animal foi medido. Para a frequência de levantar (posição em pé nos membros posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, cabeça inclinada para cima e os membros anteriores tocando ou não as paredes da caixa com suas patas dianteiras no ar) foi contado o número de vezes que o animal realizou essa atividade. Para a imobilidade, foi medido o tempo que o animal permaneceu imóvel, incluindo a ausência de movimentos das vibrissas. Foi também medido o tempo de *grooming* (movimentos de limpeza sobre a cabeça, orelhas, lambendo as patas e a barriga, que incluem a limpeza da cauda e dos genitais) (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2018). Entre um animal e outro a caixa era limpa com uma solução de álcool / água a 5%.

3.9 Delineamento experimental

A avaliação das alterações do fenótipo comportamental e variações na locomoção e ansiedade foi feita utilizando um número limitado de animais em um experimento em dois estágios, conforme descrito anteriormente (ESTORK et al., 2016 e 2014; GUSMÃO et al., 2013a e 2013b).

No primeiro estágio, três animais receberam a dose inicial (limite) de 2,500 mg/kg e foram observados em gaiola moradia por 3 minutos, seguida de observações em campo aberto por 5 minutos, após administração do tratamento ou até a morte.

As observações foram realizadas em gaiola moradia seguidas análise em aparelho de campo aberto em 7-10, 25-30, 55-60, 115-120 e 175-180 minutos após a administração do EB1151, conforme diagrama apresentado na figura 3. Os animais que sobreviveram foram observados a cada 24 horas nos 14 dias subsequentes. Se observada a morte de pelo menos um entre três animais, o teste foi repetido com dose reduzida em 50%. Desse modo, as doses utilizadas foram de 2,500, 1,250, 625,0, 312,5, 156,3, 78,1, 39,1 mg/kg.

A dose não letal (DNL) foi usada para testar um grupo maior de animais (n=10; ntotal=40) no segundo estágio dos testes, quando um grupo de camundongos

naïve foi introduzido com o objetivo de controlar a possível influência da injeção intraperitoneal e um grupo controle que recebeu 1 mg/kg de diazepam (Hipolabor; lote nº.AO011 / 11; validade: 10/13; frasco com: 5,0 mg/mL; medicação injetável), por via intraperitoneal. Com base em questões fisiológicas, os ensaios começaram às 08h00 e terminou antes das 12:00 horas, a fim de evitar as influências circadianas.

Figura 3- Delineamento experimental realizado no experimento comportamental no primeiro e no segundo realizado com observações em gaiola moradia (GM) e em aparelho de campo aberto (CA), após administração do EB1151.

Delineamento experimental para estudos comportamentais de camundongos tratados com EB1151



3.10 Análise estatística

A maioria dos parâmetros observados na prospecção geral da atividade em gaiola moradia baseou-se em escores de 0 a 4. Para esses dados, foi realizada análise de variância de Kruskal-Wallis seguida por teste posterior de Dunn (ZAR, 1999). ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni foi aplicada na avaliação dos parâmetros do experimento no aparelho de campo aberto. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de $\alpha = 0,05$. Os procedimentos estatísticos foram conduzidos pelo software Prism 5.0® (GraphPad Software, 2010).

4.0 ARTIGO SUBMETIDO (Periódico: Pharmacognosy Magazine (B1))

***Picrolemma sprucei* inibe o crescimento das células da mama e da próstata e prejudica o fenótipo comportamental em camundongos.**

Sinária Rejany Nogaia de Sousa¹, Ingrid Elida Collantes Díaz², Sérgio Alexandre Frana³, Maria Martha Bernardi¹, Ivana Barbosa Suffredini^{1,4,*}

¹Programa de graduação em Veterinária, Pós-Graduação e Pesquisa, Vice-Reitor da Universidade Paulista, São Paulo, Brasil

²Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Peru.

³Centro de Pesquisa em Biodiversidade, Laboratório de Botânica e Herbário da UNIP, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil.

⁴Centro de Pesquisa em Biodiversidade, Laboratório de Extração, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil.

* Centro de Pesquisa em Biodiversidade, Laboratório de Extração, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil, Av. Paulista, 900 – Bela vista - São Paulo – SP, CEP 01310-100 - Tel.: (11) 3170-3776 - Fax: (11) 3170-3978, ibsuffredini@yahoo.com.br*

RESUMO

Picrolemma sprucei Hook. (Simaroubaceae), conhecida popularmente como caferana, é uma planta tradicional da Amazônia brasileira usada por nativos da região contra malária, parasitas intestinais e aborto. Embora seu uso seja popular em alguns países sul-americanos, há uma falta de informação relacionada à sua atividade contra células de tumores de mama e de próstata e à sua influência sobre o fenótipo comportamental. Os extratos EB1151 (orgânico) e EB1152 (aquoso), obtidos do caule de *P. sprucei*, foram quimicamente estudados quanto à presença de quassinoides e alcaloides através de técnicas cromatográficas e de partição e suas frações foram avaliadas quanto à ação citotóxica no modelo da sulforrodamina B, e obtidos os valores de concentração inibitória 50% (IC₅₀). A influência da administração intraperitoneal de EB1151 sobre o fenótipo comportamental de camundongos machos Balb-c foi verificada em gaiola moradia e aparelho de campo aberto (CA) com observação direta de 27 parâmetros para atividade geral e cinco parâmetros para CA, com doses variando de 2,500 mg/kg a 39,1 mg/kg no primeiro estágio, em que foram obtidas a dose não letal (DNL). A DNL foi usada no segundo estágio, em maior número de animais. EB1151 e EB1152 foram fracionados e as frações F1CHCl₃ e F2CHCl₃, e as frações derivadas de F1CHCl₃, denominadas UNIP343 e UNIP344, apresentaram IC₅₀ expressivos. Da fração UNIP343, foram identificados os quassinoides sergeolídeo e 15-desacetilsergeolídeo, enquanto na fração UNIP344 foram identificados isobruceína B e sergeolídeo, substâncias responsáveis pela atividade citotóxica contra células de mama e de próstata observadas para *P. sprucei*. Foram também identificados estigmasterol, sitosterol, (14S,17S,20S)-14,17,20-trihidroxi-24-malabaricen-3-ona, (17R,20R,24R)-17,20,24,25-tetrahidroxi-14(18)-malabaricen-3-ona, e o alcaloide catin-6-ona. EB1151 apresentou DNL de 39,1 mg/kg. No primeiro estágio foram observados queda na resposta ao toque, no trem posterior, nos reflexos auricular e corneal e aumento de irritabilidade, ataxia, micção, piloereção, cianose e hipotermia. No segundo estágio, com a administração da DNL, houve uma queda na atividade geral dos animais, e na resposta ao toque. Os outros parâmetros não foram alterados. Esses dados mostram que, se usado em doses mais baixas, EB1151 é relativamente seguro para ser avaliado em experimentos farmacológicos. Essas informações se confirmam nas observações da avaliação em CA, no primeiro estágio, em que se verifica somente nas doses maiores a diminuição da locomoção, mas é

recuperada no decorrer do tempo de avaliação. Tanto a defecação quanto o *grooming* estão alterados no primeiro estágio, porém, todas as alterações não se confirmaram no segundo estágio, quando a DNL foi administrada. O potencial citotóxico de compostos identificados em *P. sprucei* foi significativo para células de tumor de mama e de próstata, e a influência sobre o fenótipo comportamental mostrou que a administração de EB1151 é segura, e suporta futuros experimentos farmacológicos em animais de laboratório.

Palavras-chave: alcaloides; comportamento; citotoxicidade; fenótipo; campo aberto; floresta amazônica.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os cânceres de mama e próstata são os mais prevalentes em mulheres e homens, respectivamente, se não for considerado o câncer de pele não melanoma. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2018 serão diagnosticados 59.700 e 68.220 novos casos de câncer de mama e de próstata respectivamente. ^[1] Por isso há a necessidade de se introduzir novos compostos no tratamento desses tumores.

A flora brasileira, a mais diversificada do mundo, é um local interessante para a prospecção de novos fármacos devido à sua diversidade em espécies e riqueza química associadas. Programas de triagem foram estabelecidos no Brasil ^[2] como uma estratégia para identificar substâncias potencialmente ativas. ^[3,4,5] A partir de modelos de triagem aplicados anteriormente, o extrato obtido dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (sinônimo *P. pseudocoffea* Ducke), uma planta pertencente à Simaroubaceae (aqui denominada EB1151) e encontrada na floresta amazônica, mostrou atividade antitumoral em ensaios *in vitro* contra linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço ^[6] e contra a linhagem celular de leucemia RPMI-8226, contra a qual mostrou inibição do crescimento de 37,56%. ^[7]

Embora relatos anteriores demonstrem atividades farmacológicas e biológicas importantes contra células tumorais, estudos sobre sua citotoxicidade contra linhagens celulares MCF-7 e PC-3 não foram realizados, bem como sobre sua

influência sobre o fenótipo comportamental. *P. sprucei* é popularmente conhecida pelos nativos da região Amazônica como “caferana”, no Brasil, é tradicionalmente usada contra gastrite, febrífugo, anti-helmíntico e antimalárico. ^[8] Além disso, ^[9] relatam que o “sacha café”, como é conhecido no Peru, também é usado para as mesmas condições.

No presente trabalho, a citotoxicidade dos extratos EB1151 e 1152 e frações purificadas de EB1151 foi avaliada, assim como a influência do EB1151 sobre o fenótipo comportamental.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de plantas e preparação de extratos

A planta foi coletada na floresta amazônica brasileira, sob licença do IBAMA / CGen / MMA (12-A / 2008). A espécie foi coletada no entorno da cidade de Manaus, estado do Amazonas, em uma floresta sazonalmente inundada da Bacia do Rio Negro (denominada de floresta de igapó). O voucher está depositado no Herbário da UNIP [A.A.Oliveira, 3582 (UNIP)]. Órgãos aéreos de *P. sprucei* foram coletados para obter o extrato bruto usado nos ensaios realizados, e sua preparação está descrita em outro artigo. ^[10, 11] Resumidamente, 202,0 g das partes aéreas da planta foram trituradas em um moinho de martelos (Holmes) e o pó foi macerado com diclorometano e metanol (1: 1) por 24h. O macerado foi drenado e os solventes removidos por evaporação rotativa (Buchi). Uma segunda maceração de 24 horas foi realizada com água Milli-q e depois a água foi liofilizada. Os extratos orgânico e aquoso foram denominados EB1151 e EB1152, respectivamente. Ambos os extratos foram submetidos a ensaios de fracionamento e citotóxicos. A identificação dos compostos e a influência sobre o comportamento foram realizadas apenas para o EB1151.

Estudos fitoquímicos

Dez gramas de EB 1151 e sete gramas de EB1152 foram pesados. Partição líquido-líquido em coluna de vidro foi realizada para cada um dos extratos, como descrito anteriormente. ^[12] EB1151 foi particionado com clorofórmio e butanol, resultando em frações clorofórmio (F1CHCl₃) e butanol (F1BuOH). A fração aquosa (F1H₂O), foi obtida da água remanescente, após a evaporação do solvente. EB1152

foi particionado com os mesmos solventes, resultando nas frações denominadas F2CHCl₃, F2BuOH e F2H₂O.

Tanto a F1CHCl₃ quanto a F2CHCl₃ foram fracionadas em coluna cromatográfica recheada com Sephadex LH-20. As frações foram inicialmente solubilizadas em hexano, que foi o primeiro solvente utilizado na eluição (200 mL), o que resultou nas frações F1Hex e F2Hex, respectivamente. Em seguida, 200 mL de diclorometano foi usado como o segundo solvente na eluição, o que resultou nas frações F1DCM e F2DCM, respectivamente. Metanol (150 mL) foi o terceiro solvente a ser utilizado na eluição, o que resultou nas frações F1MeOH e F2MeOH, respectivamente.

A fração F1Hex foi cromatografada em coluna em sílica gel, resultando em 41 frações. A fração F1DCM foi cromatografada em coluna em sílica gel, resultando em 45 frações. Todas as frações resultantes foram cromatografadas em camada delgada analítica de modo a comparar semelhanças entre elas. Frações semelhantes do F1Hex foram reunidas, resultando em frações denominadas UNIP324, UNIP328, UNIP335 e UNIP336, e frações semelhantes obtidas do F1DCM foram reunidas e resultaram nas frações UNIP343 e UNIP344. As frações UNIP foram enviadas para serem analisadas por ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C (500 MHz e 125 MHz NMR, Bruker, CDCl₃).

