

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE *Himatanthus drasticus*
(Mart.) Plumel-APOCYNACEAE (JANAGUBA)

ELIANE LEITE DE SOUSA

RECIFE-PE
2009

ELIANE LEITE DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE *Himatanthus drasticus*
(Mart.) Plumel-APOCYNACEAE (JANAGUBA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Avaliação e Obtenção de Produtos Bioativos e Naturais

Orientador (a): Prof.(a) Dr.(a) Ivone Antonia de Souza

Co-orientador (a): Dr.(a) Maria Joselice e Silva

RECIFE-PE
2009

Sousa, Eliane Leite de
Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus
drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae (Janaguba) /
Eliane Leite de Sousa. – Recife : O Autor, 2009.
93 folhas : il., fig., tab., quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Himatanthus drasticus* – Atividade antitumoral. I.
Título.

615	CDU (2.ed.)	UFPE
615.1	CDD (22.ed.)	CCS2009-151



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 26 de fevereiro de 2009.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 26 de fevereiro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Ivone Antônia de Souza
(Dept^o de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Ivone Antônia de Souza

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier
(Dept^o Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Haroudo Sátiro Xavier

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. George Chaves Jimenez
(Dept^o de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)

Assinatura: George Chaves Jimenez

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

VICE -DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dalci José Brondani

VICE- CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antonio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Pedro José Rolim Neto

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Beate Seagesser Santos

*“Segue adiante, sem olhar atrás,
Vive cada dia e nada mais.
E o que vier tu vencerás
Só Tu tens a chave, abres ou fecharás”*

Padre Fábio de Melo

À Deus:

Por sua infinita misericórdia

À Meus pais:

*Luiz Joaquim e Irene, pelo incentivo
e apóio irrestrito a minha formação.*

Meu eterno agradecimento!!!...

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo dom da vida, por ter me acompanhado nos momentos mais difíceis iluminando todos os meus caminhos, me encorajando e me abençoando.

A meu pai Luiz Joaquim, um leigo para ciência mais um sábio observador, por ter me apresentado à planta para realização desse trabalho e juntamente com minha mãe, Irene Leite Galvão, me apoiando e incentivando sempre.

Ao meu irmão, amigo, Cícero Ernandes Leite de Souza, peça fundamental para realização desse trabalho, ajudando na coleta da planta e sempre me auxiliando quando necessário.

A minha irmã, Claudiana Leite de Souza, pela paciência, carinho e amizade.

A Jackson Wallace Fernandes Calado, amigo e namorado, por sua compreensão, carinho, sempre prestativo e presente nos momentos que precisei.

A minha tia, Maria Alice de Souza, por sua ajuda, apoio e acolhida em toda minha formação acadêmica. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os meus familiares, que apesar da distância, sempre me incentivaram no meu crescimento profissional.

A minha Orientadora Ivone Antônia de Souza pela amizade, atenção, otimismo, satisfação, paciência e principalmente a confiança e oportunidade a mim depositada na realização desse trabalho.

A Maria Joselice e Silva que foi mais que uma Co-orientadora sempre me incentivando e apoiando, pela sua amizade, compreensão e orientação em todos os momentos.

Ao Prof. Haroudo Sátiro Xavier, pelo convívio, com seu maravilhoso senso de humor e exemplo de ser humano, me mostrou o “caminho das pedras” na escolha da minha planta e é claro pela ajuda, oportunidade, paciência e dedicação como ‘guia’ nos caminhos da Farmacognosia. Muito obrigado.

A Prof. Falba Bernadete Ramos pela paciência e ajuda com a Histologia.

A Prof. Elba Lúcia Amorim por me ajudar sempre que precisei.

A botânica Marlene Barbosa, pela identificação do material botânico.

Ao Hospital Barão de Lucena, especialmente na pessoa de Lucirley de Almeida Carvalho, pela compreensão e liberação para a realização desse trabalho. E a todos os meus colegas de trabalho.

A Ana Ruth Sampaio, pela ajuda, apoio, convivência, por compartilhar conhecimentos, e principalmente, pela sua amizade e até mesmo suas chatices. Valeu Ruth.

A Islã Gomes, pela ajuda incondicional e apoio nas realizações dos experimentos. O que seria de mim sem Isla? Obrigado por tudo.

Aos amigos do Laboratório de Cancerologia Experimental Guilherme Rodrigues, Grace Kelly, Renata freitas, Elizabeth, Sergio Nobrega, Antonione de Assis e Luciana. E aos agregados Fernando, Daniela Pontes e Arthur.

Aos meus amigos que souberam entender ausência durante esse tempo.

As minhas amigas Claudia Patriota e Roberta Seabra pelo incentivo e os bons tempos de convivência.

Aos meus colegas de graduação que fizeram muita falta nos “corredores de Farmácia”, especialmente Sabrina Torres e Leirismar Lucena.

Aos colegas de pós-graduação, pela convivência.

A Sandra Maria de Torres, pela ajuda, paciência e disponibilidade na ajuda da confecção das laminais histológicas.

Ao corpo docente do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFPE, pelos ensinamentos ao longo do curso.

As secretárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, Margarete Valdevino da Silva e Maria da Conceição Barros, pela paciência e ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela cooperação financeira.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

As plantas contêm princípios ativos capazes de curar diversas doenças, no entanto, são poucos os estudos que possibilitam uma visão ampla da grande diversidade das espécies com propriedades terapêuticas. *Himatanthus drasticus* (Janaguba) pertence à família Apocynaceae, é de ocorrência restrita ao Brasil, é usada popularmente como antitumoral, antifúngica, vermífuga, antianêmica e diversos males estomacais. No Nordeste é bastante utilizado no tratamento do câncer, porém quase sem registro na literatura. Este estudo avaliou o perfil fitoquímico, a toxicidade aguda e a atividade antitumoral *in vivo* frente aos tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich do látex e do extrato metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus*. O material foi coletado na Chapada do Araripe no município de Jardim-CE. A determinação da toxicidade aguda foi realizada segundo a metodologia da OECD 423 e o transplante dos tumores sólidos Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich foram realizados de acordo com Stock. Todos os ensaios foram realizados por via oral. No estudo fitoquímico para o extrato metanólico das folhas constatou-se a presença de flavonóides (quercetina e rutina), terpenos, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. No látex, foi encontrado terpenos (β -sitosterol e β -amirina). No ensaio de toxicidade aguda tanto para o extrato metanólico das folhas como para o látex foram verificadas reações estimulantes seguidas por reações depressoras sobre o Sistema Nervoso Central. Não houve óbitos em nenhuma das doses testadas. A atividade antineoplásica frente ao Sarcoma 180 do extrato metanólico das folhas apresentou uma inibição tumoral significativa em relação ao grupo controle nas doses de 300mg/Kg e 400mg/Kg de peso do animal com um percentual de inibição de 67,7% e 68% respectivamente. Já para o Carcinoma de Ehrlich apresentou inibição tumoral significativa para todas as doses testadas chegando a 86,8% para a dose de 300mg/Kg. Para a avaliação antitumoral frente ao Carcinoma de Ehrlich, apenas os animais tratados com a maior dose do látex apresentou redução significativa dos tumores chegando a um percentual de 76,9% de inibição. Para o Sarcoma 180, apesar de ter apresentado uma redução dos pesos médios dos tumores, o látex não apresentou resultado estatisticamente significativo. Na análise histológica foram observadas alterações a nível renal e hepático principalmente para os animais tratados com o látex.

Palavras-chave: *Himatanthus drasticus*, Janaguba, Perfil Fitoquímica, Toxicidade Aguda, Carcinoma de Ehrlich, Sarcoma 180

ABSTRACT

The plants contain active principles capable to cure several diseases, however, there are not many studies that make possible a wide vision of the great diversity of the species with therapeutical properties. *Himatanthus drasticus* (Janaguba) belongs to the Apocynaceae family, it is from restricted occurrence to Brazil, it is used popularly as antitumor, antifungal, vermifuge, antianemical and several stomachal males. It has a long employment history in the cure of the cancer in the Northeast, however almost without report in the literature. This study evaluated the phytochemical profile, the acute toxicity and the antitumor activity against Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma of the latex and of the crude methanolic extract of the leaves of *Himatanthus drasticus*. The material was collected in the Araripe National Forest, Jardim City, Ceará State. It was used OECD 423 methodology for study the acute oral toxicity and Stock methodology for antitumor activity. All the assays had been carried by oral administration. In the phytochemical study of crude methanolic extract from *Himatanthus drasticus* leaves, it was evidenced presence of flavonoids (quercetine and rutine), terpenoids, condensed proanthocyanidines and leucoanthocyanidines. In the latex, it was found terpenoids (β - sitosterol and α -amyrin). In the assay of acute toxicity of the crude methanolic extract of the leaves as for the latex it were verified stimulants reactions followed by depressive reactions on the Central Nervous System. There were not deaths in none of the tested doses. It antitumor activity against Sarcoma 180 in male Swiss albino mice, the extracted presented tumor growth inhibition of 67.7% and 68% at 300mg/Kg and 400mg/Kg of animal body weight respectively. Already for the Ehrlich Carcinoma it presented significant tumoral inhibition for all the tested doses arriving to 86,8% for the dose of 300mg/Kg. For the antitumor evaluation against Ehrlich Carcinoma, just the treated animals with the largest dose of the latex presented significant reduction of the tumors arriving to 76,9% of tumor growth inhibition. For Sarcoma 180, in spite of having presented a reduction of the medium weights of the tumors, the latex did not present statistical resulted significant. In the hystological analysis, alterations were observed at renal and hepatic level mainly for the treated animals with the latex.

Word-keys: *Himatanthus drasticus*, Janaguba, Phytochemical profile, Acute toxicity, Ehrlich Carcinoma, Sarcoma 180

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CTX	Ciclofosfamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
epm	Erro padrão
HE	Hematoxilina-Eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TRAT	Tratado
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

	Revisão Bibliográfica	
Figura 1	<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel – Apocynaceae	23
Figura 2	Folhas (a), flores (b) e frutos (c) de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel – Apocynaceae	23
Figura 3	Sementes de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel – Apocynaceae	24
Figura 4	Caule de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel – Apocynaceae	24
Figura 5	Processo de extração do látex: antes da extração (a), extração (b) e um período depois (c).	25
Figura 6	Estrutura química do triterpeno cinamato de lupeol	30
Figura 7	Estruturas químicas do Paclitaxel (a) e do docetaxel (b)	
	Artigo I	
Figura 1	Efeitos dos extratos de <i>H. drasticus</i> frente ao Sarcoma 180. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).	48
	Artigo II	
Figura 1	Efeitos dos extratos de <i>H. drasticus</i> frente ao Carcinoma de Ehrlich. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).	62
Figura 2	Aspectos histológicos do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com Ciclofosfamida (10mg/kg). A Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1) placas de hepatócitos (2), veias (3) corado com HE. B Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), artéria glomerular (4) corado com HE .Obj.10x.	62
Figura 3	Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich TRAT I (200mg). A Fotomicrografia do fígado. Vaso congesto (1), placas de hepatócitos (2), hepatócitos (3), sinusóides com pontos hemorrágicos (4) corado com HE. Obj. 10x. B Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), veia (4), pontos hemorrágicos	63

(5) corado com HE. Obj. 10x.

Figura 4	Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich TRAT III (400mg). A Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), vasos congestionados (3), vacúolos entre as placas dos hepatócitos (4) corado com HE. Obj. 10x. B Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), vaso renal (4) e congestão entre os túbulos (5) corado com HE. Obj. 10x	63
	Artigo III	
Figura 1	Efeitos do látex de <i>H. drasticus</i> frente ao Sarcoma 180. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).	80
Figura 2	Efeitos do látex de <i>H. drasticus</i> frente ao Carcinoma de Ehrlich. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).	80
Figura 3	Aspectos histopatológicos do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com Cilelofosfamida (10mg/kg). A Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1) placas de hepatócitos (2), veias (3) corado com HE. B Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), artéria glomerular (4) corado com HE. Obj. 10x.	81
Figura 4	Aspectos histopatológicos do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com látex 8 ml/Kg. A Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), vasos congestionados (3), sinusóides com a presença de vacúolos (4) corado com HE. B Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), pontos de congestão entre os túbulos (4) corado com HE. Obj. 10x	81
Figura 5	Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com látex 14 ml/Kg. A Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), vasos congestionados (3), vacúolos entre as placas (4) corado com HE. B Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), raios medulares (4), congestão (5) corado com HE. Obj. 10x	82

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Artigo I Efeitos toxicológicos provocados pelas doses do extrato metanólico da folhas de <i>H. drasticus</i> administrados em camundongos machos albinos Swiss (<i>Mus musculus</i>). Dados obtidos durante os primeiros 30 minutos após administração do extrato.	49
Quadro 1	Artigo II Sistemas de eluição cromatográficos e reveladores utilizados para a caracterização qualitativa dos constituintes químicos do extrato metanólico de <i>H. drasticus</i> .	61
Quadro 1	Artigo III Efeitos toxicológicos provocados pelas doses do látex de <i>H. drasticus</i> administrados em camundongos machos albinos Swiss (<i>Mus musculus</i>). Dados obtidos durante os primeiros 30 minutos após administração do extrato.	78
Tabela 1	Sistemas de eluição cromatográficos e reveladores utilizados para a caracterização qualitativa dos constituintes químicos do látex de janaguba em metanol.	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Família Apocynaceae	21
2.1.1 Gênero <i>Himatanthus</i>	21
2.1.1.1 <i>Himatanthus drasticus</i>	22
2.2. Constituintes químicos e ações farmacológicas do gênero <i>Himatanthus</i>	26
2.2.1 <i>Himatanthus articulatus</i>	26
2.2.2 <i>Himatanthus bracteatus</i>	26
2.2.3 <i>Himatanthus fallax</i>	27
2.2.4 <i>Himatanthus lancifolius</i>	27
2.2.5 <i>Himatanthus obovatus</i>	28
2.2.6 <i>Himatanthus phagedaenicus</i>	28
2.2.7 <i>Himatanthus sucuuba</i>	29
2.2.8 <i>Himatanthus drasticus</i>	29
2.3 Toxicidade aguda de Plantas medicinais.....	31
2.4 Câncer.....	31
2.4.1 Cancerologia experimental	33
2.4.1.1 Carcinoma de Ehrlich	33
2.4.1.2 Sarcoma 180.....	34
2.5 Produtos Naturais e a Terapia Anticâncer.....	35
3. OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. ARTIGO I. Atividade antitumoral do extrato metanólico das folhas de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) frente ao modelo experimental do Sarcoma 180.....	40
RESUMO	40
ABSTRACT	41
4.1 INTRODUÇÃO	41
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.4 CONCLUSÃO	45
4.5 REFERÊNCIAS.....	46
5. ARTIGO II. Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) frente ao ao modelo experimental Carcinoma de Ehrlich	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
5.1 INTRODUÇÃO	52
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.4 CONCLUSÃO	58
5.5 REFERÊNCIAS.....	58
6. ARTIGO III. Avaliação da atividade antitumoral do Látex de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) frente ao Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich	66
RESUMO	66
ABSTRACT	67
6.1 INTRODUÇÃO	67

6.2 MATERIAL E MÉTODOS	69
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6.4 CONCLUSÃO	75
6.5 REFERÊNCIAS	75
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A natureza é uma fonte atrativa de compostos farmacologicamente ativos que são candidatos ao tratamento de patologias devido a enorme diversidade química encontrada nas inúmeras espécies de plantas e microorganismos (ROCHA *et al.*, 2001).

O uso de produtos naturais com finalidade terapêuticas vem desde as primeiras civilizações. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

O número de plantas medicinais estudadas sob a óptica da farmacologia e toxicologia com o intuito de comprovar o seu uso popular e segurança, ainda é muito pequeno. Estima-se que das 250 a 500 mil espécies de plantas existentes no planeta, apenas um pequeno percentual foi investigado fitoquimicamente. Da mesma forma, pouco foi estudado em termos de propriedades biológicas e em muitos casos apenas o “screening” farmacológico foi realizado (PAYNE *et al.*, 1991). Sendo assim, a elucidação dos componentes ativos presentes nos vegetais, bem como de seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a Química Farmacêutica, Bioquímica e Farmacologia (GEBHART, 2000).

As plantas contém inúmeros constituintes e seus extratos, quando avaliados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985). As principais classes de constituintes químicos de plantas que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, compostos fenólicos, alcalóides, cumarinas e flavonóides (MATOS, 1988).

O produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (KINGSTON, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo para o planejamento e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (ORTHOLAND & GANESAN, 2004).

A escolha das plantas a serem avaliadas em um estudo deve ser feita de forma cuidadosa, observando o uso de administração na medicina popular, bem como os possíveis efeitos tóxicos observados. Aliado a isto, faz-se necessário o conhecimento e experiência da população e da cultura local ou informações sobre composição química, relacionada ao gênero ou família e dos possíveis compostos com atividade química e farmacológica definidas presentes na planta em estudo (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Atualmente a estimativa é de que cerca de 40% dos fármacos empregados na terapêutica, são provenientes de fontes naturais, sendo 25% de plantas. Este percentual aumenta ainda mais se nos restringirmos apenas aos fármacos antitumoral e antibióticos (SHU, 1998). Das 252 drogas, consideradas básicas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem natural e um número significativo destes são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Estima-se, ainda, que 80% da população mundial faça uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (CRAGG *et al.*, 1997). Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996). Com esse grande número de espécies, torna-se um forte candidato ao descobrimento de novos fármacos com ação terapêutica.

