



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Carla Costa e Silva Scarpa Pereira

Avaliação da atividade antitumoral “*in vitro*” e “*in vivo*” da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolada do extrato bruto de *Piper cubeba* (Piperaceae).

CAMPINAS

2016

Carla Costa e Silva Scarpa Pereira

Avaliação da atividade antitumoral “*in vitro*” e “*in vivo*” da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolada do extrato bruto de *Piper cubeba* (Piperaceae).

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA CARLA COSTA E SILVA SCARPA PEREIRA E ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

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

P414a Pereira, Carla Costa e Silva Scarpa, 1981-
Avaliação da atividade antitumoral "*in vitro*" e "*in vivo*" da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolada do extrato bruto de *Piper cubeba* (*Piperaceae*) / Carla Costa e Silva Scarpa Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Paulo César Pires Rosa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cubebina. 2. *Piper cubeba*. 3. Medicamentos - Dosagem. 4. Atividade antitumoral. 5. Carcinoma de Ehrlich. I. Rosa, Paulo César Pires, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Antitumoral evaluation activity "*in vitro*" and "*in vivo*" of cubebin (solid tumor Ehrlich), isolated of crude extract of *Piper cubeba* (*Piperaceae*)

Palavras-chave em inglês:

Cubebin

Piper cubeba

Drugs - Dosage

Antitumor activity

Carcinoma, Ehrlich tumor

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Paulo César Pires Rosa [Orientador]

Ildenize Barbosa da Silva Cunha

Fernando Luiz Affonso Fonseca

Data de defesa: 03-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 03/02/2016.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa

Dra. Ildenize Barbosa da Silva Cunha

Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca

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

Dedicatórias Especiais

Difícil agradecer a essas iluminadas pessoas que tanto me apoiaram e não mediram esforços para me ajudar em vários momentos de minha vida.

Sempre que necessito, recorro a essas pessoas, pois elas dão sentido à minha vida.

Agradeço aos meus amados pais, Eliane e Carlos, por todo amor, apoio, ensinamentos e pelo fato de que se não fossem vocês, eu não estaria aqui. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês.

Às minhas irmãs queridas Paula e Raquel e à minha cunhada Aline, que é uma irmã querida pra mim pela alegria, amizade e companheirismo.

Ao Ronaldo, meu marido, pelo amor, dedicação e apoio. Um grande beijo. Te amo.

À Beatriz, minha filha, meu incentivo, minha razão para continuar. Mamãe te ama.

Agradeço a Deus por colocar essas pessoas em minha vida, e por todos os momentos e oportunidades de aprendizado e crescimento.

Obrigada.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Paulo César Pires Rosa por incentivar, ajudar, pois pude alcançar um desenvolvimento científico e pessoal. Pela orientação, ensinamentos e oportunidades no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos Prof. Dr. Fábio Ferreira Perazzo e Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pela amizade, pelas dicas, oportunidades.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz pela ajuda na realização dos ensaios antitumorais “in vitro”.

Ao CPQBA por ceder, gentilmente, o laboratório de ensaios biológicos para a realização dos experimentos em animais.

Ao Instituto de Química por sempre cooperar para a realização dos testes de caracterização da cubebina.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin por gentilmente ceder o laboratório e assim possibilitar o doseamento da cubebina no extrato bruto de Piper cubeba.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia Maysa e Cidinha e ao secretário do Programa de Pós-graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, Rafael, por toda colaboração.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Biologia, Instituto de Química, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP – Campinas, por apresentarem-se acessíveis a trocas de informações e à formação de novas amizades.

RESUMO

A *Piper cubeba* é uma especiaria bastante consumida na Europa que possui diversas moléculas bioativas, dentre elas uma lignana chamada cubebina. A cubebina possui várias atividades biológicas conhecidas, como atividade analgésica e antiinflamatória, atividade tripanocida, anti leishmania e atividade antitumoral. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a atividade “*in vitro*” da cubebina em diferentes linhagens tumorais humanas e avaliar a sua atividade “*in vivo*” em um modelo de neoplasia experimental transplantável, o tumor de Ehrlich. A cubebina, isolada a partir do extrato etanólico bruto de *Piper cubeba*, foi devidamente caracterizada por análises de infravermelho, RMN, espectrometria de massas, DSC, TGA, análise elementar e solvente residual. Posteriormente, o doseamento da cubebina no extrato foi realizado por UPLC/MS, chegando à concentração de 10%. A atividade antitumoral da cubebina foi avaliada “*in vitro*” em 8 diferentes linhagens tumorais humanas e observou-se que a cubebina produziu inibição do crescimento. A cubebina apresentou $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ para as linhagens U251 (glioma, SNC), 786-0 (rim), PC-3 (próstata), HT-29 (colorretal). Para a linhagem K562 (leucemia), a cubebina apresentou $GI_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$. Para as demais linhagens, MCF-7 (mama) e NCI-H460 a cubebina pode ser considerada inativa, pois $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$. Analisando o índice de seletividade para a cubebina pode-se observar uma alta seletividade da cubebina para a linhagem K562 (leucemia). A cubebina foi avaliada em um modelo de neoplasia experimental transplantável, o tumor sólido de Ehrlich. O tratamento com cubebina foi realizado nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/Kg por via oral. A cubebina não demonstrou nenhuma toxicidade. Em relação ao tumor, não foi observada diferença estatística significativa entre o controle negativo e o positivo, utilizados no estudo, o que impossibilita uma avaliação fidedigna do resultado. A diferença significativa entre os grupos foi avaliada por ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism 5.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Assim, o estudo visa contribuir com o melhoramento da qualidade de vida de pacientes portadores de câncer, através do desenvolvimento de fármacos eficazes com potência clínica elevada e efeitos colaterais reduzidos.

Palavras-chave: cubebina, *Piper cubeba*, doseamento, atividade antitumoral

ABSTRACT

The *Piper cubeba* it is one spice, widely consumed in Europe, which has several bioactive molecules, between those a lignan call cubebin. The cubebin has several known biological activities, such as analgesic activity and anti-inflammatory, trypanocidal activity, anti leishmania and antitumor activity. The objective of this study was to evaluate the activity "*in vitro*" cubebin in different human tumor cell lines and evaluate its activity "*in vivo*" in a model of transplantable experimental neoplasm, the Ehrlich tumor. It was fully characterized by IR analysis, NMR, mass spectrometry, DSC, TGA, residual solvent and elemental analysis. Subsequently, the dosage of cubebin the extract was done by UPLC / MS, reaching the 10% concentration. The antitumor activity of cubebin was evaluated "*in vitro*" on 8 different human tumor cell lineages and it was observed that the cubebin produced growth inhibition. The cubebin showed $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g} / \text{ml}$ for lineage cell U251 (glioma CNS), 786-0 (kidney), PC-3 (prostate), HT-29 (colon rectum). For K562 cells (leukemia), the cubebin presented $GI_{50} \leq 4.0 \text{ mg} / \text{mL}$. For the other lineages cells, MCF-7 (breast) and NCI-H460 to cubebin can be considered inactive because $GI_{50} > 250 \text{ mg} / \text{mL}$. Analyzing the selectivity index for cubebin can be observed high selectivity of cubebin to K562 lineage cells (leukemia). The cubebin was evaluated in a model of experimental transplantable tumor, malignant epithelial origin: the solid tumor Ehrlich. Cubebin treatment was performed at doses of 12.5; 25 and 50 mg / kg orally. The cubebin showed no toxicity. Regarding the tumor, there was no statistically significant difference between the negative and the positive control used in the study, which prevents an accurate assessment of the result. The significant difference between groups was evaluated by ANOVA followed by Tukey post hoc test using GraphPad Prism 5.0 software. P values < 0.05 were considered significant. Therefore, the study aimed at contributing to the improvement of quality of life for cancer patients through the development of effective clinical drugs with high potency and reduced side effects.

Keywords: cubebin, *Piper cubeba*, dosage, antitumor activity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1: Fluxograma da metodologia para extração das sementes de <i>Piper cubeba</i> e isolamento da cubebina.	36
FIGURA 3.2: Curva DSC da cubebina com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹ até 600°C.	43
FIGURA 3.3: Curva TGA/DTG da substância isolada, com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹ até 600°C.	44
FIGURA 3.4: Termograma da cubebina com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹ até 600°C.	45
FIGURA 3.5: Espectro de Infravermelho da cubebina (KBr, cm ⁻¹).	45
FIGURA 3.6: Espectro de RMN de ¹ H da cubebina (500 MHz, CDCl ₃).	47
FIGURA 3.7: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da cubebina (500 MHz, CDCl ₃).	48
FIGURA 3.8: Espectro de RMN de ¹³ C da cubebina (100 MHz, CDCl ₃).	50
FIGURA 3.9: Expansão do espectro de RMN de ¹³ C da cubebina (100 MHz, CDCl ₃).	50
FIGURA 3.10: Mapa de contornos HMBC da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	52
FIGURA 3.11: Expansão do mapa de contornos HMBC da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	53
FIGURA 3.12: Expansão do mapa de contornos HMBC da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	53
FIGURA 3.13: Mapa de contornos HSQC da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	55
FIGURA 3.14: Expansão do mapa de contornos HSQC da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	56
FIGURAS 3.15 e 3.16: Expansão do mapa de contornos HSQC da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	56
FIGURA 3.17: Mapa de contornos COSY da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	57
FIGURA 3.18: Mapa de contornos COSY da cubebina (¹ H: 500 MHz, ¹³ C: 100 MHz).	58

FIGURA 3.19: Cromatograma do extrato bruto de Piper cubeba, obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletrospray. Coluna Zorbax C-18, 100 X 4,6 mm, 3,5 μ m, temperatura 25°C, fluxo 0,9 mL/min, volume de injeção 1 μ L.	59
FIGURA 3.20: Espectro do extrato bruto de <i>Piper cubeba</i> obtido pelo método ESI-MS.	60
FIGURA 3.21: Cromatograma do composto isolado cubebina obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletrospray. Coluna Zorbax C-18, 100 X 4,6 mm, 3,5 μ m, temperatura 25°C, fluxo 0,9 mL/min, volume de injeção 1 μ L.	60
FIGURA 3.22: Espectro de massas da cubebina obtido pelo método ESI-MS.	61
FIGURA 3.23: Formas monocarregadas da cubebina.	61
FIGURA 3.24: Espectro de MS/MS da m/z 379,1150 obtido pelo método ESI-MS.	62
FIGURA 3.25: Espectro de MS/MS da m/z 321,1124 obtido pelo método ESI-MS.	62
FIGURA 3.26: Proposta de mecanismo de fragmentação para o íon com m/z 161,0604.	63
FIGURA 3.27: Proposta de mecanismo de fragmentação para o íon com m/z 149,0603.	63
FIGURA 3.28: Proposta de mecanismo de fragmentação para o íon com m/z 135,0442.	64
FIGURA 3.29: Cromatograma obtido por CG referente à análise de solvente residual.	64
FIGURA 3.30: Corrente total iônica do extrato bruto de Piper cubeba, obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletrospray. Coluna Zorbax SBS C18, 1,8 μ m, 50 x 20 mm, temperatura 40°C, fluxo 0,45 mL/min, volume de injeção 1 μ L.	65
FIGURA 3.31: Espectro de massas do extrato bruto de <i>Piper cubeba</i> obtido pelo método +-ESI-MS.	65
FIGURA 3.32: Corrente total iônica do composto isolado cubebina obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletrospray. Coluna Zorbax	

SBS C18, 1,8 μm , 50 x 20 mm, temperatura 40°C, fluxo 0,45 mL/min, volume de injeção 1 μL .	66
FIGURA 3.33: Espectro de massas da cubebina obtido pelo método +-ESI-MS.	67
FIGURA 3.34: Curva analítica para cubebina construída com os valores das médias das respostas para cada concentração, na faixa de 0,025 a 0,075 mg/mL.	68
FIGURA 3.35: Gráfico de resíduos para cubebina construído com os valores das respostas obtidas em triplicata para cada concentração, na faixa de 0,025 a 0,075 mg/mL.	70
FIGURA 4.1: Atividade antiproliferativa da cubebina frente à linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 mg/mL), durante 48h.	81
FIGURA 4.2: Atividade antiproliferativa da doxorrubicina frente à linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,025; 0,25; 2,5 e 25 mg/mL), durante 48h.	82
FIGURA 4.3: Evolução de peso corporal dos animais estudados nos grupos controle negativo, controle positivo, e grupos tratados com cubebina (12,5mg/Kg, 25mg/Kg, 50mg/Kg).	83
FIGURA 4.4: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem de leucócitos, WBC ($10^6/\mu\text{L}$).	85
FIGURA 4.5: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem de hemácias, RBC ($10^6/\mu\text{L}$).	85
FIGURA 4.6: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem de plaquetas, PLT ($10^3/\mu\text{L}$).	86
FIGURA 4.7: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a análise da heterogeneidade do volume plaquetário, PDW (fL).	87

FIGURA 4.8: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem absoluta de linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)._____ **88**

FIGURA 4.9: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem absoluta de monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)._____ **88**

FIGURA 4.10: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a razão linfócitos/monócitos._____ **89**

FIGURA 4.11: Tumor sólido de Ehrlich no grupo não-tratado (PBS, pH 7,0 + Tween 80 0,3%), no grupo tratado com doxorrubicina e nos grupos tratados cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg. O tumor foi expresso como o peso do tumor dividido pelo peso corporal, multiplicado por 100. ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos._____ **90**

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Gradiente para análise UPLC-MS. Fase móvel A - água purificada (Milli-Q) e como fase móvel B – metanol.	37
TABELA 3.2: Gradiente para análise UPLC-MS. Fase móvel A - água purificada (Milli-Q) e como fase móvel B – metanol.	39
TABELA 3.3: Método de diluição pelo equipamento para construção da curva de linearidade.	41
TABELA 3.4: Método de diluição pelo equipamento para doseamento da cubebina na amostra de extrato.	41
TABELA 3.5: Frações obtidas de acordo com o esquema de solventes utilizado.	42
TABELA 3.6: Agrupamento de frações de acordo com a composição.	42
TABELA 3.7: Dados do espectro de IR da cubebina e dados da literatura, em intervalo de frequência (cm^{-1}) (Skoog <i>et al.</i> , 2002).	46
TABELA 3.8 Dados do espectro de RMN de ^1H cubebina e dados da literatura, a 500 Hz em CDCl_3 [δ em ppm, multiplicidade, (J em Hz)].	47
TABELA 3.9: Dados do espectro de RMN de ^{13}C , da cubebina a 100 MHz em CDCl_3 (δ em ppm) em comparação com os dados obtidos por PACHECO, 2010.	49
TABELA 3.10: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HMBC) referentes ao estereoisômero A.	51
TABELA 3.11: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HMBC) referentes ao estereoisômero B.	52
TABELA 3.12: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HSQC) referentes ao estereoisômero A.	54
TABELA 3.13: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HSQC) referentes ao estereoisômero B.	55
TABELA 3.14: Composição percentual teórica e experimental da amostra.	58

TABELA 3.15: Pontos da curva de linearidade, mostrando as concentrações de cubebina, as respostas obtidas em triplicata, a média e o desvio padrão relativo das respostas.	67
TABELA 3.16: Pontos da curva de linearidade, mostrando as concentrações de cubebina, as respostas obtidas em triplicata, o valor de Y (modelo) e o valor do resíduo.	69
TABELA 3.17: Doseamento realizado em triplicata com três diferentes extratos preparados na concentração de 10mg/mL.	70
TABELA 4.1: Linhagens celulares tumorais e normal (HaCat) utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas DI.	75
TABELA 4.2: Grupos de animais separados conforme marcação com ácido pícrico e tratamentos diferenciados.	77
TABELA 4.3: Growth Inhibition - GI ₅₀ (µg/mL) para Doxorubicina e Cubebina.	80
TABELA 4.4: Índice de Seletividade (IS) para a cubebina e doxorubicina.	80
TABELA 4.5: Células do hemograma e peso dos órgãos (média ± DV) dos animais do grupo não-tratado, tratado com doxorubicina e tratados com cubebina (12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg) durante 12 dias.	85
TABELA 7.1: Evolução de peso corporal dos animais tratados com PBS + DMSO (controle negativo).	103
TABELA 7.2: Evolução de peso corporal dos animais tratados com doxorubicina (controle positivo).	104
TABELA 7.3: Evolução de peso corporal dos animais tratados com cubebina (dose 12,5 mg/Kg).	105
TABELA 7.4: Evolução de peso corporal dos animais tratados com cubebina (dose 25 mg/Kg).	106
TABELA 7.5: Evolução de peso corporal dos animais tratados com cubebina (dose 50 mg/Kg).	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização química em pressão atmosférica

APPI – Fotoionização em pressão ambiente

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

COSY – Espectroscopia de correlação

COX-1 e -2 – Ciclooxigenase-1 e -2

CV– Coeficiente de variação

d – Duplete

dd – Duplo duplete

DE – Disfunção erétil

DE₅₀ – Dose efetiva em 50%

DL₅₀ – Dose letal em 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP– Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

EEB – Extrato etanólico bruto

EI – Ionização por elétrons

ESI – Ionização por eletronspray

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas

GI₅₀ – Inibição do crescimento em 50%

HPLC– Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas

HS-GC-MS – Headspace e cromatografia gasosa acoplados à espectrometria de massa

HMBC – Espectroscopia de correlação heteronuclear de múltiplas ligações

HSQC – Espectroscopia de correlação de um único quantum heteronuclear

IonTrap – Armadilha de íons

IR – Infravermelho

J – Constante de acoplamento (Hz)

m – Multipleteo

MALDI – Ionização por dessorção a laser assistida por matriz

MeOH – Metanol

$[M + Na^+]$ – Aduto de sódio

$[M + K^+]$ – Aduto de potássio

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenosina

NO – Óxido nítrico

NO/GMPc – Óxido nítrico/ Monofosfato cíclico de guanosina

PBS – Tampão fosfato-salino

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SFB – Sulforrodamina

t – Tripleto

TCA – Ácido tricloroacético

TGA – Análise termogravimétrica

TIC – Corrente total iônica

TOF – Analisadores por tempo de voo

UPLC- MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas

δ - Deslocamento químico em unidades δ (ppm)

SUMÁRIO

1. Introdução e Objetivos	19
1.1 Considerações Gerais	19
1.2 Objetivos.....	20
2. Revisão Bibliográfica	22
2.1 Câncer	22
2.2 Tumor de Erlich	22
2.3 Família Piperaceae e o gênero Piper	23
2.4 Composição do extrato de <i>Piper cubeba</i>	23
2.5 Atividades biológicas da cubebina e seus derivados por semi-síntese	23
2.5.1 Atividade analgésica e antiinflamatória	23
2.5.2 Atividade antitumoral	25
2.5.3 Atividade na disfunção erétil.....	27
2.5.4 Atividade Tripanocida	28
2.5.5 Atividade Anti-Leishmania	30
2.5.6 Atividade Antibacteriana contra patógenos orais.	31
3. Extração, Isolamento, Caracterização e Doseamento da Cubebina	33
3.1 Introdução	33
3.2 Metodologia.....	34
3.2.1 Metodologia da extração e isolamento	34
3.2.2 Metodologia da caracterização.....	36
3.2.3 Metodologia do doseamento	39
3.3 Resultados e Discussão	42
3.3.1 Resultados e Discussão da Extração e Isolamento	42
3.3.2 Resultados e Discussão sobre a caracterização da cubebina	43
3.3.3 Resultados e Discussão sobre o doseamento da cubebina	64
3.4 Conclusão	71
4. Atividade antitumoral “<i>in vitro</i>” e “<i>in vivo</i>” da cubebina	73
4.1 Introdução	73
4.2 Metodologia.....	73

4.2.1 Atividade antiproliferativa em painel de linhagens tumorais humanas (“ <i>in vitro</i> ”)..	73
4.2.2 Atividade antitumoral “ <i>in vivo</i> ”.....	75
4.3 Resultados e Discussão	79
4.3.1 Resultados e Discussão da atividade antiproliferativa em painel de linhagens tumorais humanas (“ <i>in vitro</i> ”)	79
4.3.2 Resultados e Discussão da atividade antitumoral da cubebina em tumor sólido de Ehrlich (“ <i>in vivo</i> ”)	83
4.4 Conclusão	91
5. Conclusão Geral	94
6. Referências Bibliográficas	95
7. Anexos	103

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

1. Introdução e Objetivos

1.1 Considerações Gerais

O homem sempre procurou se adaptar e utilizar os recursos da natureza para sua sobrevivência e bem estar, e passar estas informações para as gerações futuras (DI STASI, 1996).

A etnofarmacologia realiza pesquisas a partir desta cultura popular (DI STASI, 1996; SIMÕES *et al.*, 1999).

O artigo de Elisabetsky & Wannacher, de 1993, fala do status da etnofarmacologia naquela época. A dificuldade do trabalho interdisciplinar, por exemplo, entre químicos e farmacologistas, o que gerava vários estudos farmacológicos sem o devido estudo fitoquímico e, por outro lado, substâncias isoladas de plantas sem a devida avaliação farmacológica. As autoras citam o preconceito com a etnofarmacologia no meio acadêmico, e a sua falta de credibilidade na descoberta de novos compostos.

No Brasil as plantas medicinais são utilizadas por grande parcela da população, tanto na medicina popular (na forma de chás), quanto na forma de fitoterápicos (DI STASI, 1996). Com isso tornou-se cada vez mais necessário determinar o agente responsável pela ação terapêutica, contribuindo com o desenvolvimento da química farmacêutica e o início de uma nova fase de tratamento das doenças. (ROBBERS *et al.*, 1997).