Isolamento de alcaloides totais

Para separação dos alcaloides totais foi utilizado um grama de cada extrato bruto, EB1151 e EB1152. Foram adicionadas duas alíquotas de 20 mL e 40 mL de ácido fosfórico 1% (H₃PO₄) ao extrato bruto, e na sequência foi filtrado, dando origem à torta e à solução ácida de alcaloides. O filtrado foi levado ao funil de separação e lavado com hexano para retirada de compostos de baixa polaridade, e o processo gerou duas fases: a fase hexânica (retirada do funil) e a fase ácida de alcaloides “desengordurados”. A fase ácida foi alcalinizada até pH 10 com hidróxido de amônio (NH₄OH). Clorofórmio (CHCl₃) foi adicionado ao funil de separação, que foi agitado. A fase aquosa alcalina foi filtrada e levada para o liofilizador, enquanto a fase clorofórmica foi retirada do funil de separação e levada para a exposição de secagem pela adição de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e à capela de exaustão para completa

evaporação do solvente. Ambas as fases clorofórmio e aquosa alcalina foram analisadas quanto à presença de alcaloides pelo uso do reagente de Dragendorff.

Técnica de cultura celular

Linhagens celulares tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma de próstata (PC-3) foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos (Coastar), com meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (ambos Cambras) e 1% de glutamina (Sigma). Os frascos foram mantidos em incubadora (Forma) a 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Para sua manutenção as linhagens celulares aderentes foram passadas semanalmente (Trypsin-EDTA, Cambras). ^[13]As densidades celulares foram obtidas com uma câmara de hemocítmetro, utilizando o método de exclusão do azul tripiano. As mesmas condições foram mantidas durante o ensaio e as densidades celulares por poço variaram de acordo com a linha celular, como se segue: MCF-7 (10.000) e PC-3 (7.500), transferidas para cada poço em 100 µL. As células foram incubadas por 24 h antes da adição do fármaco/extrato, e o fármaco/extrato permanece em contato com as células por 48 h, no ensaio de microcultura. Os resultados são obtidos pelo ensaio da sulforrodamina B (SRB).

A doxorubicina (DOXO) foi usada como droga padrão no ensaio. A concentração mais alta de DOXO no teste foi de $2,5 \times 10^{-5}$ M. Cinco diluições logarítmicas foram feitas, e as curvas de concentração x resposta mostraram a tendência citotóxica observada para cada extrato. Foram calculados valores de inibição de crescimento 50%, a partir da obtenção da regressão não linear.

Ensaio da sulforrodamina B

As células viáveis foram fixadas às microplacas de 96 poços com solução de ácido tricloroacético 80% a frio (TCA; 50 µL/poço). As microplacas foram lavadas com água cinco vezes até completar a remoção de células não viáveis. Então, 100 µL de sulforrodamina B 0,4% em ácido acético foram adicionados a cada poço e foram mantidos em contato com as células durante 10 minutos. Depois disso, a sulforrodamina B não ligada (SRB se liga a proteínas de células viáveis) foi removida da placa por lavagem de quatro vezes com solução de ácido acético 0,1%. O corante

restante foi suspenso novamente com a adição de 100µl de tampão Trisma. A variação na quantidade de proteínas remanescentes ligadas ao corante foi medida pela obtenção das densidades ópticas dos poços em um leitor de microplacas a 515 nm^[14]. A porcentagem de letalidade foi obtida, assim como a concentração de inibição de 50% (IC50), para os extratos brutos e frações.

Ensaio comportamentais

Animais

Foram utilizados camundongos Balb-C machos pesando 25-30 g. Após a chegada ao laboratório, os animais foram alojados em grupos de cinco em gaiolas de polipropileno (38x32x16cm), com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$), umidade (65-70%) e iluminação artificial (12h claro / 12h ciclo escuro, luzes acesas às 8:00 da manhã) e livre acesso à ração para roedores Nuvilab® (Empresa Nuvital, São Paulo, Brasil) e água filtrada. Os experimentos começaram após uma semana de adaptação dos camundongos às novas condições laboratoriais. Todos os experimentos realizados foram submetidos ao Comitê de Ética (CEP / ICS / UNIP 025/08 e CaPPesq 1109/090).

Preparação de extrato vegetal e substância controle

O EB1151 foi suspenso em óleo de amêndoa e as doses utilizadas foram de 2,500, 1,250, 625,0, 312,5, 156,3, 78,1 e 39,1 mg/kg, administradas por via intraperitoneal. O óleo de amêndoa foi usado na preparação do extrato por causa de sua origem não polar e por ausência de toxicidade, o que o torna totalmente compatível com organismos de mamíferos. A via intraperitoneal foi escolhida devido à ausência de perda de biodisponibilidade.

Alterações fenotípicas comportamentais

O fenótipo comportamental (FC) foi avaliado^[15], com modificações.^[16, 12, 17, 18] Parâmetros relacionados à atividade geral, ao sistema sensorial como: tremor vocal, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, aperto da cauda, resposta ao toque, ao sistema psicomotor como: contorção, queda do trem traseiro, endireitamento, tônus corporal e reflexo de agarrar, ao sistema nervoso central como:

convulsões, ataxia, anestesia, hipnose, *straub tail*, tremor, estimulação e sedação e ao sistema nervoso autônomo como: lacrimejamento, respiração, ptose, piloereção, micção, defecação, hipotermia e cianose foram observados. Os parâmetros foram avaliados por determinação de escores que variaram de 0 a 4, dada para cada parâmetro, exceto para micção e defecação, cujos números foram contados.

Avaliação em aparelho de campo aberto

O aparelho de campo aberto (CA) foi utilizado como ferramenta para avaliar a influência do EB1151 sobre locomoção e ansiedade, sendo realizado imediatamente após observações em gaiola moradia, como descrito anteriormente [16, 12, 17, 18].

Delinemento experimental

A avaliação das alterações causadas na locomoção e ansiedade foi feita utilizando um número limitado de animais ($n=3$, $n_{total}=21$), em um experimento de dois estágios, como descrito anteriormente. [16,12,17,18] Diferentes doses de extrato foram administradas, a partir da dose limite de 2,500 mg/kg (OECD), e subsequentes doses de 50% da dose inicial de EB1151, caso tivesse ocorrido morte em pelo menos um entre três camundongos. Observações em gaiola moradia foram feitas nos tempos 7-10, 25-30, 55-60, 115-120 e 175-180 minutos após a administração ou até a morte, seguidas de avaliação em campo aberto nos tempos 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185 minutos. Os animais que sobreviveram foram observados a cada 24 horas, nos 14 dias subsequentes. A tendência de dose não letal (DNL) foi obtida no primeiro estágio do experimento. A DNL foi usada no segundo estágio do experimento para testar um grande grupo de animais ($n=10$; $n_{total}=40$). Nessa fase, um grupo de camundongos *naive* foi introduzido com o objetivo de controlar a possível influência da injeção intraperitoneal e um grupo que recebeu 1 mg/kg de diazepam (Hipolabor; lote nº.AO011 / 11; validade: 10/13; frasco com: 5,0 mg/mL; medicação injetável) foi introduzido como grupo de avaliação de droga de referência. Com base em questões fisiológicas, os ensaios começaram às 08h00 e terminaram antes das 12h00 horas, a fim de evitar as influências circadianas.

Análise estatística

A maioria dos parâmetros observados na prospecção geral da atividade baseou-se em escores de 0 a 4. A análise de variância por ranques de Kruskal-Wallis seguida por teste posterior de Dunn ^[19] foi aplicada. ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni foi aplicada na avaliação de parâmetros de campo aberto. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de $\alpha = 0,05$. Os procedimentos estatísticos foram conduzidos pelo software Prism 5.0® (GraphPad Software, 2010).

RESULTADOS

Os compostos que foram identificados nas frações reunidas do EB1151 são mostrados na figura 4. O sitosterol (1) e o estigmasterol (2) foram identificados na fração UNIP324. O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 apresenta alguns sinais com características de esteróides, tais como um duplo-duplo-duplo-dublete em δ 3,53 ($J = 9,5, 4,8, 11,2$ e $4,6$ Hz), atribuído ao H-3, e um singlete largo em δ 5,36 que indica a presença de um hidrogênio olefínico (H-6), também apresenta os duplo-dubletos em δ 5.16 e 5.02 do estigmasterol (H-23 e H-22). Os deslocamentos químicos podem ser vistos na tabela 6, em que a comparação com a literatura foi feita.^[20] Compostos (14S, 17S, 20S) -14,17,20-tri-hidroxi-24-malabaricen-3-ona (3) e (17R, 20R, 24R) -17,20,24,25-tetra-hidroxi-14 (18)-malabaricen-3-ona (4) foram identificados a partir da fração UNIP328. Os deslocamentos químicos foram obtidos: O espectro de RMN ^1H apresenta singletos na região δ 0.96 – 1.25 e na região δ 1.6 – 1.74 correspondendo às metilas. Nas estruturas a sinal do hidrogênio H17, H18 e H21 na região de δ 3.30 – 3.50, a identificação das estruturas foi realizada por comparação dos sinais dos espectros de hidrogênio e carbono com a literatura correspondente ^[21]. Os deslocamentos químicos para ^{13}C estão descritos na tabela 6. ^[21] A catin-6-ona foi identificada na fração UNIP335. A tabela 6 mostra os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C , CDCl_3 para a catin-6-ona (5), em comparação com a literatura. ^[22] A mesma molécula (5) foi identificada na fração UNIP336. Sergeolídeo (6) e 15-desacetilsergeolídeo (7) foram identificados na fração UNIP343, e a tabela 6 descreve os deslocamentos químicos obtidos para o UNIP343 e sua comparação com a literatura. ^[23, 24] Isobruceína B (8) e sergeolídeo (6) foram identificados na fração UNIP344, e a tabela 6 descreve os deslocamentos químicos para RMN ^{13}C , CDCl_3 e sua comparação com a literatura. ^[23]

Figura 4. Moléculas identificadas das frações reunidas, obtidas do extrato EB1151, extraídas de órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*. Sitosterol (1), estigmasterol (2), (14*S*,17*S*,20*S*)-14,17,20-trihidroxi-24-malabaricen-3-ona (3), (17*R*,20*R*,24*R*)-17,20,24,25-tetrahidroxi-14(18)-malabaricen-3-ona (4), cathin-6-ona (5), sergeolídeo (6), 15-desacetilsergeolídeo (7) e isobruceína B (8).

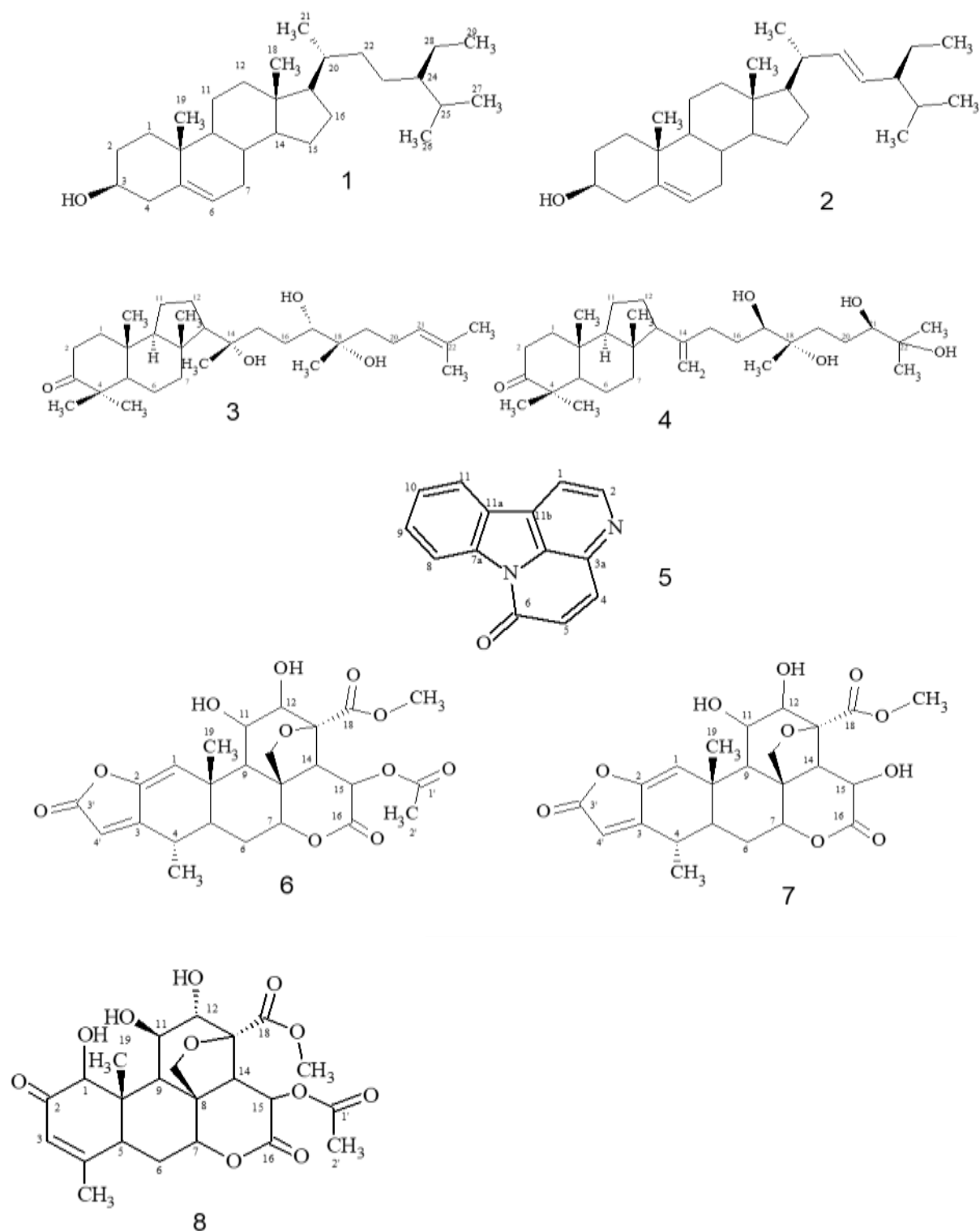


Tabela 6. Deslocamentos que foram identificados de moléculas presentes nas frações purificadas, após o fracionamento do EB1151, extrato obtido das partes aéreas de *Picrolemma sprucei*.