Entretanto, no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Muitas vezes, são empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. E as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro ainda são incipientes (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

Diante dos fatos, em 16 de março de 2004 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aprova a resolução RDC- nº 48 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. E define fitoterápico como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentação tecnocientífica em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

No intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo, criou-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que foi aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Essa política traz dentre suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápico; e o provimento do acesso aos usuários do Sistema Único de Saúde-SUS (BRASIL, 2006).

Foi publicada em 10 de dezembro de 2008 a Portaria Interministerial nº 2.960, que aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional que deliberará sobre o assunto. O Comitê tem atribuição de monitorar e avaliar o referido programa e possui caráter consultivo e deliberativo. É composto por representantes do Governo e da Sociedade Civil (BRASIL, 2008a).

Ainda em 2008, o Ministério da Saúde adotou o manual de normas técnicas da Organização mundial de Saúde para ensaios clínicos com fitoterápicos cujo título é: Instruções operacionais: informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com Fitoterápicos. Esse processo aumentaria as chances de determinar quais são as plantas medicinais e os fitoterápicos que apresentam efetividade e segurança para o uso na prática clínica e no tratamento de doenças (BRASIL, 2008b).

Diante de tantos exemplos de drogas obtidas de produtos naturais, há um grande interesse da comunidade científica em continuar a busca por novos medicamentos fitoterápicos com atividade biológica, tanto para servir como novas drogas utilizadas na terapêutica como para ser uma possível ferramenta farmacológica no auxílio à pesquisa pré-clínica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Família Apocynaceae

A família Apocynaceae compreende aproximadamente 200 gêneros presentes em duas subfamílias, Apocynoideae e Plumerioideae e 2000 espécies, distribuídas predominantemente pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. A maioria contém látex em laticíferos não-articulados, ramificados ou não-ramificados, e vivem tanto nos campos como nas matas. (JOLY, 2002).

Os constituintes químicos da família incluem glicosídeos cardioativos e cianogenéticos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitóis e triterpenóides. Constituintes da subfamília Plumerioideae incluem uma grande variedade de alcalóides indólicos, mais de 500 nos gêneros *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Hunteria*, *Pleiocarpa*, *Rauwolfia*, *Tabernaemontana* e *Voacanga* (EVANS, 2002).

2.1.1 Gênero *Himatanthus*

Por apresentarem características morfológicas semelhantes Mueller Argoviensis classificou as espécies *Himatanthus* e *Plumeria* como sinônimos (MABBERLEY, 1997). Woodson em 1938, em revisão ao trabalho de Mueller, confirmou a proposta de autoria de Willdenow, que previa a separação dos gêneros *Plumeria* e *Himatanthus*. Examinando todas as espécies e as referências bibliográficas, Plumel em 1991, confirmou a separação dos gêneros em questão, fornecendo informações adicionais baseando-se na pesquisa de abundante material botânico. Ainda foi possível distinguir 13 espécies desse gênero, entre as quais, várias espécies descritas inicialmente por Mueller Argoviensis e reclassificadas por sinonímia por Woodson, sendo elas: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Himatanthus attenuatus* (Benth.) Woodson, *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Himatanthus fallax* (Müll. Arg.) Plumel, *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Himatanthus*

phagedaenicus (Mart.) Woodson, *Himatanthus semilunatus* Markgr., *Himatanthus speciosus* (Müll. Arg.) Plumel, *Himatanthus stenophyllus* Plumel, *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson e *Himatanthus tarapotensis* (K. Schum.) Plumel.

As espécies do gênero *Himatanthus* apresentam sua distribuição restrita a região neotropical ocorrendo desde o Panamá até o sudeste do Brasil, tendo como limite sul o trópico de Capricórnio. A maioria das espécies do gênero, ocorre na região amazônica, com as demais espécies distribuídas fora da região amazônica (extra-amazônica) na costa e no centro-oeste do Brasil. As espécies *H. drasticus* e *H. bracteatus* apresentam distribuição restrita ao Brasil, ocupando respectivamente áreas de cerrado, campo rupestre, caatinga e de mata atlântica (SPINA, 2004).

2.1.1.1 *Himatanthus drasticus*

Himatanthus drasticus (Figura 1) pertence à família Apocynaceae e é de ocorrência exclusiva do Brasil nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Pará e Roraima. É conhecida popularmente como tiborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, e como janaguba no Ceará, pau-de-leite no Piauí, joanaguba no Rio Grande do Norte (PLUMEL, 1991). Cresce em altitudes de 200-1500 metros e em vegetação de transição entre Cerrado e Caatinga. Floresce e frutifica praticamente o ano todo (SPINA, 2004).

No Ceará, essa espécie ocorre com maior frequência na Chapada do Araripe, extremo sul do estado, onde é explorada pela população daquela localidade, cotidianamente e sem controle (AMARO *et al.*, 2006a).

A janaguba é uma espécie arbórea que pode atingir sete metros de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos, folhas obovais, subcoriáceas, brilhantes, glabras, verde escuro, com ápice arredondado a obtuso e pecíolos curtos. Possui flores brancas, aromáticas, fruto tipo folículo, em forma de chifre medindo entre 15 e 20cm de comprimento por 2,5cm de largura (Figura 2), e sementes aladas (Figura 3). A casca é rugosa (Figura 4) e exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular, principalmente pelos habitantes da região de ocorrência (LORENZI & MATOS, 2002; MODESTO, 1997; PLUMEL, 1991).



Figura 1. *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel- Apocynaceae.

Foto: Eliane Leite de Sousa (Chapada do Araripe-Jardim-CE), 2008.

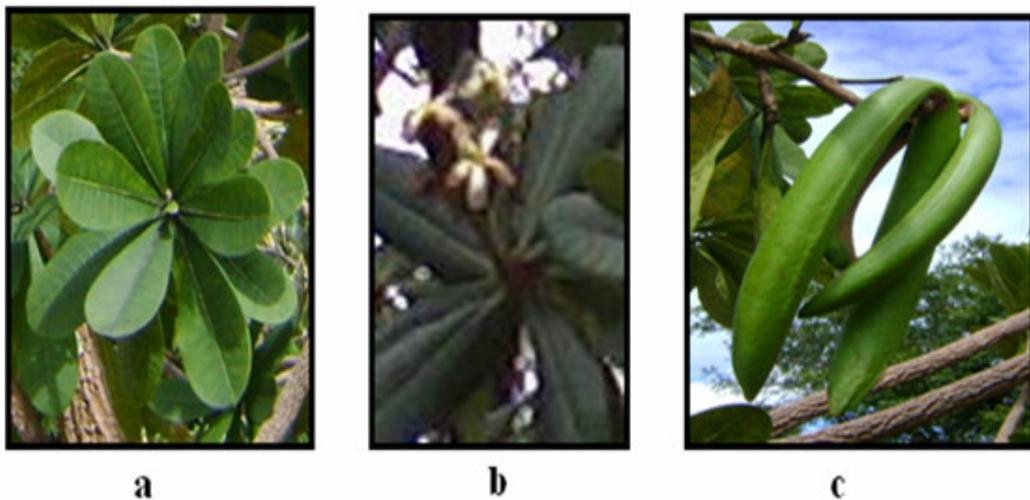


Figura 2. Folhas (a), flores (b) e fruto (c) de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel- Apocynaceae.

Foto: Eliane Leite de Sousa (Chapada do Araripe-Jardim-CE), 2008



Figura 3. Sementes de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel- Apocynaceae.

Foto: Eliane Leite de Sousa (Chapada do Araripe-Jardim-CE), 2008



Figura 4. Caule de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel- Apocynaceae.

Foto: Eliane Leite de Sousa (Chapada do Araripe-Jardim-CE), 2008

Segundo Modesto (1997), o critério estabelecido para extração do látex (Figura 5) é que a planta tenha em média 22cm de perímetro, sendo produzido um corte no floema (casca), que varia conforme o perímetro da planta, sendo 2 cortes (um de cada lado) para aqueles considerados finos em torno de 22cm, 3 e 4 cortes para as plantas com espessuras superior a 22cm. Em todos os casos devem ser deixadas quinas para regeneração da casca.

Após a extração, o látex é diluído em água na proporção de 1:10, armazenado em recipiente de vidro para ser comercializado na região (MODESTO, 1997).

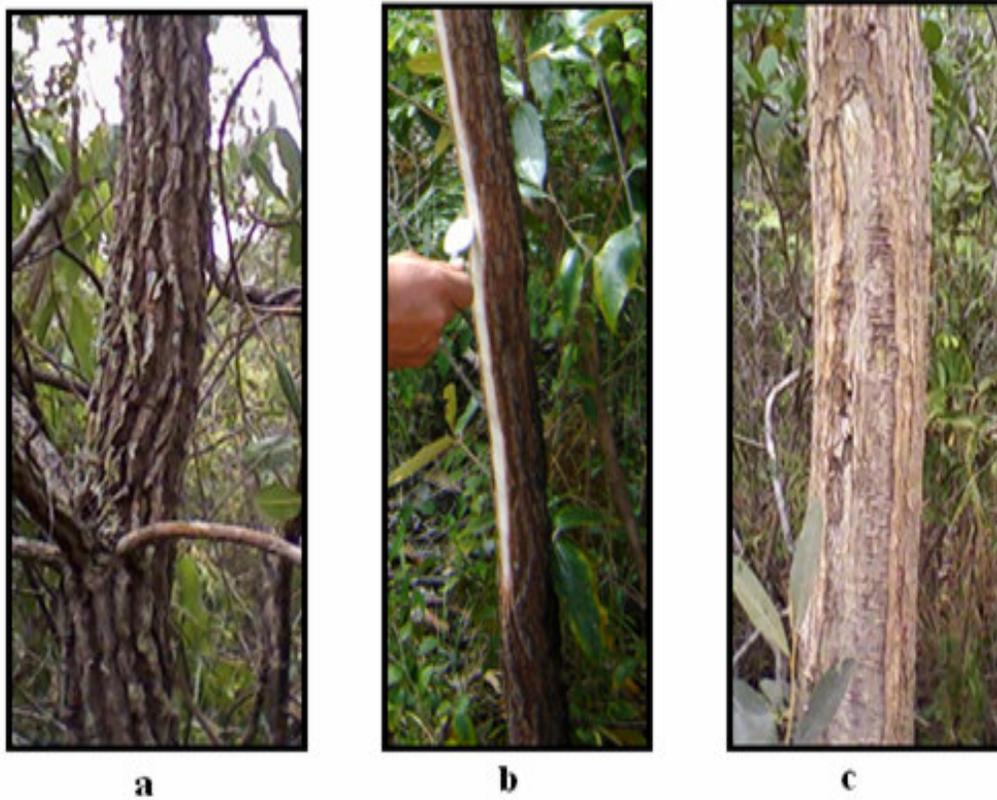


Figura 5. Processo de extração do látex: Caule antes da extração (a), extração (b) e um período depois (c).

Foto: Eliane Leite de Sousa (Chapada do Araripe-Jardim-CE), 2008

2.2. Constituintes químicos e ações farmacológicas do gênero *Himatanthus*

A identificação de metabólitos vegetais de interesse terapêutico continua sendo uma área de grande importância para a saúde humana. O melhoramento de plantas pode contribuir para o aumento significativo da produção de substâncias que normalmente é produzida em baixas quantidades (SIMÕES *et al.*, 2004).

Algumas espécies do gênero *Himatanthus*, vem sendo estudadas com relação a sua constituição química. Com isso, várias classes químicas e algumas substâncias de interesse medicinal foram isoladas e relatadas nos últimos anos, porém muito pouco se conhece a respeito do potencial farmacológico dessas substâncias.

Os metabólitos mais isolados de *Himatanthus* e *Plumeria* são os iridóides, que são compostos monoterpênicos com a estrutura do núcleo do tetraidrociclopentano-pirano (KUBLINSKI, 2000). Foram encontrados na literatura estudos a respeito das espécies a seguir:

2.2.1 *Himatanthus articulatus*

É encontrada na região do Amazonas, seu látex e casca é usado popularmente como sifilítico. O estudo fitoquímico da casca e da folha permitiu o isolamento e identificação de stigmasterol, sitosterol, cicloartenol, 3 β -cinamato de α -amirina, 3 β -cinamato de β -amirina, 3 β -acetato de α -amirina, 3 β -acetato de β -amirina, 3 β -cinamato de lupeol, 3 β -acetato de lupeol, ácido ursólico, metilmioinositol, ácido 1 β -O- β -D-glucopiranosilplumérico, 1 β -O- β -D-glucopiranosilplumerídio, plumericina e isoplumericina (BARRETO *et al.*, 1998).

2.2.2 *Himatanthus bracteatus*

Em 1947, Lima e colaboradores estudaram essa espécie e demonstraram que o extrato das sementes apresentou grande inibição para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Anos depois, pesquisadores do Departamento de Antibióticos (UFPE) identificaram no látex, as substâncias químicas acetato de β -amirina e acetato de lupeol que apresentaram inibição

significativa para os tumores sólidos carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180, porém não apresentou atividade antimicrobiana (MELLO *et al.*, 1975).

2.2.3 *Himatanthus fallax*

A respeito dessa espécie só foi encontrada uma citação na literatura ao que relata o isolamento dos compostos químicos plumericina e isoplumericina as quais já tinham sido isolados anteriormente em outras espécies de *Himatanthus* (ABDEL-KADER *et al.*, 1997).

2.2.4 *Himatanthus lancifolius*

Popularmente conhecida como Agoniada e usada para o tratamento de várias doenças de pele, tem ação febrífuga, emenagoga, purgativa, antiúlcera, antiasma, antisifilis e principalmente como estimulante das contrações uterinas, auxiliando na concepção e regularizando a menstruação (CORRÊA *et al.*, 1998).

Uma glicosilplumeridio foi isolado de *H. lancifolius* (BARRETO *et al.*, 1998). Estudos com frações rica em alcalóide da casca dessa espécie, apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SOUZA *et al.*, 2004). Apresentou também alterações na resposta da musculatura lisa vascular e não vascular, envolvendo o bloqueio da entrada de cálcio, mudança na utilização ou mobilização (RATTMANN *et al.*, 2005) e efeito gastroprotetor nos experimentos de indução de lesão gástrica por etanol e redução de ácido gástrico induzido por ligadura pilórica (BAGGIO *et al.*, 2005).

Em outras pesquisas com a uleína extraída da *H. lancifolius* mostrou ação anti-ulcera (FINAU *et al.*, 1996) e estimulante nas vias de produção de óxido nítrico através da enzima NOS (SOUZA *et al.*, 2007).

2.2.5 *Himatanthus obovatus*

O chá das folhas de *H. obovatus*, também conhecida no Brasil como tiboma, Angélica, pau-de-leite, janaúba e leiteiro. È utilizado no Norte do Brasil como depurativo, no tratamento de pressão alta, das manchas na pele, espinhas e coceiras. O seu látex é utilizado no tratamento de úlceras estomacais (COELHO & Azevedo, 2000).

Foi isolado dos extratos de *H. obovatus* duas lignanas (pinorestinol e isolariresinol), sendo esta a segunda descrição de lignanas no gênero *Himatanthus*, três nor-isoprenóides (classe de compostos não isolada até o momento deste gênero) e um iridóide. O iridóide isolado já havia sido isolado de *H. fallax* e *H. phagedaenicus*, mas não de *H. obovatus* e duas misturas de terpenos (acetato de lupeol + acetato de α -amirina + acetato de β -amirina + acetil germanicol e stigmasterol + β -sitosterol + campesterol) (LIMA , 2005).

Em outros trabalhos *H. obovatus* foi testado sua atividade antiplasmadio e contra larvas do *Aedes aegypti* porém não apresentou resultados significativos (MESQUITA *et al.*, 2007; OMENA *et al.*, 2007).

2.2.6 *Himatanthus phagedaenicus*

È conhecida vulgarmente como leiteiro, banana de papagaio e angélica do mato. O látex desta planta é de largo emprego na medicina popular como anti-helmíntico, em afecções herpéticas, úlceras, psoríase e verrugas (PIO CORREA, 1984).

Vanderlei e colaboradores (1991), identificaram a presença de α -amirina, β -amirina, lupeol, β -sitosterol, plumericina, alamandina, isoplumericina, plumerideo e ainda glucosídeos e sacarose. O ácido β -dihidropumericínico foi identificado também nesta espécie (VELOSO *et al.*, 1999).

Estudos farmacológicos anteriores demonstraram uma inibição da diurese induzida por sobrecarga hídrica em ratos, aumento da glicemia em ratos aloxano-diabéticos, aumento da dor induzida por ácido acético em camundongos, contração das preparações isoladas de musculatura esquelética (frênico-diafragma de rato e reto-abdominal de sapo), além de um efeito contrátil acentuado na musculatura lisa intestinal de íleo isolado de cobaia (VANDERLEI & SOUZA BRITO, 1985). A *H. phagedaenicus* apresentou ação espasmogênica em musculatura lisa de íleo (VANDERLEI & SOUZA BRITO, 1989)

2.2.7 *Himatanthus sucuuba*

É uma planta conhecida na região norte do Brasil como sucuuba, janaguba ou sucuba. Esta planta é amplamente utilizada na medicina popular como antitumoral, antifúngica, vermífuga e anti-anêmica (SILVA *et al.*, 1998). É a espécie mais citada na literatura.

Os compostos químicos mais isolados dessa planta são iridóides, encontrados no caule e no látex, como fulvoplumierina, plumericina que apresentou atividade contra o carcinoma nasofaringe epidermóide humano (PERDUE & BLOMSTER, 1978), isoplumericina, acetato de lupeol, cinamato de α -amirina e cinamato de lupeol (SILVA *et al.*, 1998; WOOD *et al.*, 2001), ao qual foram evidenciadas as atividades antiinflamatória e analgésica (MIRANDA *et al.*, 2000). Na raiz também foram encontrados esses iridóides ao qual apresentou inibição oxido de nítrico e interferon γ (SOUZA *et al.*, 2006). Os depsídeos isolados da casca, ácido confluêntico e ácido metilperlatólico, apresentaram atividade como inibidores da enzima beta monoamino-oxidase (ENDO *et al.*, 1994) e Amaral e colaboradores em 2007 isolaram um novo iridóide do látex de *H. sucuuba* o ácido 15-desmetilplumierídeo.