Atualmente, as plantas e seus metabólitos secundários são utilizados na indústria farmacêutica como protótipos para a síntese de novos fármacos, ou como fitoterápicos (SIMÕES *et al.*, 1999).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antitumoral da cubebina “*in vitro*” em linhagens celulares tumorais humanas e avaliar a sua atividade antitumoral “*in vivo*” em um modelo de neoplasia experimental, o tumor sólido de Ehrlich.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Isolar a substância cubebina a partir das sementes secas de *Piper cubeba*.
- Realizar a caracterização química da substância isolada cubebina por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Análise Espectral De Infravermelho (IV), Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada À Espectrometria De Massas (LC/MS), Calorimetria Diferencial De Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA), Análise Elementar.
- Desenvolver método de doseamento da cubebina no extrato bruto de *Piper cubeba*.
- Avaliar a atividade antitumoral “*in vitro*” da cubebina em linhagens celulares tumorais humanas.
- Avaliar a atividade antitumoral “*in vivo*” da cubebina em tumor sólido de Ehrlich.

CAPÍTULO 2

REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Câncer

Segundo dados da GLOBOCAN 2012, apesar dos avanços na área de pesquisa de drogas anticâncer 14,1 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados no mundo, com 8,2 milhões de mortes (FERLAY, J. *et al.*, 2012).

As neoplasias podem ser devidas a agente químicos, físicos ou biológicos. Os carcinógenos químicos causam a maioria das neoplasias humanas, já que estão presentes ao longo de toda a sua vida (MAINENTI, ROSA, 2008). Os carcinógenos químicos não têm necessariamente origem exógena. Os radicais livres geram um estresse oxidativo celular, que associado a fatores genéticos, exposições ambientais e estilo de vida podem promover o surgimento de alterações neoplásicas (SERPI, 2003; RUBIN, FARBER, 2006).

Tumores de animais e seres humanos são de maneira geral constituídos por células semelhantes, sendo que esta constatação possibilitou o surgimento da oncologia experimental, tumores transplantáveis (CHEVILLE, 1994).

Em 1876, transplantou-se o tumor venéreo canino (sarcoma de Sticker) e, no início do século XX, transplantaram-se suspensões teciduais de tumores mamários de ratos. Esse fato, aliado ao progresso do conhecimento dos mecanismos de homeostase de hospedeiros portadores de tumor, resultou em investigações sobre os efeitos do desenvolvimento do tumor em modelos experimentais baseados em hospedeiros, como o tumor de Ehrlich (DAGLI, 1989).

2.2 Tumor de Erlich

O tumor de Ehrlich se constitui como uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica, correspondendo ao adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea (EHRlich, 1906). Como o tumor de Ehrlich possui um alto índice de invasividade, tem sido utilizado no estudo dos componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SEGURA *et al.*, 2000; MADY, 2002; PALERMO-NETO *et al.*, 2003). A vantagem na utilização de neoplasias transplantáveis se deve ao desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo e sobre o conhecimento prévio da quantidade e das

características iniciais das células tumorais a serem inoculadas (STEWART *et al.*, 1959).

2.3 Família Piperaceae e o gênero Piper

A família Piperaceae, pertencente ao reino Plantae é uma das famílias mais primitivas de Angiosperma. Pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Piperales. Essa família é constituída por quatro gêneros (*Ottonia*, *Piperomia*, *Piper*, *Sarcorrhachis*) com cerca de 3000 espécies (YUNCKER, 1972). O gênero *Piper* inclui mais de 1000 espécies de plantas que crescem como ervas, arbustos ou árvores (JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

2.4 Composição do extrato de *Piper cubeba*

A *Piper cubeba* é uma especiaria consumida na Europa, Arábia, Índia, Indonésia e Marrocos. Esta pimenta tem sido usada desde a idade média tanto como uma especiaria quanto na medicina tradicional para tratamento de várias doenças (JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos do extrato de *Piper cubeba* identificaram a presença de terpenos, alcalóides e lignanas, dentre os quais se destacam pela quantidade produzida pela planta, os óleos essenciais e as lignanas (ELFAHMI *et al.*, 2007).

As atividades biológicas do extrato bruto (SILVA *et al.*, 2007; PANDEY and SINGH, 2009) e óleos essenciais (MAGALHÃES *et al.*, 2012) tem sido bastante investigados. As pesquisas porém se concentram em uma lignana dibenzilbutirolactônica, a (-)-cubebina (SILVA *et al.*, 2005) isolada das sementes secas de *Piper cubeba*, que possui uma ampla gama de atividades biológicas. As várias propriedades benéficas incluem atividade analgésica, antiinflamatória (BASTOS *et al.*, 2001), antitumoral (YAN *et al.*, 2008), tripanocida (BASTOS *et al.*, 1999; de SOUZA *et al.*, 2005) e atividade antileishmania (BODIWALA *et al.*, 2007).

2.5 Atividades biológicas da cubebina e seus derivados por semi-síntese

2.5.1. Atividade analgésica e antiinflamatória

A inflamação é uma resposta do sistema imune durante um quadro de infecção ou após uma lesão tecidual. A resposta inflamatória constitui-se na

liberação de mediadores químicos pelas células do sistema imune (STUTZ *et al.*, 2009).

Prostaglandinas são potentes mediadores da inflamação e os medicamentos antiinflamatórios não-esteroidais agem inibindo sua produção. O alvo farmacológico desses medicamentos é a ciclooxigenase, a qual participa na primeira etapa do metabolismo do ácido araquidônico. Duas isoformas da ciclooxigenase são conhecidas, a COX-1 e a COX-2. É desejável que os medicamentos inibam seletivamente a COX-2, de maneira a evitar efeitos colaterais ulcerogênicos típicos destes medicamentos (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Em estudo realizado por Bastos *et al.*, (2001) foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. A cubebina foi isolada a partir do extrato bruto hexânico das folhas de *Zanthoxylum naranjillo*. As folhas foram secas a 40°C e exaustivamente extraídas por maceração com hexano. Detalhes das técnicas para isolamento e identificação da cubebina foram descritas por Bastos *et al.*, (1999). Neste estudo a cubebina foi testada e comparada à indometacina, que é um antiinflamatório não-esteroidal, usado como controle positivo. Os pesquisadores observaram que a administração de carragenina produziu um edema significativo nas patas dos ratos, que foi mais intensa nos animais tratados apenas com Tween 5%. A cubebina (10mg/Kg) administrada 30 minutos antes da injeção de carragenina inibiu a formação do edema em 53% depois de 2,5h da injeção do estímulo inflamatório, o que foi bastante semelhante ao resultado obtido para a mesma dose oral de indometacina, que inibiu o edema em 58%. Neste estudo, o grupo de pesquisa também utilizou outros modelos de inflamação, como edema induzido por dextrano, por histamina, por serotonina e por prostaglandina PGE₂, separadamente. Destes, a cubebina foi capaz de inibir parcialmente o edema induzido por serotonina e de forma significativa o edema induzido por prostaglandina.

Em outro estudo conduzido por Coimbra *et al.*, (2004) os efeitos analgésico e antiinflamatório da cubebina e de seu derivado benzilado, a (-) o-benzilcubebina, foram investigados usando diferentes modelos de testes em animais. A cubebina foi isolada a partir das sementes secas de *Piper cubeba* L. A (-) o-benzilcubebina mostrou baixa atividade antiinflamatória e alta atividade analgésica, produzindo correlação dose-resposta nas doses de 10, 20 e 40mg/Kg. No teste de placa quente e migração de células, a cubebina e seu derivado não

mostraram atividade. Desta maneira, de acordo com o grupo de pesquisa, a adição do grupo benzil contribuiu apenas para a atividade analgésica.

Souza *et al.*, (2004) realizou um trabalho com o objetivo de obter (-)-O-acetil,(-)-O-metil, (-)-O-dimetiletamina cubebina a partir da cubebina (isolada de sementes secas de *Piper cubeba* L.) e testar suas atividades analgésica e antiinflamatória. Estes compostos foram obtidos respectivamente por acetilação, metilação e aminação do grupo hidroxila da cubebina. De acordo com os resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que a acetilação e aminação da cubebina aumentaram as atividades analgésica e antiinflamatória. Em relação ao teste de placa quente e de migração de células de ratos nenhum dos quatro compostos testados mostrou atividade.

Em estudos realizados em 2005 foram testados a cubebina e seus derivados: hinoquinina, 6,6-dinitrohinoquinina e 6,6-diaminohinoquinina em diferentes modelos animais. A cubebina foi isolada de sementes secas de *Piper cubeba* L. (SILVA *et al.*, 2005). No modelo de edema de pata induzido por carragenina as respostas foram comparadas à indometacina. Neste estudo a administração da carragenina nas patas de rato induziu uma resposta edematogênica alta e o tratamento dos animais com cubebina e seus derivados inibiu de forma variada, porém significativa a formação do edema. Segundo os autores a introdução de grupos $-NH_2$, 6,6-diaminohinoquinina pode ser benéfica para a atividade (inibição 82%) e as diferentes substituições podem afetar a seletividade pela COX_2 . No teste de contorção induzido por ácido acético em ratos, os compostos hinoquinina e 6,6-diaminohinoquinina mostraram níveis de inibição de 97% e 92% respectivamente. Os pesquisadores concluíram através dos estudos que a introdução de grupos polares nos anéis aromáticos é vantajosa para as atividades analgésica e antiinflamatória (SILVA *et al.*, 2005).

2.5.2 Atividade antitumoral

O processo de carcinogênese se dá a partir da interação entre um agente carcinogênico (ou oncogênico) e genes, alterando características celulares, descontrolando a divisão celular e gerando um crescimento desgovernado de células neoplásicas (MAINENTI, ROSA, 2008, VAINIO *et al.*, 1992).

Os radicais livres gerados pelos processos metabólicos de um organismo

aeróbio acarretam um estresse oxidativo celular, contribuindo com processos de envelhecimento, transformação e morte celular. Estes processos se relacionam a muitas patologias, dentre elas o câncer (VASCONCELOS *et al.*, 2007). As substâncias fenólicas, por sua vez, possuem propriedades antioxidantes, atuam como sequestradores de radicais livres e como quelante de metais (PESSUTO *et al.*, 2009).

Em estudo conduzido por Aboul-Eneim *et al.*, (2011) a atividade antioxidante de 16 compostos isolados de *Piper cubeba*, dentre elas a cubebina foi medida através da capacidade de eliminar os radicais livres: o radical hidroxila (OH^\cdot), o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH) em diferentes sistemas. Os resultados obtidos demonstraram que a maioria dos compostos testados agiu como sequestrador de radicais livres em condições *in vitro* e podem agir como agentes antioxidantes pelo mecanismo anti-radical livre.

Rezende *et al.*, (2011) avaliou o potencial genotóxico e influência sobre danos cromossômicos induzidos por doxorrubicina em células V79 e por uretano em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Concluiu-se que a cubebina possui capacidade antioxidante, atuando como sequestrador de radicais livres em baixas concentrações, um pró-oxidante em concentrações mais elevadas quando interage com o sistema enzimático que catalisa a desintoxicação metabólica de doxorrubicina ou uretano e/ou um indutor de reparo de DNA (ácido desoxirribonucleico) por recombinação. Existe uma relação dose - dependente.

Os mesmos autores continuaram seus estudos e analisaram a capacidade da cubebina interagir com o sistema enzimático que catalisa a detoxificação metabólica do uretano (carcinógeno). A cubebina teve essa capacidade comprovada, inibindo a atividade do complexo mitocondrial I, agindo como captador de radical livre. Além disso, a cubebina pôde modular a ativação metabólica do uretano por inibir a ligação dos metabólitos ao DNA (REZENDE *et al.*, 2013).

Vários produtos naturais comumente usados na medicina tradicional podem alterar a biodisponibilidade e a farmacocinética de uma ampla gama de medicamentos pela inibição da citocromo P450 (MUKERJEE *et al.*, 2011).

A cubebina pode inibir significativamente a CYP3A4 (USIA *et al.*, 2005, 2006) e a atividade do complexo mitocondrial I da NADPH oxidase (SARAIVA *et al.*,

2009). De acordo com Sinigaglia *et al.*, (2006), co-tratamentos com oxidantes e cubebina resultam em uma redução da taxa de mutação, podendo ser classificado como efeito desmutagênico. A capacidade desmutagênica da cubebina não está muito clara, podendo ser atribuída à capacidade antioxidante e à supressão da atividade metabólica.

Em estudo *in vitro* realizado em duas diferentes linhagens celulares de câncer de próstata humano (LNCaP-FGC e PC-3) foi avaliado o potencial anti-câncer de um extrato etanólico de *Piper cubeba*, chamado no estudo de P9605. Análises de HPLC revelaram que P9605 continha 16,53% de cubebina. Os resultados indicaram que P9605 inibiu a proliferação em células de câncer de próstata humano LNCaP por reduzir a síntese de DNA e induzir apoptose. O efeito anti-crescimento foi menos pronunciado na linhagem PC-3. P9605 inibiu de forma pronunciada a atividade da 5 α -redutase II, que é responsável por converter a testosterona em sua forma ativa e suprimiu a secreção de PSA em células LNCaP, agindo portanto por vários mecanismos (YAM *et al.*, 2008).

2.5.3 Atividade na disfunção erétil

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente em se obter e/ou manter uma rigidez peniana adequada a qual permita uma relação sexual satisfatória, segundo o consenso do National Institutes of Health (NIH) sobre impotência (IMPOTENCE, 1992).

Alguns metabólitos de plantas como flavonóides, taninos e lignanas podem produzir relaxamento de vasos mediado por NO (ACHIKE e KWAN, 2003).

Carvalho *et al.*, (2013) investigou o efeito vasorrelaxante produzido pela cubebina, a partir de sementes secas de *Piper cubeba L.*, em anéis de aorta isolada de ratos, pré-contraídos com fenilefrina e o possível mecanismo envolvido neste evento foi avaliado. Sugeriu-se que a cubebina tem um efeito vasorrelaxante dependente da via NO/GMPc. Além de NO, a liberação de prostaciclina endotelial também contribui para o relaxamento do músculo liso via GMPc (PARKINGTON *et al.*, 2004). Porém neste caso, segundo os autores, o pré-tratamento com indometacina falhou em modificar o relaxamento induzido por cubebina, sugerindo que os prostanóides não contribuem para o efeito relaxante.

Pesquisadores da UNIFRAN (Universidade de Franca), liderados pelo Prof. Dr. Márcio Luiz de Andrade e Silva, têm uma patente depositada, com o número de publicação (WO/2011/075801/A1) a respeito do uso da lignana dibenzilbutirolactônica e seus derivados, bem como de outras lignanas e neolignanas, e em especial da cubebina como agente vasodilatador na terapia da disfunção erétil. Foram realizados testes *in vivo* utilizando camundongos Swiss. Os camundongos foram divididos em grupos recebendo diferentes doses de cubebina, grupos controle e grupos recebendo tratamento com citrato de sildenafil. A partir do resultado dos testes o grupo de pesquisa pôde observar que o uso da cubebina revelou efeitos positivos similares aos das drogas atualmente empregadas para o tratamento da impotência sexual masculina, particularmente do Viagra, porém sem apresentar a taquicardia e a agitação inerentes à mesma. O mecanismo de ação sugerido foi o bloqueio da PDE5 - fósforo diesterase 5 (SILVA, *et al.*, 2009).

2.5.4 Atividade Tripanocida

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o responsável pelo desenvolvimento da doença de Chagas no hospedeiro humano, principalmente pelo vetor hematófago conhecido como “barbeiro”. São possíveis também outras vias de transmissão como transfusões de sangue, transmissão vertical mãe-bebê e mais raramente por alimentos frescos contaminados (MONCAYO *et al.*, 2006). Esta doença afeta cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina (RASSI *et al.*, 2010).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença são o benzonidazol (Rochagan, Roche) e nifurtimox (Lampit, Bayer), porém estes fármacos apresentam vários efeitos colaterais, além disso, já existem *T. cruzi* resistentes ao tratamento (COURA, 2009).

O complexo ciclo biológico do *T. cruzi* é um desafio na busca de um fármaco eficiente para o tratamento da doença. Seu ciclo biológico envolve três formas distintas: epimastigota (forma proliferativa), tripomastigota (forma sanguínea circulante e infectante) e amastigota (forma de replicação intracelular).

Bastos *et al.*, (1999) ao avaliarem algumas lignanas dibenzilbutirolactônicas biologicamente ativas isoladas das folhas de *Zanthoxylum naranjillo*, demonstraram ação tripanocida da cubebina e do metilpluviatolido.

Souza *et al.*, (2005) avaliou a atividade de derivados da cubebina (isolada das sementes secas de *Piper cubeba*) contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em ensaio realizado em cultura de células. A atividade biológica foi avaliada usando método colorimétrico e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA. Segundo o artigo, o composto mais ativo foi a hinoquinina, com IC_{50} 0,7 μ M. A benzil-cubebina (IC_{50} 5,7 μ M) e o-N,N-dimetilaminoetil-cubebina (IC_{50} 4,7 μ M) também tiveram atividade significativa. A o-acetil cubebina foi inativa e 6,6-dinitrohinoquinina apresentou IC_{50} de 95,3 μ M. Os pesquisadores concluíram que a introdução do grupo nitro foi nociva para esta atividade.

Estudos *in vitro* e *in vivo* a respeito da atividade da cubebina e derivados contra *Trypanosoma cruzi* foi realizado por Saraiva *et al.*, (2007). A cubebina foi isolada a partir de sementes secas de *Piper cubeba* e seus derivados foram obtidos por síntese parcial e purificados por HPLC. A cubebina, benzil-cubebina e dinitrohinoquinina mostraram baixa atividade anti-epimastigota em ensaio *in vitro*. A metil-cubebina, hinoquinina e dimetoximorelensina apresentaram alta atividade neste ensaio. A hinoquinina apresentou um IC_{50} de 0,67 μ M e foi selecionada para estudo *in vivo*. No estudo os pesquisadores observaram uma redução de 70,8% da parasitemia (formas amastigotas), enquanto o benzonidazol reduziu a parasitemia em 29,0%, tornando a hinoquinina um potencial fármaco para a Doença de Chagas, segundo os autores.

Em estudo *in vivo* realizado por Esperadin *et al.*, (2010) foi avaliada a atividade tripanocida da cubebina e hinoquinina na fase crônica da Doença de Chagas. A hinoquinina foi obtida por síntese parcial a partir da cubebina isolada das sementes secas de *Piper cubeba*. Foram utilizados no estudo camundongos albinos BALB/c que foram divididos em grupos de acordo com a forma de administração da droga (oral e intraperitoneal) e dosagem (20 e 50mg/Kg). Foi também separado um grupo negativo (inoculado com tripomastigotas), tratado com o solvente usado na preparação das soluções, um grupo positivo tratado com benzonidazol e um grupo não infectado. Em todos os casos o tratamento foi iniciado 90 dias após a infecção. A redução do parasitismo foi avaliada pela quantificação da enzima β -galactosidase. O tratamento com as lignanas levou a uma maior redução do parasitismo em todos os órgãos avaliados em comparação com o benzonidazol. O tratamento oral se mostrou mais eficaz. A conclusão dos pesquisadores foi que os dados sugeriram

que cubebina e hinoquinina podem ser considerados como potenciais compostos para o desenvolvimento de novas drogas para a Doença de Chagas.

Hinoquinina e 6,6-dinitrohinoquinina foram avaliados quanto à sua interferência no processamento do RNA mensageiro em tripomastídeos. Este estudo conduzido por Silva *et al.*, (2011) utilizou formas epimastigotas de *T. cruzi*, das cepas Y e BOL (Bolívia). De acordo com o artigo, as substâncias pareceram intervir em alguma etapa da transcrição do RNA, promovendo alterações em sua síntese. Hinoquinina e 6,6-dinitrohinoquinina não foram capazes de interferir no processamento de RNA por *trans-splicing* em *T. cruzi*, como foi observado pela *RNase protection reaction*.

Dando continuidade aos estudos iniciados em 2010, os pesquisadores realizaram estudo *in vivo* a fim de averiguar a atividade da cubebina e da hinoquinina contra *Trypanosoma cruzi*. A cubebina foi obtida da mesma forma de seu estudo anterior. Foi realizado em camundongos BALB/c, que foram inoculados com 2×10^4 formas tripomastigotas 48h antes do tratamento. Os camundongos foram divididos em 6 grupos: controle negativo (recebiam injeção intraperitoneal com DMSO 5%, Tween 2,5%, etanol 5%) controle positivo (tratados com benzonidazol, 20mg/Kg), e grupos tratados com cubebina 20mg/Kg e 50mg/Kg, grupos tratados com hinoquinina 20mg/Kg e 50mg/Kg. Os tratamentos foram por via oral, durante a fase aguda de infecção por *T. cruzi*. Os animais com parasitemia aguda foram investigados por análises morfométricas do tecido. Houve redução significativa da parasitemia dos animais tratados com cubebina ou hinoquinina em comparação com o controle negativo (ESPERADIM *et al*, 2013).

2.5.5 Atividade Anti-Leishmania

Segundo Bates *et al.* (2007), leishmaniose é um grupo de doenças tropicais causadas por protozoários tripomastídeos, somando mais de 30 espécies, das quais 11 têm significância médica e veterinária. A leishmaniose tem um grande impacto nas populações no mundo todo, principalmente na Ásia, África e América Latina (CHAN-BACAB, PENA-RODRIGUES, 2001).

Bodiwala *et al.*, (2007) investigou amidas e lignanas de *P. cubeba* e *P. retrofractum*. Foram isoladas duas lignanas – cubebina e hinoquinina do extrato hexânico de *P. cubeba* e a lignana sesamina e duas amidas, pellitorine e piplartine

dos extratos metanólico e hexânico de *P. retrofractum*. Realizaram-se ensaios *in vitro* de citotoxicidade para avaliar atividade contra promastigotas, utilizando método colorimétrico MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide] e ensaios *in vivo* contra amastigotas, utilizando hamsters infectados. Em ambos os testes foi utilizada a espécie *L. donovani*.