¹³ C-NMR (CDCl ₃)			¹³ C-NMR (CDCl ₃)		Nº	¹³ C-NMR (CD ₃ OD)		¹³ C-NMR (CDCl ₃)			¹ H-NMR CDCl ₃	¹ H-NMR CDCl ₃		¹ H-NMR CDCl ₃	¹ H-NMR CDCl ₃	¹³ C-NMR	¹³ C-NMR		¹³ C-NMR (CDCl ₃ – 5%pyridine- <i>d</i> ₅)	¹³ C-NMR (CDCl ₃)	¹ H-NMR (CDCl ₃)	¹ H-NMR (CDCl ₃)		¹³ C-NMR (CDCl ₃ – 5%pyridine- <i>d</i> ₅)		¹³ C-NMR (CDCl ₃)			
N	Sitosterol	estigmasterol	UNIP324			(14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-14,17,20-trihidroxi4-malabaricen-3-ona	(17 <i>R</i> ,20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-17,20,24,25-tetrahidroxi-14(18)-malabaricen-3-ona	UNIP328		N	Cathin-6-ona	UNIP335	Nº	Cathin-6-ona	UNIP-336	Cathin-6-ona	UNIP-336	N	Sergeolideo	UNIP-343	15-desacetilsergeolideo	UNIP-343	N	isobruceína B	sergeolideo	UNIP344			
1	37.3	37.3	37.23	37.23	1	39.34	38.95	38.54	38.54	1	7.59 d J=5.0	7.99 d J=5.19	1	7.59 d J=5.0	7.93 d J=5.19	115.37	116.42	1	113.2	113.21	6.23 s	6.24 s	1	81.3	113.2	80.54	113.21		
2	31.6	31.6	31.63	31.63	2	33.71	33.72	33.83	33.21	2	8.58 d J=5.0	8.85 d J=5.19	2	8.58 d J=5.0	8.76 d J=5.19	144.84	145.62	2	160.8	160.51	-	-	2	197.6	160.8	197.01	160.51		
3	71.8	71.8	71.78	71.78	3	218.97	218.00	217.87	217.79	4	7.77 d J=9.7	8.06 d J=9.76	3a	-	-	135.23	136.81	3	148.4	148.44	-	-	3	124.5	148.4	124.23	148.44		
4	42.2	42.3	42.19	42.26	4	47.14	47.13	46.71	47.83	5	6.75 d J=9.7	7.01 d J=9.66	4	7.77 d J=9.7	8.01 d J=9.76	138.57	139.38	4	30.7	30.65	2.38 m	2.37 m	4	162.6	30.7	163.05	30.65		
5	140.8	140.8	140.73	140.73	5	55.02	55.35	55.46	55.61	8	8.28 d J=7.7	8.71 d J=8.24	5	6.75 d J=9.7	6.95 d J=9.76	127.98	128.86	5	38.8	38.86	1.80 ddd J=13;2;9	1.85 m	5	43.4	38.8	43.41	38.86		
6	121.7	121.7	121.69	121.69	6	20.57	20.22	19.51	19.69	9	7.45 t J=7.7	7.73 ddd J=7.32, 7.32, 1.22	6	-	-	158.21	159.49	6	28.5	28.53	1.69 ddd J=15; 2.5;2.5	1.68 m	6	28.2	28.5	28.42	28.53		
7	31.9	31.9	31.88	31.88	7	36.81	35.55	36.70	36.32	10	7.28 t J=7.7	7.55 ddd J=7.32, 7.32, 1.22	7a	-	-	138.24	139.38				2.24 ddd J=15;2;2	2.23 m	7	81.7	82.8	81.04	82.97		
8	31.9	31.9	31.88	31.88	8	44.18	44.81	44.61	44.72	11	7.73 d J=7.7	8.14 d J=8.24	8	8.28 d J=7.7	8.62 d J=8.29	116.29	117.20	7	82.8	82.97	4.63 s	4.65 s	8	45.8	46.4	45.55	46.35		
9	51.2	51.2	51.22	51.22	9	59.79	54.31	60.83	54.39					9	7.45 t J=7.7	7.68 ddd J=7.32, 7.32, 1.22	129.84	129.49	8	46.4	46.35	-	-	9	42.4	44.7	42.58	44.66	
10	36.5	36.5	36.49	36.49	10	36.46	36.02	36.16	36.74					10	7.28 t J=7.7	7.49 ddd J=7.62, 7.62, 0.95	124.69	124.93	9	44.7	44.66	2.28 d J=5	2.28 m	10	47.7	41.6	47.48	41	
11	21.1	21.1	21.04	21.04	11	21.09	20.13	20.95	20.95					11	7.73 d J=7.7	8.07 d J=7.63	121.61	122.68	10	41.6	41	-	-	11	74.3	72.9	73.76	72.87	
12	39.8	39.7	39.75	39.66	12	23.68	26.93	22.61	26.65					11a	-	-	123.33	124.58	11	72.9	72.87	4.54 d J=5	4.50 m	12	75.1	76	75.63	76.07	
13	42.3	42.3	42.26	42.26	13	59.79	56.71	60.83	55.46					11b	-	-	128.99	130.40	12	76	76.07	4.17 s	4.23 s	13	81.7	81.1	81.04	81.04	
14	56.8	56.9	56.74	56.84	14	75.40	155.81	74.08	155.00					11c	-	-	130.91	131.28	13	81.1	81.04	-	-	14	52.3	53.1	52.93	53.26	
15	24.3	24.4	24.28	24.35	15	39.01	36.42	39.27	36.99											14	53.1	53.26	2.81 dd J=13;2	2.89 dd J=12.5;1.5	15	67.8	66.9	66.67	66.67
16	28.3	28.4	28.23	28.89	16	25.17	30.03	25.56	29.68											15	66.9	66.67	5.16 d J=13	4.9 d J=12.85	16	167.6	167.1	166.95	166.80
17	56	56.1	55.93	55.93	17	78.25	77.52	78.84	78.84											16	167.1	166.80	-	-	18	169.5	170.9	169.25	171.24
18	11.9	11	11.96	11.83	18	74.17	72.55	73.87	73.95											18	170.9	171.24	-	-	30	73.0	73.8	73.31	73.76
19	19.4	21.2	19.61	21.20	19	37.97	35.39	37.12	36.16											30	73.8	73.76	4.75 d J=8	4.77 d J=8.25	OMe	49.8	51.2	53.02	52.93
20	36.2	40.5	36.16	40.47	20	24.38	20.58	24.76	20.98											OMe	51.2	52.93	3.83	3.84	Me-4	22.4	18.0	22.51	17.98
21	18.8	21.2	18.87	21.20	21	124.70	79.03	124.59	79.41											Me-4	18.0	17.98	1.18 d J=7	1.19 d J=6.65	Me-10	11.3	19.4	11.48	19.43

Continuação tabela 6. Deslocamentos que foram identificados de moléculas presentes nas frações purificadas, após o fracionamento do EB1151, extrato obtido das partes aéreas de *Picrolemma sprucei*.

¹³ C-NMR (CDCl ₃)			¹³ C-NMR (CDCl ₃)		Nº	¹³ C-NMR (CD ₃ OD)		¹³ C-NMR (CDCl ₃)			¹ H-NMR CDCl ₃	¹ H-NMR CDCl ₃		¹ H-NMR CDCl ₃	¹ H-NMR CDCl ₃	¹³ C-NMR	¹³ C-NMR		¹³ C-NMR (CDCl ₃ – 5%pyridine- <i>d</i> ₅)	¹³ C-NMR (CDCl ₃)	¹ H-NMR (CDCl ₃)	¹ H-NMR (CDCl ₃)		¹³ C-NMR (CDCl ₃ – 5%pyridine- <i>d</i> ₅)		¹³ C-NMR (CDCl ₃)			
N	Sitosterol	estigmasterol	UNIP324			(14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-14,17,20-trihidroxi4-malabaricen-3-ona	(17 <i>R</i> ,20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-17,20,24,25-tetrahidroxi-14(18)-malabaricen-3-ona	UNIP328		N	Cathin-6-ona	UNIP335	Nº	Cathin-6-ona	UNIP-336	Cathin-6-ona	UNIP-336	N	Sergeolideo	UNIP-343	15-desacetilsergeolideo	UNIP-343	N	isobruceína B	sergeolideo	UNIP344			
22	33.9	138.3	33.93	138.29	22	130.56	74.16	127.96	73.87											Me-10	19.4	19.43	1.57 s	1.57 s	1°	170.7	169.4	170.32	169.25
23	26.1	129.3	26.04	129.25	23	21.65	24.52	20.98	24.76											1°	169.4	169.25	-		2°	20.5	20.4	20.32	20.84
24	45.9	51.2	45.80	51.22	24	14.88	13.08	14.19	13.81											2°	20.4	20.84	-		3°		171.4		171.55
25	29.2	31.9	29.12	31.88	25	20.85	25.63	20.95	25.56											3°	171.4	171.55	-		4°		161.1		160.51
26	19.8	21.2	19.79	21.2	26	24.47	24.56	24.76	25.82											4°	161.1	160.51	5.72 s	5.69 s					
27	19.3	19	19.38	19.02	27	16.33	24.08	16.62	25.32																				
28	23.1	25.4	23.04	25.39	28	20.04	20.08	19.39	20.95																				
29	12.2	12.1	12.23	12.02	29	25.70	107.90	25.82	108.66																				
					30	25.07	23.35	25.32	22.67																				

A tabela 7 demonstra os resultados obtidos a partir do ensaio citotóxico. FCHCl₃, obtido a partir de EB1151 (IC₅₀= 0,128 µg / mL e 0,388 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) e EB1152 (IC₅₀= 0,011 µg / mL e 0,029 µg / mL para mama e próstata, respectivamente), mostrou ser mais citotóxico contra as linhagens celulares de câncer de mama e de próstata. Em seguida, as frações FBuOH foram também citotóxicas contra ambas as linhas celulares (para F1BuOH IC₅₀= 3,573 µg / mL e 9,528 µg / mL para mama e próstata, respectivamente; para F2BuOH IC₅₀= 0,370 µg / mL e 2,519 µg / mL para mama e próstata, respectivamente). Ambas as frações de FH₂O foram menos ativas (para F1H₂O IC₅₀= 42,740 µg / mL e 937,800 µg / mL para mama e próstata, respectivamente; para F2H₂O IC₅₀= 28,740 µg / mL e 40,580 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) embora ainda tivessem apresentado IC₅₀ expressivas contra as células de mama e de próstata.

As frações UNIP343 (IC₅₀= 0,093 µg / mL e 0,299 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) e UNIP344 (IC₅₀= 0,031 µg / mL e 0,158 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) foram mais efetivas contra ambas as linhagens celulares de câncer, enquanto a fração UNIP324 (IC₅₀= 256,700 µg / mL e 177,100 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) não foi ativa contra as linhagens celulares. As frações UNIP328 (IC₅₀= 17,510 µg / mL e 23,570 µg / mL para mama e próstata, respectivamente), UNIP335 (IC₅₀= 33,820 µg / mL e 34,640 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) e UNIP336 (IC₅₀= 19,260 µg / mL e 21,970 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) mostraram-se relativamente ativas contra as células cancerígenas testadas.