Com base em estudos farmacológicos, foram evidenciados uma baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas, indicando que seu consumo é seguro na espécie humana no tratamento de gastrites e hemorróidas (GUERRA & PETERS, 1991), atividade sobre a pressão sanguínea; musculatura lisa; permeabilidade capilar e cicatrizantes (VILLEGAS *et al.*, 1997). A *H. sucuuba* também apresentou atividade antileishmaniose (CASTILLO *et al.*, 2007).

2.2.8 *Himatanthus drasticus*

Himatanthus drasticus, como outras espécies de *Himatanthus*, foram escassamente relatadas em relação aos seus estudos fitoquímicos e suas atividades biológicas. Recentemente foi publicado estudos com extrato da casca onde foi isolado o triterpeno cinamato de lupeol (Figura 6). Com extrato etanólico foi realizado a atividade citotóxica com *Artemia salina*, antimicrobiana e analgésica, porém não apresentou atividade antimicrobiana para os microorganismos testados (COLARES *et al.*, 2008a).

Outro trabalho com ação farmacológica dessa espécie foi, o efeito gastroprotetor do látex através de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina (COLARES *et al.*, 2008b).

O leite da janaguba, como é chamado o látex pela população local, tem uma longa história de emprego na cura do câncer no Nordeste, porém, quase sem registro na literatura (AMARO *et al.*, 2006b), também é utilizado para o tratamento de verminoses, gastrites e artrites.

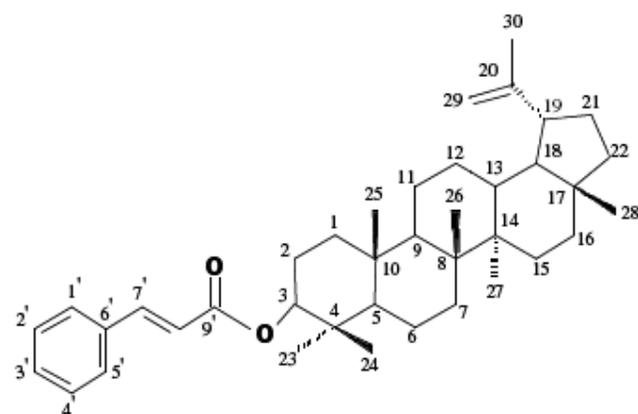


Figura 6: Estrutura química do triterpeno cinamato de lupeol

2.3 Toxicidade aguda de Plantas medicinais

O uso de uma espécie vegetal pela população não é suficiente para validar sua segurança e efetividade. Os remédios elaborados a partir de plantas são frequentemente indicadas ou prescritos por pessoas comuns ou mesmos religiosos em rituais e não menos freqüente o resultado é a intoxicação que acontece logo após a ingestão (RATES, 2001)

A toxicidade aguda é um estudo conduzido antes que os ensaios farmacológicos sejam iniciados, e representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações acerca dos riscos sobre a saúde, resultantes de uma exposição de curta duração pela via selecionada (DI STASI, 1996).

No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o produto em teste ou, eventualmente, com doses parceladas em período não superior a 24 horas. A avaliação dos resultados imediatamente após esse período, permite conhecer a espécie mais sensível e o índice de letalidade. A manutenção de alguns animais tratados agudamente por 1 e 14 dias, permite também, verificar os efeitos tardios do tratamento e se a recuperação da ação tóxica ocorre durante esse período de observação dos animais sobreviventes (SIMÕES *et al.*, 2004)

2.4 Câncer

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer de origem latina (*cancer*) significando "caranguejo", originalmente referia-se aos carcinomas, que se estendem aos tecidos adjacentes como pernas de um caranguejo, mas hoje em dia, também é aplicado às demais neoplasias (OSÓRIO *et al.*, 2001).

Atualmente, a definição de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos de cânceres, correspondendo aos vários sistemas e células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadirem tecidos e órgãos, próximos ou distantes de onde se originaram (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer surge de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais que sofrem transformações até se tornarem malignas. Todos os processos desde a iniciação tumoral, transformação, invasão até metástase ocorrem em múltiplas etapas e podem envolver dezenas, até centenas de genes, por meio de mutações intragênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidades genômicas e mecanismos epigenéticos (como metilação e acetilação). Em tecidos normais, as taxas celular estão em equilíbrio. No câncer, esse equilíbrio é rompido por perda no controle de crescimento celular e/ou dos mecanismos de apoptose. Os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor desempenham um papel fundamental no controle do ciclo celular, por meio de uma rede de interações protéicas complexas estimulatórias e inibitórias (GUIMARAES, 2006).

O aumento crescente da incidência do câncer, segundo estatísticas apresentadas em todo mundo, é consequência do aumento demográfico, da longevidade e, provavelmente, da entrada de novos fatores cancerígenos causais ou casuais, cuja natureza é pouco conhecida. A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento dos diversos tipos de cânceres estão relacionados a múltiplos fatores, como idade, sexo raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (GOMES, 2003).

Como as condições associadas ao risco de câncer são mais prevalentes em populações urbanas de regiões industrializadas, é comum se pensar que o câncer é uma doença do desenvolvimento. No entanto, é justamente nos países em desenvolvimento que se verifica um grande aumento na incidência e na mortalidade. Cerca de 50% do total de óbitos e mais 60% dos novos casos ocorrem nestes países. Estima-se que em 2020 ocorram 15 milhões de casos novos para essa patologia (INCA, 2006).

A incidência do câncer no Brasil ocorre de forma crescente, como em todo o mundo, num ritmo que acompanha o envelhecimento populacional decorrente do aumento da expectativa de vida. O SUS registrou 423 mil internações por neoplasias malignas em 2005, além de 1,6 milhões de consultas ambulatoriais em oncologia (INCA, 2006). Até novembro de 2008 já tinham sido registrados em torno de 498 mil internações por neoplasias (DATASUS, 2009).

Além da cirurgia, radioterapia e tratamento "biológico", a quimioterapia ainda é os meios mais efetivos para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e prolongar a sobrevivência (WANG *et al.*, 2008).

2.4.1 Cancerologia experimental

Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. A maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos humanos (KAMB, 2005).

A regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados são fatores diretamente relacionados à atividade antitumoral. Schabel e colaboradores, em 1977, demonstraram que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser iniciado até 48h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam dado início a formação do nódulo tumoral.

2.4.1.1 Carcinoma de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906 como um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932 o tumor foi convertido para a forma ascítica (DAGLI, 1989). O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos (MATSUZAKI et al., 2003)

A forma sólida do tumor de Ehrlich apresenta na sua histologia extensas áreas de necrose. Estas são oriundas da morte das células neoplásicas. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são também comumente verificadas no tumor. O mesmo possui poucas células inflamatórias e estroma escasso. Alto índice mitótico e de invasividade caracterizam essa neoplasia (GABAI *et al.*, 1995; DAGLI, 1989). O tecido tumoral ao exame macroscópico, apresenta-se como uma massa de consistência borrachóide, superfície lisa, formato irregular. Ao se incisar a massa tumoral há a presença de pontos avermelhados e

áreas esbranquiçadas, que são, respectivamente, pontos hemorrágicos e áreas de necrose. Há ao redor da massa tumoral uma pseudocápsula, o que justifica seus limites bem definidos quando da visualização da mesma durante o procedimento cirúrgicos (DAGLI, 1989)..

2.4.1.2 Sarcoma 180

O Sarcoma 180 foi inicialmente identificado no Croker Laboratory (Universidade da Columbia, Nova Iorque) em 1914. É um tumor de natureza sólida, que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa e manteve-se sem alterações até os dias atuais. A forma sólida caracteriza-se por ter um rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10mm por volta de sete dias após o transplante. Pode causar metástase para os pulmões o que pode ocorrer quando os tumores estão com mais de quatro semanas de evolução (SCHABEL *et al.*, 1977).

Estudos de microscopia eletrônica mostraram contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando ser esta neoplasia um carcinoma. No entanto, outros estudos demonstraram que suas células não produzem laminina, o que não permite sua caracterização como de origem epitelial. Suas células são de fácil obtenção, sendo utilizadas em vários centros de pesquisa e, após a inoculação o tumor desenvolve-se em 90 a 100% dos casos (BUCCHI, 2002).

2.5 Produtos Naturais e a Terapia Anticâncer

Um importante avanço no tratamento do câncer foi a descoberta de drogas a partir de plantas medicinais. Muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido direcionadas para o combate ao câncer (NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004).

Desde 1955, o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, vem realizando triagens pré-clínicas de compostos e materiais, que incluem extratos de origem natural. Mais de 400.000 compostos, de origem sintética e natural foram testados para avaliar atividade anticâncer, incluindo 180.000 derivados de microrganismos e 114.000 extratos vegetais. Entre os anos de 1990 e 1996, aproximadamente, vinte agentes anticâncer, os quais incluem produtos naturais puros ou modificações semi-sintéticas de material natural, foram aprovados para o mercado (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

Dentre as drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40 % foram produtos naturais ou derivados de produtos naturais e outros 8 % foram substâncias sintéticas inspiradas em moléculas naturais (NEWMAN *et al.*, 2003).

Após a descoberta e o sucesso do paclitaxel (Taxol®) (Figura 7a), isolado da *Taxus brevifolia* por Wani e colaboradores (1971), a busca de novos produtos naturais, com atividade anticâncer por mecanismos de ação similar ao deste fármaco ou por outras vias de ação, recebeu atenção especial por parte de diferentes grupos de pesquisa. Isso pode ser confirmado pelo número de promissores compostos naturais isolados de diferentes fontes (MAGALHÃES, 2005). Nesse seguimento a fim de buscar fármacos mais específicos Potier e colaboradores, do Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), em Gif-sur-Yvette França, descobriram, em 1986, o docetaxel (Taxotere®) (Figura 7b) que é, em alguns casos, 1,6 vezes mais ativo que o taxol (RINGEL & HORWITZ, 1991)

Outras alternativas para a terapia anticâncer tem sido encontrado no oceano e nos microorganismos uma vasta fonte de compostos com importante potencial terapêutico. Exemplos de drogas obtidas de microorganismos que já foram aprovadas para uso clínico são: actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina C e estreptozocina (ROCHA *et al.*, 2001).

O Brasil é uma rica fonte de plantas medicinais, e um grande número são usados na medicina popular, ao qual apenas alguns foram investigados cientificamente. Muitas delas têm seu uso bastante difundido entre a população como é o caso da Janaguba, que é utilizada principalmente para o câncer entre outras enfermidades, porém sem comprovação científica.

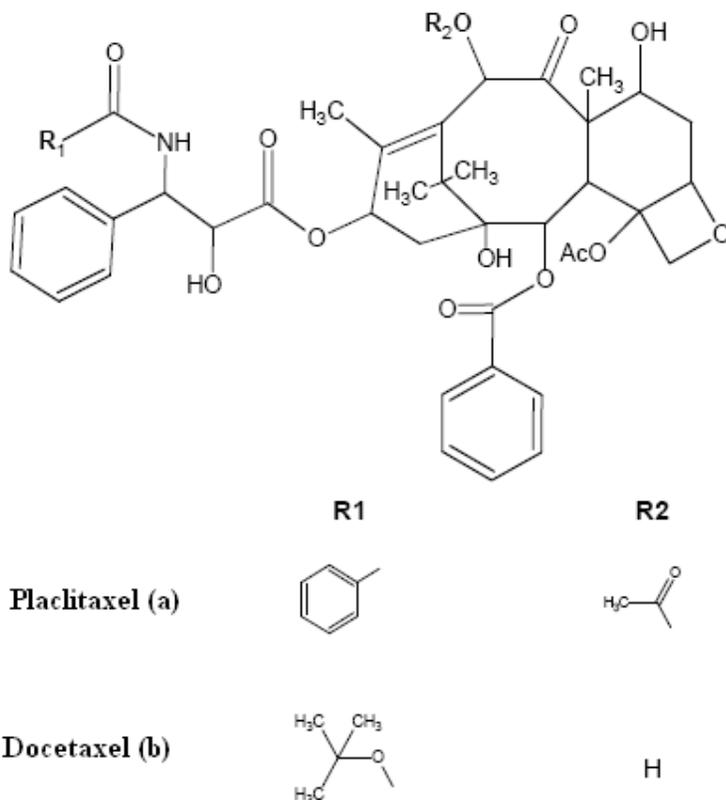


Figura 7. Estruturas químicas do Paclitaxel (a) e do docetaxel (b)

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antitumoral do extrato metanólico das folhas e do látex de *Himatanthus drasticus* frente aos tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, identificados com análises histopatológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar botanicamente o vegetal;
- Avaliar o perfil fitoquímico das folhas e do látex de *Himatanthus drasticus*;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus*;
- Avaliar a toxicidade aguda do látex de *Himatanthus drasticus*;
- Analisar a atividade antineoplásica do extrato metanólico das folhas *Himatanthus drasticus* frente aos tumores Sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich ;
- Analisar a atividade antineoplásica do látex de *Himatanthus drasticus* frente aos tumores Sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich ;
- Avaliar os efeitos antitumorais do extrato metanólico das folhas e do látex de *Himatanthus drasticus* através de análise quantitativa e histopatológica.

4. ARTIGO I

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.

4. ARTIGO I

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE (JANAGUBA) FRENTE AO MODELO EXPERIMENTAL DO SARCOMA 180

Eliane Leite de Sousa, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues¹, Maria Joselice e Silva¹, Cicero Ernandes Leite de Sousa², Ivone Antonia de Souza³

1- Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

2-Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri-URCA

3-Departamento de Antibióticos, Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

RESUMO

Himatanthus drasticus conhecida popularmente como janaguba, tem uma longa história de emprego na cura do câncer no nordeste brasileiro, porém quase sem registro na literatura. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antitumoral do extrato bruto metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus* frente ao modelo experimental do sarcoma 180 e avaliar sua toxicidade aguda. A determinação da toxicidade aguda foi realizada segundo a metodologia da OECD 423 e o transplante do tumor sólido de sarcoma 180 foi realizado seguindo a metodologia de Stock. O extrato apresentou baixa toxicidade nas doses testadas (50, 300 e 2000mg/Kg) por via oral. A atividade antineoplásica em camundondos albinos Swiss machos (*Mus musculos*) apresentou uma inibição tumoral significativa em relação ao grupo controle nas doses de 300mg/Kg e 400mg/Kg de peso do animal com um percentual de inibição de 67,7% e 68% respectivamente.

Unitermos: *Himatanthus drasticus*, Janaguba, Sarcoma 180, Toxicidade aguda.

ANTITUMORAL ACTIVITY OF THE LEAVES OF *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL-APOCYNACEAE (JANAGUBA) AGAINST SARCOMA 180 MODEL

ABSTRACT

Himatanthus drasticus, known as janaguba, is used popularly in Brazilian Northeast for treat the cancer, but there is no report about this. In the present study we have investigated for the first time, the antitumoral activity of crude methanolic extract from *Himatanthus drasticus* leaves against tumor Sarcoma 180 and its acute oral toxicity. It was used OECD 423 methodology for study the acute oral toxicity and Stock methodology for antitumor activity. The crude extract presented low toxicity in the tested doses (50, 300 and 2000mg/Kg) for oral administration. It also presented activity against tumor Sarcoma 180 in male Swiss albino mice with tumor growth inhibition of 67.7% and 68% at 300mg/Kg and 400mg/Kg respectively.

Uniterms: *Himatanthus drasticus*, Janaguba, Sarcoma 180, Acute toxicity.

4.1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor (OSÓRIO *et al.*, 2001).

Um grande número de produtos naturais tem sido estudado quanto à sua atividade antitumoral, em vários modelos experimentais. Isto resultou no surgimento de várias drogas anticâncer efetivas (RAMAKRISHNA *et al.*, 1984). Os agentes anticâncer atualmente em uso incluem um grande número de moléculas retiradas de vegetais. Entre estas se encontram os alcalóides da vinca: vimblastina e vincristina, obtidos da *Catharanthus roseus* (ALMEIDA *et al.*, 2005); o paclitaxel, diterpenóide retirado de *Taxus brevifolia* (SOUZA, 2004); o alcalóide camptotecina, da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* (SILVA *et al.*, 2003), e muitos outros.

O gênero *Himatanthus*, pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie arbórea que cresce até 7m de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos. Sua distribuição geográfica vai desde o sudeste do Brasil até a Guiana Francesa, Suriname e Guiana (PLUMEL, 1991). No Ceará (Brasil), a espécie mais encontrada é a *H. drasticus* e ocorre com maior frequência na Chapada do Araripe, extremo sul do estado. É conhecida popularmente neste estado como janaguba. Sua casca é rugosa e exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular (AMARO *et al.*, 2006a).

A janaguba tem uma longa história de emprego na “cura” do câncer no Nordeste do

Brasil, porém quase sem registro na literatura (AMARO *et al.*, 2006b).

Colares e colaboradores (2008) isolaram e identificaram do extrato etanólico da casca o triterpeno lupeol cinamato que provavelmente é uma substância com perspectiva de apresentar atividade antitumoral. Em outras espécies do gênero como *H. succuuba* foi isolado o iridóide fulvoplumierina que apresentou atividade contra o carcinoma nasofaringe epidermóide humano (PERDUE & BLOMSTER, 1978).