De acordo com os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa, cubebina e pipartine mostraram alta atividade *in vitro* na concentração de 100µM e foram testadas *in vivo* em um modelo de leishmaniose visceral, em hamster. Pipartine mostrou atividade *in vivo* na dose de 30mg/Kg.

2.5.6 Atividade Antibacteriana contra patógenos orais.

Durante toda a vida as pessoas estão propensas ao desenvolvimento de cárie, uma doença infecciosa que se desenvolve como um desequilíbrio na microbiota oral e pode ser desencadeada pela combinação de fatores como: presença de bactérias, fatores genéticos e imunológicos e aspectos comportamentais (SELWITZ *et al*, 2007; AAS *et al*, 2008).

A bactéria *Streptococcus mutans* é considerada um dos patógenos primários na etiologia da cárie dentária (HOIBY *et al*, 2011; TANZER *et al*, 2001).

Silva *et al.*, (2007) pesquisou a atividade do extrato etanólico bruto de *Piper cubeba*, cubebina e derivados semi-sintéticos contra patógenos orais. Os patógenos escolhidos para participar da pesquisa foram: *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans*. O método usado na avaliação foi a microdiluição em caldo. A CIM (concentração inibitória mínima), foi definida como a menor concentração que não permitiu nenhum crescimento em ágar sangue e a ausência de crescimento de células viáveis indicou um efeito bactericida.

O extrato de *Piper cubeba*, a cubebina e seus derivados mostraram atividade contra todos os microorganismos testados. Segundo análise do grupo de pesquisa a introdução de grupos polares em anel aromático foi benéfico para a atividade antimicrobiana.

CAPÍTULO 3

EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E
DOSEAMENTO DA CUBEBINA
NO EXTRATO DE *PIPER*
CUBEBA

3. Extração, Isolamento, Caracterização e Doseamento da Cubebina.

3.1 Introdução

A análise fitoquímica objetiva o conhecimento dos constituintes químicos das plantas. As principais etapas da investigação fitoquímica são: coleta e preparação do material vegetal, extração, fracionamento, isolamento e purificação de substâncias e elucidação estrutural (SIMÕES, 1999).

Todas essas etapas são bastante importantes e determinantes do sucesso da investigação fitoquímica. Por exemplo, para uma boa extração é importante considerar também as características químicas do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e o método de extração.

“O termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros” (SIMÕES, 1999).

Para a separação e fracionamento dos constituintes químicos das plantas são efetuadas uma ou mais técnicas cromatográficas (DI STASI, 1996). A cromatografia líquida em coluna é uma das técnicas mais utilizadas para a separação ou isolamento de constituintes de extratos vegetais (SIMÕES, 1999).

A elucidação estrutural envolve técnicas como espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta (UV), no visível e no infravermelho (IV), bem como a ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (SIMÕES, 1999).

No presente estudo foi realizada, com a utilização de técnicas cromatográficas, a purificação da lignana cubebina a partir de um extrato etanólico bruto de sementes de *Piper cubeba*.

A substância cristalizada, cubebina, apresentou-se na forma de cristais aciculares incolores. Foram realizadas várias técnicas para caracterização da cubebina, a saber: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA), Análise espectrométrica no Infravermelho (IR), Análise Espectrométrica de ^1H -RMN, Análise Espectrométrica de ^{13}C -RMN, Análise Elementar, Análise de Espectrometria de Massas e Análise de Solvente Residual.

O uso de plantas medicinais está cada vez mais difundido, não só no Brasil, como também em outros países, especialmente da Europa (DI STASI, 1996). Visto o uso aumentado pela população não só das plantas medicinais como também dos medicamentos fitoterápicos, a ANVISA adotou a Resolução RDC N° 26, de 13 de maio de 2014, a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Considerando que o medicamento fitoterápico é um medicamento e, portanto deve ter assegurada sua qualidade, segurança e eficácia, a adoção desta resolução foi extremamente pertinente.

Em relação à qualidade de um medicamento fitoterápico é necessário o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a matéria-prima em primeiro lugar, já que se adotando um planejamento adequado e um controle do processo de produção do medicamento, a qualidade do produto final está em grande parte assegurada (SIMÕES, 1999).

Um dos parâmetros importantes para assegurar a qualidade da matéria-prima vegetal ou do extrato vegetal são os ensaios quantitativos de constituintes químicos. Estes ensaios visam à determinação do teor de classes de substâncias ou de substâncias ativas presentes nas drogas vegetais (SIMÕES, 1999). Essa substância ou classe de substâncias utilizadas como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal, extrato vegetal ou medicamento fitoterápico devem preferencialmente ter correlação com o efeito terapêutico, sendo chamadas de marcador (ANVISA, 2014).

A determinação do teor utiliza técnicas analíticas que fazem uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que podem ser acoplados à detectores ultravioleta (UV), arranjo de diodo (DAD) ou espectrometria de massas (EM).

A cubebina está presente no extrato e é responsável pela ação terapêutica, podendo ser considerada, portanto, um marcador passível de ser doseado no extrato.

3.2 Metodologia

3.2.1 Metodologia da extração e isolamento

O material vegetal utilizado, sementes da espécie *Piper cubeba* L., constitui-se de estruturas globulares, medindo de 4 a 6 mm de diâmetro, marrom

escuras e secas. Quatrocentos gramas de material vegetal triturados foram submetidos à extração em banho de ultrassom com etanol 98%. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rotaevaporador, retirando-se o etanol.

Visando o isolamento da cubebina, montou-se uma coluna cromatográfica clássica, tendo gel de sílica como fase estacionária. O extrato (4,46g) foi aplicado à coluna, que foi eluída na seguinte ordem:

- com 150 ml de hexano
- com sistemas binários entre hexano e acetato de etila (AcOEt) de polaridade crescente (nas proporções 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 4:6 respectivamente, sendo utilizados 150 ml de cada sistema)
- com 150 ml de AcOEt
- com 200 ml de metanol (MeOH) puro, para se retirar o remanescente da coluna.

Ao longo do processo foi feito o acompanhamento das frações através cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

Após a revelação destas placas cromatográficas com iodo, foi feita uma comparação do perfil cromatográfico das mesmas, sendo as frações que apresentaram cristais e tiveram perfis cromatográficos semelhantes consideradas frações enriquecidas em cubebina.

O pool de frações enriquecido em cubebina foi submetido à técnica de recristalização em sistema solvente hexano : acetona até a formação dos cristais da lignana.

Na **figura 3.1** podemos observar o fluxograma da metodologia para extração das sementes de *Piper cubeba* e isolamento da cubebina.

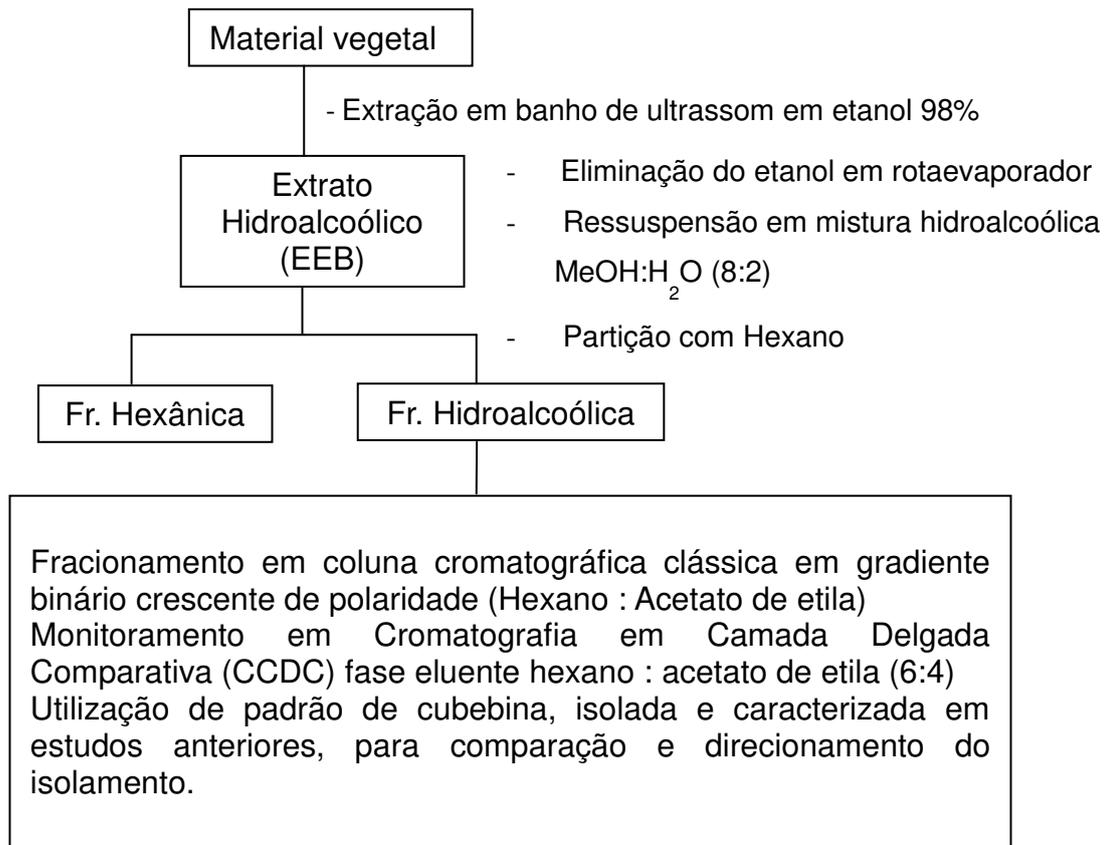


Figura 3.1. Fluxograma da metodologia para extração das sementes de Piper cubeba e isolamento da cubebina.

3.2.2 Metodologia da caracterização

- DSC (Calorimetria diferencial de varredura) e Análise Termogravimétrica (TGA)

Utilizou-se 5mg de amostra para o DSC e 5mg de amostra para o TGA.

A análise de DSC/TGA da amostra foi realizada nas seguintes condições:

- Equipamento: 2910 DSC V4.4E
- Temperatura inicial: 28°C
- Taxa de aquecimento: 10°C/min
- Temperatura final: 600°C
- Cadinho de alumina: 70µL
- Fluxo de argônio: 50mL/min (DSC) e 100mL/min (TGA)

- Análise Espectral no Infravermelho (IR)

Para análise no infravermelho foi utilizado o espectrômetro Varian 640-IR com o software de análise Varion Resolutions Pro. A análise no I.R. foi realizada a 23°C e umidade de 40%.

- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN ^1H e RMN de ^{13}C (COSY ^1H - ^1H , HMBC e HSQC) foram realizados em espectrômetros de ressonância magnética nuclear de 500 MHz e 100 MHz (Avance 500), usando clorofórmio deuterado (Sigma®) como solvente. Os Deslocamentos químicos (δ) e ^1H e ^{13}C foram plotados em ppm, tendo como padrão de referência interna TMS (δ 0,00).

- Análise Elementar

A amostra foi analisada quanto aos teores de C, H e N em equipamento Perkin Elmer modelo 2400 e a quantidade de amostra utilizada foi de aproximadamente 2mg. A concentração de O foi obtida por diferença (100% - soma das porcentagens de C, H e N). As análises foram feitas em triplicata.

- Cromatografia líquida (UPLC) acoplada à espectrometria de massas

Preparação da fase móvel e das amostras (extrato bruto de *Piper cubeba* e cubebina)

Fase Móvel – A mistura binária das proporções da fase móvel foi realizada no próprio sistema de UPLC, em cada canal foi colocado um dos solventes, metanol e água e programou-se o software do UPLC, conforme **tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Gradiente para análise UPLC-MS. Fase móvel A - água purificada (Milli-Q) e como fase móvel B – metanol.

Tempo (min)	% de fase móvel A	% de fase móvel B
Inicial	50	50
4,00	25	75
15,00	25	75

20,00	50	50
-------	----	----

Extrato bruto de *Piper cubeba* – Pesou-se 10,0 mg do extrato e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL, adicionando metanol e colocando em ultrassom até completa dissolução.

Cubebina – Pesou-se 5,0 mg de cubebina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL, adicionando metanol e colocando em ultrassom até completa dissolução.

As amostras foram filtradas utilizando seringa de vidro e filtro 0,2 µm em vial e analisadas em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletronspray. A coluna utilizada foi Zorbax C-18, 100 X 4,6 mm, 3,5 µm, temperatura 25°C. A eluição foi feita por gradiente, com fluxo de 0,9 mL/min, volume de injeção 1 µL.

Condições de análise:

- Ionização eletronspray modo positivo
- Voltagem de capilar: 3KV
- Fluxo do gás de secagem: 11L/min.
- Pressão do nebulizador: 45 psig
- Temperatura de dessolvatação: 350°C
- Fluxo de gás de dessolvatação: 12L/min.
- Temperatura da fonte: 290°C

Para a realização dos testes de MS/MS o fragmentador estava ajustado em 80V.

- Análise de Solvente Residual

As amostras foram submetidas à análise por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MSD), utilizando o equipamento constituído de um GC modelo 7890A e um MSD modelo 5975 Cambos fabricados pela Agilent. O sistema de injeção automática usado foi o MPS2 Twister fabricado pela Gerstel no modo de injeção HS (*headspace*) dinâmico usando a micro-extração em fase sólida.

Para a identificação dos compostos empregou-se a biblioteca de espectros de massas da NIST de 2008, selecionando-se um índice de similaridade \geq a 85. Nos

casos em que o índice de similaridade for inferior procede-se a interpretação dos espectros de massas.

Preparo da amostra de cubebina

Colocou-se 50mg de amostra de cubebina dentro de um frasco de vidro apropriado para análise de *headspace*. O frasco foi aquecido, incubado, a 45°C por um período de 15 min com agitação de 250 rpm. Após esse período a fibra mista constituída de polidimetilsiloxano, divinilbenzeno e carboxen (PDMS/DVB/CAR), previamente condicionada a 240°C por 30 minutos, foi inserida no *headspace* do vial e a composição de vapores da amostra extraída por um período de 5 min. Finalmente a fibra é inserida no injetor para a dessorção térmica dos compostos voláteis por um período de 5,0 min.

Condições de análise:

Coluna capilar: Fase estacionária 5% difenil 95%dimetilpolisiloxano (HP-5MS 19091S-433) e dimensões 30 m x 0.25 mm x 0.25m.

Injetor: 260°C, liner tipo Split/Splitless, modo de injeção Split (1:20) e fluxo constante 0.8 mL min⁻¹.

Forno: 35°C (3 min), 35°C →100°C (3°C min⁻¹), 100°C →200°C (5°C min⁻¹), 200°C →290°C (10°C min⁻¹), 280°C (5 min).

Detector: MSD quadrupolo, linha de transferência a 280°C, temperatura da fonte 230°C, temperatura do quadrupolo 160°C, modo de aquisição scan na faixa de 10 a 400 Daltons, corte de solvente 1,0 min.

3.2.3 Metodologia do doseamento

Preparação da fase móvel e das amostras (extrato bruto de *Piper cubeba* e cubebina, padrão interno)

Fase Móvel – A escolha da fase móvel foi realizada através da mistura binária de solventes constituídos por metanol e água, conforme **tabela 3.2**.

Tabela 3.2. Gradiente para análise UPLC-MS. Fase móvel A - água purificada (Milli-Q) e como fase móvel B – metanol.

Tempo (min)	% de fase móvel A	% de fase móvel B
-------------	-------------------	-------------------

0	50	50
3,00	10	90
4,00	50	50

Extrato bruto de *Piper cubeba* – Pesou-se 50,0 mg do extrato e transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando metanol e colocando em ultrassom até completa dissolução (10mg/mL).

Cubebina – Pesou-se 25,0 mg de cubebina e transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando metanol e colocando em ultrassom até completa dissolução (5mg/mL).

Cafeína – A cafeína foi utilizada como padrão interno, sendo a solução estoque na concentração 10mg/mL.

Para a construção da curva de linearidade e doseamento as condições foram otimizadas conforme demonstrado abaixo:

As amostras foram filtradas utilizando seringa de vidro e filtro 0,2 µm em vial e analisadas em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-funnel, Agilent, fonte eletrospray. A coluna utilizada foi SBS C18, 1,8 µm, 50 x 20 mm Agilent Technologies, temperatura 40°C. A eluição foi feita por gradiente, com fluxo de 0,45 mL/min, volume de injeção 1µL.

Condições de análise:

- Ionização eletronspray modo positivo
- Voltagem de capilar: 3KV
- Fluxo do gás de secagem: 11L/min.
- Pressão do nebulizador: 45 psig
- Temperatura de dessolvatação: 350°C
- Fluxo de gás de dessolvatação: 12L/min.
- Temperatura da fonte: 290°C

Método de análise:

A cubebina (5mg/mL) foi diluída em vials contendo 1mL de metanol, sendo a diluição realizada pelo próprio equipamento, chegando às concentrações: 25, 30, 35, 40, 50, 65, 70 e 75 µL/mL, conforme **tabela 3.3**. Primeiro o amostrador retirou a quantidade especificada de metanol (*) e depois adicionou o valor total correspondente à soma da cubebina e cafeína (**).

Tabela 3.3. Método de diluição pelo equipamento para construção da curva de linearidade.

Posição	Cubebina (μL)	Cafeína (μL)	VT retirado * (μL)	VT	Concentração
				adicionado** (μL)	da cubebina ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
A1	5	2	7	7	25
A2	6	2	8	10	30
A3	7	2	9	11	35
A4	8	2	10	12	40
A5	9	2	12	14	50
A6	12	2	14	16	60
A7	14	2	16	18	70
A8	15	2	17	19	75

Uma curva de calibração foi construída e realizada a quantificação da amostra.

O extrato (10mg/mL) e a cafeína (10mg/mL) foram diluídos em vials contendo 1mL de metanol, sendo a diluição realizada pelo próprio equipamento, conforme **tabela 3.4**. Primeiro o amostrador retirou a quantidade especificada de metanol (*) e depois adicionou o valor total correspondente à soma do extrato e cafeína (**). O volume do injeto foi de 10 μL .

Tabela 3.4. Método de diluição pelo equipamento para doseamento da cubebina na amostra de extrato.

Extrato (μL)	Cafeína (μL)	VT retirado* (μL)	VT adicionado** (μL)
6	2	8	8
6	2	8	8
6	2	8	8

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Resultados e Discussão da Extração e Isolamento

Dos sistemas binários de eluentes avaliados, o que se mostrou mais eficiente para purificação da cubebina foi hexano/AcOEt na proporção 6:4, visto que em avaliação realizada em CCDC verificou-se que este sistema de solventes foi capaz de separar a cubebina das demais substâncias presentes no extrato com maior eficácia. Da coluna cromatográfica foram obtidas 88 frações (**Tabela 3.5**):

Tabela 3.5. Frações obtidas de acordo com o esquema de solventes utilizado.

Sistema de solventes	Frações correspondentes
Hexano	1-11
Hexano/AcOEt (9:1)	12-22
Hexano/AcOEt (8:2)	23-33
Hexano/AcOEt (7:3)	34-44
Hexano/AcOEt (6:4)	45-55
Hexano/AcOEt (1:1)	56-66
Hexano/AcOEt (4:6)	67-77
AcOEt	78-88

De acordo com a composição das frações, aquelas que se mostraram semelhantes em CCDC foram agrupadas conforme demonstrado (**Tabela 3.6**):

Tabela 3.6. Agrupamento de frações de acordo com a composição.

Pool de frações	Frações agrupadas
1	1-9
2	10-17
3	18-28
4	29-35
5	36-44
6	45-48
7	49-59
8	60-72
9	73-88

O pool de frações enriquecido em cubebina (número 7) foi submetido à técnica de recristalização, obtendo-se 468mg de substância purificada.

A metodologia relatada na literatura envolve a utilização de sistema de solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila, com rendimento de 8,6% (SOUZA *et al.*, 2005).

Com a utilização de sistemas binários de solventes hexano e AcOEt o rendimento foi de 10,5%, portanto superior ao relatado na literatura.

3.3.2 Resultados e Discussão sobre a caracterização da cubebina DSC (Calorimetria diferencial de varredura)

Na curva de DSC (**Figura 3.2**) o ponto de fusão obtido foi de 137,18°C, o que é indicativo de boa estabilidade da amostra, já que resiste a altas temperaturas. A cubebina apresenta um evento endotérmico relacionado à fusão, com faixa de temperatura de $T_{\text{onset}} = 131,28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{peak}} = 137,18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Considerando que a diferença entre T_{onset} e T_{peak} é pequena, pico relativamente estreito, temos um indicativo de pureza da amostra.

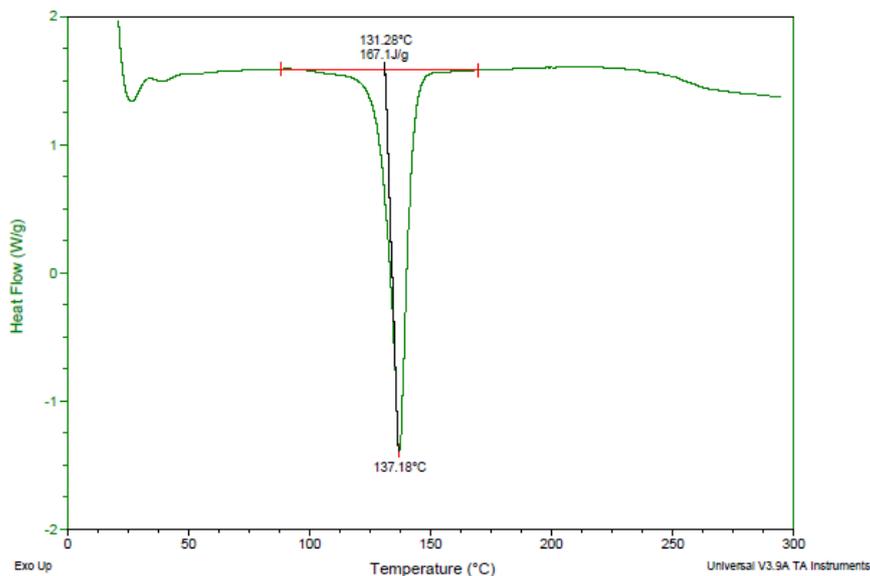


Figura 3.2: Curva DSC da cubebina com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 600°C .