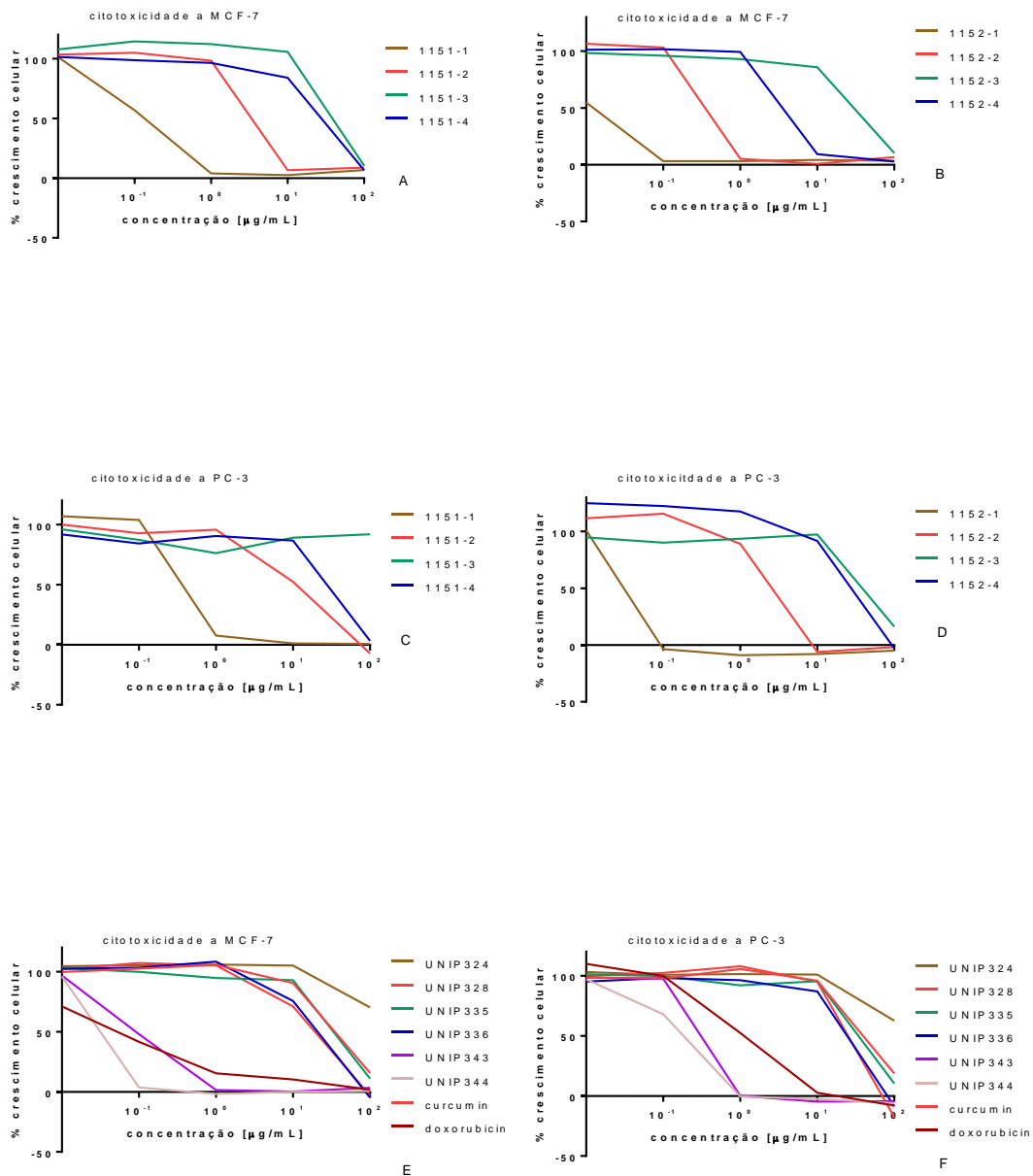
As frações contendo alcaloides responderam diferentemente, pois alcaloides do EB1152 (IC₅₀= 3,716 µg / mL e 28,080 µg / mL para mama e próstata, respectivamente) foram mais efetivos contra linhagem de câncer de mama, em relação à fração de alcaloides do EB1151 (IC₅₀= 26,130 µg / mL e 25,380 µg / mL para mama e próstata, respectivamente). Ambas as frações alcaloides, de EB1151 e EB1152, mostraram uma atividade citotóxica semelhante contra a linha celular de câncer de próstata.

Curcumina e doxorrubicina foram utilizados como substâncias de referência no ensaio de citotoxicidade. Curcumina apresentou IC₅₀ de 36,790 μ M e de 43,080 μ M para mama e próstata, respectivamente, e doxorrubicina apresentou IC₅₀ de 0,057 mM e de 1,096 mM para mama e próstata, respectivamente

Tabela 7- Resultados obtidos de ensaio citotóxico feito com linhagens de células humanas de câncer de mama (MCF-7) e próstata (PC-3) após tratamentos com FCHCl₃, FBUOH, FH₂O, alcaloide e para frações isoladas de EB1151 denominadas UNIP324, UNIP328, UNIP335, UNIP336, UNIP 343 e 344, expressa em IC₅₀, em μ g/mL e drogas de referência, curcumina e doxorrubicina, expressas em IC₅₀, em mM.

Frações	Mama (MCF-7)	Próstata (PC-3)
	IC ₅₀ [μ g/mL]	IC ₅₀ [μ g/mL]
F1CHCl ₃	0,128	0,388
F1BuOH	3,573	9,528
F1H ₂ O	42,740	937,800
1151 fração alcaloídica	26,130	25,380
F2CHCl ₃	0,011	0,029
F2BuOH	0,370	2,519
F2H ₂ O	28,740	40,580
1152 fração alcaloídica	3,716	28,080
UNIP324	256,700	177,100
UNIP328	17,510	23,570
UNIP335	33,820	34,640
UNIP336	19,260	21,970
UNIP343	0,093	0,299
UNIP344	0,031	0,158
Curcumina	36,790 μ M	43,080 μ M
Doxorrubicina	0,057 mM	1,096 mM

Figura 5. Resultados obtidos do ensaio citotóxico feito com frações e isolados dos órgãos aéreos de *Picrolemma sprucei*. **A.** Citotoxicidade para linhas celulares MCF-7 a partir de frações EB1151; **B.** Citotoxicidade para linhas celulares PC-3 das frações EB1151; **C.** Citotoxicidade para linhas celulares MCF-7 a partir de isolados EB1151; **D.** Citotoxicidade para linhas celulares PC-3 de isolados EB1151; **E.** Citotoxicidade para linhas celulares MCF-7 a partir de frações EB1152; **F.** Citotoxicidade para linhas celulares PC-3 das frações EB1152.



As alterações no fenótipo comportamental originadas da administração de diferentes doses de extrato a três camundongos de cada grupo no estágio um dos experimentos foram analisadas e os resultados são estatisticamente descritos, como segue. Os resultados relacionados com a influência da administração de EB1151 sobre FC no primeiro estágio do experimento são dados na figura 6. A administração de doses diferentes não influenciou significativamente a atividade geral ($H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 7,989; p > 0,05$). A diminuição na resposta ao toque (Fig. 6B; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 14,64; p < 0,05$) após a administração da dose de 2,500 mg/kg. Foi observada diminuição da queda do trem posterior após dosagem de 2,500 mg/kg (Fig. 6C; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 34,33; p < 0,01$). Irritabilidade apareceu (Fig. 6D; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 22,11; p < 0,01$) na dose de 1,250 mg/kg. Reflexo auricular (Fig. 6E; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 27,00; p < 0,01$) diminuiu após a administração da dose de 2,500 mg/kg. Reflexo corneal (fig. 6F; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 15,35, p < 0,05$) diminuiu na dose de 153,8 mg/kg. A Figura 7 demonstra a presença de ataxia apareceu (Fig. 7A; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 38,89; p < 0,001$) em animais que receberam dose de 1,250 mg/kg. A micção foi mais frequente na dosagem de 2,500 mg/kg (fig. 7B; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 25,30; p < 0,01$). A ptose esteve presente após a administração da dose 625,0 mg/kg (Fig. 7C; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 30,33; p < 0,01$). Foi observado piloereção após a administração de todas as doses testadas, exceto para 2,500 e 625,0 mg/kg (fig. 7D; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 27,89; p < 0,01$). Finalmente, presença de hipotermia (Fig. 7E; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 22,11; p < 0,01$) após a administração da dose de 153,8 mg/kg e a cianose aumentou (Fig. 7F; $H \sim \chi^2_{20,05}, (7) = 23,58; p < 0,01$) após a administração de doses de 153,8 e 78,1 mg/kg.

A figura 8 mostra quais parâmetros foram alterados no estágio 2 do experimento, realizados com a dose não letal. A atividade geral dos animais tratados com EB1151 foi significativamente diminuída em relação ao grupo controle e ao grupo *naïve* (Fig. 8A; $H \sim \chi^2_{20,05}, (8) = 12,97; p < 0,01$) e resposta ao toque (Fig. 8B; $H \sim \chi^2_{20,05}, (8) = 11,94, p < 0,01$).

A Tabela 8 apresenta as mudanças comportamentais relacionadas à locomoção e ansiedade, avaliadas no aparelho de campo aberto. No primeiro estágio de análise, houve diminuição da frequência de locomoção e a interação ($F (28,64) = 1,87; p < 0,05$), tratamento ($F (7,16) = 4,11; p < 0,01$) e tempo ($F (4), 64) = 8,10; p < 0,001$) representaram 19,54%, 28,50% e 12,13%, respectivamente, da variância

total. Não foram observadas diferenças entre os grupos no tempo de imobilidade, embora o tempo ($F(4,64) = 6,65$; $p < 0,001$) tenha representado 15,02% da variância total. O mesmo foi observado para a frequência de levantar ($F(4,64) = 8,32$; $p < 0,001$) representou 17,40% da variância total. Diminuição na defecação foi observada, e a variável tempo ($F(4,64) = 4,61$; $p < 0,01$) e tratamento ($F(7,16) = 2,88$; $p < 0,05$) influenciaram em 10,87% e 17,98% a variância total. Finalmente, houve diminuição do *grooming* (tempo ($F(4,64) = 13,26$; $p < 0,001$; 18,68%), tratamento ($F(7,16) = 5,62$; $p < 0,01$; 28,70%) e interação ($F(28,64) = 1,87$; $p < 0,05$; 18,42%)). Na segunda etapa, as seguintes afirmações poderiam ser feitas. Apesar da interação ($F(12,140) = 2,98$; $p < 0,001$) e tempo ($F(4,140) = 13,00$; $p < 0,001$), não foram observadas diferenças entre as médias na frequência de locomoção após a administração. Em relação ao tempo de imobilidade, a interação ($F(12,140) = 2,11$; $p < 0,05$), tempo ($F(4,140) = 6,66$; $p < 0,001$) e tratamento ($F(3,140) = 10,16$; $p < 0,001$) foram considerados significantes, e representaram 11,09%, 11,68% e 13,36% da variância total, respectivamente. Interação ($F(12,140) = 1,90$; $p < 0,05$) e tratamento ($F(3,140) = 5,99$; $p < 0,001$) afetaram os resultados, sendo responsáveis por 12,28% e 9,67% da variância total. Embora a interação ($F(12,140) = 2,16$; $p < 0,05$) e tratamento ($F(3,140) = 3,01$; $p < 0,05$) tenham sido consideradas significativas e representaram 14,56% e 5,06% da variância total, não foram observadas diferenças entre as médias nos grupos. Finalmente, não foram observadas diferenças significativas na preparação ($p > 0,05$).

Figura 6. Alterações sobre o fenótipo comportamental após administração intraperitoneal de EB1151 a camundongos machos Balb-c. **A.** atividade geral, **B.** resposta ao toque, **C.** trem posterior, **D.** irritabilidade, **E.** reflexo auricular, **F.** reflexo corneal, no primeiro estágio do experimento. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($n = 3$; $N_{\text{total}} = 21$) foi usada para todos os parâmetros analisados. Diferenças entre as medianas foi analisada pelo teste posterior de Dunn, com significância de $\alpha < 0.05$.