Entretanto, alguns vegetais, embora muito utilizados, apresentam reações consideradas nocivas em organismos vivos. A avaliação quanto à toxicidade das plantas é fundamental e deve-se considerar que as plantas não têm somente o efeito terapêutico esperado, mas sofrem biotransformação e seus produtos podem ser tóxicos a ponto de causar danos à saúde (HILARY *et al.*, 2005).

Baseado neste princípio, o objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antitumoral do extrato bruto metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus* frente ao modelo experimental do Sarcoma 180 e avaliar sua toxicidade aguda.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Botânico

As folhas de Janaguba foram coletadas em dezembro de 2007, na Chapada do Araripe, município de Jardim (Ceará). A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob número 48.961.

4.2.2 Obtenção do Extrato

Foram utilizadas as folhas de *Himatanthus drasticus* para a formulação do extrato. A secagem foi realizada a temperatura ambiente em local seco e arejado por aproximadamente sete dias. Realizou-se três extrações a frio, do material triturado em metanol submetido à agitação contínua (48 horas para cada extração). Estes extratos foram filtrados e evaporados a vácuo para fornecer o material bruto concentrado com rendimento de 20,12%.

4.2.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos e peso entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro), temperatura ($22 \pm 2^\circ$) e receberam água e ração *ad libitum*. O manuseio dos animais durante o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (Processo número 23076.03566/2008-71).

4.2.4 Toxicidade Aguda

A determinação da toxicidade aguda foi realizada segundo a metodologia da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423). Os animais foram divididos em grupos de três. Permaneceram sem alimento por um período de 8 horas antes do experimento, recebendo água *ad libitum*.

O extrato da folha de *Himatanthus drasticus* foi administrado em única dose por gavagem. As dosagens utilizadas foram de acordo com a OECD em três concentrações fixas, 50, 300 e 2000 mg/kg. Os animais foram observados individualmente, depois da administração do extrato, durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com atenção especial para as primeiras 4 horas, e diariamente durante 14 dias. Todas as observações foram registradas individualmente para cada animal e após os 14 dias o ensaio foi repetido.

4.2.5 Atividade Antitumoral

O transplante do tumor sólido de Sarcoma 180 foi realizado seguindo a metodologia de Stock *et al.*, (1955) modificada. O tratamento teve início 48 horas após o transplante dos tumores. Os animais foram divididos em grupos (n=5) e subdivididos em grupo padrão (ciclofosfamida, CTX, 10 mg/kg), grupo controle (solução salina 0,9%) e os grupos tratados I, II e III que receberam o extrato metanólico da janaguba, nas doses de 200, 300 e 400 mg/Kg respectivamente. Todas as substâncias foram administradas por via oral durante sete dias. No oitavo dia os animais foram sacrificados e os tumores retirados, dissecados, pesados e em seguida calculada a diferença entre os grupos tratados e controle para se obter o índice de inibição tumoral de acordo com a fórmula abaixo (MACHON *et al.*, 1981).

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Onde:

TWI% = % de inibição tumoral

C = Média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle

T = Média dos pesos dos tumores dos animais do grupo tratado

4.2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste “*t*” de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $< 0,05$.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o extrato em teste por um período aproximadamente de 24 horas (SIMÕES, 2003).

A administração por via oral do extrato metanólico das folhas de *H. drasticus* nas doses, 50 e 300mg não apresentaram nenhuma alteração comportamental nos animais nos primeiros 30 minutos observados. E ao final dos 14 dias de observações permaneceram sem alterações.

Na dose de 2000mg nos primeiros 15 minutos de observações os animais apresentaram reações excitatórias e estimulantes, tais como: exoftalmia, agitação, movimentos de vibrissas, estereotipados e circulares, além de aumento da frequência respiratória, postura em garra, edema de focinho, irritabilidade e reação de fuga. Após esse período, reações depressoras tais como abaixamento do trem posterior e prostração tornaram-se mais evidentes, resultados mostrados na tabela 01. Ao final dos 14 dias não foi observado nenhum óbito e nem mudanças comportamentais. As reações de excitabilidade seguida por depressiva, sugerem a redução da quantidade de neurotransmissores estimulantes liberados durante a fase excitatória (FAI *et al.*, 2005).

Com os resultados obtidos e de acordo com as normas estabelecidas pela OECD 423, o extrato metanólico de *H. drasticus* apresentou baixa toxicidade por via oral.

Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intrincada patogênese do câncer em seres humanos. A maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de

desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (KAMB, 2005).

O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

A atividade antineoplásica do extrato metanólico das folhas de *H. drasticus* foi testada por via oral no modelo experimental Sarcoma 180. A figura 1 mostra as médias do peso dos tumores em gramas para os grupos controle, padrão (Ciclofosfamida, 10 mg/Kg), tratado I (200 mg/Kg), tratado II (300 mg/Kg) e tratado III (400 mg/Kg). O padrão apresentou uma inibição tumoral significativa de 70,4% em relação ao controle. Os grupos tratados também apresentaram uma diminuição na média dos pesos dos tumores em relação ao grupo controle, porém as doses de 300 mg/Kg e 400 mg/Kg foram significativas apresentando um percentual de inibição de 67,7% e 68% respectivamente. Na menor dose analisada, 200 mg/Kg, o percentual de inibição tumoral foi apenas de 32,8%.

A análise macroscópica dos animais do grupo controle apresentou ascite hemorrágica, tumor sólido, invasivo, aderido às costelas e a epiderme, e bem vascularizado. Já os tratados, apenas a menor dose (200 mg/Kg) apresentou ascite, o tumor também mostrou-se sólido, invasivo, aderido a epiderme e bem vascularizado. Os grupos tratados nas doses de 300mg/Kg e 400mg/Kg apresentaram tumores sólidos bem delimitado e com vascularização menor que o controle.

Não foram encontrados na literatura estudos com avaliação de ação antitumoral, referente à espécie *H. drasticus*. O mecanismo pelo qual a janaguba apresentou atividade antitumoral não foi possível elucidar. Devido o gênero *Himatanthus* apresentar principalmente iridóide e triterpenos em sua constituição, provavelmente uma dessas substâncias seria responsável pela atividade. Estudos mais detalhados estão sendo realizados a fim de esclarecer a atividade antitumoral nas folhas *H. drasticus*, assim como novas vias de administração.

4.4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o extrato metanólico das folhas de *H. drasticus* possui baixa toxicidade por via oral e significativa atividade antitumoral nas doses testadas. Com um percentual de inibição do crescimento tumoral de 67% e 68% nas doses de 300 mg/Kg e 400 mg/Kg de peso em camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*) respectivamente. Porém, análise mais detalhada é necessária para elucidar essa atividade.

4.5 REFERÊNCIAS

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE). *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 30, n. 3, p. 450-457, 2006a.

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE). *Rev. Bras. Sementes*, v. 28, n. 1, p. 63-71, 2006b.

COLARES, A. V., CORDEIRO, L. N., COSTA, J. G. M., SILVEIRA, E. R., CAMPOS, A. R., CARDOSO, A. H. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Phco. Mag.*, v. 4, n. 14, p. 73-77, 2008.

FAI, P. B. A.; FAGANDE, S. O. Acute toxicity of *Euphorbia Kamerunia* on *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 62, n. 1, p.123-131, 2005.

HILARY, J. E.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga reptans* in experimental animals. *J. Ethnopharmacology*, v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. *Exp. Anim.*, v. 52, n. 5, p. 371-375, 2003.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005.

MACHON, S.; KUOZYNSKI, L.; CIELDAOWSAKI, Y.; WEICZSEK.; ZIMECKI, M.; BLASCZY, B.; MORDANKI, M.; WICZORSK; FIOZERRALISZEWASKA, L. Chemical and Biological properties of 2-pyridielbenzil-carbinol. *Achiv. Immunol. Ther. Exp.*, v. 29, n. 2, p. 217-233, 1981.

MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 58, n. 2, p. 235-241, 2006.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 423. Acute Oral Toxicity-Acute Class Method. 17^o December 2001.

OSÓRIO-BORGES, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. 2. Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 279, 2001.

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). *J. Pharm. Sci.*, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.

PLUMEL, M. M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae). Revisión taxonomique: brandea. *Boletim do Herbarium Bradeanu*, Rio de Janeiro, v. 5, p.1-20, 1991.

RAMAKRISHNA, Y.; MAHONOR, A. I.; MAMATA, P.; SHREEKANT, K. G. Plants and novel antitumour agents: A review. *Indian Drugs*, v. 21, n.1, p. 173-185, 1984.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quím. Nova*, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. Ed. Porto Alegre: UFRGS/UFCS, p. 256, 2004.

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

STOCK, C.C.; CLARCK, D.A.; PHILIPS, F.S. Sarcoma 180 – inibitor screening date. *Cancer Res.*, v. 15, n. 2, p. 2-3, 1955.

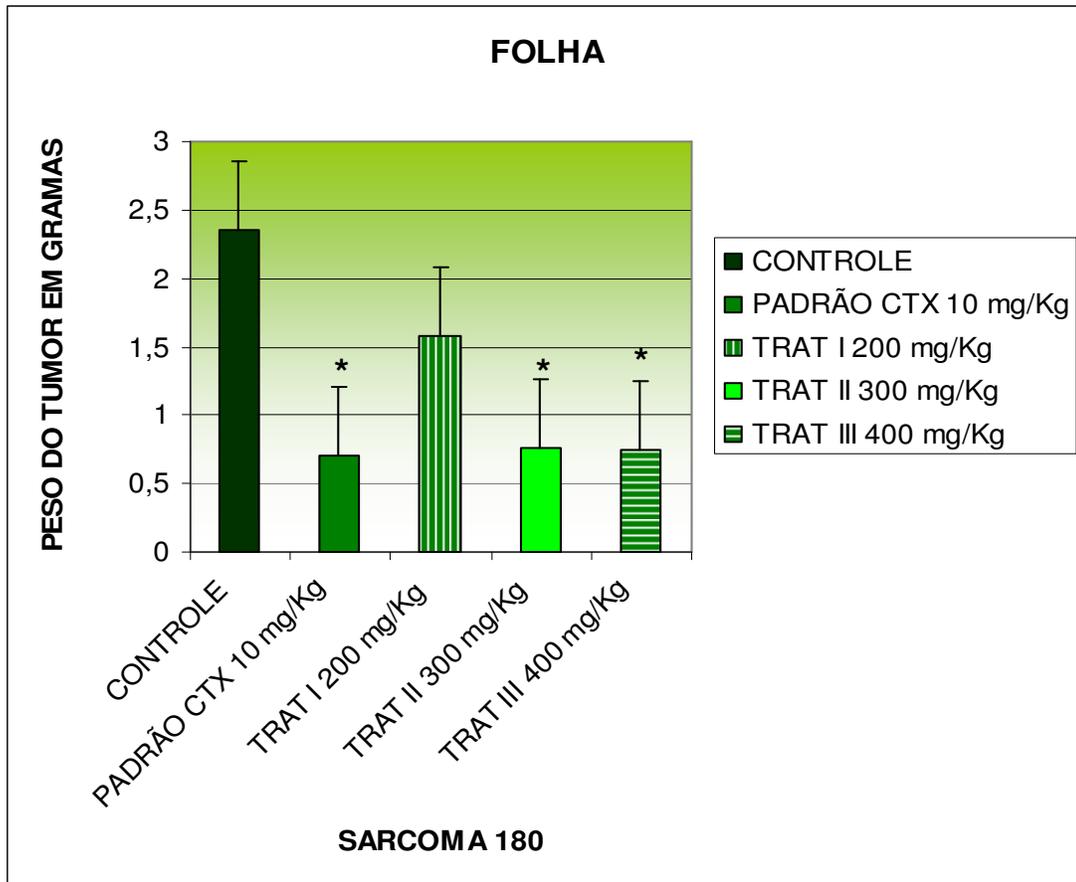


Figura 1: Efeitos dos extratos de *H. drasticus* frente ao Sarcoma 180. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

Tabela 1 – Efeitos toxicológicos provocados pelas doses do extrato metanólico da folhas de *H. drasticus* administrados em camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*). Dados obtidos durante os primeiros 30 minutos após administração do extrato.

EFEITOS	DOSES (mg/Kg)		
	50	300	2000
ESTIMULANTES			
Taquicardia	-	-	-
Taquipnéia	-	-	+
Piloereção	-	-	++
Agitação	-	-	+
Exoftalmia	-	-	+
Movimentos Estereotipados	-	-	+++
Movimentos circulares	-	-	++
Movimentos de vibrissas	-	-	+
Ondulação de cauda	-	-	+
Tremores finos/grosseiros	-	-	-
Postura de ataque	-	-	+
Levantamento dos membros posteriores	-	-	-
Convulsão focal	-	-	-
Reação de fuga	-	-	+++
DEPRESSORES			
Abaixamento dos membros posteriores	-	-	+
Apnéia	-	-	-
Alteração de marcha	-	-	-
Sonolência	-	-	-
Prostração	-	-	++
OUTROS			
Excreção fecal	-	-	+
Diurese	-	-	+
Contorções abdominais	-	-	-
Petéquias	-	-	+
Edema de focinho	-	-	++
Cianose	-	-	-
Fotofobia	-	-	-
Refluxo	-	-	-

(-) sem efeito; (+) efeito leve; (++) efeito moderado; (+++) efeito acentuado.

5. ARTIGO II

5. ARTIGO II

EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.-Apocynaceae (JANAGUBA) FRENTE AO MODELO EXPERIMENTAL CARCINOMA DE EHRLICH

Eliane Leite de Sousa¹, Haroudo Sátiro Xavier¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Maria Joselice e Silva¹, Cicero Ernandes Leite de Sousa², Falba Bernadete Ramos dos Anjos³, Ivone Antonia de Souza⁴

1- Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

3-Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri-URCA

4- Departamento de Histologia - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

5- Departamento de Antibióticos, Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

RESUMO

Himatanthus drasticus (Apocynaceae) é conhecida como janaguba tem sido utilizada popularmente para o tratamento de câncer. O presente estudo avaliou a triagem fitoquímica e a atividade antitumoral do extrato bruto metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus* frente ao modelo experimental Carcinoma de Ehrlich. Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos tratados por via oral nas doses de 200, 300, e 400 mg/Kg de peso do animal. Após o oitavo dia de tratamento, os animais foram sacrificados, os tumores pesados e realizado o exame histopatológico dos órgãos. No estudo fitoquímico, o extrato metanólico das folhas mostrou a presença de flavonóides (quercetina e rutina), terpenos, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. A atividade antineoplásica apresentou inibição tumoral significativa para todas as doses testadas chegando a 86,8% para a dose de 300mg/Kg. A avaliação histopatológica demonstrou alteração nos tecidos hepático e renal, quando comparados com os animais do grupo controle.

Unitermos: *Himatanthus drasticus*, Janaguba, Carcinoma de Ehrlich, Perfil fitoquímico

EFFECT OF THE METHANOLIC EXTRACT OF THE LEAVES *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.-Apocynaceae (JANAGUBA) AGAINST TO EHRlich CARCINOMA MODEL

ABSTRACT

Himatanthus drasticus (Apocynaceae) is known popularly as Janaguba has been used in the treatment of cancer popularly. The present study evaluated the screen phytochemical and the antitumor activity of crude methanolic extract from *Himatanthus drasticus* leaves against to Ehrlich Carcinoma experimental model. Males Swiss Albino mice (*Mus musculus*) were used and treated orally in the doses of 200, 300, and 400 mg/Kg of animal body weight. After the eighth day of treatment, the animals were sacrificed, the tumors weighted and carried the hystopathological examination of the organs. In the phytochemical study, the methanolic extract of the leaves showed the presence of flavonoids (quercetine and rutine), terpenoids, condensed proanthocyanidines and leucoanthocyanidines. The antitumor activity presented significant tumoral inhibition for all the tested doses arriving to 86,8% for the dose of 300mg/Kg. The hystopatological evaluation demonstrated alterations in the hepatic and renal level, when compared with the animals of the controlled groups.

Key words: *Himatanthus drasticus*, Janaguba, Ehrlich Carcinoma, Phytochemical profile

5.1 INTRODUÇÃO

Plantas têm sido usadas por muito tempo no tratamento de câncer (HARTWELL, 1982). A importância dos produtos naturais é particularmente evidente nas áreas de oncologia e doenças infecciosas, onde 60% e 75% das drogas, respectivamente, são de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003).

O isolamento dos alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina do *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), introduziu uma nova era no uso de produtos naturais como agentes antineoplásicos. Eles foram os primeiros fármacos de origem natural utilizados na clínica para o tratamento dessa patologia. A descoberta do paclitaxel da casca da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) é outra evidência do sucesso da descoberta de drogas a partir de produtos naturais (CRAGG & NEWMAN, 2005).

As espécies do gênero *Himatanthus*, pertencente à família Apocynaceae, apresentam sua distribuição restrita na região Neotropical ocorrendo desde o Panamá até a Região sudeste do Brasil, tendo como limite sul o trópico de Capricórnio. A espécie *Himatanthus drasticus* apresenta distribuição restrita ao Brasil (SPINA, 2004). No Ceará, essa espécie ocorre com

maior frequência na Chapada do Araripe, extremo sul do estado, onde é explorada pela população daquela localidade, cotidianamente e sem controle (AMARO *et al.*, 2006).

Himatanthus drasticus, é conhecida popularmente como janaguba, é uma espécie arbórea que pode atingir até sete metros de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos. Sua casca é rugosa e exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular (AMARO *et al.*, 2006).