TGA (Análise termogravimétrica)

Na análise por TGA da cubebina foram obtidos termogramas apresentados nas **Figuras 3.3 e 3.4**.

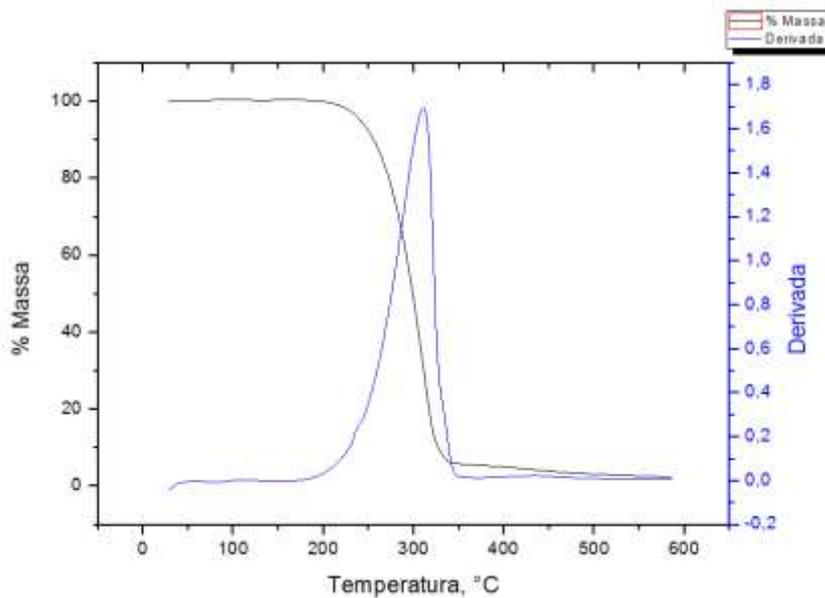


Figura 3.3: Curva TGA/DTG da substância isolada, com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 600°C .

A termogravimetria derivada (DTG) é a derivada primeira da curva TG, nela os patamares existentes na curva TG (variação de massa) são substituídos por picos que possuem áreas correspondentes às variações de massa.

A curva DTG não contém mais informações do que uma curva TG obtida com as mesmas condições experimentais. É somente uma forma diferente de apresentar os dados. A vantagem da curva DTG é a área do pico sob a curva ser proporcional à variação de massa e a altura do pico a qualquer temperatura fornecer a razão de variação de massa àquela temperatura (STORPIRTIS, *et al.* 2009)

A substância se decompõe na faixa de $200 - 380^{\circ}\text{C}$, com perda de peso atingindo a perda de massa máxima em aproximadamente 297°C , com 2% de resíduo sólido a 600°C . A massa inicial é de 6,135mg e a massa final é de 0,128mg.

A curva DTG apresenta um pico com máximo em cerca de 310°C , indicando uma única etapa em sua degradação térmica.

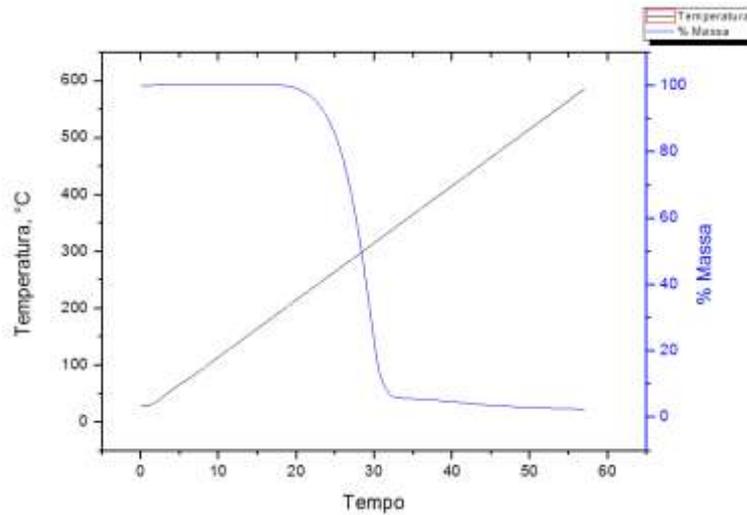


Figura 3.4: Termograma da cubebina com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 600°C .

Análise espectrométrica no Infravermelho

O espectro de infravermelho IV para a amostra de cubebina (**Figura 3.5**) apresentou os seguintes sinais: 3300 – 3500 ($-\text{OH}$), 1000 - 1300 ($\text{C}-\text{O}$), 1500 – 1600 (ligação $\text{C}=\text{C}$ do anel), 2900 – 3000 ($\text{C}-\text{H}$ alcano), 772 – 810 ($\text{C}-\text{H}$ benzeno). Ausência de sinal entre 1630 – 1820 correspondente a $\text{C}=\text{O}$.

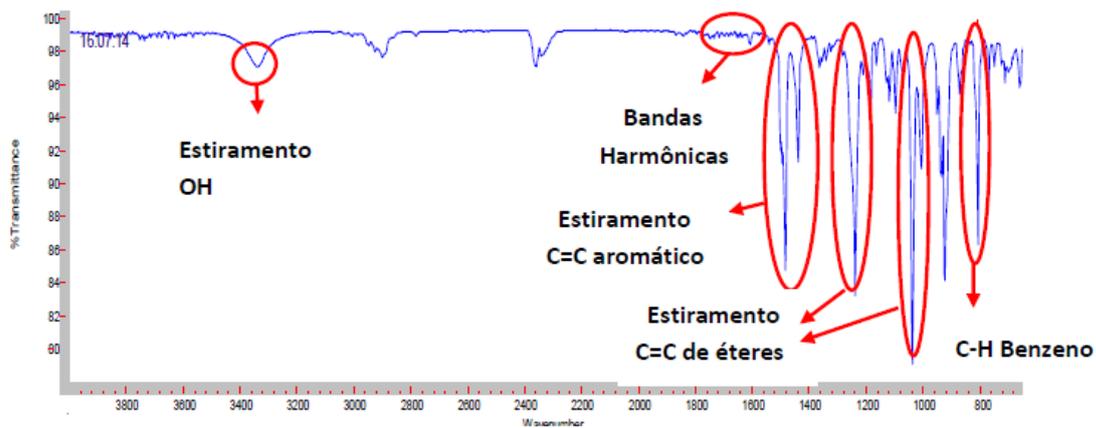


Figura 3.5: Espectro de Infravermelho da cubebina (KBr , cm^{-1}).

Alguns dados referentes à frequência para grupos funcionais foram reunidos em tabela (**Tabela 3.7**).

Tabela 3.7: Dados do espectro de IR da cubebina e dados da literatura, em intervalo de frequência (cm^{-1}) (Skoog *et al.*, 2002)

Ligação	Tipo de composto	Intervalo de frequência (cm^{-1})	Cubebina
-OH	Alcoóis e fenóis	3100 - 3650	3300 - 3500
C-O	Alcoóis, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos	1000 - 1300	1000 - 1300
C=C	Anel aromático	1500 - 1600	1500 - 1600
C-H	Alcano	2850 - 2970 (estiramento)	2900 - 3000 (estiramento)
C-H	Benzeno	761	772 - 810

Análise espectrométrica de ^1H - RMN

Comparando-se os dados espectroscópicos obtidos com os previamente publicados em literatura científica (PACHECO *et al.*, 2010), pode-se concluir que a substância obtida trata-se da cubebina. O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), (**Figuras 3.6 e 3.7**), apresentou uma região de ressonância de núcleo de hidrogênio de sistema aromático entre δ_{H} 6,80 e 6,40 (multipletos). Sinais com deslocamentos químicos em ppm na região de δ_{H} 2,80 - 2,50 (*m*) são referentes aos hidrogênios H-7 e H-7'. Sinais com deslocamentos químicos na região de δ_{H} 2,20 - 1,90 (*m*) e δ_{H} 2,60 - 2,40 (*m*) correspondem aos hidrogênios H-8 e H-8', respectivamente. O sinal do hidrogênio H-9 foi observado em δ_{H} 5,21 (*s*). Os tripletos entre δ_{H} 4,20 e 3,50 podem ser atribuídos aos hidrogênios H-9'. Os sinais em δ_{H} 4,00 e δ_{H} 3,79, correspondem aos hidrogênios H-9'. O sinal atribuído ao grupo metilenodioxílico apresenta-se com deslocamento químico em δ_{H} 5,92 (*s*). Os dados são apresentados na **Tabela 3.8** em comparação com os dados obtidos por PACHECO, 2010.

Tabela 3.8 Dados do espectro de RMN de ^1H cubebina e dados da literatura, a 500 Hz em CDCl_3 [δ em ppm, multiplicidade, (J em Hz)]. * **PACHECO, 2010**

Prótons	Cubebina isolada	Cubebina*
Aromáticos	6,80-6,50	6,80-6,50
7	2,80-2,50	2,90-2,50
7'	2,80-2,50	2,70-2,40
8	2,20-1,90	2,20-1,90
8'	2,60-2,40	2,90-2,50
9	5,21	5,15
9'	4,20	4,05
	3,50	3,50
O-CH₂-O	5,92	5,87

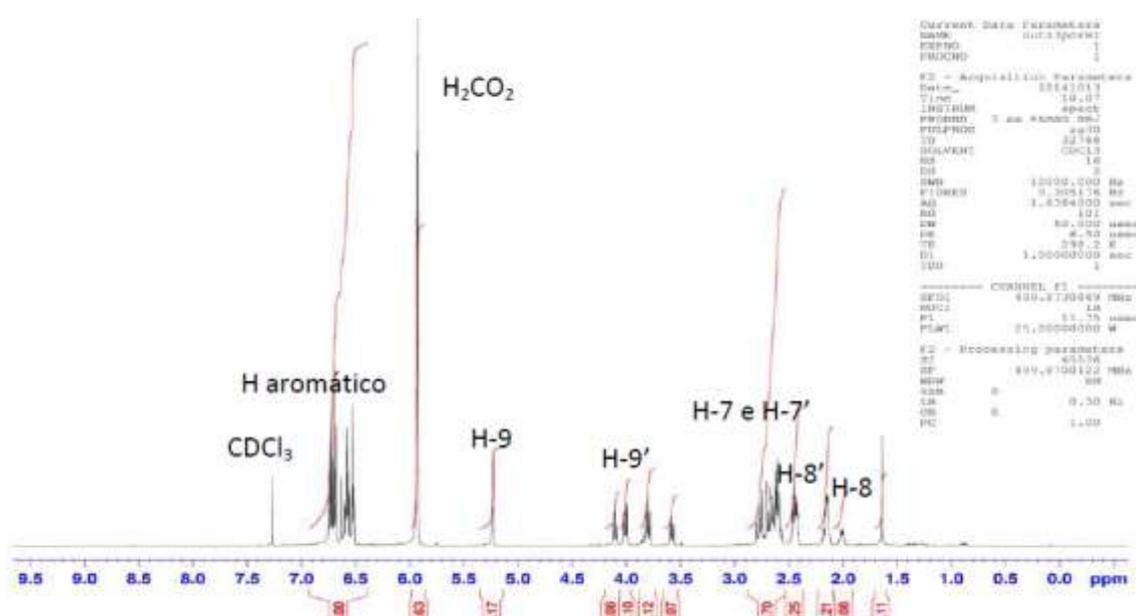


Figura 3.6: Espectro de RMN de ^1H da cubebina (500 MHz, CDCl_3).

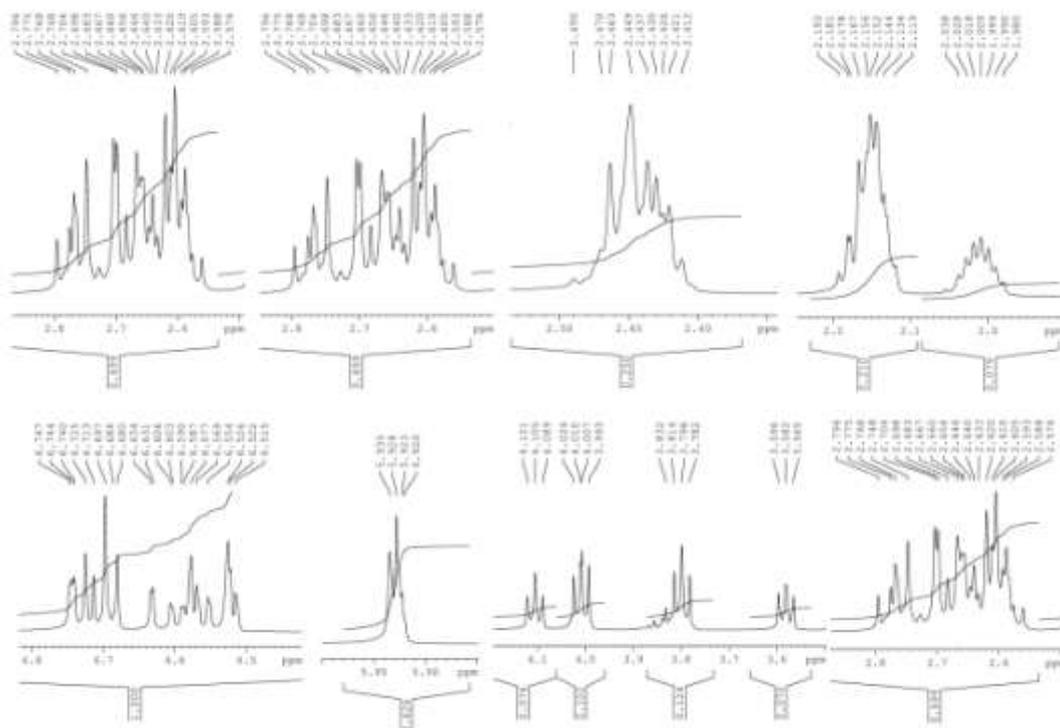


Figura 3.7: Expansão do espectro de RMN de ^1H da cubebina (500 MHz, CDCl_3).

Análise espectrométrica de ^{13}C -RMN

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), confirma a elucidação estrutural da cubebina (**Figuras 3.8 e 3.9**). Os dados espectroscópicos obtidos foram comparados com os previamente publicados em literatura científica (PACHECO *et al.*, 2010). Os sinais em δ_{C} 147,7, 147,6, 145,9 e 145,8 podem ser atribuídos a núcleos de carbono de anel aromático oxigenado e os sinais em δ_{C} 134,5, 134,1, 133,9 e 133,3 podem ser atribuídos a núcleos de carbono de anel aromático não hidrogenado. O sinal em δ_{C} 100,8 pode ser atribuído ao núcleo de carbono metilênico dioxigenado. Os sinais entre δ_{C} 121,7 e 108,1 podem ser atribuídos a núcleos de carbono de anel aromático hidrogenado. Os sinais em δ_{C} 98,8 e 103,4 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metínico dioxigenado. Os sinais em δ_{C} 52,1, 53,1, 45,9 e 42,9 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metínico e os sinais em δ_{C} 72,7, 72,3, 39,3, 38,9, 38,5 e 33,7 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metilênico. Os carbonos C-9 e C-9' apresentam deslocamentos de δ_{C} 103,4 e δ_{C} 72,7. Os carbonos C-8 e C-8' apresentam-se com deslocamentos químicos de δ_{C} 53,12 e δ_{C} 45,92, respectivamente. Os valores de δ_{C} 39,25 e δ_{C} 38,93

são atribuídos respectivamente aos carbonos C-7 e C-7'. Os valores decrescentes para as diferenças dos deslocamentos químicos para os carbonos C-9 e 9', C-8- e C-8', C-7 e C-7' podem ser explicados pelo efeito exercido pela hidroxila presente no C-9. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentam sinais indicativos de uma mistura de estereoisômeros da cubebina. Os estereoisômeros serão chamados arbitrariamente de estereoisômero A e estereoisômero B.

Tabela 3.9 Dados do espectro de RMN de ^{13}C , da cubebina a 100 MHz em CDCl_3 (δ em ppm) em comparação com os dados obtidos por PACHECO, 2010.

Carbonos	Cubebina	Cubebina (PACHECO, 2010)	Carbonos	Cubebina	Cubebina (PACHECO, 2010)
1	133,3	133,8	1'	134,54	134,5
2	108,11	108,9	2'	108,13	109,3
3	147,57	147,7	3'	147,57	147,5
4	145,81	145,7	4'	145,76	145,9
5	109,35	108,2	5'	109,20	108,1
6	121,77	121,3	6'	121,64	121,6
7	39,25	33,66	7'	38,93	38,88
8	53,12	51,9	8'	45,92	42,9
9	103,4	98,8	9'	72,7	72,5
-O-CH ₂ O-	100,8	108,8			

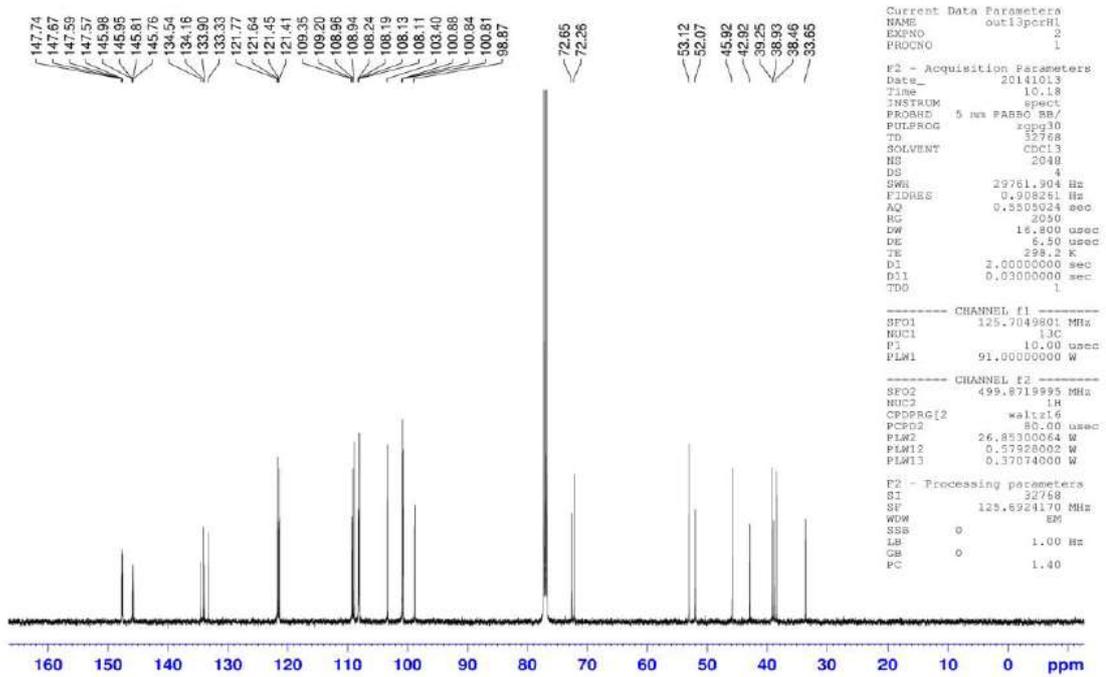


Figura 3.8: Espectro de RMN de ^{13}C da cubebina (100 MHz, CDCl_3)

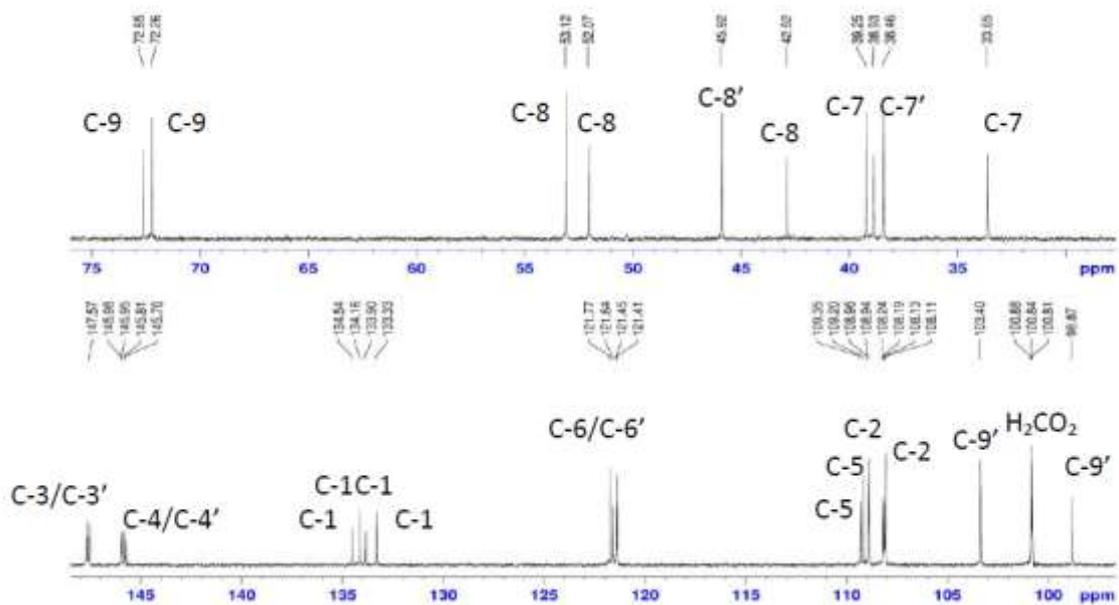


Figura 3.9: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da cubebina (100 MHz, CDCl_3)

Análise espectrométrica de RMN por correlações

O mapa de contornos HMBC e ampliações obtidas para a cubebina isolada são apresentados respectivamente nas **Figuras 3.10, 3.11 e 3.12**. As correlações dos sinais entre ^1H e ^{13}C são mostradas nas **tabelas 3.10 e 3.11**.