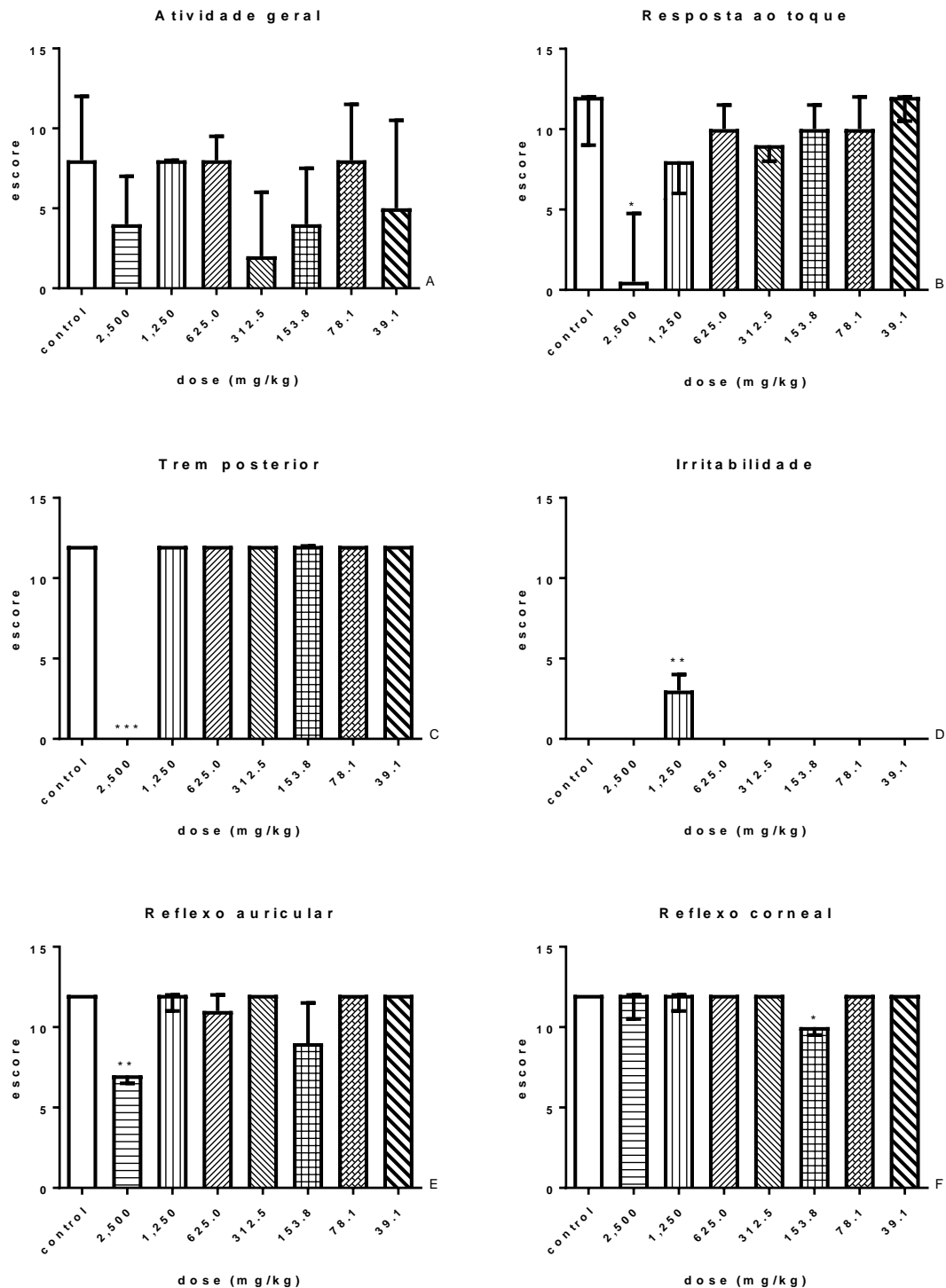


Figura 7. Alterações sobre o fenótipo comportamental após administração intraperitoneal de EB1151 a camundongos machos Balb-c. **A.** ataxia, **B.** micção, **C.** ptose, **D.** piloereção, **E.** hipotermia, **F.** cianose, no primeiro estágio do experimento. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($n = 3$; $N_{\text{total}} = 21$) foi usada para todos os parâmetros analisados. Diferenças entre as medianas foi analisada pelo teste posterior de Dunn, com significância de $\alpha < 0.05$.

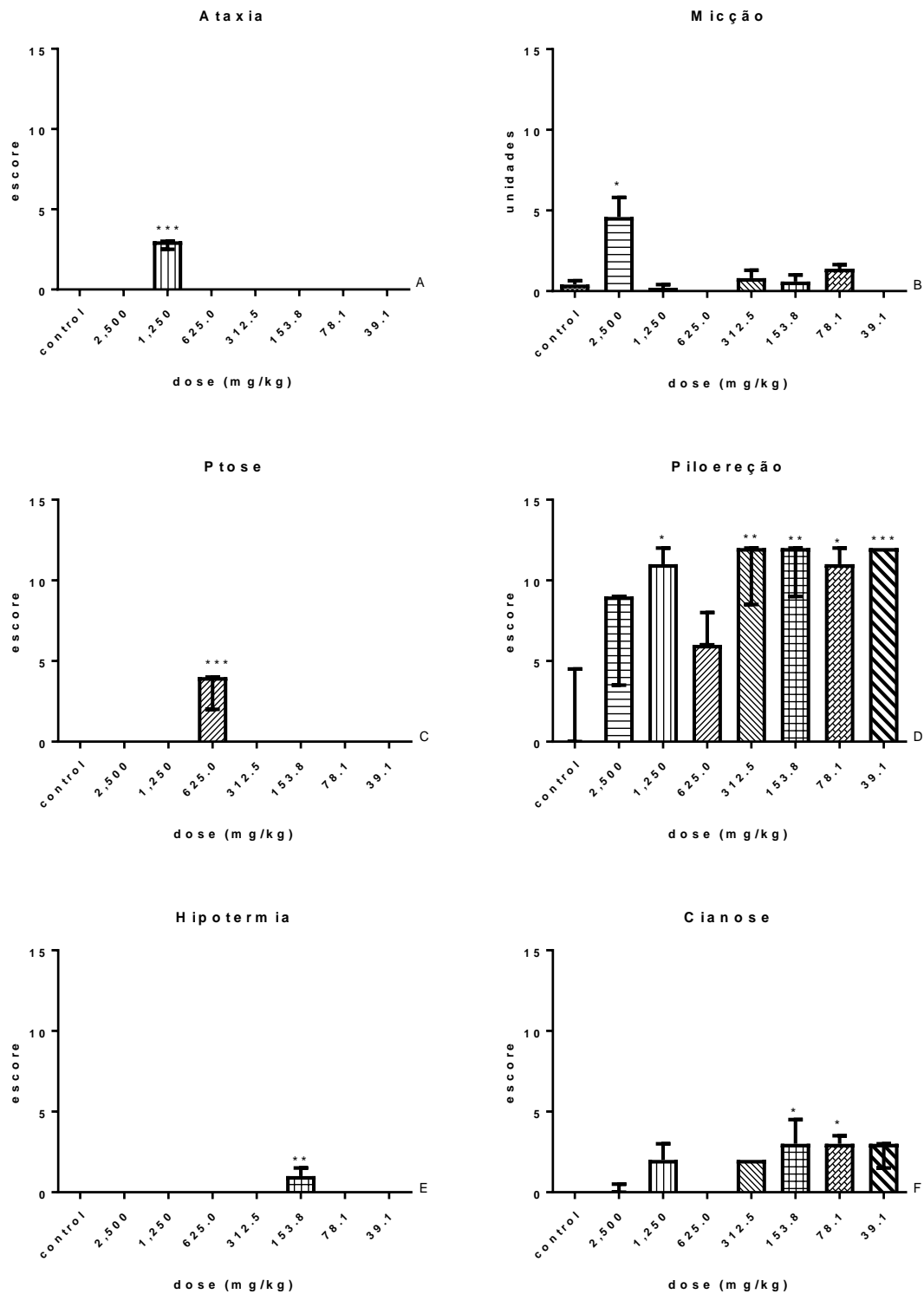


Figura 8. Alterações sobre o fenótipo comportamental após administração intraperitoneal de EB1151 a camundongos machos Balb-c. **A.** atividade geral. **B.** resposta ao toque, no segundo estágio experimental. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($n = 3$; $N_{\text{total}} = 12$) foi usada para todos os parâmetros analisados. Diferenças entre as medianas foi analisada pelo teste posterior de Dunn, com significância de $\alpha < 0.05$.

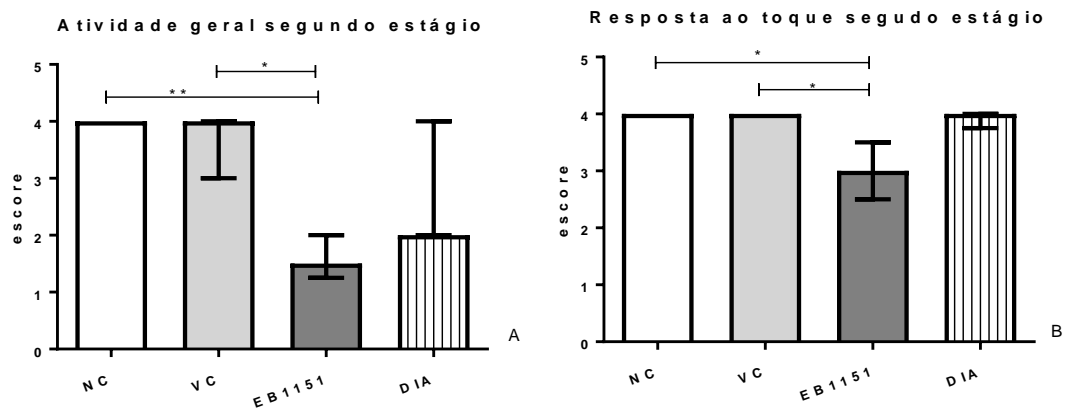


Tabela 8- Resultados obtidos nos dois estágios do experimento no aparelho de campo aberto realizados em camundongos Balb-c machos através de aplicação de EB1151 intraperitoneal com DL aplicada em n=21 animais e a DNL aplicada em n=40 animais dividido em quatro grupos.

Avaliação de campo aberto estágio 1								
Frequência de locomoção								
Tempo	controle	2,500 mg/kg	1,250mg/kg	625 mg/kg	312.5mg/kg	156.3mg/kg	78.1 mg/kg	39.1 mg/kg
15-20	165.00	61.33	148.00	122.00	61.00	102.00	176.70	81.00
30-35	171.70	62.67	106.30	44.33*	103.70	70.00	49.00*	66.33
60-65	166.00	70.00	140.70	65.00	139.70	61.67	137.70	104.30
120-125	183.00	26.67**	122.00	82.67	163.30	118.00	162.30	134.30
180-185	91.00	22.33	35.33	65.33	72.33	67.00	113.30	100.70
Frequência de levantar								
Tempo	Controle	2,500 mg/kg	1,250mg/kg	625mg/kg	312.5mg/kg	156.3mg/kg	78.1 mg/kg	39.1 mg/kg
15-20	4.33	0.67	4.33	4.667	3.333	2.667	10	1.667
30-35	5.67	2.00	4.00	2.333	3	1.667	1.667	9.667
60-65	13.33	10.00	14.33	3	14.33	11.33	17.67	6.667
120-125	18.33	1.33	12.33	4.667	28.67	14	21	22.67
180-185	20.67	2.00	6.67	14	5	14.33	17.33	7.667
Defecação								
Tempo	controle	2,500 mg/kg	1,250mg/kg	625 mg/kg	312.5mg/kg	156.3mg/kg	78.1 mg/kg	39.1 mg/kg
15-20	0.67	0.00	0.00	0.67	0.00	0.67	1.67	0.00
30-35	1.33	0.00	0.00	0.33	0.67	0.67	0.33	1.00
60-65	2.33	0.33*	0.33*	1.00	0.67	1.00	0.67	2.00
120-125	0.67	0.00	0.33	1.00	0.00	0.67	0.67	0.67
180-185	0.67	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.67
Grooming								
Tempo	controle	2,500 mg/kg	1,250mg/kg	625 mg/kg	312.5mg/kg	156.3mg/kg	78.1 mg/kg	39.1 mg/kg
15-20	4.00	0.00	3.67	0.33	2.33	0.00	1.00	0.67

Avaliação de campo aberto estágio 2				
Frequência de locomoção				
Tempo	NC	VC	EB1151	DIA
15-20	129.50	174.30	132.10	236.20
30-35	129.50	58.50	83.00	82.80
60-65	124.20	83.50	88.00	74.80
120-125	124.30	82.00	97.00	90.70
180-185	127.20	83.17	78.70	53.40
Frequência de levantar				
Tempo	NC	VC	EB1151	DIA
15-20	22.33	5.33	5.80	31.10*
30-35	25.17	2.50	6.40	12.80
60-65	20.33	10.17	5.50	8.50
120-125	18.33	19.33	9.70	14.00
180-185	23.33	21.83	13.50	9.10
Defecação				
Tempo	NC	VC	EB1151	DIA
15-20	1.67	1.00	0.30	0.90
30-35	0.83	1.00	0.40	0.20
60-65	0.33	1.00	1.00	0.40
120-125	1.00	0.83	0.20	1.10
180-185	0.50	0.83	0.40	1.10
Grooming				
Tempo	NC	VC	EB1151	DIA
15-20	21.83	39.33	18.60	5.70

Continuação tabela 8- Resultados obtidos nos dois estágios do experimento no aparelho de campo aberto realizados em camundongos Balb-c machos através de aplicação de EB1151 intraperitoneal com DL aplicada em n=21 animais e a DNL aplicada em n=40 animais dividido em quatro grupos.