Em trabalhos anteriores realizados com outras espécies de *Himatanthus* foi possível registrar o isolamento de compostos. Na espécie *Himatanthus sucuuba* foi encontrado, no caule e no látex, fulvoplumierina e plumericina (PERDUE & BLOMSTER, 1978), isoplumericina, acetato de lupeol, cinamato de α -amirina e cinamato de lupeol (SILVA *et al.*, 1998; WOOD *et al.*, 2001). Na *H. phageadaenicus* foi isolado e identificado uma mistura de α -amirina, β -amirina, lupeol, β -sitosterol, plumericina, alamandina, isoplumericina, plumerídeo e ainda glucosídeos e sacarose e o ácido β -dihidropumericínico (VANDERLEI *et al.*, 1991, VELOSO *et al.*, 1999). Na *H. articulata*, acetato e cinamato de α - e β -amirina. Uma glicosilplumierídeo também foi isolado de *H. lancifolius* (BARRETO *et al.*, 1998).

Estudos prévios com as espécies de *Himatanthus* demonstraram atividade farmacológica contra o carcinoma nasofaringe epidermóide humano (PERDUE & BLOMSTER, 1978); espasmogênica em musculatura lisa de íleo (VANDERLEI & BRITO, 1989); inibição da enzima beta monoamino-oxidase (ENDO *et al.*, 1994); antiinflamatória e analgésica (MIRANDA *et al.*, 2000); antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2004); efeito gastroprotetor (BAGGIO *et al.*, 2005) e atividade antileishmaniose (CASTILLO *et al.*, 2005).

Afim de buscar novas alternativas para o tratamento do câncer, o presente trabalho teve como objetivo realizar a triagem fitoquímica, e investigar atividade antitumoral do extrato metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus* frente ao Carcinoma de Ehrlich, identificados com análise histopatológica.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material Botânico

As folhas de Janaguba foram coletadas em dezembro de 2007, na Chapada do Araripe, município de Jardim (Ceará). A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Dr^a.

Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob número 48.961.

5.2.2 Obtenção do Extrato

Foram utilizadas as folhas de *Himatanthus drasticus* para a formulação do extrato. A secagem foi realizada a temperatura ambiente em local seco e arejado por aproximadamente sete dias. Realizou-se três extrações a frio, do material triturado em metanol, submetido à agitação contínua (48 horas para cada extração). Estes extratos foram filtrados e evaporados a vácuo para fornecer o material bruto concentrado com rendimento de 20,12%.

5.2.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos e peso entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro), temperatura ($22 \pm 2^\circ$) e receberam água e ração *ad libitum*. O manuseio dos animais durante o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (Processo número 23076.03566/2008-71).

5.2.4 Perfil Fitoquímico

O extrato metanólico das folhas da janaguba em metanol foi analisado por cromatografia em camada delgada (placas de sílica – MERCK- Alemanha, 105551), empregando-se diversas fases móveis, reveladores adequados à caracterização dos diversos grupos e padrões cromatográficos (Quadro 1).

5.2.5 Atividade Antitumoral

No experimento realizado foram utilizadas células tumorais da linhagem Carcinoma de Ehrlich (forma sólida). Os fragmentos tumorais inicialmente foram retirados de animais doadores e implantado fragmentos com cerca de 3mm de diâmetro na região axilar direita dos animais receptores (STOCK *et al.*, 1955). Após 48h do transplante dos tumores, iniciou-se o tratamento dos grupos, por um período de sete dias. Os animais foram divididos em grupos (n=5) e subdivididos em grupo padrão (Ciclofosfamida, CTX, 10 mg/kg), grupo controle (solução salina 0,9%) e os grupos tratados I, II e III que receberam o extrato metanólico da janaguba, nas doses de 200, 300 e 400 mg/Kg de peso respectivamente. Todas as substâncias foram administradas por via oral durante sete dias. No oitavo dia os animais foram

sacrificados e os tumores retirados, dissecados, pesados e em seguida calculada a diferença entre os grupos tratados e controle para se obter o índice de inibição tumoral de acordo com a fórmula abaixo.

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Onde:

TWI% = % de inibição tumoral

C = Média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle

T = Média dos pesos dos tumores dos animais do grupo tratado

5.2.6 Estudo Histológico

Após extirpação dos tumores, procedeu-se a necropsia, para avaliação da morfologia externa dos órgãos. Os órgãos retirados para exame foram: fígado, rins e baço, para avaliação macroscópica e posterior fixação em formaldeído a 10%, em solução tampão neutra. Após 24h de fixação das amostras, as peças foram lavadas e processadas para inclusão em parafina, em seguida cortadas com 7µm de espessura, e coradas segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina, para serem posteriormente observadas em microscopia óptica.

5.2.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste “t” de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre < 0,05.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil Fitoquímico

Na investigação fitoquímica qualitativa preliminar do extrato metanólico das folhas de *H. drasticus* pôde-se observar que foram revelados flavonóides (quercetina e rutina), em grande concentração. A presença de terpenos como β-amirina, também foi constatada. Verificou-se ainda a presença de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. Em outras espécies de *Himatanthus* foi identificado, tanto na casca como no látex, a presença de

terpenos como na espécie *H. drasticus* (COLARES *et al.*, 2008) e *H. sucuuba* (SILVA *et al.*, 1998), porém na folha ainda não foi encontrado relatos na literatura.

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. O emprego terapêutico de planta contendo flavonóides é vasto e, em muitos casos ainda empírico. Embora alguns resultados tenham mostrado que esses compostos possam apresentar efeito mutagênico, em geral, são considerados como benéficos (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Vários flavonóides têm demonstrado suprimir a carcinogênese em modelos animais (YANG *et al.*, 2001). Representam um grande grupo de fitoquímicos que são conhecidos por exercerem uma atividade antitumoral. Assim, estudos investigativos têm demonstrado que os possíveis mecanismos de inibição da carcinogênese por polifenóis estejam relacionados com o aumento da expressão de superóxido dismutase, indução de apoptose e repressão do ciclo celular, como demonstrado em células carcinogênicas humanas *in vitro* (MANSON, 2003), inibição da cicloxigenase e lipoxigenase (HONG, 2001; SAKATA, 2003).

Atividade Antitumoral

Nos ensaios com camundongos frente ao tumor Carcinoma de Ehrlich, as médias dos pesos dos tumores dos grupos controle, padrão (Ciclofosfamida, 10mg/Kg) e os tratados com o extrato metanólico das folhas de *H. drasticus*, tratado I (200mg/Kg), tratado II (300mg/Kg) e tratado III (400mg/Kg) estão representadas na Figura 1. O padrão apresentou uma inibição tumoral significativa de 91,3 % em relação ao controle. Os grupos tratados também apresentaram uma diminuição na média dos pesos dos tumores em relação ao grupo controle, para todas as doses testadas 200, 300 e 400mg/Kg apresentando um percentual de inibição estatisticamente significativo de 70, 86,8 e 63% respectivamente.

Mediante a análise macroscópica, verificou-se que os animais do grupo controle apresentaram os tumores aderidos às costelas e à epiderme, bem vascularizados e sólidos. Já para o grupo padrão os tumores apresentaram-se bem delimitados e pouco vascularizados. Para os animais tratados observou-se que os tumores também apresentaram-se bem delimitados e com consistência sólida em todos os grupos.

Segundo Ferguson (2001), os flavonóides são reconhecidos por apresentar ação antioxidante e promover uma estabilização genômica, com efeito, no reparo do DNA, inibindo a ação das enzimas topoisomerases, as quais exercem papel primordial na transcrição e replicação do DNA. Isto corrobora com a sua reconhecida propriedade anticarcinogênica,

sugestivo de que estes compostos influenciaram na inibição tumoral observada no atual estudo. Não foi observado um índice de inibição tumoral dose dependente 200, 300 e 400mg/Kg sendo 70, 86,8 e 63% respectivamente, provavelmente por estar trabalhando com extrato bruto e não frações purificadas.

Estudo Histológico

A análise histopatológica revelou para os animais do grupo padrão frente ao Carcinoma de Ehrlich à nível hepático pontos hemorrágicos, nos interstícios do parênquima hepático. As veias centrolobulares e os espaços porta apresentaram tamanho e distribuição normal, mas congestão, isto quando comparado ao grupo controle (Figura 2A). Já os rins apresentaram morfologia das estruturas tubulares e glomerulares pouco preservada. Os túbulos contorcidos distais e proximais apresentaram-se amorfos. Os corpúsculos renais de estrutura pouco preservados, com espaço capsular irregular, com a presença de artéria glomerular e de mácula densa histologicamente comprometidos (Figura 2B).

Para os animais dos grupos tratados com extrato metanólico das folhas de *H. drasticus*, a histopatologia evidenciou a nível do fígado, hepatócitos e placas pouco preservadas, e em alguns casos foi notada a presença de vacúolos nos hepatócitos. Foi marcante a presença de sinusóides. As veias evidenciadas apresentaram congestão. Entre os sinusóides e hepatócitos foi evidenciada pontos de hemorragias para alguns grupos (Figura 3A e 4A). Para a microscopia renal foi observado que o córtex renal mostrou corpúsculos renais pouco preservados, no qual os espaços capsulares ficaram comprometidos, em meio aos túbulos contorcidos distais e proximais. Ao redor dos túbulos observaram-se vários pontos hemorrágicos (Figura 3A e 4B). O baço apresentou congestão de polpa vermelha e hiperplasia de polpa branca. Os efeitos observados foram intensificados com o aumento da dose.

As análises histopatológicas dos órgãos removidos de animais tratados com extrato metanólico de *H. drasticus* sugerem toxicidade a nível renal e hepático. Porém alterações similares foram encontradas nos animais tratados com a ciclofosfamida, fármaco amplamente utilizado em protocolos quimioterápicos sozinho ou em associação, e que apresenta seu mecanismo farmacológico já elucidado, embora isto não significa que a inviabilização metabólica do tecido renal e hepático tenha sido promovida por mecanismos similares.

5.4 CONCLUSÃO

O extrato metanólico das folhas de *H. drasticus* apresentou uma inibição tumoral significativa, em todas as doses testadas, em relação aos animais controle portadores do Carcinoma de Ehrlich. Esse extrato mostrou-se rico em flavonóides e terpenos em investigação qualitativa preliminar dos seus constituintes químicos.

Assim podemos concluir que as folhas de *H. drasticus* representa uma forte candidata para uma série de investigações e isolamento de substâncias ativas e estudos com outros testes pré-clínicos.

5.5 REFERÊNCIAS

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 30, n.3, p. 450-457, 2006.

BAGGIO, C. H., OTOFUJI, G. M., *et al.* Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med*, v. 71, n .8, p.733-8. 2005.

BARRETO, A. S.; CARVALHO, M.G.; NERY, I.A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *H.articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, p. 430-434. 1998.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESTRE, J. L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v. 112, p. 410-414. 2007.

COLARES, A. V.; CORDEIRO, L. N.; COSTA, J. G. M.; SILVEIRA, E. R.; CAMPOS, A. R.; CARDOSO, A. H. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Phcog. Ma.*, v. 4, n.14, p.73-77, 2008.

CRAGG G. M., NEWMAN D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* v. 100, 72–79, 2005.

ENDO, Y.; HAYASHI, H.; SATO, T.; MARUNO, M.; OHTA, T.; NOZOE, S.; Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 42, p. 1198-1201, 1994.
FERGUNSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* V. 475, p. 89-111, 2001.

HARBONE, J. B. *Phytochemical Methods*. 3. Ed., London: Chapman & Hall. 1998.

HARTWELL, J. L. *Plants used against cancer: a survey*. Lawrence, MA. *Quarterman Publications*, p 438-39, 1982.

HONG, J.; SMITH, J. T.; HO, T. C.; AUGUST, A. D.; YANG, S. C.; Effects of purified green tea and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxigenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues, *Biochem. Pharmacol.* v. 62 , p.1175–1183, 2001.

MANSON, M. Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signaling. *Trends in Molecular Medicine*. v. 9, n. 1, p. 11-18, 2003.

MARKHAN KR. *Techniques of flavonoid Identification*. London: Academic Press, 1982

MIRANDA, A. L. P.; SILVA, J. R.; REZENDE, C. M.; NEVES, J.S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. B. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. *Planta Med.* v. 66, n. 3, p. 284-6. 2000.

NEU R. A New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43: 82, 1956

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

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). *J. Pharm. Sci.*, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.

SAKATA, K., HIROSE, Y.; QIAO, Z.; TANAKA, T.; MORI, H. Inhibition of

inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters*, v. 199, p. 139-145, 2003.

SHARMA OP, DAWRA RK. Thin- layer chromatographic separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) plant. *J Chrom* 587-354, 1991.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Esteres triterpênicos de *himatanthus sucuuba* (spruce) woodson.. *Quím. Nova*, v. 21, p. 702-704, 1998.

SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M.; SANTOS, C. A. M. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia*, v.75, p.750-753, 2004.

SPINA, A. P. **Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. Ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae).** Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. p. 40, 2004.

STOCK, C. C.; CLARCK, D. A.; PHILIPS, F. S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. *Cancer Res.*, v. 15, n. 2, p. 2-3, 1955.

VANDERLEI, M. F.; SILVA, M. S.; GOTTLIEB, H. E.; BRAZ-FILHO, R. Iridoids and Triterpenes from *Himatanthus phagedaenicus*: The complete Assignment of the ¹H and ¹³C RNM Spectra of Two Iridoid Glycosides. *J. Braz. Chem. Soc*, v.2, n.51, 1991

VANDERLEI, M. F. & BRITO, A. R. S. Ações espasmognicas do extrato etanólico bruto de *Himatanthus phagedaenica* (MART.) Woodson, em ileo isolado de cobaia. *Rev. Bras. Farm.*, v. 70, n. 1, p. 15-18. 1989.

VELOSO, M. P.; TANUS, J. N.; OLIVEIRA, T. T. β-Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochem. System. Ecol.* v. 27, p. 669-671, 1999.

WAGNER H, BLADT S. *Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas*. Munich: Springer. 2 Ed. Berlin: Springer Verlag, p 384, 1996.

WOOD, C. A.; LEE, K.; VAISBERG, A. J.; KINGSTON, D. G. I.; NETO C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem. Pharm. Bull.* v.49, p1477-1478, 2001

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of

carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* v. 21, p. 381–406, 2001

ZUANAZZI, J. A. S. & MONTANHA, J. A. Flavonóides. IN: SIMÕES, C. M. O *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 Ed. Porto Alegre: UFRGS/UFCS, p. 577-605, 2004.

Quadro 1 – Sistemas de eluição cromatográficos e reveladores utilizados para a caracterização qualitativa dos constituintes químicos do extrato metanólico das folhas de *H. drasticus*.

Grupo de Metabólitos	Fase móvel	Revelador	Referência
Alcalóides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Dragendorff	Wagner, 1996
Derivados Cinâmicos	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	2-Aminoetildifenil borinato	Markham, 1982 e Neu, 1956
Flavonóides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	2-Aminoetildifenil borinato	Markham, 1982 e Neu, 1956
Protoantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilina clorídrica	Wagner, 1996
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	Benzeno-AcOEt (97:3 v/v)	Vanilina sulfúrica	Wagner, 1996
Iridóides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilina sulfúrica	Harbone, 1998
Triterpenóides, Esteróides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Liebermann Burchard	Sharma, 1991
Saponinas	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Anisaldeído	Wagner, 1996

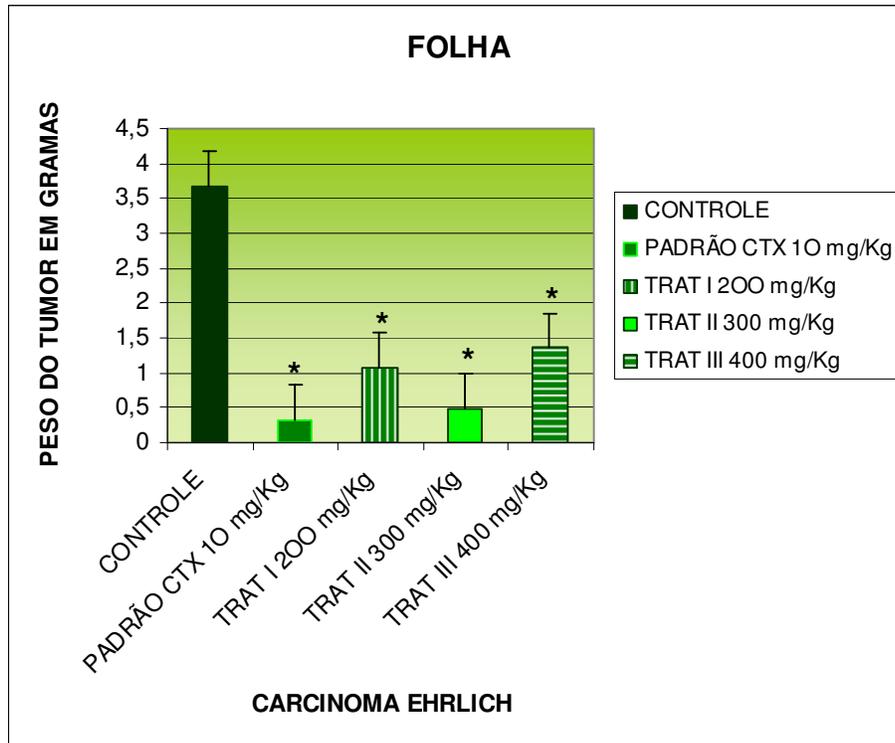


Figura 1. Efeitos dos extratos de *H. drasticus* frente ao Carcinoma de Ehrlich. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

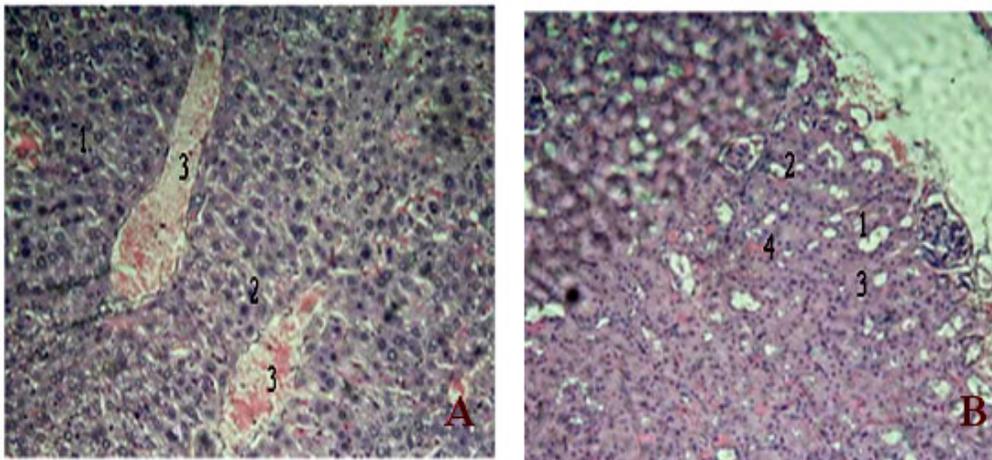


Figura 2. Aspectos histológicos do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com Ciclofosfamida (10mg/kg). **A** Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), veias (3) corado com HE. **B** Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), artéria glomerular (4) corado com HE Obj.10x.