Tabela 3.10: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HMBC) referentes ao estereoisômero A.

δ_{H}	H	δ_{C}	C
6,80 - 6,40	H-2, H-5, H-6, H-2', H-5' e H-6'	148	C-3 e C-3'
		146	C-4 e C-4'
		122,2	C-6'
		121,9	C-6
		38,9	C-7'
		33,6	C-7
3,6	H-9' α	38,9	C-7'
5,2	H-9	72,7	C-9'
2,44	H-7' α	72,6	C-9'
2,15	H-8	72,6	C-9'
		38,9	C-7'
		134	C-1
5,92	O-CH ₂ -O e O-CH ₂ -O'	147,7	C-3 e C-3'
		145,9	C-4 e C-4'

Tabela 3.11: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HMBC) referentes ao estereoisômero B.

δ_H	H	δ_C	C
6,80 - 6,40	H-2, H-5, H-6, H-2', H-5' e H-6'	148	C-3 e C-3'
		146	C-4 e C-4'
		122	C-6'
		121,9	C-6
		38,9	C-7'
		38,5	C-7
5,2	H-9	38,5	C-7
		45,9	C-8'
4	H-9' β	38,9	C-7'
3,7	H-9' α	53,8	C-8
2,7	H-7' β	45,9	C-8'
2,6	H-7' α	53,8	C-8
		72,7	C-9'
2,4	H-7 α	121,9	C-6
5,92	O-CH ₂ -O e O-CH ₂ -O'	147,7	C-3 e C-3'
		145,9	C-4 e C-4'

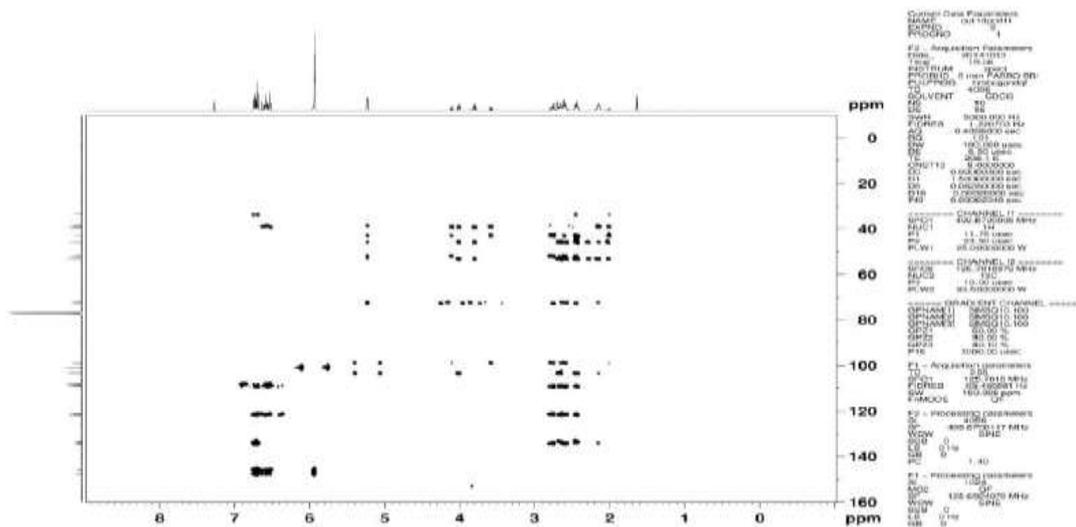


Figura 3.10: Mapa de contornos HMBC da cubebina (¹H: 500 MHz, ¹³C: 100 MHz).

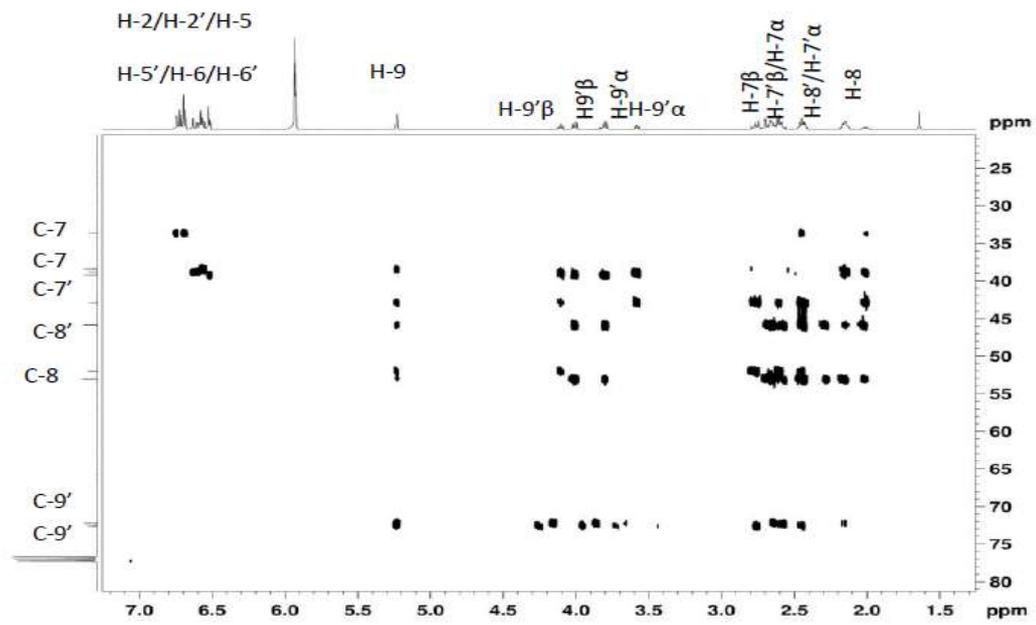


Figura 3.11: Expansão do mapa de contornos HMBC da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).

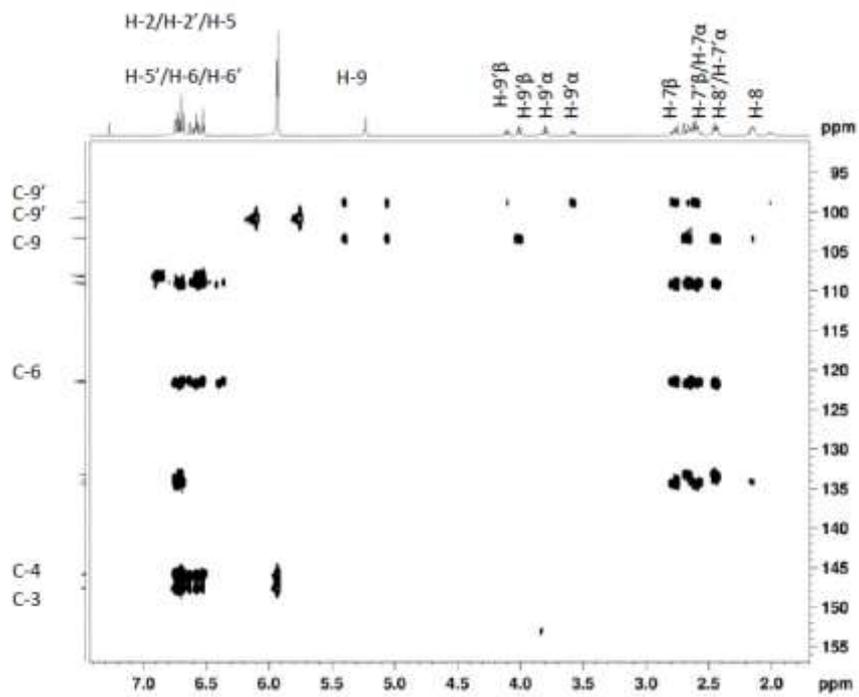


Figura 3.12: Expansão do mapa de contornos HMBC da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).

O mapa de contornos HSQC e suas expansões (**Figuras 3.13, 3.14, 3.15 e 3.16**). As correlações dos sinais entre ^1H e ^{13}C são mostradas nas **tabelas 3.12 e 3.13**.

Tabela 3.12: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HSQC) referentes ao estereoisômero A.

δ_{H}	H	δ_{C}	C
6,75	H-2, H-2', H-5	109,3	C-2'
		108,9	C-2
		108,1	C-5'
6,69	H-6'	121,6	C-6'
6,52	H-5 e H-6	108,2	C-5
		121,4	C-6
5,21	H-9	98,9	C-9
4,1	H-9' β	72,6	C-9'
3,6	H-9' α		
2,7	H-7 β e H-7' β	33,6	C-7
2,6	H-7 α e H-7' α	38,9	C-7'
2,45	H-8'	42,9	C-8'
2	H-8	52,1	C-8

Tabela 3.13: Correlações de sinais entre ^1H e ^{13}C (HSQC) referentes ao estereoisômero B.

δ_{H}	H	δ_{C}	C
6,7	H-2, H-5'	109,21	C-2
		108,1	C-5'
6,6	H-5 e H-2'	108,2	C-5
		109,1	C-2'
6,55	H-6'	121,8	C-6'
6,5	H-6	121,4	C-6
5,9	OCH ₂ O	100,8	OCH ₂ O
5,21	H-9	103,4	C-9
4	H-9' β	72,2	C-9'
3,8	H-9' α		
2,7	H-7' β	39,2	C-7'
2,6	H-7' α		
2,7	H-7' β	38,5	C-7
2,4	H-7' α		
2,15	H-8'	45,9	C-8'

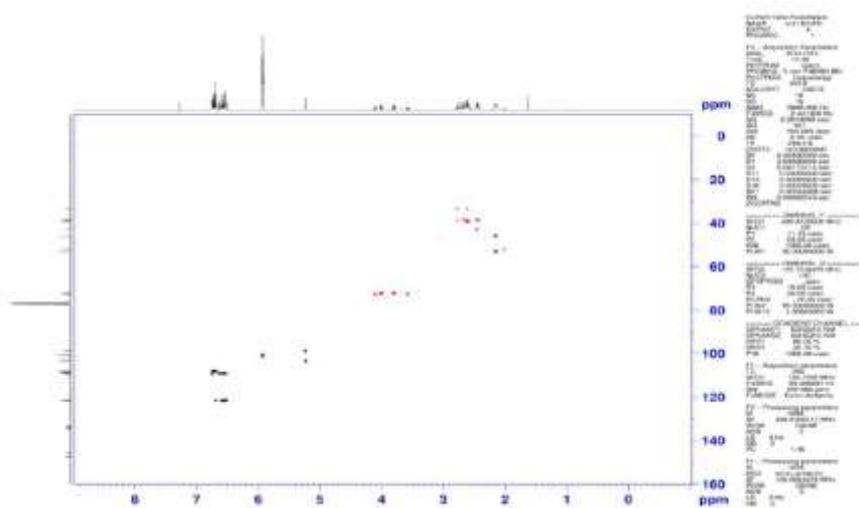


Figura 3.13: Mapa de contornos HSQC da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).

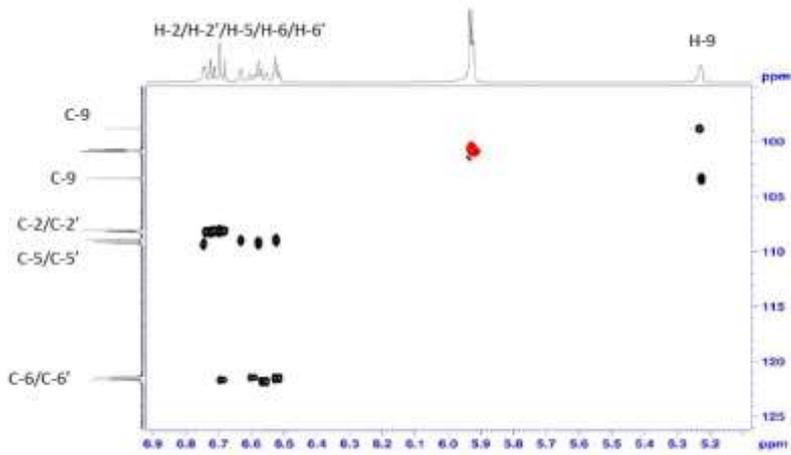
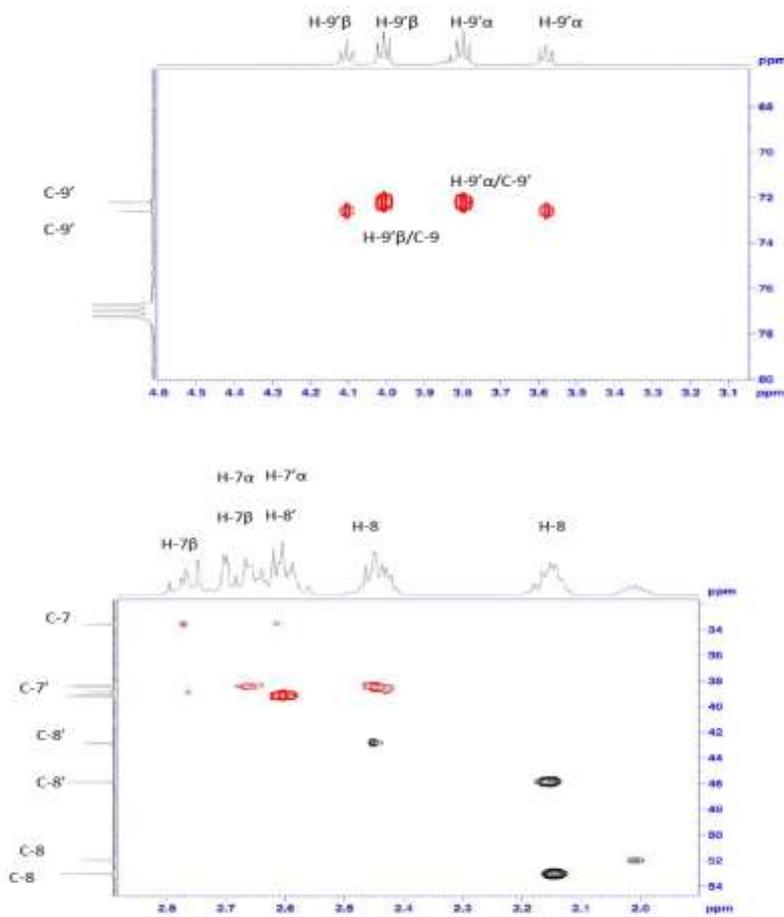


Figura 3.14: Expansão do mapa de contornos HSQC da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).



Figuras 3.15 e 3.16: Expansão do mapa de contornos HSQC da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).

Mapa de contornos COSY e sua expansão para a cubebina (**Figuras 3.17 e 3.18**). O sinal em δ_H 2,00 (H-8) correlaciona-se com os sinais em δ_H 2,70 (H-7), 2,40 (H-8') e 5,20 (H-9). O sinal δ_H 2,10 (H-8') correlaciona-se com os sinais em δ_H 4,00 (H-9' β), 3,80 (H-9' α), 2,60 (H-7' β) e 2,40 (H-7' α). O sinal em δ_H 2,40 (H-8') correlaciona-se com os sinais em δ_H 4,10 e 3,60 (H-9').

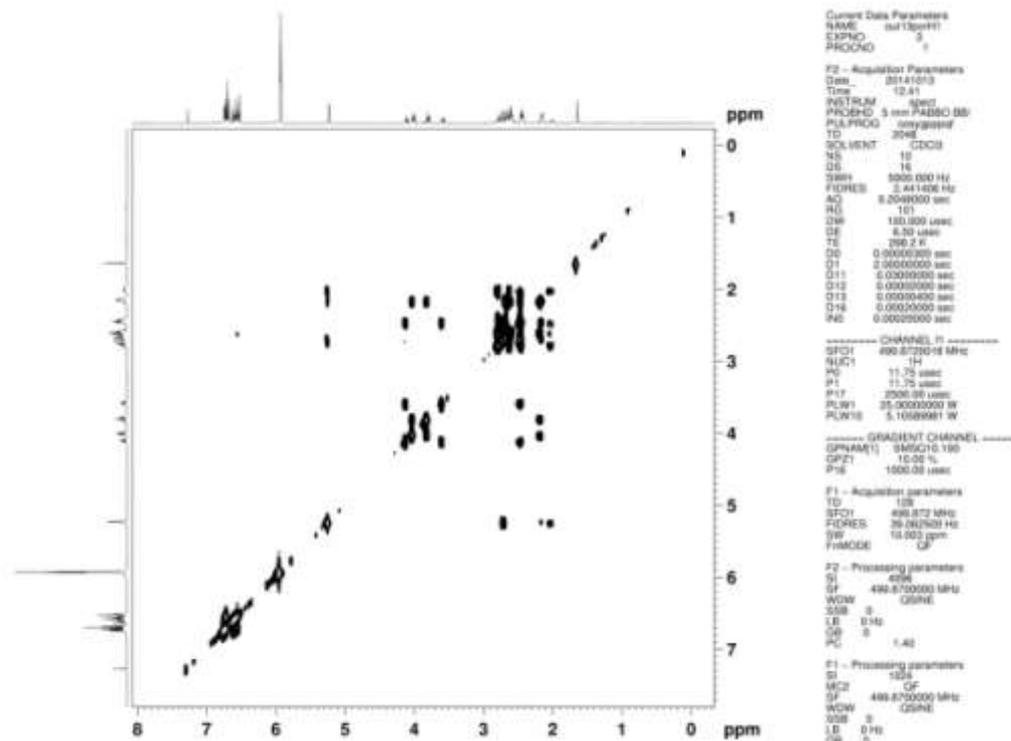


Figura 3.17: Mapa de contornos COSY da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).

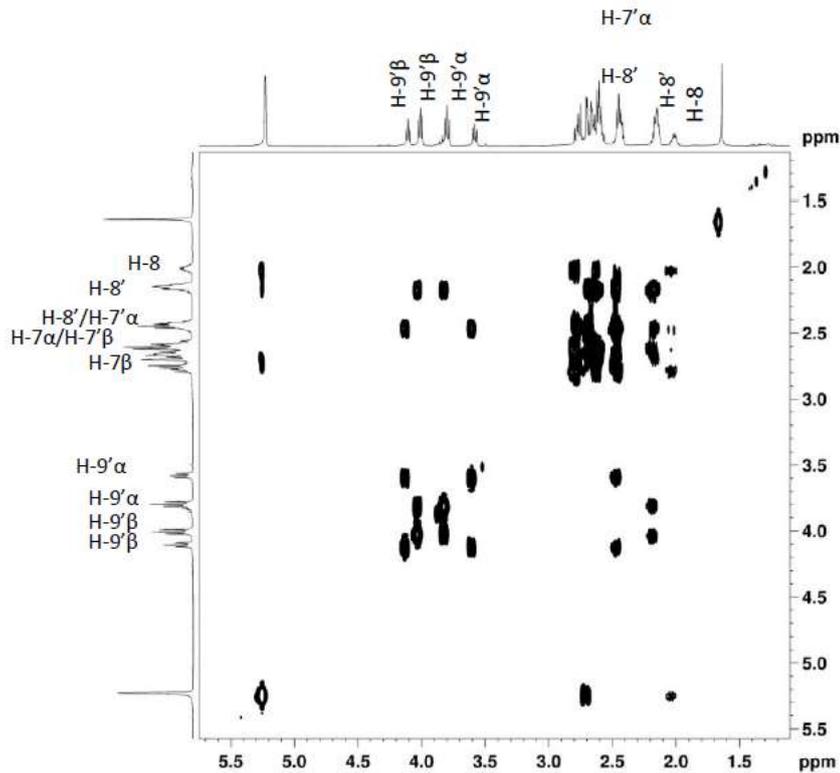


Figura 3.18: Mapa de contornos COSY da cubebina (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz).

Análise Elementar

Análise elementar da cubebina foi realizada e a porcentagem de O foi obtida por diferença (100% - soma das porcentagens de C, H e N).

Tabela 3.14: Composição percentual teórica e experimental da amostra.

Amostra (Cubebina)	%C	%H	%O
Porcentagem teórica	67,40	5,62	26,98
Porcentagem experimental	67,22	5,83	26,95

Utilizando a razão entre carbono obtido experimentalmente por análise elementar e teórica para o cálculo do teor do material em base tal que:

Teor em tal que: $\frac{\text{Valor experimental (67,22)} \times 100}{\text{Valor Teórico (67,40)}}$

Valor Teórico (67,40)

Teor em tal que: 99,73%

Calculando o valor do teor em base seca, utilizaremos a perda de massa de água obtida por TGA (1,94%) através da seguinte equação:

$$\text{Teor na base anidra} = \frac{\text{Teor tal qual} \times 100}{100 - \text{umidade \%}} = \frac{99,73 \times 100}{100 - 1,94}$$

$$\text{Teor na base anidra} = 101,70\%$$

Análise de Espectrometria de Massas

Conforme descrito na metodologia para cromatografia líquida (UPLC) acoplada à espectrometria de massas, a cubebina e o extrato bruto de *Piper cubeba* foram analisados em equipamento Q-TOF LC/MS 6550, i-Funnel, Agilent technologies, fonte eletronspray (ESI).

A corrente total iônica do extrato bruto de *Piper cubeba* segundo metodologia descrita, é apresentado na **Figura 3.19** e o espectro de massas do extrato é apresentado na **Figura 3.20**.