<i>Grooming</i>								
Tempo	controle	2,500 mg/kg	1,250mg/kg	625 mg/kg	312.5mg/kg	156.3mg/kg	78.1 mg/kg	39.1 mg/kg
30-35	5.00	1.00	2.67	1.00	2.67	0.33	0.00	1.33
60-65	16.33	2.00**	4.33	3.67*	15.00	5.33	12.67	1.67**
120-125	14.33	2.00*	10.67	0.33*	9.33	6.00	15.67	4.33
180-185	14.67	0.00**	3.33	2.00*	3.33	2.00*	15.67	3.67
<i>Tempo de imobilidade</i>								
Tempo	controle	2,500 mg/kg	1,250mg/kg	625 mg/kg	312.5mg/kg	156.3mg/kg	78.1 mg/kg	39.1 mg/kg
15-20	79.67	209.70	108.30	120.70	126.30	151.30	76.00	113.00
30-35	148.70	203.00	164.00	209.00	128.30	187.70	161.70	125.70
60-65	78.67	142.70	42.00	182.70	53.33	125.70	68.67	73.67
120-125	95.00	116.30	120.70	136.30	58.33	116.30	55.00	49.67
180-185	101.00	137.30	193.00	131.70	115.00	220.00	116.70	129.30

<i>Grooming</i>				
Tempo	NC	VC	EB1151	DIA
30-35	19.50	13.67	18.80	10.30
60-65	19.17	10.67	40.70	20.70
120-125	19.50	43.00	37.60	22.60
180-185	24.83	34.83	21.70	8.90
<i>Tempo de imobilidade</i>				
Tempo	NC	VC	EB1151	DIA
15-20	38.83	64.67	30.60	35.70
30-35	48.17*	191.50	95.70	166.50
60-65	38.33	135.50	79.00	165.60
120-125	40.67	89.83	99.80	105.90
180-185	51.33	51.33	117.90	144.00

DISCUSSÃO

As espécies de Simaroubaceae são conhecidas por sua atividade biológica e pela presença de alcaloides, quassinoides e outros compostos como os glicosídeos C da antracenona, que ocorrem em *Alvaradoa haitiensis* que apresentaram atividade citotóxica no modelo murino *in vivo* de *hollow fiber* usando linhagem KB e contra tumores *in vitro*.^[25] Estudos de compostos isolados de *Simarouba glauca* por fracionamento biomonitorado usando linhagem celular de câncer KB, isolaram alcaloides, triterpenos, cumarinas e triglicerídeos.^[26] *Simaba orinocensis* foi estudada quanto ao potencial antimalárico dos quassinosídeos.^[27] Atividade anti-hipertensiva de flavonoides relacionada às folhas de *Ailanthus excelsa* também foi observada.^[28]

Dados de citotoxicidade obtidos para EB1151, feito a partir dos órgãos aéreos de *P. Sprucei*, corroboram com achados relacionados à citotoxicidade contra o carcinoma de células escamosas KB-ADR-12 de boca, *in vitro*^[6] e conta células HL-60, leucêmicas.^[29]

No presente trabalho, a fração UNIP344, que contém quassinoides sergeolídeo e isobruceína B, foi a mais ativa contra linhagens celulares de câncer de mama e próstata e ambos os compostos foram primeiramente isolados de *Cedronia granatensis* (Simaroubaceae) e mostraram atividade contra melanoma, câncer de cólon e de pulmão e contra outras linhagens tumorais sólidas. Os resultados foram obtidos em concentrações tão baixas quanto 10^{-2} mM a 10^{-5} mM.^[30] Os resultados anteriores estão de acordo com os presentes. Além disso, a fração UNIP343 mostrou um efeito satisfatório contra a linhagem de câncer de mama e próstata. Dessa fração, sergeolídeo e o 15-desacetilsergeolídeo foram identificados. Relatórios anteriores mostram que a sergeolídeo, 15-desacetilsergeolídeo e isobruceína B mostraram atividade contra a linhagem celular de leucemia P-388.^[24] Por outro lado, a fração UNIP324, contendo sitosterol e estigmasterol, não apresentou atividade contra as linhagens celulares de câncer de mama e próstata.

Estudos prévios feitos com *P. sprucei*^[31] levaram ao isolamento de isobruceína B, neosergeolídeo e 12-acetilneosergeolídeo. Mais tarde,^[29] relatos sobre o isolamento de quassinosídeos e alguns derivados semi-sintéticos que foram testados contra *Artemia franciscana* e contra linhas de células tumorais humanas *in*

vitro, particularmente mostrando uma forte atividade contra a linhagem de leucemia HL-60. Além disso, o extrato apresentou atividade contra larvas de *Aedes aegypti*, hemólise contra eritrócitos murinos e contra *Plasmodium falciparum*.^[32] ^[33] Alguns relatos sobre o neosergeolideo isolado de *P. sprucei* testado contra linhagem de leucemia HL-60 descrevem que o composto mediou a apoptose por causar dano ao DNA por desencadear suas vias intrínsecas. A maioria dos relatos sobre quassinósdeos e outros compostos de Simaroubaceae descreve sua atividade farmacológica e resalta a importância dessa classe química. Embora haja muitos trabalhos descrevendo a farmacologia dos quassinósdeos, não há muitos estudos que reportem a toxicidade desses compostos, ou mesmo dos extratos vegetais que os contenham. Alguns quassinósdeos já foram estudados quanto à toxicidade, como o brusatol, isolado pela primeira vez de *Brucea javanica* (L.) Merr. Esse quassinósdeo induz apoptose em células de inseto, o que o torna um inseticida em potencial.^[34] Os autores reportam que o brusatol apresenta toxicidade durante o processo de maturação de oócitos de camundongos.^[35] Já o extrato padronizado (TAF 273) de *Eurycoma longifolia* Jack. melhorou problemas reprodutivos induzidos por testosterona em ratas.^[36] A fração n-butanol desta espécie apresentou maior toxicidade em um experimento que comparou frações de diferentes polaridades. Segundo os autores ^[37] o composto euricomano, um quassinósdeo, apresentou-se como o mais tóxico entre os compostos isolados. Por conta da ausência de informação a respeito da toxicidade de extratos ou compostos derivados de *P. sprucei* na literatura, salvo dados referentes à citotoxicidade a células humanas.^[6] A presente pesquisa relata as influências de EB1151 sobre o fenótipo comportamental. EB1151 foi testado em camundongos Balb-c machos, no primeiro estágio do experimento, não foram verificadas alterações significativas na atividade geral. Porém, alterações na ataxia, estimulação, tremor, irritabilidade, resposta ao toque e queda no trem posterior podem indicar que partes do sistema nervoso relacionadas ao controle do movimento e equilíbrio podem ter sido afetadas pelo tratamento. Alterações no reflexo auricular, piloereção e ptose podem indicar que também o sistema nervoso simpático pode ter sido influenciado por EB1151. Micção, defecação, hipotermia e cianose também apresentaram alterações. Todas as alterações observadas foram acarretadas após administração das doses mais elevadas de EB1151. Nas doses mais baixas, essas alterações deixaram de se manifestar.

No segundo estágio do experimento, a dose não letal foi administrada e as alterações foram observadas somente na atividade geral e na resposta ao toque, e todos os animais, após os 14 dias de observação, estavam totalmente recuperados. Observações macroscópicas não revelaram alterações nos pulmões, fígado, rins ou intestino. Sinais de toxicidade prevalecem nas doses mais elevadas e podem indicar que o uso inadvertido de *P. sprucei* pode causar lesões no sistema nervoso. Porém, em doses usuais, mais baixas, não há o aparecimento de sinais de toxicidade ou de alterações comportamentais, sendo seu uso considerado seguro.

Conclusões

As frações F1CHCL₃ e F2CHCL₃, mais as frações UNIP343 e UNIP344 apresentaram atividade citotóxica expressiva contra células de tumor de mama e de próstata. Das frações UNIP343 e UNIP344, foram isolados os compostos sergeolídeo, 15-desacetilsergeolídeo e isobruceína. EB1151 foi testado quanto a alterações no fenótipo comportamental, e foi observado que apresenta atividade geral prejudicada em doses mais elevadas, mas há uma recuperação no decorrer do tempo, e em doses mais baixas, não foram observadas alterações nos experimentos comportamentais realizados.

Referências

- 1-Inca,2018.
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>, accessed in 03/20/2018.
- 2- Suffredini IB, Varella AD, Younes RN. Cytotoxic molecules from natural sources. Tapping the Brazilian biodiversity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2006; 6 (4): 367-75.
- 3- Suffredini IB, Paciência MLB, Frana SA, Varella AD, Younes RN *In vitro* breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. *Pharmazie*. 2007a; 62 (10): 798-800.
- 4- Suffredini IB, Paciência MLB, Varella AD, Younes RN. *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. *Pharmazie*. 2006b; 61 (8): 722-24.
- 5- Suffredini IB, Sader HS, Gonçalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD. et al. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; 37 (3): 379-384.

- 6- Ozi JM, Suffredini IB, Paciência MLB, Frana SA, Dib LL. In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz. Oral Res.* 2011; 25 (6): 519-25.
- 7- Suffredini IB, Paciência MLB, Varella AD, Younes. R.N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against a human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia.* 2007b; 78 (3): 223-6.
- 8- Saraiva RCG, Barreto AS, Siani AC, Ferreira JLP, Araujo RB, Nomura SM, et al. Pohlit AM. Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). *Acta Amazônica.* 2003; 33(2): 213-220.
- 9- Duke JA, Vasquez R. *Amazonian Ethnobotany Dictionary.* Boca Raton: CRC Press. 1994; 137.
- 10- Castilho AL, Saraceni CHC, Diaz IEC, Paciência MLB, Suffredini IB. New trends in Dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. *Braz Oral Res.* 2013; 27: 109-115.
- 11- Castilho AL, da Silva JPC, Saraceni CHC, Díaz IEC, Paciência MLB, Varella AD, et al. *In vitro* activity of Amazon Plant Extracts against *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2014; 45 (3): 769-79.
- 12- Estork DM, Gusmão DF, Paciência MLB, Díaz IEC, Varella AD, Younes RN, et al. First chemical and toxicological evaluation of *Casanga-cheirosa* in Balb-c male mice. *Molecules.* 2014; 19: 3973-87.
- 13- 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; 83: 757-66.
- 14- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 1107-1112.
- 15- Brito AS. *Manual de ensaios de toxicologia.* Campinas: Editora da Unicamp. 1994: 122.
- 16- Estork DM, Gusmão DF, Paciência MLB, Frana SA, Díaz IEC, Varella AD, et al. *Casanga-cheirosa* organic extract impairment over Balb-c male mice behavioral phenotype. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 26: 216-224.
- 17- Gusmão DF, Estork DM, Paciência MLB, Diaz IEC, Frana SA, Rodrigues PA, et al. Preliminary evaluation of the acute toxicity related to *Abarema auriculata* to mice and investigation of cytotoxicity of isolated flavonones. *Pharmacologyonline (Salerno).* 2013a; 1: 113-127.
- 18- Gusmão DF, Estork DM, Paciência MLB, Díaz IEC, Suffredini IB, Varella AD, et al. Influence of the intraperitoneal administration of antitumor *Abarema auriculata* extract on mice behavior. *Rev Bras Farmacogn.* 2013b; 23: 903-912.

- 19- Zar JH. Biostatistical Analysis. (4th edn) New Jersey: Prantice-Hall Inc. 1999; 663: 212.
- 20- Pateh, UU, Haruna AK, Garba M, Iliya I, Sule IM, Abubakar MS, et al. Isolation of estigmasterol, β -sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* pyer and kotchy (Araceae). Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009; 7(1): 19-25.
- 21 - Prabhakar S, Achanta RKG, Adavi RVB, Raghuram RA, Ravi KB, Appa RVNA. 2015. New malabaricane triterpenes from the oleoresin of *Ailanthus malabarica*. Fitoterapia. 2015; 100: 166-173
- 22- Koike K, Ohmoto T. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of cathin-6-one alkaloids. Chemical pharmaceutical bulletin. 1985; 33(12): 5239-44.
- 23- Moretti Ch, Polonsky J, Vuilhorgne M, Prange T. Isolation and structure of sergeolide, a potent cytotoxic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. Tetrahedron Letters. 1982; 23(6): 647-50.
- 24- Polonsky J, Bhatnagar S, Moretti C. 15-Deacetylsergeolide, a potente antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. J Nat Prod. 1984; 47(6):994-6.
- 25- Phifer SS, Lee D, Seo EK, Kim NC, Graf TN, Kroll DJ, et al. Alvaradoins E-N, antitumor and cytotoxic anthracenone C-glycosides from the leaves of *Alvaradoa haitiensis*. J Nat Prod. 2007; 70(6): 954-61.
- 26- Rivero-Cruz JF, Lezutekong R, Lobo-Echeverri T, Ito A, Mi Q, Chai HB, et al. Cytotoxic constituents of the twigs of *Simarouba glauca* collected from a plot in Southern Florida. Phytother Res. 2005; 19(2): 136-40.
- 27- Muhammad I, Bedir E, Khan SI, Tekwani BL, Khan IA, Takamatsu S, et al. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. J Nat Prod. 2004; 67(5): 772-7
- 28- Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti GA, Hufner A, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). Phytother Res. 2007; 21(1) :32-6.
- 29- Silva EC, Cavalcanti BC, Amorim RC, Lucena JF, Quadros DS, Tadei WP, Montenegro RC, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, Moraes MO, Nunomura RC, Nunomura SM, Melo MR, Andrade-Neto VF, Silva LF, Vieira PP, Pohlit AM. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2009b; 104(1):48-56.
- 30- Tischler M, Cardellina JH 2nd, Boyd MR, Cragg GM. Cytotoxic quassinoids from *Cedronia granatensis*. J Nat Prod. 1992; 55(5): 667-71.
- 31- Silva EC, Amorim RCN, Tadei WP, Pohlit AM. Gram-scale isolation of isobrucein and neosergeolide from *Picrolemma sprucei* Hook.f. Acta Amazonica, 2009^a; 39(1):229-232.