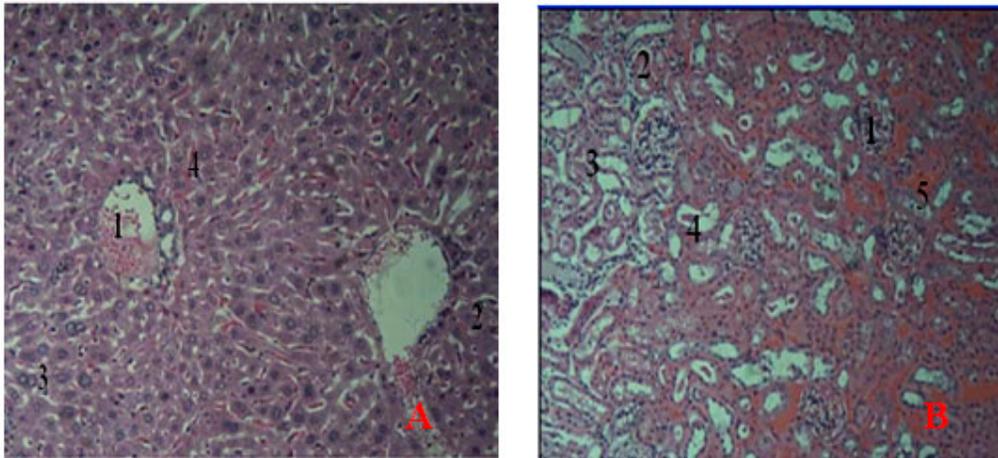


Figura 3. Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich TRAT I (200mg). **A** Fotomicrografia do fígado. Vaso congestionado (1), placas de hepatócitos (2), hepatócitos (3), sinusóides com pontos hemorrágicos (4) corado com HE. Obj. 10x. **B** Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), veia (4), pontos hemorrágicos (5) corado com HE. Obj. 10x.

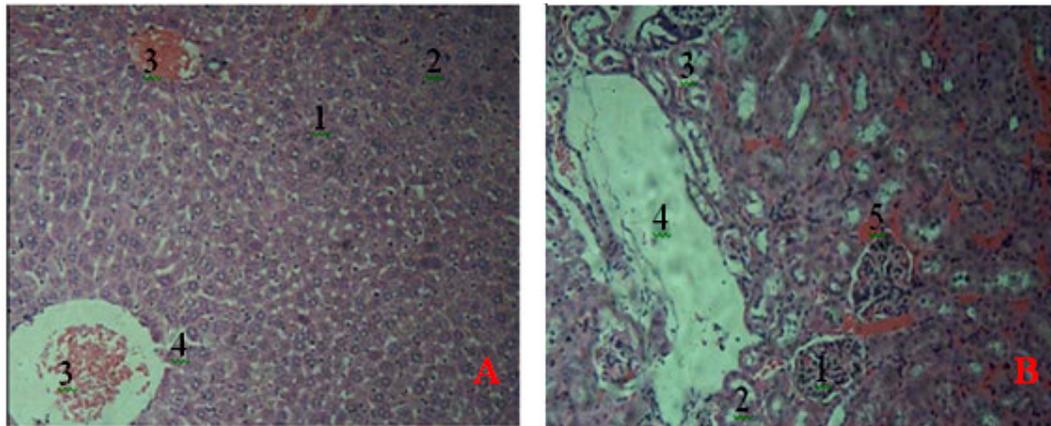


Figura 4. Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich TRAT III (400mg). **A** Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), vasos congestionados (3), vacúolos entre as placas dos hepatócitos (4) corado com HE. Obj. 10x. **B** Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), vaso renal (4) e congestão entre os túbulos (5) corado com HE. Obj. 10x.

6. ARTIGO III

6. ARTIGO III

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.-Apocynaceae (JANAGUBA) FRENTE AO SARCOMA 180 E CARCINOMA DE EHRLICH

Eliane Leite de Sousa¹, Haroudo Sátiro Xavier¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Maria Joselice e Silva¹, Cicero Ernandes Leite de Sousa², Falba Bernadete Ramos dos Anjos³, Sandra Maria de Torres,⁴ Ivone Antonia de Souza⁵

1- Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco –UFPE

2-Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri-URCA

3- Departamento de Histologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

4-Departamento de Morfologia e Fisiologia animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

5- Departamento de Antibióticos, Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

RESUMO

Himatanthus drasticus pertence à família Apocynaceae, é de distribuição restrita ao Brasil, conhecida popularmente como Janaguba. É uma espécie arbórea que cresce até 7m de altura, sua casca é rugosa e exsuda um látex branco, bastante utilizado na medicina popular principalmente no combate ao câncer, porém sem registro na literatura. No presente trabalho, foi realizada a triagem fitoquímica, avaliada a toxicidade aguda e investigada a atividade antitumoral do látex de *Himatanthus drasticus* frente aos tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, identificados com análise histopatológica. A determinação da toxicidade aguda foi realizada segundo a metodologia da OECD 423 e o transplante do tumor sólido Sarcoma 180 foi realizado seguindo a metodologia de Stock. No estudo fitoquímico para o látex foi encontrado terpenos (β - sitosterol e β -amirina). No ensaio de toxicidade aguda por via oral foram verificadas reações estimulantes seguidas por reações depressoras sobre o Sistema Nervoso Central. Não houve óbitos em nenhuma das doses testadas. Na avaliação antitumoral para o Carcinoma de Ehrlich, apenas os animais tratados com a maior dose (14ml/kg) apresentou redução significativa dos tumores chegando a um percentual de 76,9% de inibição. Para o Sarcoma 180, apesar de ter apresentado uma redução dos pesos médios dos tumores, o látex não apresentou resultados estatisticamente significativos. Na análise histológica, verificou-se alterações nos tecidos hepático e renal, quando comparados com os animais dos grupos controle.

Unitermos: *Himatanthus drasticus*, látex, atividade antitumoral, toxicidade aguda oral, perfil fitoquímico

EVALUATION OF ANTITUMORAL ACTIVITY OF THE LATEX OF *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.–Apocynaceae (JANAGUBA) AGAINST TO SARCOMA 180 AND EHRLICH CARCINOMA

ABSTRACT

Himatanthus drasticus belongs to the Apocynaceae family from restricted distribution to Brazil, known popularly as Janaguba. It is an arboreal species that it grows up to 7m of height, your bark is wrinkled and it has white latex, quite used mainly in the popular medicine for the cancer, however without report in the literature. In the present work, it was investigated the phytochemical screen, the acute oral toxicity and antitumor activity of the latex of *Himatanthus drasticus*. The antitumor activity was avaluated against to the Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma, identified with analysis hystopathological. It was used OECD 423 methodology for study the acute oral toxicity and Stock methodology for antitumor activity. In the phytochemical analysis, it was found terpenoids (β - sitosterol and α -amyrin). In the acute oral toxicity assay, stimulating reactions were verified followed by depressive reactions on the Central nervous system. There were not deaths in none of the tested doses. The results show that antitumor evaluation for the Ehrlich Carcinoma just the treated animals with the largest dose (14ml/kg) presented significant reduction of the tumor growth arriving to 76,9% of inhibition. For the Sarcoma 180, in spite of having presented a reduction of the medium weights of the tumors, the latex did not present statistical resulted significant. For the hystopathological analysis, alterations were observed in the hepatic and renal fabrics, when compared with the animals of the controlled groups.

Key words: *Himatanthus drasticus*, latex, antitumor activity, acute oral toxicity, phytochemical profile

6.1 INTRODUÇÃO

As plantas contêm princípios ativos capazes de nos curar das diversas doenças, no entanto, são poucos os estudos que possibilitam uma visão ampla da grande diversidade das espécies utilizadas com fins terapêuticos (SILVA *et al.*, 2005).

A automedicação milagrosa com plantas medicinais, chega ao extremo de substituir terapias clássicas em doenças graves e é um reflexo do pensamento comum de que plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas pelo seu uso prolongado na própria espécie humana. Não são incomuns atos de má fé na sua exploração comercial, como tem ocorrido, por exemplo, com “plantas que curam o câncer” (SIMÕES *et al.*, 2004).

Embora no Brasil existam normas e legislação para garantir a segurança e qualidade dos fitoterápicos, a planta medicinal comercializada por raizeiros, em feiras, ervanários, e

outros locais pouco apropriados, não estão sujeitas a esse controle. Além disso, para muitas das plantas utilizadas popularmente, não há registros facilmente disponíveis (ALVES, 2007).

Himatanthus drasticus pertence à família Apocynaceae, é de distribuição restrita ao Brasil, ocupando respectivamente áreas de cerrado, campo rupestre e caatinga e de mata atlântica (SPINA, 2004). É uma espécie arbórea que cresce até 7m de altura, conhecida popularmente como tiborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, janaguba no Ceará, pau-de-leite no Piauí, joanaguba no Rio Grande do Norte (PLUMEL, 1991). No Ceará, essa espécie ocorre com maior frequência na Chapada do Araripe, extremo sul do estado, onde é explorada pela população daquela localidade, cotidianamente e sem controle. Sua casca é rugosa e exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular (AMARO *et al.*, 2006a).

O leite da janaguba, como é chamado o látex pela população local, tem uma longa história de emprego na cura do câncer no Nordeste, porém, quase sem registro na literatura (AMARO *et al.*, 2006b). É utilizado também para o tratamento de verminoses, gastrites e artrites.

O método de extração do látex consta na retirada do floema através de cortes. Após a extração, o látex é diluído em água na proporção de 1:10, armazenado em recipiente de vidro e mantido sob refrigeração para ser comercializado na região (MODESTO, 1997). Porém em levantamento com extratores local do látex, a diluição é feita na proporção de 1: 4 e essa suspensão é administrada uma a duas vezes ao dia, uma colher de sopa diluída em um copo com água.

Himatanthus drasticus, como outras espécies de *Himatanthus*, foram escassamente mencionadas em literatura científica com relação aos seus estudos fitoquímicos e suas atividades biológicas. Estudos anteriores com extrato da casca mostram que foi isolado o triterpeno cinamato de lupeol e que foi realizado a atividade citotóxica com *Artemia salina*, a antimicrobiana e a analgésica (COLARES *et al.*, 2008a). Outro trabalho com a ação farmacológica dessa espécie foi, o efeito gastroprotetor do látex através de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina (COLARES *et al.*, 2008b).

Apesar do consumo difundido do leite da janaguba no estado do Ceará, e em outros estados brasileiros, não há estudos disponíveis na literatura sobre sua atividade antitumoral e sua segurança toxicológica. No presente trabalho, foi realizado a triagem fitoquímica, avaliado a toxicidade aguda, e investigado a atividade antitumoral do látex de *Himatanthus drasticus* frente aos tumores Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, identificados com análise histopatológica.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material Botânico

O látex da Janaguba foi coletado em Julho de 2008, na Chapada do Araripe, município de Jardim (Ceará). A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob número 48.961.

6.2.2 Extração do látex

A extração foi feita produzido um corte no floema (casca) em um recipiente graduado na diluição 1:1 em soro fisiológico para realização das atividades farmacológicas e em metanol para triagem fitoquímica, obtendo duas soluções. As soluções foram acondicionadas sob refrigeração a 4-8 °C.

6.2.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos e peso entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro), temperatura (22 ± 2°) e receberam água e ração *ad libitum*. O manuseio dos animais durante o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (processo número 23076.03566/2008-71).

6.2.4 Perfil Fitoquímico

O látex da janaguba em metanol foi analisado por cromatografia em camada delgada (placas de sílica – MERCK- Alemanha, 105551), empregando-se diversas fases móveis, reveladores adequados à caracterização dos diversos grupos e padrões cromatográficos (Quadro 1).

Outra amostra do látex em metanol, foi filtrado e o precipitado lavado com vários solventes como: metanol à quente, éter, acetato de etila e acetato de metila. As amostras foram cromatografadas para caracterização de terpenos segundo Sharma (1991).

6.2.5 Toxicidade Aguda

A determinação da toxicidade aguda foi realizada segundo a metodologia da

Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento Européia (OECD 423). Os animais foram divididos em grupos de três. Permaneceram sem alimento por um período de 8 horas antes do experimento, recebendo água *ad libitum*.

O látex de *Himatanthus drasticus* foi administrado em única dose por gavagem. O volume da solução fisiológica administrada foi de 14, 28 e 42ml/Kg. Os animais foram observados individualmente, depois da administração do extrato, durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com atenção especial para as primeiras 4 horas, e diariamente durante 14 dias. Todas as observações foram registradas individualmente para cada animal. E após os 14 dias o ensaio foi repetido e os animais sacrificados para a análise histopatológica.

6.2.6 Atividade Antitumoral

No experimento realizado foram utilizadas células tumorais da linhagem Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich (forma sólida). Os fragmentos tumorais inicialmente foram retirados de animais doadores e implantados fragmentos com cerca de 3mm de diâmetro na região axilar direita dos animais receptores (STOCK *et al.*, 1955). Após 48h do transplante dos tumores, iniciou-se o tratamento, por um período de sete dias. Os animais foram divididos em grupos (n=5) e subdivididos em grupo padrão (Ciclofosfamida, CTX, 10 mg/kg), grupo controle (solução salina 0,9%) e os grupos tratados. Para o Sarcoma 180 os animais receberam as doses 4, 12 e 14ml/Kg de peso da solução fisiológica do látex de *Himatanthus drasticus* e para o Carcinoma de Ehrlich 4, 8 e 14ml/Kg. Todas as substâncias foram administradas por via oral. No oitavo dia os animais foram sacrificados e os tumores retirados, dissecados, pesados e em seguida calculada a diferença entre os grupos tratados e controle para se obter o índice de inibição tumoral de acordo com a fórmula abaixo.

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Onde:

TWI% = % de inibição tumoral

C = média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle

T = média dos pesos dos tumores dos animais do grupo tratado

6.2.7 Estudo Histológico

Foi realizada a análise macroscópica e histopatológica dos órgãos de todos os animais submetidos à avaliação de toxicidade aguda e atividade antitumoral. Para toxicidade aguda fígado, rins, baço e pulmão foram retirados, já para atividade antitumoral foram analisados fígado, baço e rim. Os órgãos foram cortados em pequenos fragmentos e imersos em solução neutra de formol a 10%, no qual permaneceram em temperatura ambiente durante 24 horas. Após fixação, as peças foram lavadas e processadas para inclusão em parafina, em seguida cortadas com 7 μm de espessura, coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (MICHELANY, 1980), e observadas em microscopia de luz.

6.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste “*t*” de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $< 0,05$.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil Fitoquímico

A triagem fitoquímica do látex de *Himatanthus drasticus* demonstrou a presença de terpenos (β - sitosterol e β -amirina) que foi confirmado através da cromatografia do solvente etér. Este resultado corrobora com a pesquisa de Colares e colaboradores (2008) que isolaram do extrato da casca o triterpeno cinamato de lupeol. Outras espécies de *Himatanthus* ao qual tem sua fitoquímica elucidada também demonstraram a presença de terpenos como os ésteres triterpênicos acetato de lupeol, cinamato de α -amirina e cinamato de lupeol encontrado na *H. sucuuba* (SILVA *et al.*, 1998a; WOOD *et al.*, 2001).

Algumas plantas contêm grandes quantidades de triterpenóides em seu látex e resinas cujas funções fisiológicas destes compostos é geralmente creditada a sua defesa química contra patógenos e herbívoros (MAHATO & SEM, 1997).

Triterpenóides são metabólitos secundários não-esteroidais presente na flora terrestre, marinha e fauna, constituindo-se nos componentes majoritários em algumas plantas usadas na medicina tradicional, com ocorrência na forma livre, bem como na forma de éteres, ésteres e glicosídeos. Os triterpenóides pentacíclicos são os constituintes dominantes desta classe, e

têm sido amplamente investigados, dos quais fazem parte os compostos α -amirina e β -amirina (MAHATO & KUNDU, 1994).