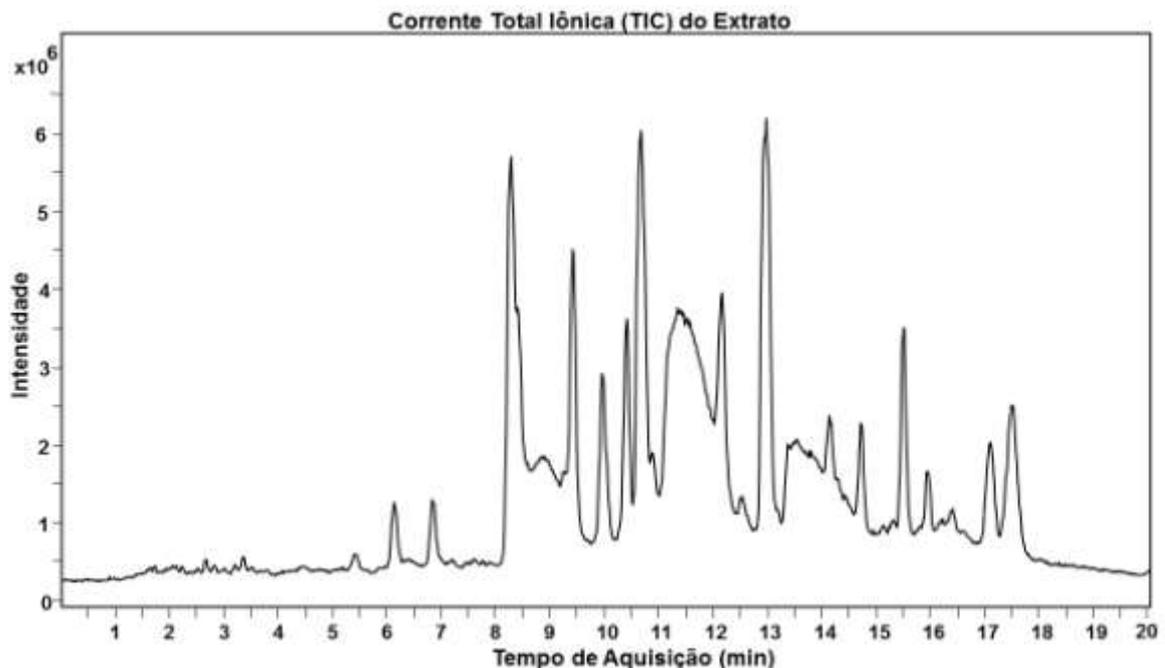


Figura 3.19: Corrente total iônica do extrato bruto de *Piper cubeba*, obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletronspray. Coluna Zorbax C-18, 100 X 4,6 mm, 3,5 μm , temperatura 25°C, fluxo 0,9 mL/min, volume de injeção 1 μL .

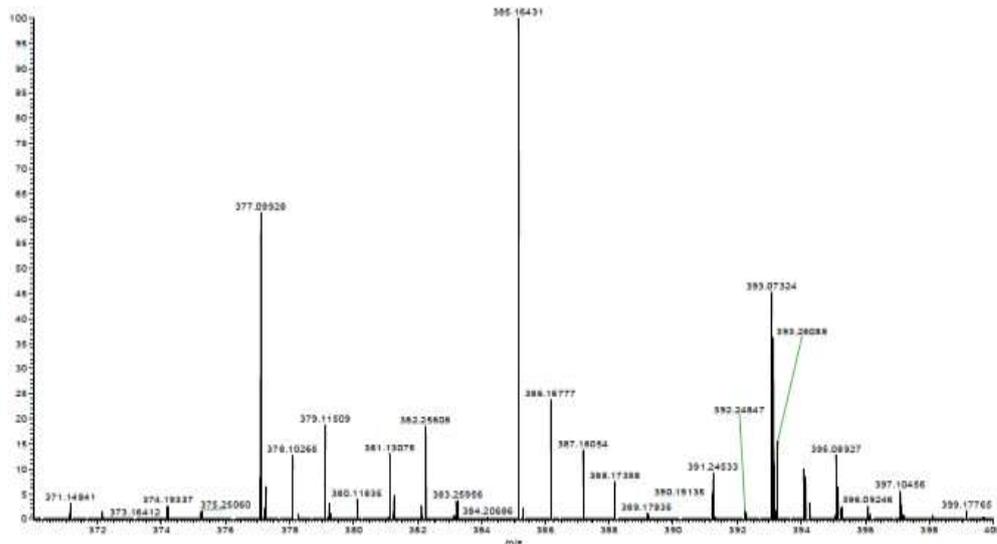


Figura 3.20: Espectro do extrato bruto de *Piper cubeba* obtido pelo método +-ESI-MS.

A corrente total iônica da cubebina isolada segundo metodologia descrita, é apresentada na **Figura 3.21** e o espectro para o pico em 13,5 minutos é apresentado na **Figura 3.22**.

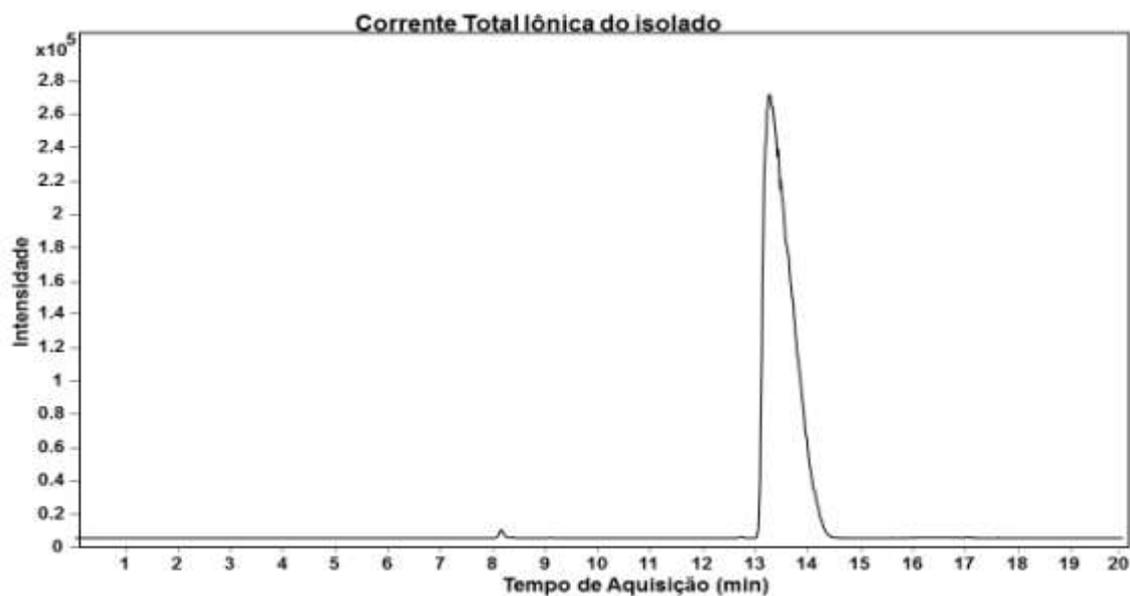


Figura 3.21: Corrente total iônica da substância isolada cubebina obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte electrospray. Coluna Zorbax C-18, 100 x 4,6 mm, 3,5 μ m, temperatura 25°C, fluxo 0,9 mL/min, volume de injeção 1 μ L.

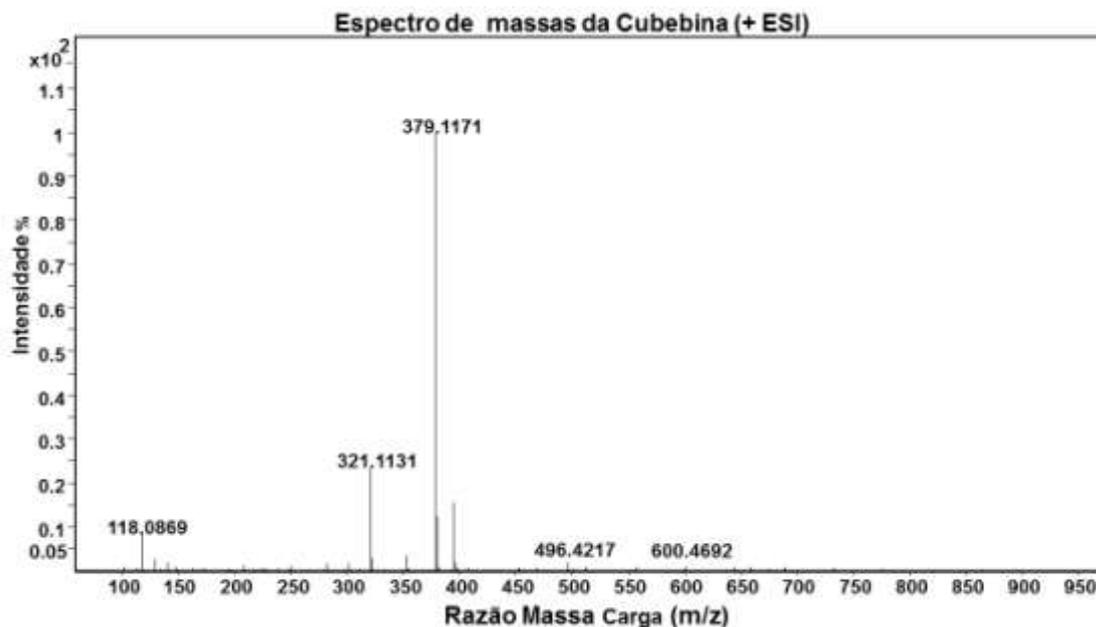


Figura 3.22: Espectro de massas da cubebina obtido pelo método +-ESI-MS. (Erro: 5 ppm)

Ao fazer a análise de massas do pico de cubebina foram encontradas duas formas de cubebina mono carregadas: o íon com m/z 379,1171 $[M + Na^+]$ correspondendo ao aduto de sódio da cubebina e o íon com m/z 385,1643 $[M + K^+]$ relacionado ao aduto de potássio da cubebina (**Figura 3.23**).

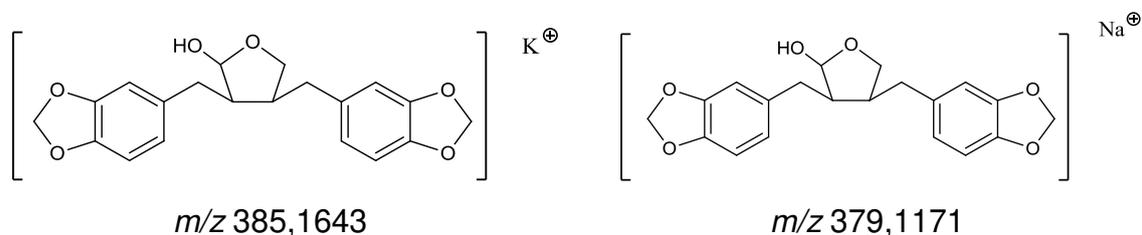


Figura 3.23: Formas monocarregadas da cubebina.

Além disso, é possível observar uma outra massa presente no pico, a m/z 321,1121. Com o intuito de avaliar se a m/z 321,1121 se tratava de uma outra substância ou era formada devido à fragmentação da cubebina na fonte, foi realizado o MS/MS dos picos para avaliar o padrão de fragmentação (**Figura 3.24**, **Figura 3.25**). Então, conforme demonstrado nas figuras, as m/z 379,1171 e m/z 321,1121 possuem o mesmo padrão de fragmentação, se tratando portanto da mesma substância, a cubebina.

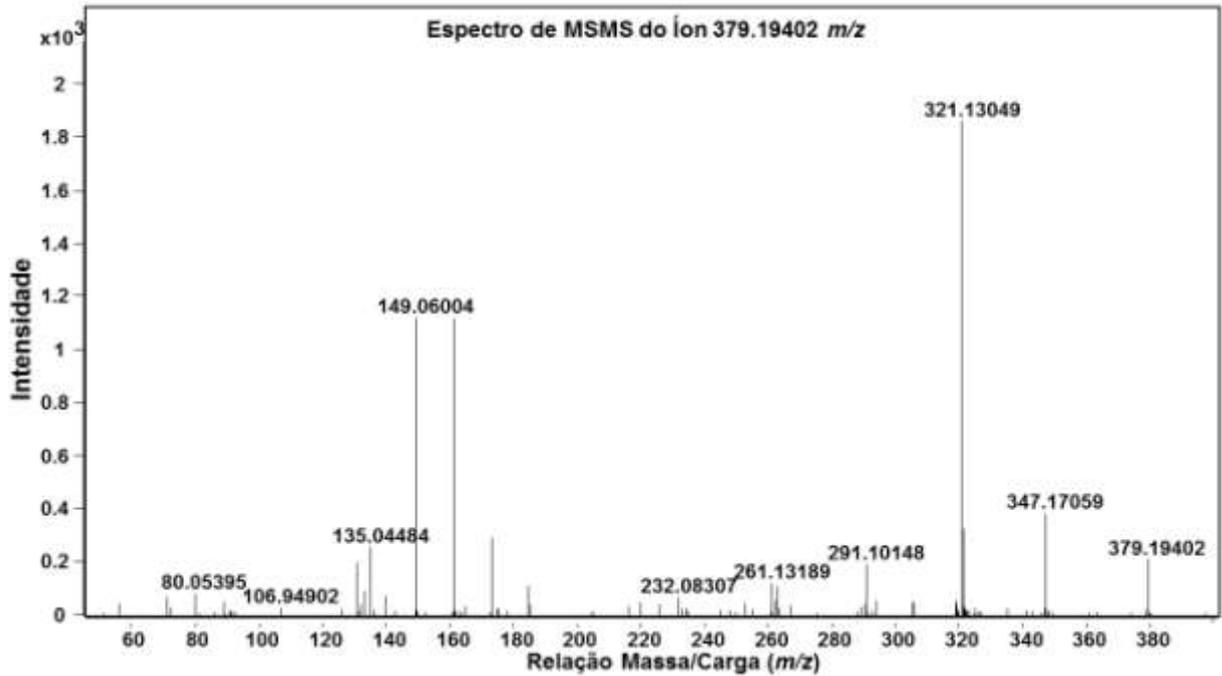


Figura 3.24: Espectro de MS/MS da m/z 379,1150 obtido pelo método +-ESI-MS.

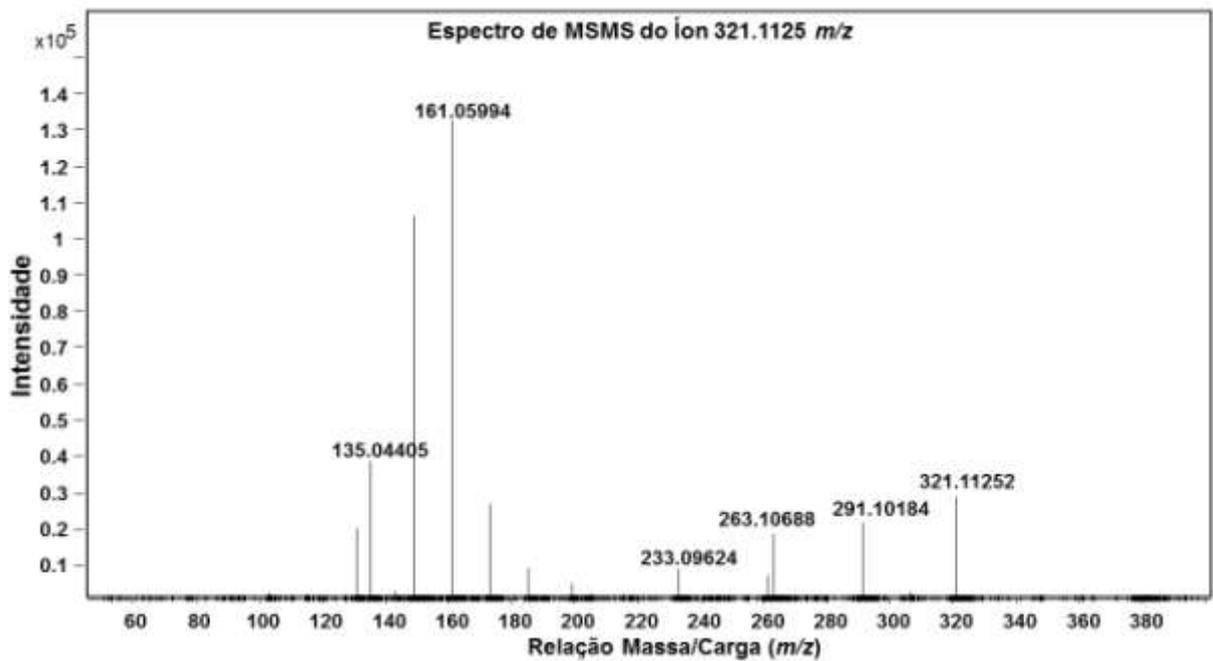


Figura 3.25: Espectro de MS/MS da m/z 321,1124 obtido pelo método +-ESI-MS.

Proposta de mecanismo de fragmentação para os principais íons formados no MS/MS.

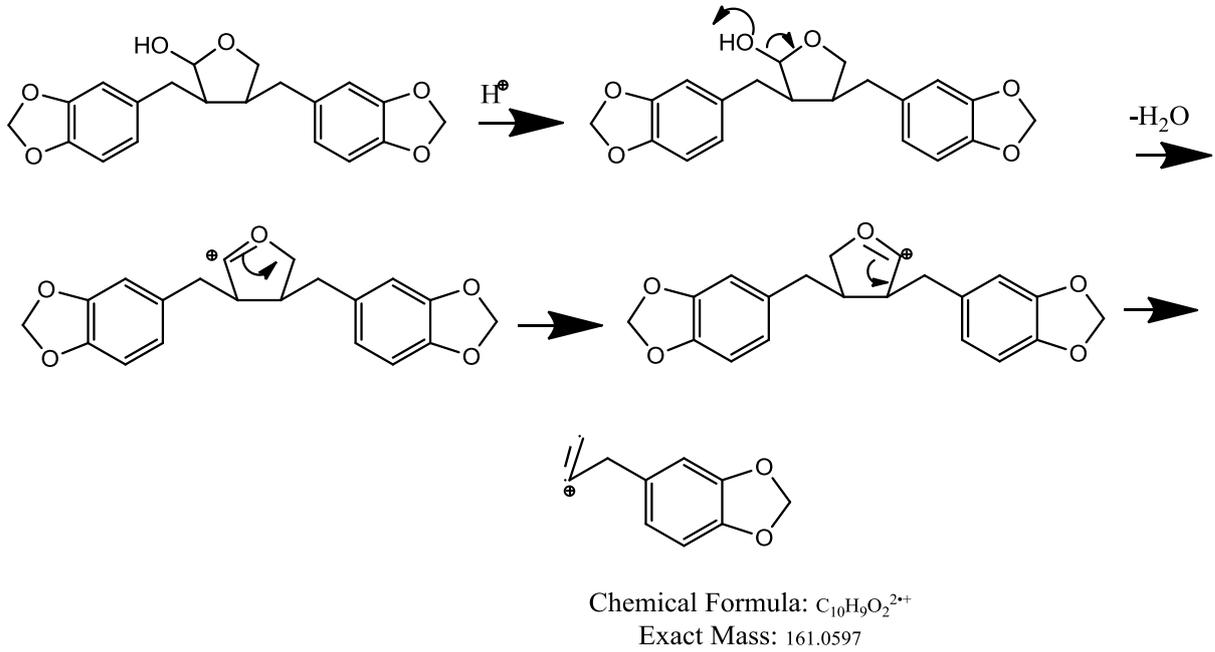


Figura 3.26: Proposta de mecanismo de fragmentação para o íon com m/z 161,0604.

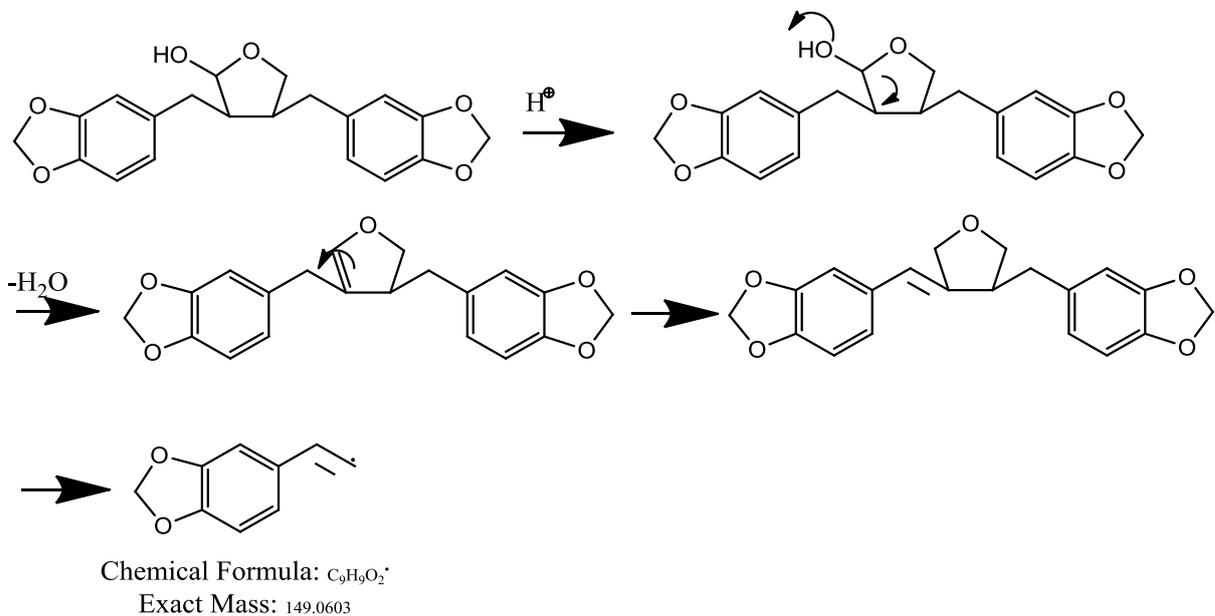
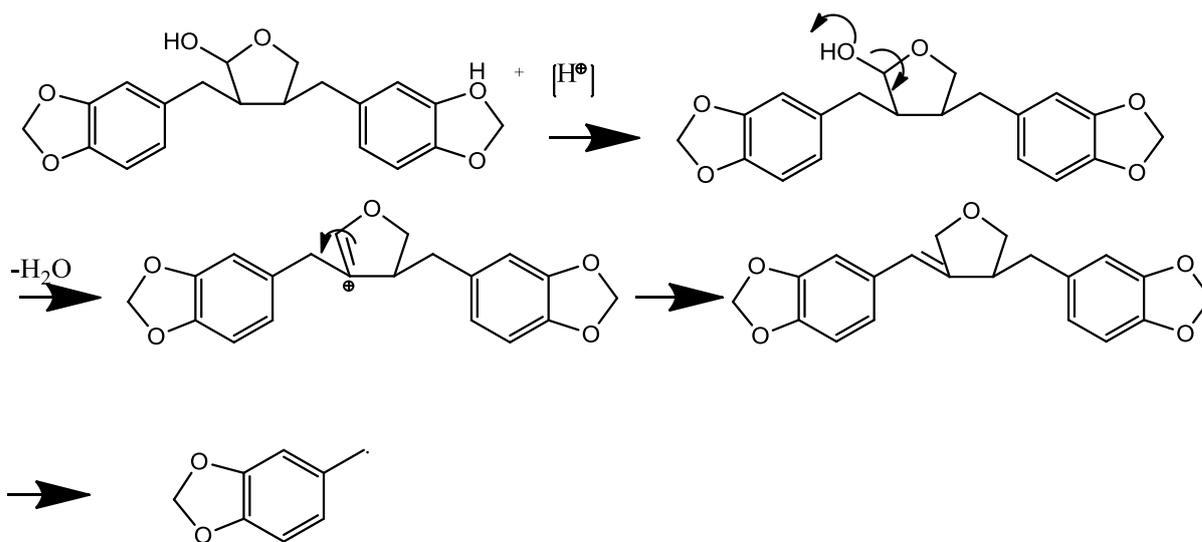


Figura 3.27: Proposta de mecanismo de fragmentação para o íon com m/z 149,0603.