- 32- Andrade-Neto VF, Pohlit AM, Pinto AC, Silva EC, Nogueira KL, Melo MR, et al. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007; 102(3): 359-65.
- 33 - Cavalcanti BC, Da Costa PM, Carvalho AA, Rodrigues FAR, Amorim RCN, Silva ECC, et al. Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: the role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage. Pharmaceutical Biology, 2012; 50 (8): 980-993.
- 34- Zhang L, Feng X, Ma D, Yang J, Jiang H, Zhang Y, He W. Brusatol isolated from *Brucea javanica* (L.) Merr. induces apoptotic death of insect cell lines. Pestic Biochem Physiol. 2013; 107(1), 18-24.
- 35- Ma R, Li H, Zhang Y, Lin Y, Qiu X, Xie M, Yao B. The toxic effects and possible mechanisms of Brusatol on mouse oocytes. PLoS One, 2017; 18;12(5).
- 36- Abdulghani M, Hussin AH, Sulaiman SA, Chan KL. The ameliorative effects of *Eurycoma longifolia* Jack on testosterone-induced reproductive disorders in female rats. Reprod Biol. 2012; 12(2):247-55.
- 37- Chan KL, Choo CY. The toxicity of some quassinoids from *Eurycoma longifolia*. Planta Med. 2002; 68(7):662-4.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As frações UNIP343 (IC₅₀= 0,093 µg/mL e 0,299 µg/mL para mama e próstata, respectivamente) e UNIP344 (IC₅₀= 0,031 µg/mL e 0,158 µg/mL para mama e próstata, respectivamente) foram mais efetivas contra ambas as linhagens celulares de câncer. As frações UNIP328 (IC₅₀= 17,510 µg/mL e 23,570 µg/mL para mama e próstata, respectivamente), UNIP335 (IC₅₀= 33,820 µg/mL e 34,640 µg/mL para mama e próstata, respectivamente) e UNIP336 (IC₅₀= 19,260 µg/mL e 21,970 µg/mL para mama e próstata, respectivamente) mostraram-se relativamente ativas contra as células cancerígenas testadas.

Das frações UNIP343 e UNIP344, foram isolados os compostos sergeolídeo, 15-desacetilsergeolídeo e isobruceína. Além desses compostos também foram isolados sitosterol, estigmasterol, (14*S*,17*S*,20*S*)-14,17,20-trihidroxí-24-malabaricen-3-ona, (17*R*,20*R*,24*R*)-17,20,24,25-tetrahidroxí-14(18)-malabaricen-3-ona, cathin-6-ona.

EB1151 foi testado quanto a alterações no fenótipo comportamental, e foi observado que apresenta atividade geral prejudicada em doses mais elevadas, mas há uma recuperação no decorrer do tempo, e em doses mais baixas, não foram observadas alterações nos experimentos comportamentais realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULGHANI, M.; HUSSIN, A. H.; SULAIMAN, S. A.; CHAN, K. L. The ameliorative effects of *Eurycoma longifolia* Jack on testosterone-induced reproductive disorders in female rats. **Reprod. Biol.**, v. 12 n. 2 p. 247-255, 2012.
- ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.
- ALVES, I. A. B. S.; MIRANDA, H. M.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Família Simaroubaceae: botânica, composição química e atividades biológicas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, n. 4, 2014.
- AMORIM, V. M. S.; BARROS, M. B. A.; CÉSAR, C. L. G.; GOLDBAUM, M.; CARANDINA, L.; ALVES, M. C. G. P. Fatores associados à realização dos exames de rastreamento para o câncer de próstata: um estudo de base populacional. **Cad. Saúde Pública**, v. 27, n. 2, p. 347-456, 2011.
- AMORIM, R. C. N. **Contribuições para o conhecimento da composição química e atividade biológica de infusões, extratos e quassinóides obtidos de *Picrolemma sprucei* Hook.f. (Simaroubaceae).** 2009, 117 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- AMORIM, R. C. N.; MELO, M. R. S.; SILVA, F. R.; ANDRADE-NETO, V. F.; TADEI, W. P.; POHLIT, A. M. Atividade biológica e teor de quassinóides dos frutos da planta medicinal amazônica *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 13-17, 2013.
- ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. H.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, C. G.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-365, 2007.
- ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.
<http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>. acesso 29/05/2018.
- ARAUJO, I. M. A.; FERNANDES, A. F. C. The meaning of diagnostic of breast cancer for woman. **Esc. Anna Nery**, v. 12, n. 4, 2008.
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p. 1154-1160, 1985.
- BARBOSA, A. M. **Estudo farmacológico de extratos secos padronizados de folhas de *Picrolemma sprucei* Hook coletadas na Amazônia Ocidental.** 2012. 137 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

BATISTON, A. P.; TAMAKI, E. M.; SOUZA, L. A.; SANTOS, M. L. M. Knowledge of and practices regarding risk factors for breast cancer in women aged between 40 and 69 years. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, v. 11, n. 2, p. 163-171, 2011.

BERO, J.; QUETIN-LECLERCQ, J. Natural Products Published in 2009 from Plants Traditionally Used to Treat Malaria. **Planta Med**, v. 77, p. 631-640, 2011.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRED, P. H.; EHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 45-54, 2005.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. **Quím. Nova**, v. 33, n. 6, São Paulo, 2010.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios de toxicologia**. Campinas, ed. Unicamp, 1994.

BROADHURST, P. L. **Experiments in psychogenetics, application of biometricalgenetics to the inheritance of behavior**. In: H. J. Eysenck, ed. Experiments in personality, v. 1. Routledge & Kegan Paul, London, p. 1-256, 1960.

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; SILVA, A. A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L. H. P.; STABELI, R. G. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.

CHAN, K. L.; CHOO, C. Y. The toxicity of some quassinoids from *Eurycoma longifolia*. **Planta Med**, v. 68, n. 7, p. 662-664, 2002.

CASTILHO, A. L.; SARACENI, C. H. C.; DÍAZ, I. E. C.; PACIÊNCIA, M. L. B.; SUFFREDINI, I. B. New trends in Dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. **Braz. Oral Res**, v. 27, p. 109-115, 2013.

CASTILHO, A. L.; DA SILVA, J. P. C.; SARACENI, C. H. C.; DÍAZ, I. E. C.; PACIÊNCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. *In vitro* activity of Amazon Plant Extracts against *Enterococcus faecalis*. **Braz. J. Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 769-779, 2014.

CAVALCANTI, B. C.; da COSTA, P. M.; CARVALHO, A. A.; RODRIGUES, F. A. R.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, E. C. C.; POHLIT, A. M.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: the role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage. **Pharma. Biology**, v. 50, n. 8, p. 980-993, 2012.

COSTA, W. B.; VIEIRA, M. R. M.; NASCIMENTO, W. D. M.; PEREIRA, L. B.; LEITE, M. T. S. Mulheres com câncer de mama: Interações e percepções sobre o cuidado do enfermeiro. **Rev. Min. Enferm**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Rev. Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas**. 2012. Disponível em http://www.nnce.org/Arquivos/Artigos/2012/cruz_etal_2012.pdf. Acesso em 25/05/2018.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochem. Rev**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2014.

DEWICK, P. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, p. 507, 2002.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotany Dictionary**. USA, CRC Press, p. 137, 1994.

ESTORK, D. M.; GUSMÃO, D. F.; PACIÊNCIA, M. L. B.; DIAZ, I. E. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; REIS, L. F. L.; MONTERO, E. F. S.; BERNARDI, M. M.; SUFFREDINI, I. B. First chemical and toxicological evaluation of *Casanga-cheirosa* in Balb-c male mice. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 3973-3987, 2014.

ESTORK, D. M.; GUSMÃO, D. F.; PACIÊNCIA, M. L. B.; FRANA, S. A.; DIAZ, I. E. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; REIS, L. F. L.; MONTERO, E. F. S.; BERNARDI, M. M.; SUFFREDINI, I. B. *Casanga-cheirosa* organic extract impairment over Balb-c male mice behavioral phenotype. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 26, n. 2, p. 216-224, 2016.

FANDEUR, T.; MORETTI, C.; POLONSKY, J. In Vitro and in Vivo Assessment of the Antimalarial Activity of Sergeolide. **Planta Med**, v. 51, n. 1, p. 20-23, 1985.

FERREIRA, I. B.; MARINHO, E. C.; CUSTÓDIO, D. B.; GONTIJO, C. A.; PAIVA, C. E.; CRISPIM, C. A.; MAIA, Y. C. P. Consumo alimentar e estado nutricional de mulheres em quimioterapia. **Ciênc. Saúde Col**, v. 21, n. 7, p. 2209-2218, 2016.

FLORA DO BRASIL

<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/>. Acesso 25/05/2018

GONNELLI, F. A. S.; PALMA, L. F.; GIORDANI, A. J.; DEBONI, A. L. S.; DIAS, R. S.; SEGRETO, R. A.; SEGRETO, H. R. C. Laser de baixa potência para prevenção de hipofluxo salivar em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço após radioterapia e quimioterapia. **Radiol. Bras**, v. 49, n. 2, p. 86-91, 2016.

GUSMAO, D. F.; ESTORK, D. M.; PACIÊNCIA, M. L. B.; DIAZ, I. E. C.; FRANA, S. A.; RODRIGUES, P. A.; SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; REIS, L. F. L.; MONTERO, E. F. S.; BERNARDI, M. M. Preliminary evaluation of the acute toxicity related to

Abarema auriculata to mice and investigation of cytotoxicity of isolated flavonones. **Pharmacologyonline (Salerno)**, v. 1, p. 113-127, 2013a.

GUSMAO, D. F.; ESTORK, D. M.; PACIÊNCIA, M. L. B.; DIAZ, I. E. C.; SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; REIS, L. F. L.; MONTERO, E. F. S.; BERNARDI, M. M. Influence of the intraperitoneal administration of antitumor *Abarema auriculata* extract on mice behavior. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 23, n. 6, p. 903-912, 2013b.

HOUE, E.; STIEN, D.; BOURDY, G.; DEHARO, E. **Quassinoids: Anticancer and Antimalarial Activities**. In: Ramawat KG, Merillon J-M, editors. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of alkaloids, Phenolics and Terpenes, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 3775-3802, 2013.

HUGUET, P. R.; MORAIS, S. S.; OSIS, M. J. D.; PINTO-NETO, A. M.; GURGEL, M. S. C. Qualidade de vida e sexualidade de mulheres tratadas de câncer de mama. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 31, n. 2, p. 61-67, 2009.

HUSSAIN, M.; TANGEN, C. M.; LARA, P. N. JR.; VAISHAMPAYAN, U. N.; PETRYLAK, D. P.; COLEVAS, A. D.; SAKR, W. A.; CRAWFORD, E. D. Ixabepilone (epothilone B analogue BMS-247550) is active in chemotherapy-naïve patients with hormone-refractory prostate cancer: a Southwest Oncology Group trial S0111. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 34, p. 8724-8729, 2005.

INCA, Instituto Nacional de Câncer;

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama> acesso em: 26/04/2018.

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata> acesso em: 26/04/2018.

KAMEO, S. Y.; SILVA, G. M.; NEVES, S. O. C.; SAWADA, N. O.; COSTA, R. R. Education and cancer prevention: knowledge of Brazilian students about breast cancer. **Medicas UIS**, v. 29, n. 1, p. 37-44, 2016.

KOIKE, K.; OHMOTO, T. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of cathin-6-one alkaloids. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 12, p. 5239-5244, 1985.

KUNDU, C. N.; DAS, S.; NAYAK, A.; SATAPATHY, S. R.; DAS, D.; SIDDHARTH, S. Anti-malarials are anti-cancers and vice versa – One arrow two Sparrows. **Acta Trop**, v. 149, p. 113-127, 2015.

LAPIZ-BLUHM, M. D.; BONDI, C. O.; DOYEN, J.; RODRIGUES, G. A.; BÉDARD-ARANA, T.; MORILAK, D. S. Behavioral assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. **J. Neuroendocrinol**, v. 20, n. 10, p. 1115-1137, 2008.