A sua grande ocorrência e diversidade estrutural têm atraído a atenção quanto à evolução de suas atividades biológicas, como agentes antitumoral, antiinflamatório, antiviral e antibacteriano. Ling e colaboradores, em 1982, estudaram a relação entre a estrutura química e a atividade antineoplásica de alguns triterpenóides pentacíclicos e tetracíclicos. Embora as aplicações destes metabólitos secundários com sucesso como agentes terapêuticos sejam ainda limitadas, uma extensiva exploração das atividades nesta área tem ocorrido nos últimos anos (MAHATO *et al.*, 1992).

Toxicidade Aguda

Para a determinação da toxicidade aguda usou-se a metodologia da OECD 423 que é um procedimento em etapas no qual são utilizados três animais de um mesmo sexo em cada uma das etapas. Dependendo da mortalidade ou da condição de quase-morte dos animais, 2 a 4 etapas podem ser necessárias para permitir uma correta avaliação da toxicidade aguda da amostra testada.

A administração por via oral do látex de *H. drasticus* nas doses de 14 e 28ml/kg não apresentaram nenhuma alteração comportamental nos animais durante os primeiros 30 minutos observados. E ao final dos 14 dias de observações permaneceram sem alterações. Para esses animais não foram realizados análises histopatológica.

Na dose de 42ml/Kg, inicialmente, os animais apresentaram reações excitatórias e estimulantes, tais como: piloereção, exoftalmia, agitação, movimentos de vibrissas, estereotipados e circulares, além de aumento da frequência respiratória, postura em garra, irritabilidade e reação de fuga. Após esse período, reações depressoras foram observadas, como abaixamento do trem posterior e prostração tornaram-se mais evidentes. Ainda foram observadas reações do sistema nervoso autônomo como palidez, edema de focinho, refluxo, petéquias e excreção fecal aumentada, como mostra a tabela 1. A fase excitatória aqui observada sugere que o látex possui compostos estimulantes do sistema nervoso central, e após esta fase os sinais depressores foram talvez devido a uma fadiga neuronal e exaustão dos estoques de neurotransmissores (BLOOM, 2003).

No final dos 14 dias não foi observado nenhum óbito e nem mudanças comportamentais, porém foi registrado um aumento da excreção fecal (fezes amolecidas) com uma perda de peso até o quinto dia do experimento e logo após os animais voltaram a ganhar peso.

Na análise histopatológica dos órgãos para a toxicidade aguda(para maior dose) o fígado apresentou processo inflamatório crônico característico de hepatite. Infiltrado de células polimorfo nucleares, discreta congestão, micro esteatose difusa, necrose difusa, infiltrado mononuclear periportal e pericentro-lobular. No baço foi evidenciado hiperplasia de polpa branca, congestão de polpa vermelha. O rim mostrou a presença de cilindros protéicos nos tubos contorcidos, glomérulo nefrite proliferativa, congestão renal, degeneração hidrópica difusa nos túbulos contorcidos, atrofia do glomérulo e infiltrado mononuclear. A nível de pulmão observou-se proliferação de pneumócito 2 (células produtoras de surfactante), espessamento de túnica média de vaso pulmonar, pneumonia intersticial crônica, congestão e hemorrágica.

Atividade Antitumoral

A atividade antineoplásica do látex de *H. drasticus* verificada através da administração por via oral no modelo experimental sólido Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Nos ensaios com Sarcoma 180, os animais tratados com o látex apresentaram redução na média dos pesos dos tumores quando comparados com o grupo controle, porém não foi estatisticamente significativo (Figura 2), apresentando um percentual de inibição de 18,7, 46,8 e 52,7% para as doses 4, 12 e 14ml/Kg de peso respectivamente. O padrão (Ciclofosfamida, 10mg/Kg), apresentou uma inibição tumoral significativa de 70,4% em relação ao controle.

A análise macroscópica dos animais do grupo controle apresentou ascite hemorrágica, tumor sólido, invasivo, aderido às costelas e a epiderme, e bem vascularizado. Para os tratados, o padrão apresentou tumores pouco vascularizados e bem delimitados, a menor dose (4ml/Kg) apresentou ascite hemorrágica, o tumor também mostrou-se sólido, invasivo, aderido a epiderme e bem vascularizado. Já os tratados nas doses de 12ml/Kg e 14ml/Kg, apresentaram tumores sólido bem delimitado e com vascularização menor que o controle.

No ensaio frente ao tumor Carcinoma de Ehrlich, apenas o grupo tratado com a maior dose (14ml/Kg) do látex apresentou inibição tumoral estatisticamente significativo de 77% aproximadamente. Para a dose de 8ml/Kg verificou-se diminuição na média de peso tumoral com percentual de inibição de 47%. Já para os animais tratados com a menor dose (4ml/kg) não apresentaram redução na média de peso tumoral em relação ao grupo controle, houve um aumento não significativo estaticamente de 11,4% (Figura 3). O grupo padrão tratado com a ciclofosfamida apresentou um índice de inibição significativa de 91,3%. Após as análises macroscópicas, observou-se que os tumores apresentaram delimitações e consistência sólida

em todos os animais tratados. Para o grupo padrão os tumores apresentaram-se bem delimitado e pouco vascularizado.

Para ambos modelos experimentais, para as atividades antineoplásicas, não houve alteração de peso estatisticamente significativo.

A diferença de ação do látex frente às duas linhagens tumorais deve-se ao fato de possuírem origem e fisiologia diferentes. Vale ressaltar que tumores do tipo sarcomatoso são mais difíceis de tratar, isto por que ele afeta regiões como tecidos ósseos e músculos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A análise histopatológica mostrou-se semelhante para ambos os tumores. Para o grupo padrão, mostrou-se alteração a nível hepático e foram observados pontos hemorrágicos, nos interstícios do parênquima hepático. As veias centrolobulares e os espaços porta apresentaram tamanho e distribuição normal, mas congestão, isto quando comparado ao grupo controle. Já os rins apresentaram morfologia das estruturas tubulares e glomerulares pouco preservadas. Os túbulos contorcidos distais e proximais apresentaram-se amorfo. Corpúsculos renais de estrutura pouco preservados, com espaço capsular irregular, com a presença de artéria glomerular e de mácula densa histologicamente comprometidos (Figura 4).

A estrutura hepática dos animais tratados com látex, foi evidenciada placas e hepatócitos de morfologia conservada. Vasos com limites possivelmente normais, mas altamente congestionados, os sinusóides hepáticos com moderada presença de células de Kupffer, ou seja, macrófagos com capacidade de fagocitose (Figura 5A e 6A). Na estrutura renal mostrou-se pouco preservada tanto nas regiões cortical e medular, glomérulos renais com arquitetura comprometida, bem como pontos de congestão entre túbulos contorcidos distais e proximais (Figura 5B e 6B).

Com os modelos experimentais utilizados, ficou evidente que o látex da janaguba apresentou uma redução na média dos pesos tumorais, porém os melhores resultados só foram evidenciados em altas doses. Na menor dose (4ml/Kg) para o Carcinoma de Ehrlich mostrou-se carcinogênico, um resultado preocupante já que a população faz uso em doses bastante baixas, porém, por um período de tempo maior que o utilizado no experimento. Talvez o látex possua propriedade quimiopreventiva o que necessitaria de estudos mais detalhados para sua confirmação e assim justificar seu uso.

Outro resultado preocupante é em relação à toxicidade aguda, que apesar de não ter sido observado nenhum óbito nas doses testadas a análise histopatológica apresentou alterações morfológicas a nível renal, hepático, pulmonar e no baço. Também foram evidenciadas alterações morfológicas a nível hepático e renal para os grupos tratados com o

látex em relação ao controle, ao qual foi se agravando à medida que a dose foi aumentada, porém também foi observado alterações semelhantes para o grupo tratado com a ciclofosfamida.

6.4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o látex de *H. drasticus* apresentou uma inibição tumoral significativa em relação ao controle apenas para o Carcinoma de Ehrlich e na maior dose testada(14mL/Kg). Ao verificar seus componentes fitoquímicos, nota-se a necessidade de novos estudos e pesquisas para um melhor conhecimento de seu mecanismo de ação, potenciais farmacológicos e principalmente toxicológico.

6.5 REFERÊNCIAS

ALVES, N. M. **Estudos Farmacognósticos e da Toxicidade Experimental (Aguda e Subaguda) do Extrato Etanólico da casca do Guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, p.37, 2007.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e ciclo-celular não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M; TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 30, n. 3, p.450-457, 2006a.

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M; TEÓFILO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE. *Ver. Brás. Sem.*, v. 28, n. 1, p. 63-71, 2006b.

BLOOM, F. R. Neurotransmissão e o Sistema Nervoso Central. In: GOODMAN & GILMAN, A.; HARDMER, J. G.; LIMBIRD, L.E."As Bases Farmacológicas da

Terapêutica". 10 ed. McGraw Hill Interamericana do Brasil, p. 239, 2003.

COLARES, A.V.; CORDEIRO, L. N.; COSTA, J. G. M.; SILVEIRA, E. R.; CAMPOS, A.R.; CARDOSO, A.H. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Phcog. Mag*, v. 4, n. 14, p. 73-77, 2008a.

COLARES, A. V., CORDEIRO, L. N., COSTA, J. G. M., SILVEIRA, E. R., CAMPOS, A. R., CARDOSO, A. H. Efeito gastroprotetor do Látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Infarm*. v. 20, n. 11/12, p. 34-36, 2008b

HARBONE, J. B. *Phytochemical Methods*. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1998.

LING, H. C.; KING, M. L.; CHEN, C. F.; HSU, K. P.; SU, M. H.; LIN, M. H. Structure activity relationship of some triterpenoid and their derivatives as anticancer agents. *Chin. Med. J.*, v. 29, p. 308-315, 1982.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclitriterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p.1517-1575, 1994.

MAHATO, S. B.; NANDY, A. K.; ROY, G. Triterpenoids. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 2199-2249, 1992.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoids research. *Phytochemistry*, v. 44, n.7, p.1185-1236, 1997.

MARKHAN, K. R. *Techniques of fl avonoid Identifi cation*. London: Academic Press, 1982

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda., São Paulo, p. 277, 1980.

MODESTO, M. M. L. S. **Aspectos ecológicos e socioeconômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. Janaguba da Chapada do Araripe**. Monografia (Especialização em Botânica) – Universidade Regional do Cariri, Crato, p. 55, 1997.

NEU, R. A New reagent for differentiating and determining fl avones of paper chromatograms. *Naturwissenschaften*, v. 43, p. 82, 1956.

OECD – **Organization for Economic Cooperation and Development**. Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 423. Acute Oral Toxicity-Acute Class Method. 17^o December 2001.

PLUMEL, M. M. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae). Revisión taxonomique: brandea. *Boletim do Herbarium Bradeanu*, v. 5, p.1-20, 1991.

SHARMA OP, DAWRA RK 1991. Thin- layer chromatographic separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) plant. *J Chrom* 587-354;

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, p. 2738, 2005.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B; CORDEIRO, M. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Esteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (spruce) woodson. *Quim. Nova*, v. 21, p. 702-704, 1998.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre: UFRGS/UFCS, p.229- 256, 2004.

SPINA, A. P.. **Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. Ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. p.40, 2004.

STOCK, C. C.; CLARCK, D. A.; PHILIPS, F. S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. *Cancer Res.*, v. 15, n. 2, p. 2-3, 1955.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas**. Munich: Springer. 2^oed. Berlin: Springer Verlag, p 384, 1996.

WOOD, C. A; LEE, K.; VAISBERG, A. J; KINGSTON, D. G. I; NETO, C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull* v.49, p1477-1478, 2001.

Quadro 1 – Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para a caracterização qualitativa dos constituintes químicos do látex de janaguba em metanol.

Grupo de Metabólitos	Fase móvel	Revelador	Referência
Alcalóides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Dragendorff	Wagner, 1996
Derivados Cinâmicos	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	2-Aminoetildifenil borinato	Markham, 1982 e Neu, 1956
Flavonóides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	2-Aminoetildifenil borinato	Markham, 1982 e Neu, 1956
Protoantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilina clorídrica	Wagner, 1996
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	Benzeno-AcOEt (97:3 v/v)	Vanilina sulfúrica	Wagner, 1996
Iridóides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilina sulfúrica	Harbone, 1998
Triterpenóides, Esteróides	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Liebermann Burchard	Sharma, 1991
Saponinas	EtOAc-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Anisaldeído	Wagner, 1996

Tabela 1 – Efeitos toxicológicos provocados pelas doses do látex de *H. drasticus* administrados em camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*). Dados obtidos durante os primeiros 30 minutos após administração do extrato.

EFEITOS	DOSES (ml/Kg)		
	14	28	42
ESTIMULANTES			
Taquicardia	-	-	+
Taquipnéia	-	-	-
Piloereção	-	+	++
Agitação	-	-	+
Exoftalmia	-	-	+
Movimentos Estereotipados	-	+	+++
Movimentos circulares	-	-	++
Movimentos de vibrissas	-	-	+
Ondulação de cauda	-	-	+
Tremores finos/grosseiros	-	-	+
Postura de ataque	-	-	+
Levantamento dos membros posteriores	-	-	-
Convulsão focal	-	-	-
Reação de fuga	-	+	+++
DEPRESSORES			
Abaixamento dos membros posteriores	-	-	+
Apnéia	-	-	-
Alteração de marcha	-	-	-
Sonolência	-	-	-
Prostração	-	-	++
OUTROS			
Excreção fecal	-	+	++
Diurese	-	-	+
Contorções abdominais	-	-	-
Petéquias	-	-	+
Edema de focinho	-	-	++
Cianose	-	-	-
Fotofobia	-	-	-
Refluxo	-	-	+

(-) sem efeito; (+) efeito leve; (++) efeito moderado; (+++) efeito acentuado.

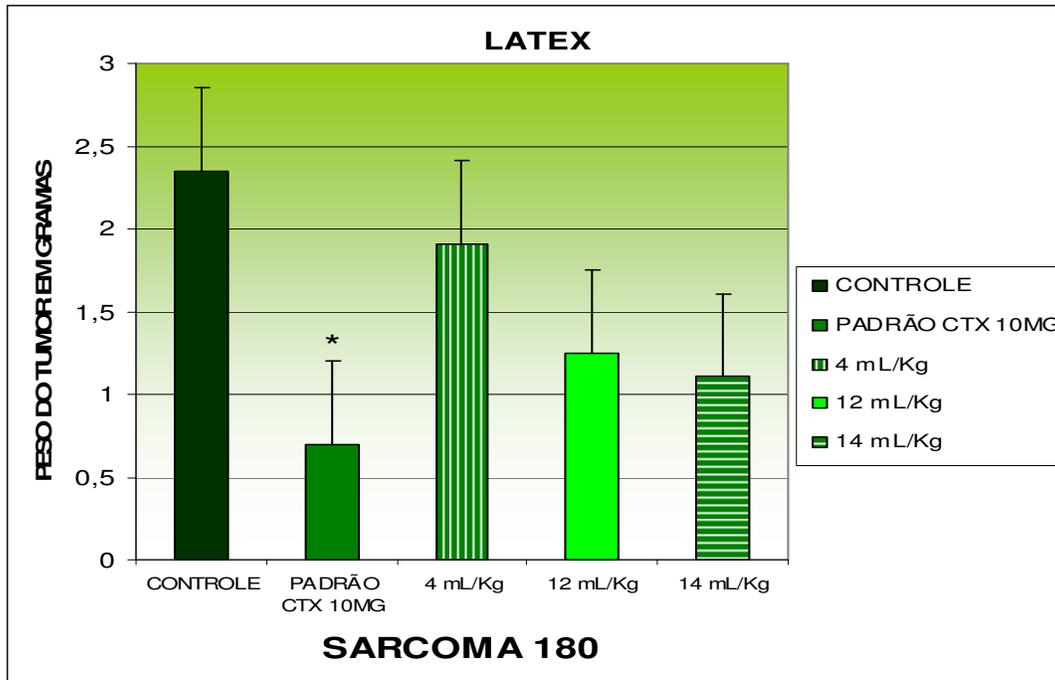


Figura 2. Efeitos do látex de *H. drasticus* frente ao Sarcoma 180. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

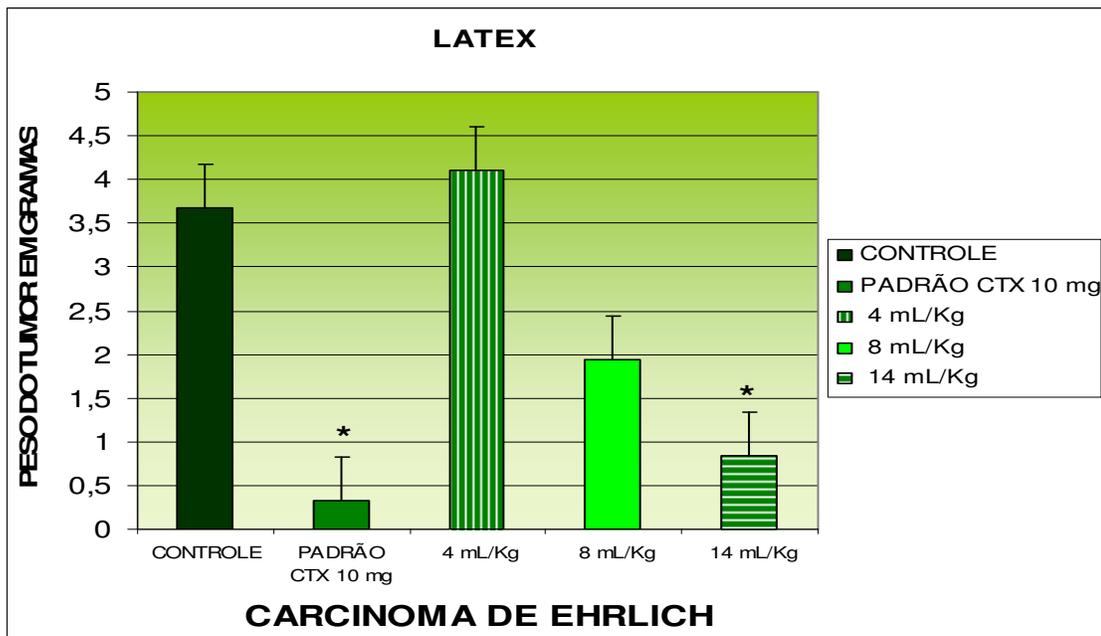


Figura 3: Efeitos do látex de *H. drasticus* frente ao Carcinoma de Ehrlich. Média dos pesos dos tumores. *P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

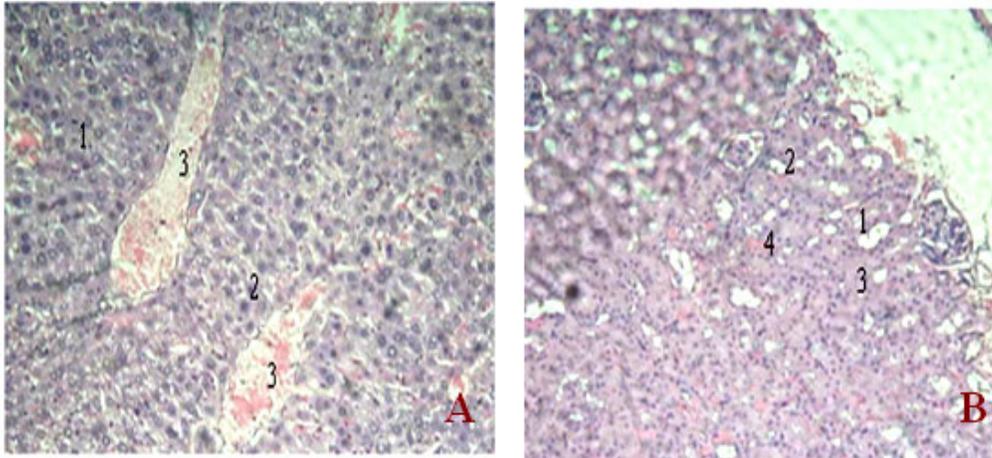


Figura 4 Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com Ciclofosfamida (10mg/kg). **A** Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1) placas de hepatócitos (2), e veias (3) corado com HE. **B** Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), artéria glomerular (4) corado com HE .Obj.10x.