Chemical Formula: $C_8H_7O_2^+$

Exact Mass: 135.0446

Figura 3.28: Proposta de mecanismo de fragmentação para o íon com m/z 135,0442.

Análise de Solvente Residual

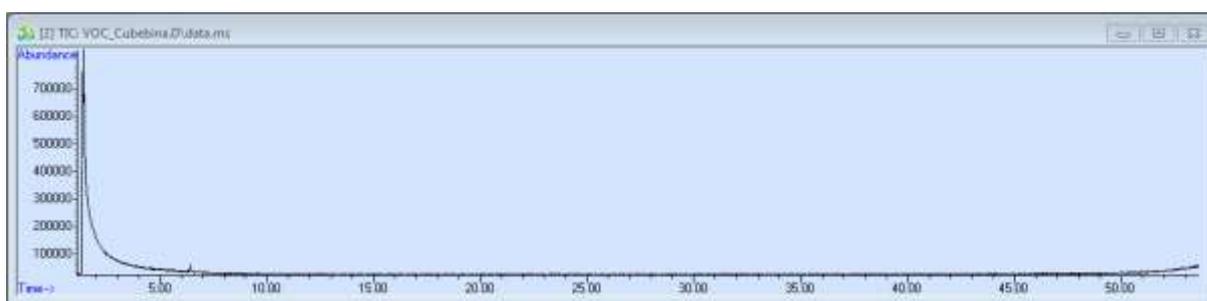


Figura 3.29: Cromatograma da análise por CG-Headspace para a determinação de solvente residual

Os picos cromatográficos observados com tempos de retenção entre 1,0 e 6,5 minutos (**Figura 3.29**) foram atribuídos à umidade da amostra e aos gases permanentes que acompanham o gás de arraste hélio. Acima desse tempo de retenção não foram observadas outras eluições, o que reflete a ausência de solventes orgânicos residuais utilizados na purificação da cubebina.

3.3.3 Resultados e Discussão sobre o doseamento da cubebina

Para a construção da curva de linearidade e doseamento as condições cromatográficas foram otimizadas. A corrente total iônica do extrato bruto de *Piper cubeba*, adquirida no modo positivo por uma fonte de ESI, e seu espectro de massas

no tempo de 2.7 minutos são apresentados, respectivamente, nas **Figuras 3.30 e 3.31**.

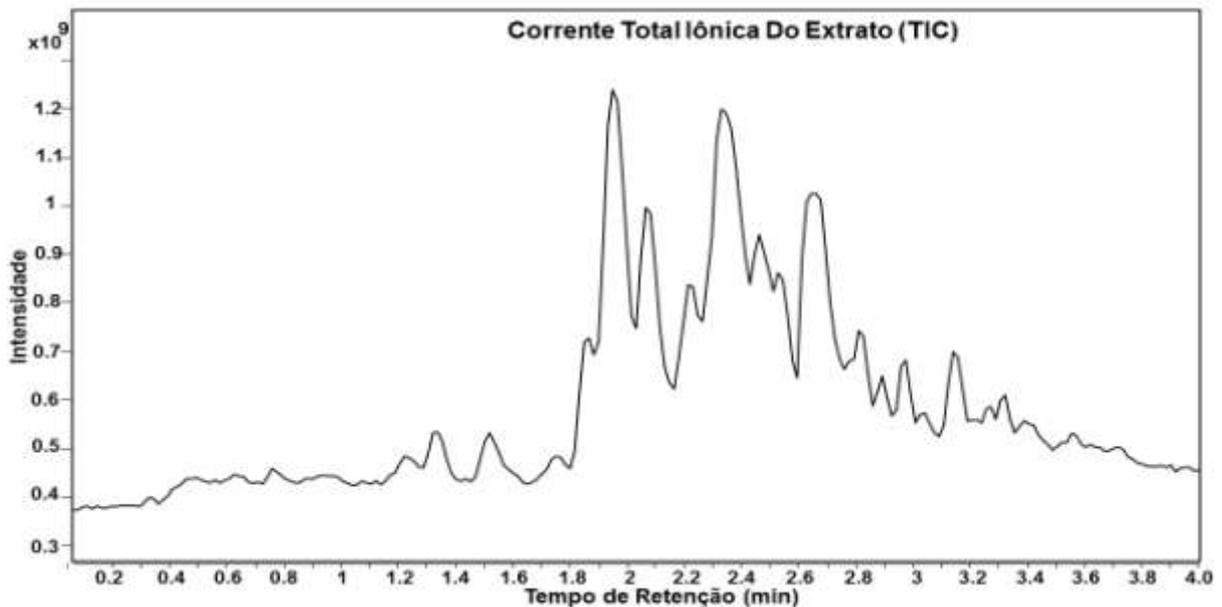


Figura 3.30: Corrente total iônica do extrato bruto de *Piper cubeba*, obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletronspray. Coluna Zorbax SBS C18, 1,8 μm , 50 x 20 mm, temperatura 40°C, fluxo 0,45 mL/min, volume de injeção 1 μL .

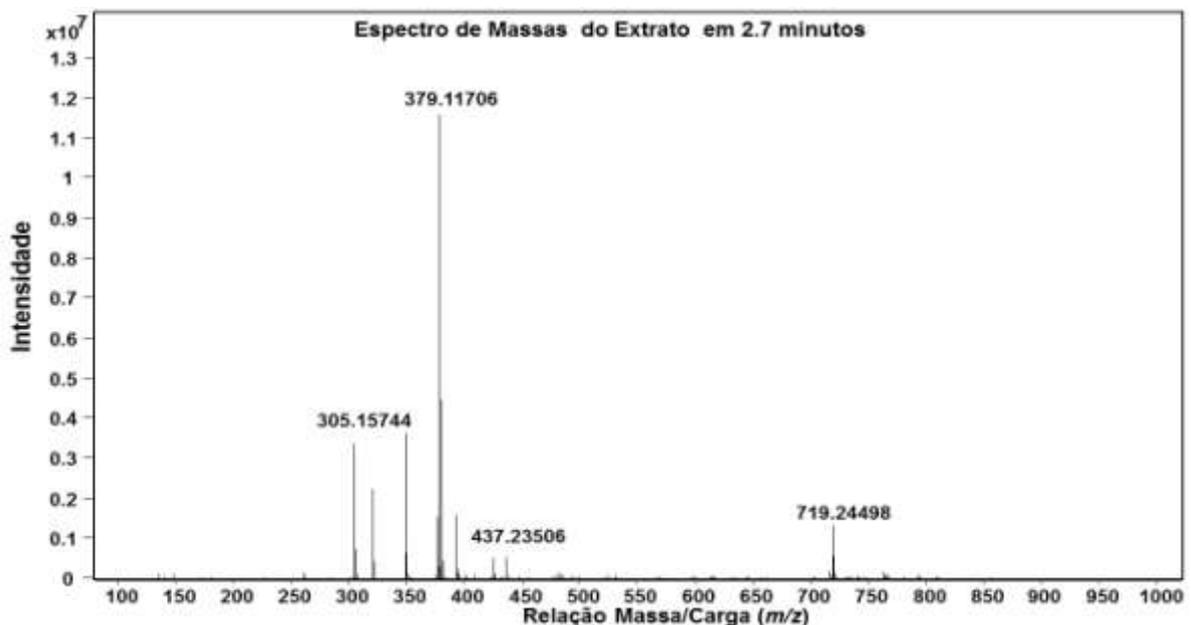


Figura 3.31: Espectro de massas do extrato bruto de *Piper cubeba* obtido pelo método +ESI-MS.

Segundo condições otimizadas, a corrente total iônica da cubebina isolada, adquirida no modo positivo por uma fonte de ESI, e seu espectro de massas

no tempo de 2.7 minutos são apresentados, respectivamente, nas **Figuras 3.32 e 3.33**.

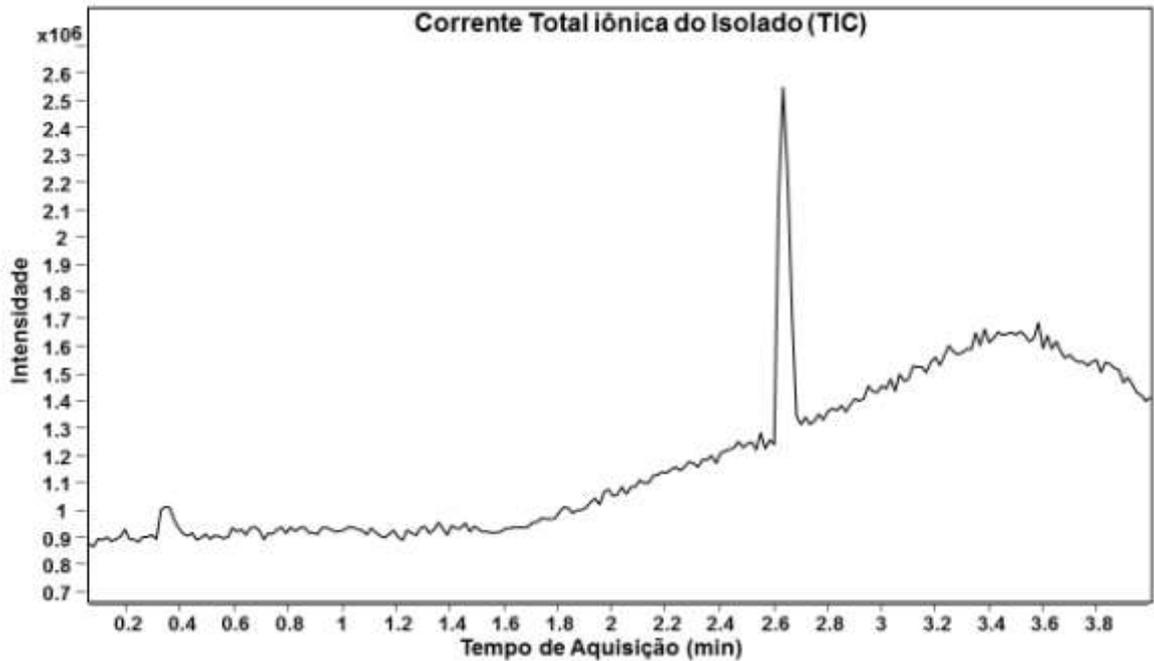


Figura 3.32: Corrente total iônica da substância isolada cubebina obtido em equipamento Q-TOF LC/MS 6550 i-Funnel, Agilent, fonte eletronpray. Coluna Zorbax SBS C18, 1,8 μm , 50 x 20 mm, temperatura 40°C, fluxo 0,45 mL/min, volume de injeção 1 μL .



Figura 3.33: Espectro de massas da cubebina obtido pelo método +-ESI-MS.

(Erro: 7,4ppm)

Linearidade

Tabela 3.15: Pontos da curva de linearidade, mostrando as concentrações de cubebina, as respostas obtidas em triplicata, a média e o desvio padrão relativo das respostas.

Pontos	Concentração (mg/mL)	R1	R2	R3	Média	DPR
1	0,025	303,91	289,03	260,86	284,60	7,68
2	0,030	348,51	310,40	304,87	321,26	7,39
3	0,035	403,60	376,50	375,74	385,28	4,12
4	0,040	469,25	435,67	412,10	439,01	6,54
5	0,050	519,16	522,61	456,83	499,53	7,41
6	0,065	609,43	605,38	618,56	611,12	1,10
7	0,070	635,11	662,69	690,56	662,78	4,18
8	0,075	673,60	688,33	699,14	687,02	1,87

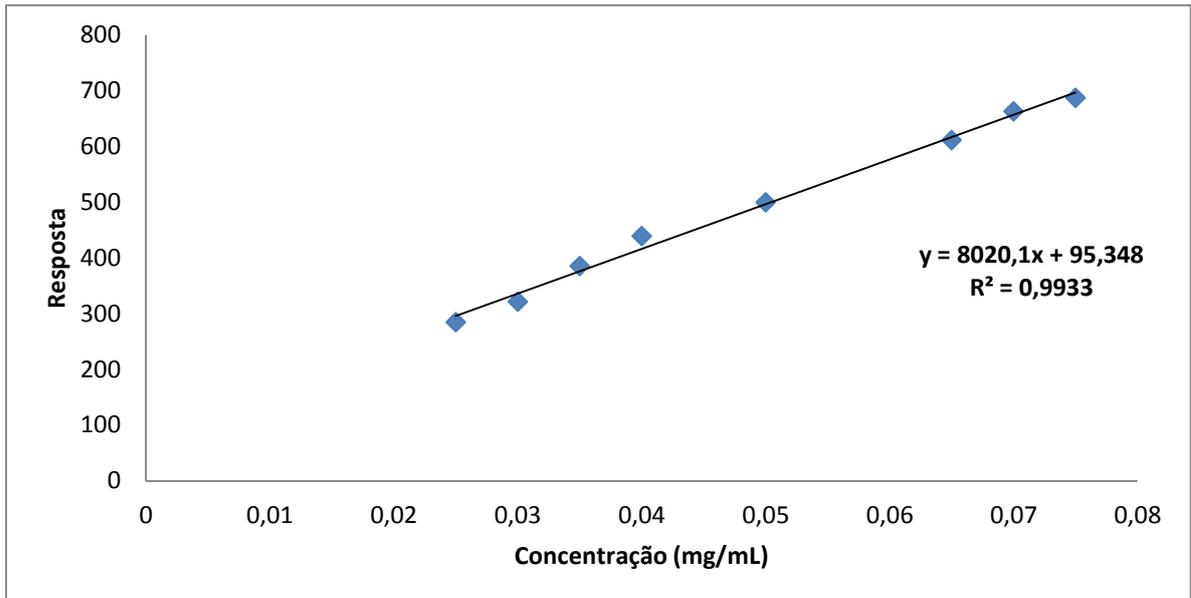


Figura 3.34: Curva analítica para cubebina construída com os valores das médias das respostas para cada concentração, na faixa de 0,025 a 0,075 mg/mL.

De acordo com a curva de calibração acima o método pode ser considerado linear, já que a metodologia analítica pôde demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. Isso pode ser demonstrado pela regressão linear obtida com coeficiente de correlação ao quadrado de $R^2 > 0,99$, que é o critério mínimo aceitável pela ANVISA (ANVISA, 2003)

Também foi realizado o gráfico de resíduos, **Figura 3.35** segundo dados da **tabela 3.16** (*Y (modelo) = Concentração x 8020,1 + 95,348 e **Resíduo = Resposta – Y modelo)

Tabela 3.16: Pontos da curva de linearidade, mostrando as concentrações de cubebina, as respostas obtidas em triplicata, o valor de Y (modelo) e o valor do resíduo.

Concentração (mg/mL)	Área	*Y (modelo)	**Resíduo
0,025	303,914	296	8
0,025	289,027	296	-7
0,025	260,8593	296	-35
0,03	348,5071	336	13
0,03	304,8736	336	-31
0,03	310,4006	336	-26
0,035	403,6002	376	28
0,035	376,5053	376	0
0,035	375,7376	376	0
0,04	469,2461	416	53
0,04	435,6673	416	20
0,04	412,1024	416	-4
0,05	519,1617	496	23
0,05	522,6104	496	26
0,05	456,8314	496	-40
0,065	609,4271	617	-7
0,065	605,3833	617	-11
0,065	618,5598	617	2
0,07	635,1083	657	-22
0,07	662,6875	657	6
0,07	690,5598	657	34
0,075	673,6037	697	-23
0,075	688,3267	697	-9
0,075	699,1434	697	2

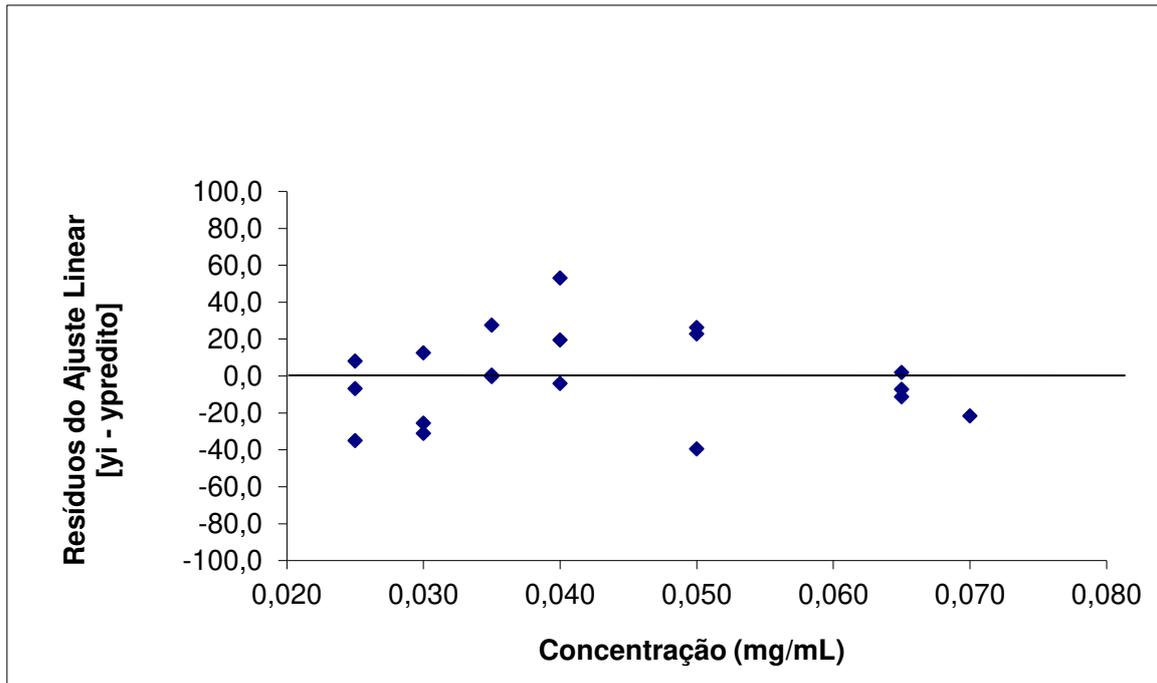


Figura 3.35: Gráfico de resíduos para cubebina construído com os valores das respostas obtidas em triplicata para cada concentração, na faixa de 0,025 a 0,075 mg/mL.

Através do gráfico de resíduos podemos observar uma distribuição aleatória dos resíduos da curva de calibração, indicando a eficiência do modelo de regressão linear proposto.

Doseamento

De acordo com o doseamento realizado em triplicata, a cubebina representa 10% do extrato etanólico bruto de *Piper cubeba*, sendo o desvio padrão relativo entre as concentrações obtidas iguais a CV: 1,62%.

Tabela 3.17: Doseamento realizado em triplicata com três diferentes extratos preparados na concentração de 10mg/mL.

Extrato (μL)	Volume do injetor (μL)	Concentração de cubebina (mg/mL)
6	10	0,0548
6	10	0,0566
6	10	0,0556

3.4 Conclusão

Isolou-se com sucesso a cubebina, utilizando sistemas binários de solventes entre hexano e acetato de etila, o que otimizou o seu rendimento (10,5%).

Foram realizadas técnicas para sua devida caracterização, as quais demonstraram que a substância isolada se trata realmente da cubebina.

Finalmente, a cubebina foi doseada no extrato bruto de *Piper cubeba*, mostrando que representa 10% do extrato.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DA CUBEBINA
"IN VITRO" E "IN VIVO"

4. Atividade antitumoral “*in vitro*” e “*in vivo*” da cubebina

4.1 Introdução

Como visto anteriormente na revisão bibliográfica, a cubebina é uma substância bastante ativa, que tem várias propriedades benéficas, como atividade analgésica, anti-inflamatória, anti-leishmania, tripanocida, antibacteriana, antitumoral, etc.