LEE, K. H. Discovery and Development of Natural Product-derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. **J. Nat. Prod**, v. 73, n. 3, p. 500-516, 2010.

LIU, G.; CHEN, Y.; DIPAOLA, R.; CARDUCCI, M.; WILDING, G. Phase II trial of weekly ixabepilone in men with metastatic castrate-resistant prostate cancer (E3803): A trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Clin. Genitourin. Cancer**, v. 10, n. 2, p. 99-105, 2012.

LOIZZO, M. R.; SAID, A.; TUNDIS, R.; RASHED, K.; STATTI, G. A.; HUFNER, A. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). **Phytother. Res**, v. 21, n. 1, p. 32-36, 2007.

LUMONADIO, L.; ATASSP, G.; VANHAELEN, M.; FASTRE, R. V. Antitumor activity of quassinoids from *Hannoa Klaineana*. **J. Ethnopharmacol**, v. 31, n. 1, p. 59-65, 1991.

LUYEN LE, H.; JULLIAN, V.; CLAPAROLS, C.; VANSTEELANDT, M.; HADDAD, M.; CABOU, C.; DEHAROA, E.; FABREA, N. Development and Validation of LiquidChromatography Combined with Tandem Mass Spectrometry Methods for the Quantitation of Simalikalactone E in Extracts of Quassia amara L. and in Mouse Blood. **Phytochem. Anal**, v. 26, n. 2, p. 111-118, 2015.

MA, R.; LI, H.; ZHANG, Y.; LIN, Y.; QIU, X.; XIE, M.; YAO, B. The toxic effects and possible mechanisms of Brusatol on mouse oocytes. **PLos One**, v. 18, n. 5, p. e0177844, 2017.

MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Phytotherapy medicines in dentistry: evidence and perspectives on the use of "Aroeira-do-sertão" (*Myracrodruon Urundeuva* Allemão). **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.

MARANHÃO, H. M. L.; VASCONCELOS, C. F. B.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J.; SILVA-NETO, J. C.; SILVA-FILHO, R. C.; FERNANDES, M. P.; COSTA-SILVA, J. H.; ARAUJO, A. V.; WANDERLEY, A. G. Hepatoprotective Effect of the Aqueous Extract of Simarouba amara Aublet (Simaroubaceae) Stem Bark against Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Hepatic Damage in Rats. **Molecules**, v. 19, v. 11, p. 17735-17746, 2014.

MARSICANO, A. P.; SOARES, C. C.; PEMPER, K. C. O.; SILVA, J. S.; ZEM, P. S.; BORGES, B. E.; CHRISTO, D. **Câncer de Mama**. IV Jornada Científica de Enfermagem, Faculdade Santa Cruz, Curitiba, 2014.

MARTINS, K. F.; MESSIAS, A. D.; LEITE, F. L.; DUEK, E. A. R. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLDLA microspheres. **Mat. Res**, v. 17, n. 3, 2014.

MATUHARA, A. M.; NAGANUMA, M. Manual instrucional para aleitamento materno de recém-nascidos pré-termo. **Pediatria**, n. 28, v. 2, p. 81-90, 2006.

MENEGUETTI, D. U. O.; CUNHA, R. M.; LIMA, R. A.; OLIVEIRA, F. A. S.; MEDEIROS, D. S. S.; PASSARINI, G. M.; MEDEIROS, P. S. M.; MILITÃO, J. S. L. T.; FACUNDO, V. A. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 35, n. 4, p. 577-587, 2014.

MIGOWSKI, A.; SILVA, G. A. Sobrevida e fatores prognósticos de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 2, p. 344-352, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

MONKS, A.; SUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Nat. Can. Inst.**, v. 83, n. 11, p.757-766, 1991.

MORETTI, C.; POLONSKY, J.; VUILHORGNE, M.; PRANGE, T. Isolation and structure of sergeolide, a potent cytotoxic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 6, p. 647-650,1982.

MOSCHETA, M. S.; SANTOS, M. A. Grupos de apoio para homens com câncer de próstata: revisão integrativa da literatura. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 17, n. 5, p. 1225-1233, 2012.

MUHAMMAD, I.; BEDIR, E.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; TAKAMATSU, S.; PELLETIER, J.; WALKER, L. A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **J. Nat. Prod**, v. 67, n. 5, p. 772-777, 2004.

NASCIMENTO, A. E. X.; SALES, L. M. S.; CAYANA, E. G. **Riscos associados ao uso de fitoterápicos**. Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde. Revista Espaço Para A Saúde, v. 6, p. 1-6, Londrina, 2005.

NASSIF, A. E.; PR, A. C. B. C.; TÂMBABA-FILHO, R.; DE PAULA, R. X. G.; TAGUCHI, W. S.; POZZOBON, H. J. Epidemiologic profile and prognostic factors in clinically localized prostate adenocarcinoma submitted to surgical treatment. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 36, n. 4, p. 327-331, 2009.

NASSIF, A. E.; TÂMBARA-FILHO, R. Expressão imunohistoquímica do marcador tumoral CD34 e P27 como fator prognóstico em adenocarcinoma de próstata clinicamente localizado após prostatectomia radical. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 37, n. 5, p. 338-344, 2010.

NEWMAM, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod**, v. 75, n. 3, p.311-355, 2016.

NUNOMURA, R. C. S.; SILVA, E. C. C.; OLIVEIRA, D. F.; GARCIA, A. M.; BOELONI, J. N.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. In vitro estudos da atividade anti-helmíntico de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae); Estudos in vitro da Atividade-helmíntica anti de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). **Acta Amaz**, v. 36, n. 3, p. 327-330, 2006.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Accessed in 12/07/2011, at http://www.oecd.org/document/7/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html.

OLIVA, M.; SALGADO, M. Aleitamento materno – aspectos práticos. **Revista Saúde Infantil, Hospital Pediátrico de Coimbra**, n. 27, v. 1, p. 1-81, 2005.

OLIVEIRA, A. M. G. **Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de plantas medicinais dos Biomas da Caatinga e Amazônico**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biodiversidade) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

OZI, J. M.; SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M.; FRANA, S. A.; DIB, L. L. *In vitro* efeitos citotóxicos de planta brasileira extrai em carcinoma de células escamosas da cavidade oral. **Braz. Res. Orais**, v. 25, n. 6, p. 519-525, 2011.

PAIVA, E. P.; MOTTA, M. C. S.; GRIEP, R. H. Conocimientos, actitudes y prácticas acerca de la detección del cáncer de próstata. **Acta Paul. Enferm**, v. 23, n. 1, p. 88-93, 2010.

PAIVA, E. P.; MOTTA, M. C.; GRIEP, R. H. Barriers related to screening examinations for prostate cancer. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 19, n. 1, p. 73-80, 2011.

PATEH, U. U.; HARUNA, A. K.; GARBA, M.; ILIYA, I.; SULE, I. M.; ABUBAKAR, M. S.; AMBI, A. A. Isolation of estigmasterol, β -sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* pyer and kotchy (Araceae). **Niger J. Pharm. Sci**, v. 7, n. 1, p. 19-25, 2009.

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

PIRANI, J. R.; THOMAS, W. W. **Simaroubaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1304>> acesso 30/05/2018.

POHLIT, A. M.; JABOR, V. A.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, E. C. C.; LOPES, N. P. Determinação LC-ESI-MS de quassinóides isobrucein B e neosergeolide em *Picrolemma sprucei* infusões-tronco. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 20, n. 6, p. 1065-1070, 2009.

PHIFER, S. S.; LEE, D.; SEO, E. K.; KIM, N. C.; GRAF, T. N.; KROLL, D. J.; NAVARRO, H. A.; IZYDORE, R. A.; JIMÉNEZ, F.; GARCIA, R.; ROSE, W. C.; FAIRCHILD, C. R.; WILD, R.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; OBERLIES, N. H.; WALL, M. E.; WANI, M. C. Alvaradoins E-N, antitumor and cytotoxic anthracenone C-glycosides from the leaves of *Alvaradoa haitiensis*. **J. Nat. Prod**, v. 70, n. 6, p. 954-961, 2007.

POLONSKY, J.; BHATNAGAR, S.; MORETTI, C. 15-deacetylsergeolide, a potent antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. **J. Nat Prod**, v. 47, n. 6, p. 994-996, 1984.

PRABHAKAR, S.; ACHANTA, R. K. G.; ADAVI, R. V. B.; RAGHURAM, R. A.; RAVI, K. B.; APPA, R. V. N. A. New malabaricane triterpenes from the oleoresin of *Allanthurus malabarica*. **Fitoterapia**, v. 100, p.166-173, 2015.

RIVERO-CRUZ, J. F.; LEZUTEKONG, R.; LOBO-ECHEVERRI, T.; ITO, A.; MI, Q.; CHAI, H. B.; SOEJARTO, D. D.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; SWANSON, S. M.; MORELLI, I.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of the twigs of *Simarouba glauca* collected from a plot in Southern Florida. **Phytother. Res**, v. 19, n. 2, p. 136-140, 2005.

SARAIVA, R. C. G.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERREIRA, J. L. P.; ARAUJO, R. B.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). **Acta Amaz**, v. 33 n. 2, p. 213-219, 2003.

SILVA, B. M.; NETO, J. A. B. S.; LIMA, R. L. Analysis of complications in metastatic prostate cancer patients submitted to bilateral orchiectomy. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 37, n. 4, p. 269-273, 2010.

SILVA, E. C.; AMORIM, R. C. N.; TADEI, W. P.; POHLIT, A. M. Gram-scale isolation of isobrucein and neosergeolide from *Picrolemma sprucei* Hook.f. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p. 229-232, 2009a.

SILVA, E. C. C.; CAVALCANTI, B. C.; AMORIM, R. C. N.; LUCENA, J. F.; QUADROS, D. S.; TADEI, W. P.; MONTENEGRO, R. C.; LOTUFO, L. V. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; NUNOMURA, R. C.; NUNOMURA, S. M.; MELO, M. R. S.; NETO, V. F. A.; SILVA, L. F. R.; VIEIRA, P. P. R.; POHLIT, A. M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n.1, p. 48-55, 2009b.

SILVA, L. C. Câncer de mama e o sofrimento psicológico: Aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, v. 13, n. 2, p. 231-237, 2008.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Cancer Inst**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOUSA, R. P.; OLIVEIRA, J. S. S. M.; CHAVES, M. H. Prospecção científica e tecnológica do gênero *Simaba aubl.* (Simaroubaceae). **Rev. Geintec**, v. 6, n. 3, p. 3343-3355, 2016.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SOUZA, L. M.; SILVA, M. P.; PINHEIRO, I. S. Um toque na masculinidade: a prevenção do câncer de próstata em gaúchos tradicionalistas. **Rev. Gaúcha Enferm**, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2011.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Cytotoxic molecules from natural sources. Tapping the Brazilian biodiversity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 367-75, 2006.

SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 61, n. 8, p. 722-24, 2006b.

SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M. L.; FRANA, S. A.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. *In vitro* breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 62, n. 10, p. 789-800, 2007a.

SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M. L.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 223-6, 2007b.

SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M. L. B.; DÍAZ, I. E. C.; FRANA, S. A.; BERNARDI, M. M. Mice behavioral phenotype changes after administration of anani (*Symphonia globulifera*, Clusiaceae), na alternative Latin American and African medicine. **Pharmacogn. Mag**, v. 13, n. 52, p. 617-626, 2017.

TESHIMA, L. Y. G.; CELY, F. S. V.; MUNOZ-SANDOVAL, S.; CHEYNE, J. R.; SALDARRIAGA-GIL, W. Síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario: aplicación clínica. **Rev. Colomb. Obstet. Ginecol**, v. 67, n. 1, p. 36-49, 2016.

TISCHLER, M.; CARDELLINA, J. H.; BAOYD, M. R.; CRAGG, G. M. Cytotoxic quassinoids from *Cedronia granatensis*. **J. Nat. Prod**, v. 55, n. 5, p. 667-71, 1992.

TONON, T. C. A.; SCHOFFEN, P. F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403-410, 2009.

VIEIRA, S. M.; SILVA, R. L.; LEMOS, H. P.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, E. C. C.; REINACH, P. S.; CUNHA, F. Q.; POHLIT, A. M.; CUNHA, T. M. Gastro-protective effects of isobrucein B, a quassinoid isolated from *Picrolemma sprucei*. **Fitoterapia**, v. 95, p. 8-15, 2014.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. Upper Saddle River, Prantice-Hall, ed 4, p. 663, 1999.

ZHANG, L.; FENG, X.; MA, D.; YANG, J.; JIANG, H.; ZHANG, Y.; HE, W. Brusatol isolated from *Brucea javanica* (L.) Merr. induces apoptotic death of insect cell lines. **Pestic Biochem Physiol**, v.107, n. 1, p. 18-24, 2013.