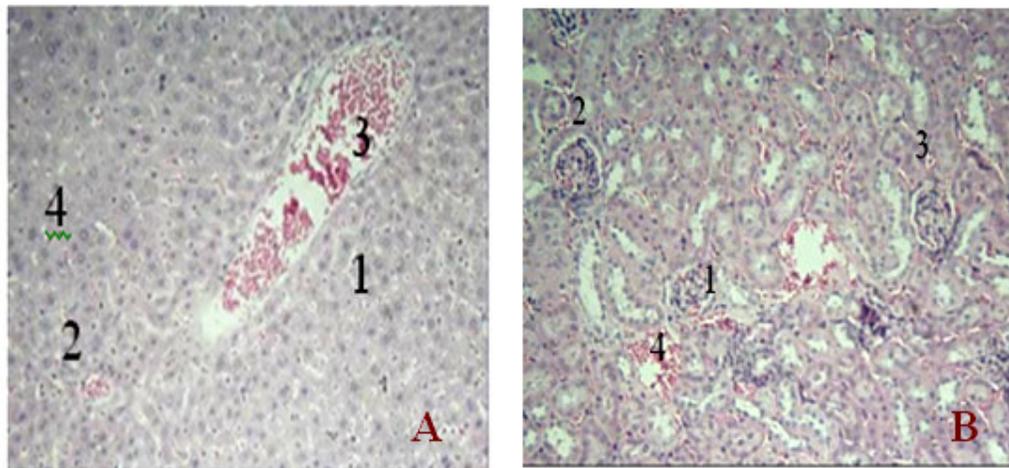


Figura 5. Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com látex 8 ml/Kg. **A** Fotomicrografia do fígado. hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), Vasos congestos (3), sinusóides com a presença de vacúolos (4) corado com HE. **B** Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), pontos de congestão entre os túbulos (4) corado com HE. Obj. 10x

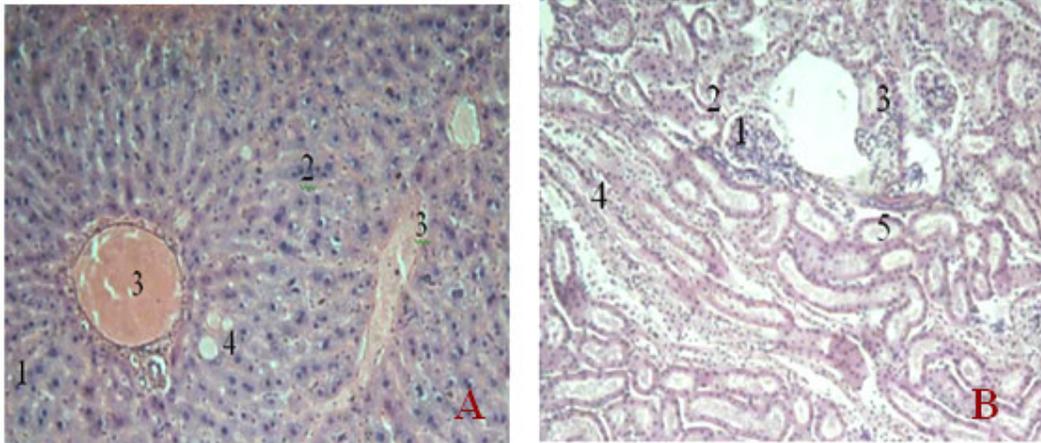


Figura 6. Aspectos histopatológico do fígado e rim dos animais implantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados com látex 14 ml/Kg. **A** Fotomicrografia do fígado. Hepatócitos (1), placas de hepatócitos (2), vasos congestos (3), vacúolos entre as placas (4) corado com HE. **B** Fotomicrografia do rim. Corpúsculo renal (1), túbulo contorcido distal (2), túbulo contorcido proximal (3), raios medulares (4), congestão (5) corado com HE. Obj. 10x

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Para os ensaios fitoquímicos realizados no extrato metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus*, constatou-se a presença de flavonóides (quercetina e rutina), terpenos, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas quando comparados o extrato bruto com o padrão dessas substâncias. Para o látex foram encontrados terpenos como (β - sitosterol e β -amirina).

Na avaliação da toxicidade aguda por via oral tanto para o extrato metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus* como para o látex, foram verificadas reações estimulantes seguidas por reações depressoras sobre o Sistema Nervoso Central. Não houve nenhum óbito nas doses testadas, porém a análise histopatológica do látex apresentou alterações morfológicas a nível renal, hepático, pulmonar e no baço. Para o extrato metanólico das folhas, as alterações morfológicas foram em menor intensidade.

Os resultados da atividade antineoplásica nos modelos experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich apontam uma redução das médias dos pesos dos tumores nos grupos tratados com extrato metanólico das folhas de *H. drasticus*, apresentando melhor atividade para o Carcinoma. Para o látex obteve uma inibição tumoral significativa em relação ao controle apenas para o Carcinoma de Ehrlich e na maior dose testada e na menor dose houve um aumento na média do peso tumoral. Para o Sarcoma 180, apesar de ter apresentado uma redução dos pesos médios dos tumores, o látex não apresentou resultados estatisticamente significativo.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M. S.; WISSE, J.; EVANS, R.; VAN DER WERFF, H.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. *J. Nat. Prod.*, v. 60, n. 12, p. 1294-1297, 1997.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e ciclo-celular não Específicos que Interação com O DNA: Uma Introdução. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, 118-129, 2005

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL-APOCYNACEAE. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 30, n. 3, p. 450-457, 2006a.

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E.M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.-APOCYNACEAE. *Rev. Bras. Sementes*, v. 28, n.1, p. 63-71, 2006b.

BAGGIO, C. H.; MARTINI, G. O.; SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A. M.; TORRES, L. M.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A.; MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med*, v.71, n.8, p.733-738, 2005.

BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G.; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *H. articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.9, p.430-434, 1998.

BRASIL. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispões sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: Diário Oficial da União. 2004.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, Junho 2006.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília, DF, 10 dez. Seção 1. p. 56. 2008a

BRASIL. Ministério da Saúde. Instruções operacionais: informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde. 2008b.

BUCCHI, D.F. **Efeitos do medicamento homeopático método Canova em camundongos normais e portadores de tumor sarcoma 180.** Dissertação (Compilação de duas teses de mestrado). Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 2002.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.*, v. 67 n. 12, p.2141-2153, 2004.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESTRE, J. L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J. Ethnopharmacol.* v.112, p.410-414. 2007.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificações estrutural para a otimização da atividade. *Quim. Nova*, v. 21, p. 99-105, 1998.

COELHO, M. F. B. & AZEVEDO, R. A. B. In: XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife (PE), 2000.

COLARES, A. V.; CORDEIRO, L. N.; COSTA, J. G .M.; SILVEIRA, E. R.; CAMPOS, A. R.; CARDOSO, A. H. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Phcog. Mag.*, v.4, n.14, p.73-77, 2008^a.

COLARES, A. V.; CORDEIRO, L. N.; COSTA, J. G. M.; SILVEIRA, E. R.; CAMPOS, A. R.; CARDOSO, A. H. Efeito gastroprotetor do Látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Infarma*, v.20, n.11/12, p.34-36, 2008b.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. *Do cultivo a terapêutica. Plantas medicinais.* Petrópolis, Vozes, p.69, 1998.

CRAGG, G.C.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, vol. 60, pp. 52-60, 1997.

DAGLI, M. L. Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental**. São Paulo, USP, 1989, p.148. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 1989.

DATASUS. Incidência de câncer no Brasil <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/>>. Acessado em 18.01.2009.

DE SMETT, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, v. 54, p.801-840, 1997.

DIAS, B. F. S. *A implementação da convenção sobre diversidade biológica do Brasil: desafios e oportunidades*. Campinas: André Tosello, 10, 1996.

ENDO, Y.; HAYASHI, H.; SATO, T.; MARUNO, M.; OHTA, T.; NOZOE, S. Confuentic acid and 2'-*O*-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull.* v. 42, p.n1198-1201, 1994.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 15. ed. Londres: Saunders, 2002. 585 p.

FINAU, J.; ANGUINONI, M. *et al.* Ação antiulcerogênica da fração alcaloídica da *Plumeria lancifolia* (Agoniada). XIV Reunião anual da Federação. Caxambu-Brasil, 1996.

GABAI, V. L.; ZAMULAEVA, I. V.; MOSIN, A.; YULIA, M. M.; BUDAGOVA, Y. V.; KABAKOV, A .E. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due accumulation of heat shock proteins. *Cancer Letters*, v. 375, p. 21-26, 1995.

GEBHARDT, R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel. *Planta Med.*, v. 66, p.99-105, 2000.

GOMES, M. J. V. M. & REIS, A. M. M.. **Ciências Farmacêuticas uma abordagem em Farmácia Hospitalar**. 1. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2003. p.429.

GUERRA, M. O & PETERS V. M. Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himatanthus sucuuba* stem bark. *J. Ethnopharmacol.* v. 34, n. 2-3, p.195-

199, 1991.

GUIMARAES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**, 2 ed. São Paulo: BBS Editora. 2006. p.37.

INCA. **Situação do câncer no Brasil. Ministério da Saúde**, Rio de Janeiro, p. 22-53, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13.^o ed. São Paulo: Imprensa Nacional, 2002. p.560

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005.

KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In:**The Practice of Medicinal Chemistry**. Ed. by Wermuth CG. Academic Press Limited, 1996. p. 102-114.

KUBLINSKI, C. **Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural**. Barcelona: Omega, 2000. p.515.

LIMA, O. G.; BANDEIRA, J. A.; VIEIRA, A. E. Uma nova substância antibacteriana, difusiva e termolábil, encontrada na *Plumeria bracteata* D. C. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco*, v. 7, n. 1, p. 698-699, 1947.

LIMA, V. B. **Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Muell. Arg.) Woodson Apocynaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica**. Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, p.13, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Plantarun, 2002. p. 427-2002.

MABBERLEY, D. J. **The Plant Book: Portable dictionary of the vascular plants**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 858.

MAGALHÃES, H. I. F. **Atividade Antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) das Fisalinas Isoladas de *Physalis Angulata* Lin.** Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1998. 126p.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; GORMIAK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Effect of *pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life sciences*, v. 74, p. 573-579, 2003.

MÉLLO, J. F.; LIMA, O. G.; BETTÓLO, G. B.; MONACHE, F. D.; D'ALBUQUERQUE, M. M. F.; OLIVEIRA, R. M. M.; SILVA FILHO. Preliminary observations on the biological effects of the látex from *Plumera bracteata* D. C. *Revista. do Instituto de Antibióticos*, Recife, v. 15, n. (1/2), 1975.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA J. E.; ESPINDOLA L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J. Ethnopharmacol.* v.110, p. 165-170, 2007.

MIRANDA, A. L. P.; SILVA, J. R.; REZENDE, C. M.; NEVES, J.S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. B. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. *Planta Med*, v. 66, n. 3, p. 284-286. 2000.

MODESTO, M. M. L. S. **Aspectos ecológicos e socioeconômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. Janaguba da Chapada do Araripe**. 1997. 55 f. Monografia (Especialização em Botânica) - Universidade Regional do Cariri, Crato, 1997.

MUKHERJEE, A.K.; et al. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 1467-1486, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p.1002-1037, 2003.

OMENA, M.C.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA A. E. G.. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2549–2556, 2007.

ORTHOLAND, J. Y. & GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*. p. 271-280, 2004.

OSÓRIO-BORGES, M. R.; ROBINSON, W. M. *Genética Humana*. 2. Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001. p. 279.

PAYNE, G., BRINGI, *et al.* The quest for commercial production of chemical from plant cell culture. In: PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M. L. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Oxford: Oxford University Press, 1991.

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). *J. Pharm. Sci.*, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Brasília: Min. da Agric. - IBDF, v. 4, p.154, 1994.

PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae). Revisión taxonomique: brandea. *Boletim do Herbarium Bradeanu*, v. 5, p.1-20, 1991.

RATES, S. M. K. Plantas as souces of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-913, 2001.

RATTMANN, Y. D.; TERLUK, M. R.; SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A. M.; BIAVATTI, M. W.; TORRES, L. B. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *J. Ethnopharmacol.*, v.100, n. 3, p. 268-275. 2005.

ROCHA, A. B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v.1. n.4 p. 364-369, 2001.

RINGEL, J. & HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 83, p.288 - 291, 1991.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. *Pharmacol. Ther.*, v.1, p.411 - 435, 1977.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Esteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (spruce) woodson.. *Quim. Nova*, v. 21, p. 702-704, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. MELLO, J .C. P.; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFCS, 2004.

SOUZA, M. S.; CORDEIROA, M. S.; ROSASB, E. C.; HENRIQUESB, M. G. O. M.; SIANIB, A. C. Inhibition of nitric oxide and interferon- γ production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus sucuuba*. *Phcog. Mag.*, v. 2, n. 8, p. 216-218, 2006.

SOUZA, W. M.; BREHMER, F.; NAKAO, L. S.; STINGHEN, A. E. M.; SANTOS, C. A. M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. *Ver. Brás. Farmacogn.* v.17 n. 2, p.191-196, 2007.

SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M.; SANTOS, C. A. M. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia*, v. 75, n. 7-8, p. 750-753. 2004.

SPINA, A. P. **Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. Ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. p.40, 2004.

VANDERLEI, M. F. & SOUZA BRITO, A. R. M. - **Estudo químico e farmacológico de *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.)Woodson** - Dissertação de Mestrado apresentada ao LTF / UFPB, João Pessoa, PB, p.178-236, 1985.

VANDERLEI, M. F.; SILVA, M. S.; GOTTLIEB, H. E.; BRAZ-FILHO, R. Iridoids and Triterpenes from *Himatanthus phagedaenicus*: The complete Assignment of the 1H and 13C NMR Spectra of Two Iridoid Glycosides. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 2, n. 51. 1991

VANDERLEI, M. F.; BRITO, A. R. S. Ações espasmognicas do extrato etanólico bruto de *Himatanthus phagedaenica* (MART.) Woodson, em ileo isolado de cobaia. *Ver. Brás. Farm.*, v. 70, n.1, p.15-18. 1989.

VASCONCELLOS, M. C. **Estudo do potencial antineoplásico da biflorina, o-naftoquinona isolada das raízes de *Capraria biflora* L.** Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura

segura? *Quim. Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELOSO, M. P.; TANUS, J. N.; OLIVEIRA, T. T. β -Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 27, p. 669-671, 1999.

VILLEGAS L. F; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. *J. Ethnopharmacol.* v. 55, p. 193-200, 1997.

WANG, H.; LI, H.; ZUO, M.; ZHANG, Y.; LIU, H.; FANG, W.; CHEN, X. Lx2-32c, a novel taxane and its antitumor activities in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, v. 268 n. 89-97, 2008.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P. & MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 93, p. 2325 - 2327, 1971.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of Cancer. *Cancer Res.* v.45, p. 1-8, 1985

WOOD, C. A.; LEE, K.; VAISBERG, A. J; KINGSTON, D. G. I.; NETO, C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem. Pharm. Bull.* v. 49, p 1477-1478, 2001.

WOODSON, R. E. Studies in the Apocynaceae – 7th., an evaluation of the genera *Plumeria* L. and *Himatanthus* Willd. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 25, n. 1, p. 190-224, 1938.