Estudos *in vitro* já foram realizados em duas diferentes linhagens celulares de câncer de próstata humano (LNCaP-FGC e PC-3), que avaliaram o potencial anti-câncer de um extrato etanólico de *Piper cubeba*. Os resultados indicaram que o extrato inibiu a proliferação em células de câncer de próstata humano LNCaP por vários mecanismos (Yam *et al.*, 2008).

Sendo assim, torna-se interessante testar a atividade “*in vitro*” da substância isolada cubebina em uma linhagem de câncer de próstata e também em outras linhagens tumorais humanas. O teste de citotoxicidade “*in vitro*” em cultura de células tumorais é importante para a avaliação de agentes anticâncer, inclusive aqueles provenientes de produtos naturais.

Quando se analisa o potencial de citotoxicidade das substâncias em linhagens celulares tumorais, pode-se avaliar desde a morte celular até a alteração do metabolismo (KEAWPRADUB *et al.*, 1999).

Os tumores sólidos são estruturas complexas e heterogêneas (TRÉDAN, O. *et al.*, 2007). Entre os tumores sólidos existem diferenças de pH, fluxo de nutrientes, pressão de oxigênio, que podem gerar uma distribuição inadequadas da drogas dentro do tumor, comprometendo a quimioterapia. Portanto, além dos testes “*in vitro*” torna-se necessário um modelo experimental “*in vivo*” para prever o comportamento dos tumores sólidos à quimioterapia (TRÉDAN, O. *et al.*, 2007; IWAMOTO, L.H. *et al.*, 2015).

4.2 Metodologia

4.2.1 Atividade antiproliferativa em painel de linhagens tumorais humanas (“*in vitro*”).

- A suspensão celular em sua respectiva densidade de inoculação foi

preparada em meio RPMI (criado pelo Roswell Park Memorial Institute, meio sintético completo) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e tratado com penicilina-estreptomicina (1%).

- Foram inoculados 100 μ L de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, as quais se mantiveram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi também preparada uma placa controle (placa T₀), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento e que não foram tratadas com amostra.

- As amostras foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI+5% de SFB e penicilina-estreptomicina (1%), o que evita a toxicidade do DMSO.

- As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 mg/mL, (100 μ L/compartimento) em triplicata, e a seguir incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 mg/mL (100 μ L/compartimento), em triplicata.

- No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T₀ foram fixadas com 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®) para determinação da quantidade de células presentes no momento de adição das amostras, sendo este o valor basal 0.

- Após 48 horas de tratamento, as células foram fixadas com 50 μ L de TCA a 50% e incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

- Após a secagem, foram adicionados 50 μ L/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1% e a seguir as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos.

- As placas foram então lavadas por quatro vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e após secagem completa à temperatura ambiente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 μ L/compartimento de Trizma Base (10 μ M, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância

foi realizada em leitor de microplacas a 540nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

A sulforrodamina B (SRB) é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste (SKEHAN *et al*, 1990; RUBISTEIN *et al*, 1990; MONKS *et al*, 1991).

Tabela 4.1: Linhagens celulares tumorais e normal (HaCat) utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas DI. *DI: densidade de inoculação.

Linhagem celular	Nome	DI*(x10⁴ células/mL)
Pulmão	NCI-H460	4,0
Mama	MCF-7	6,0
Ovário com fenótipo de multiresistência	NCI-ADR/RES	5,0
Cólon	HT-29	4,0
Próstata	PC-3	5,0
Leucêmica	K-562	5,0
Renal	786-0	4,5
Glia	U251	4,0
Queratinócito humano (não tumoral)	HaCat	4,0

4.2.2 Atividade antitumoral “*in vivo*”.

Animal

Para o modelo biológico utilizado na avaliação da atividade antitumoral foram utilizados camundongos BalB/C machos, com peso entre 25 – 30 g, com 90 dias de idade. Estes animais foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (Cemib) – Unicamp. Foram mantidos em instalações adequadas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do

CPQBA, UNICAMP em ambiente com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), em ciclos de 12h luz/escuro, com água e ração “*ad libitum*”.

O ensaio biológico envolvendo essa lignana dibenzilbutirolactônica, a cubebina, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), Instituto de Biologia, UNICAMP (nº 3693-1, de 15 de dezembro de 2014). Sacrifício foi realizado com anestesia seguida de deslocamento cervical.

Preparação do animal doador e inoculação das células tumorais nos camundongos.

As células de Ehrlich foram descongeladas e somente depois de 2 passagens (intervalo de 5 dias entre elas) foram inoculadas em 4 animais doadores (aproximadamente 1×10^5 célula/animal) por via intraperitoneal. Após 5 dias do inóculo:

- Injetou-se 10mL de PBS (temperatura ambiente) no peritônio do animal doador, estando o animal anestesiado.

- O líquido ascítico do animal doador foi coletado com seringa e agulha e vertido em Becker.

O procedimento foi repetido em todos os animais doadores.

- Foi transferido 1 mL da suspensão celular para uma proveta e completado para 10mL com PBS para contagem das células. Homogeneizou-se e transferiu-se para câmara de Neubauer para contagem celular.

- Foram contadas as células de cada quadrante da câmara (19+18+28+20), realizado o cálculo da média (21,25) e do fator de correção da câmara de Neubauer ($8,5 \times 10^6$ em 1mL).

Após contar as células cada animal deveria ser inoculado com 5×10^6 células tumorais. Para tanto, foi realizado cálculo para inoculação em 70 animais, levando em consideração a densidade/animal e volume/animal.

- De acordo com os cálculos para inocular os 70 animais seriam necessárias 350×10^6 células que correspondiam a 41,2 mL da suspensão.

Este volume é maior que o máximo que se pode inocular, que é 60 μL por animal ($70 \text{ animais} \times 0,06\text{mL} = 4,2\text{mL}$).

Desta forma, a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos à 2000rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e ressuspenso em 4,2 mL de PBS, obtendo-se então uma suspensão de 350×10^6 células em 4,2mL suficiente para 70 animais.

Os animais foram anestesiados, o dorso de cada animal foi raspado e as células tumorais foram inoculadas por via subcutânea na área raspada. Foram inoculados 60 μ L de suspensão celular em cada animal.

Distribuição dos grupos

Grupos:

- 1– Controle positivo: Doxorrubicina 3mg/Kg
- 2 – Controle negativo: PBS pH 7
- 3 – Cubebina: 12,5mg/Kg
- 4 – Cubebina: 25mg/Kg
- 5 – Cubebina: 50mg/Kg

Os grupos foram separados e os animais pesados, marcados com ácido pícrico e identificados com o número e grupo do animal, conforme **tabela 4.2**.

Tabela 4.2: Grupos de animais separados conforme marcação com ácido pícrico e tratamentos diferenciados.

Grupo	Número de animais	Marcação	Tratamento
I	6	Pata dianteira direita	PBS + DMSO - controle negativo (via oral)
		Pata dianteira esquerda	Doxorrubicina 3mg/Kg - controle positivo (via peritoneal)
III	6	Pata traseira direita	Cubebina 12,5mg/Kg via oral
		Pata traseira esquerda	
IV	6	esquerda	Cubebina 25mg/Kg via oral
V	6	Cabeça	Cubebina 50mh/Kg via oral

Tratamento

Doxorrubicina

- Foi utilizado o medicamento Cloridrato de Doxorrubicina (Eurofarma). Cada frasco-ampola de cloridrato de doxorrubicina 50mg contém:

Cloridrato de doxorrubicina	_____	50mg	} 550mg
Manitol	_____	250mg	
Lactose	_____	250mg	
Dose: 3mg/Kg			

- Foram pesados 10mg do medicamento e diluído em 3mL de PBS.

A doxorrubicina foi administrada por via intraperitoneal a cada 3 dias, sendo que antes da sua administração o animal era pesado e a dose calculada de acordo com o peso.

Cubebina (dose 12,5mg/Kg)

- Foram pesados 28,75 mg de cubebina e diluídos em 23mL (3 gotas de DMSO → 3 gotas Tween 80 → PBS) e divididos em 10 alíquotas de 2,3mL, armazenados no freezer.

A cubebina foi administrada por via oral diariamente, sendo que a cada 3 dias o peso do animal era conferido a dose calculada de acordo com o peso.

Cubebina (dose 25mg/Kg)

- Foram pesados 50 mg de cubebina e diluídos em 20mL (3 gotas de DMSO → 3 gotas Tween 80 → PBS) e divididos em 10 alíquotas de 2,0mL, armazenados no freezer.

A cubebina foi administrada por via oral diariamente, sendo que a cada 3 dias o peso do animal era conferido a dose calculada de acordo com o peso.

Cubebina (dose 50mg/Kg)

- Foram pesados 150mg de cubebina e diluídos em 30mL (3 gotas de DMSO → 3 gotas Tween 80 → PBS) e divididos em 10 alíquotas de 3,0mL, armazenados no freezer.

A cubebina foi administrada por via oral diariamente, sendo que a cada 3 dias o peso do animal era conferido e a dose calculada de acordo com o peso.

No décimo quinto dia de tratamento realizou-se coleta de sangue para análise de hemograma em equipamento Sysmex (modelo Poch-100iV Diff). Os animais foram sacrificados e os órgãos retirados, pesados e analisados macroscopicamente

(baço, fígado, rins, testículos). O peso da carcaça também foi avaliado. Os tumores foram retirados e pesados.

Análise estatística

A diferença significativa entre os grupos foi avaliada por ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism 5.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão (DP).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Resultados e Discussão da atividade antiproliferativa em painel de linhagens tumorais humanas (“*in vitro*”)

A substância cubebina foi avaliada quanto à citotoxicidade nas seguintes linhagens neoplásicas: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); NCI-H460; PC-3 (próstata); HT-29 (colorretal); K562 (leucemia). Também foi testada em uma linhagem de células normais HaCaT (queratinócito humano, célula normal imortalizada). Como controle positivo dos experimentos foi utilizado o quimioterápico Doxorubicina.

A viabilidade celular foi avaliada pela coloração das proteínas a partir do corante SRB, nas linhagens de células neoplásicas, semeadas em 96 cavidades e mantidas em meio de cultura RPMI. Os resultados da avaliação da atividade antitumoral “*in vitro*” da cubebina e do quimioterápico doxorubicina frente às linhagens celulares estão apresentados na tabela abaixo, que mostra a GI_{50} (Growth Inhibition 50) – concentração necessária para que ocorra 50% de proliferação celular (**Tabela 4.3**).

Como parâmetro de atividade considerou-se como potente atividade antineoplásica os compostos que apresentarem $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ (ITHARAT *et al.*, 2004). Em seu programa de triagem de drogas anticâncer, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) considera potente atividade antineoplásica valores

$GI_{50} \leq a$ 4,0 $\mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991). No presente estudo, os compostos foram considerados inativos quando $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$.

É também bastante útil o conhecimento do índice de seletividade (IS), o qual pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991). O IS corresponde à divisão entre o valor da GI_{50} da cubebina na linhagem de células normais HaCaT e o valor da GI_{50} da cubebina na linhagem de células neoplásicas ($IS = GI_{50} \text{ HaCaT} / GI_{50} \text{ células neoplásicas}$). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.3: Inibição do crescimento - GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para Doxorubicina e Cubebina.

Ativo	2	m	a	7	4	p	h	k	q
Doxorrubicina	<0,025	0,071	0,15	0,11	<0,025	0,040	0,045	<0,025	0,026
Cubebina	9,5	>250	38,3	20,1	>250	12,9	25	0,81	17,4

Tabela 4.4: Índice de Seletividade (IS) para a cubebina e doxorubicina.

Ativo	2	m	a	7	4	p	h	k
Doxorrubicina	1,04	0,3662	0,1733	0,2364	1,04	0,65	0,5778	1,04
Cubebina	1,83158	0,0696	0,4543	0,8657	0,0696	1,3488	0,696	21,481

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460; p = PC-3 (próstata); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia);

Linhagem não tumoral humana: q = HaCaT (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Para uma melhor visualização da atividade da cubebina os resultados também foram plotados em gráfico, utilizando a curva concentração-resposta que fornece informações importantes da sua atividade antiproliferativa. Com esse tipo de gráfico é possível verificar se a substância possui efeito citocida (pontos da curva abaixo do ponto zero) ou efeito citostático (pontos da curva acima do ponto zero). Os gráficos para a cubebina e para a doxorubicina (**Figura 4.1 e 4.2**), respectivamente,

são mostrados abaixo, a fim de se traçar um perfil comparativo das duas substâncias ativas em relação à sua atividade antitumoral.

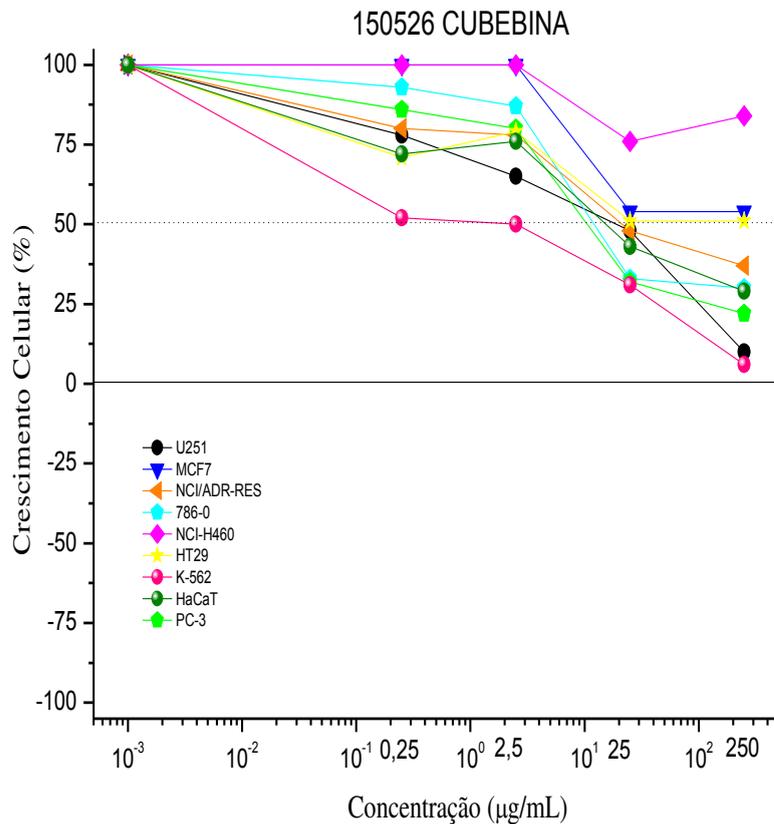


Figura 4.1: Atividade antiproliferativa da cubebina frente à linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 mg/mL), durante 48h.

Na figura 4.1 observa-se que a cubebina produziu inibição do crescimento, efeito citostático, não apresentando efeito citocida em nenhuma linhagem. A cubebina apresentou GI₅₀ ≤ 30 µg/mL para as linhagens U251 (glioma, SNC), 786-0 (rim), PC-3 (próstata), HT-29 (colorretal).

Para a linhagem K562 (leucemia), a cubebina apresentou GI₅₀ ≤ a 4,0 µg/mL. Para as demais linhagens, MCF-7 (mama) e NCI-H460 a cubebina pode ser considerada inativa, pois GI₅₀ > 250 µg/mL.

Analisando o índice de seletividade para a cubebina, segundo tabela 6.3, pode-se observar uma alta seletividade da cubebina para a linhagem K562 (leucemia).

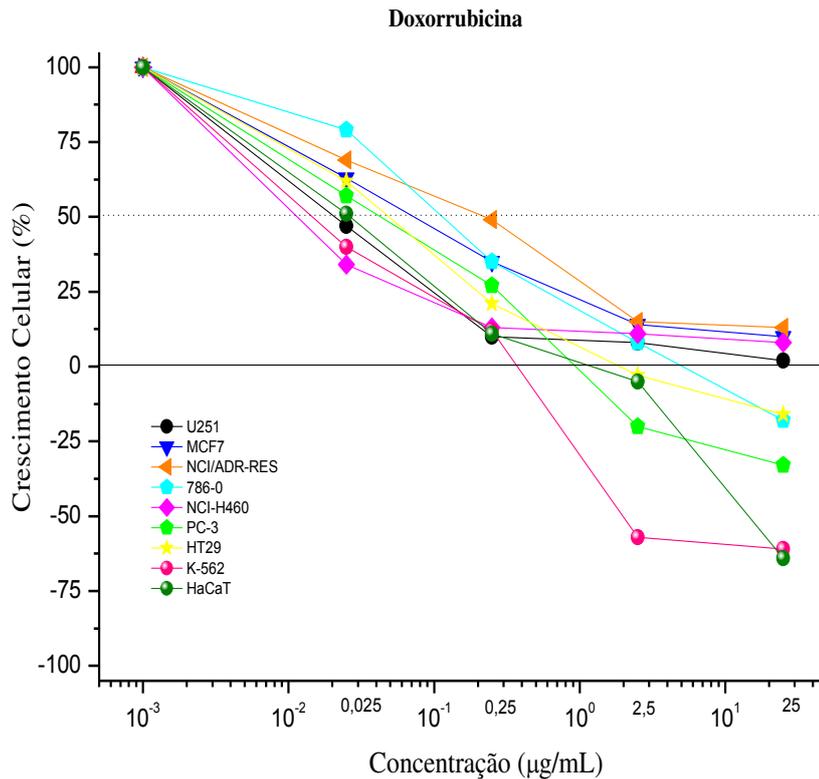


Figura 4.2: Atividade antiproliferativa da doxorrubicina frente à linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,025; 0,25; 2,5 e 25 mg/mL), durante 48h.

Na figura 4.2 observa-se que a doxorrubicina apresenta um perfil de gráfico bastante diferente da cubebina, já que a doxorrubicina produz efeito citocida em algumas linhagens: K562 (leucemia), PC-3 (próstata), 786-0 (rim), HT-29 (colorretal).

4.3.2 Resultados e Discussão da atividade antitumoral da cubebina em tumor sólido de Ehrlich (“*in vivo*”)

O modelo de tumor ascítico de Ehrlich apresenta uma limitação quando os tratamentos são feitos por via intraperitoneal, porque neste caso as amostras são aplicadas no mesmo local onde há o crescimento das células de Ehrlich. Isto torna difícil elucidar parâmetros relacionados com a absorção e distribuição da droga. Neste estudo as células de Ehrlich foram inoculadas no flanco dos animais (tumor sólido de Ehrlich) e o tratamento com cubebina foi feito por via oral. Portanto estamos analisando o efeito sistêmico da cubebina.

O tratamento com cubebina via oral foi escolhido por haver relatos na literatura de uma melhor atividade *in vivo* da cubebina por via oral em relação à via intraperitoneal em doença de Chagas (ESPERADIN *et al.*, 2010).

Quanto à toxicidade da Cubebina

Nenhum estudo específico foi realizado a respeito da toxicidade aguda da cubebina. Porém, temos relatos da literatura sobre estudos de toxicidade com o extrato etanólico bruto de *Piper cubeba*. Segundo estudos anteriores a DE₅₀ do extrato bruto é 150mg/Kg e a DL₅₀ é 2000mg/Kg (PERAZZO, F.F. *et al.*, 2013). Considerando também o doseamento da cubebina no extrato etanólico bruto de *Piper cubeba* no qual obteve-se que a cubebina representa 10% do extrato bruto, temos que as doses utilizadas no estudo estavam dentro do limite de segurança para os animais.

Além disso, foi realizado um acompanhamento dos animais, com controle do peso e observação das condições físicas gerais dos animais envolvidos no estudo. O controle da evolução de peso corporal dos animais mostra que apenas o grupo tratado com doxorrubicina apresentou perda progressiva de peso (**figura 4.3**). Esse primeiro sinal de toxicidade da doxorrubicina também foi observado no acompanhamento clínico, já que os animais apresentaram piloereção e indícios de diarreia.

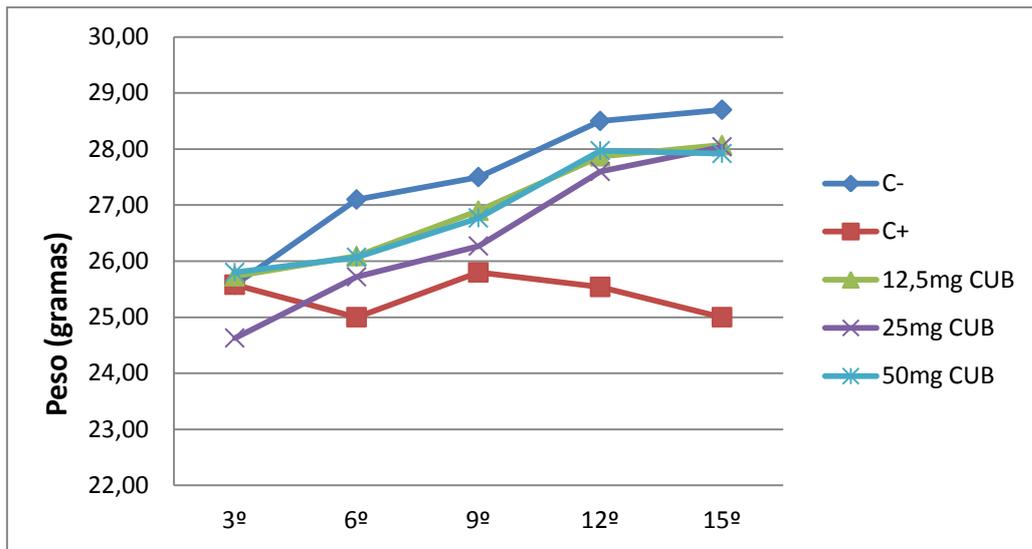


Figura 4.3: Evolução de peso corporal dos animais estudados nos grupos controle negativo, controle positivo, e grupos tratados com cubebina (12,5mg/Kg, 25mg/Kg, 50mg/Kg).

Foram também analisadas alterações macroscópicas de peso ou volume dos órgãos, e alterações hematológicas nos animais envolvidos no estudo (**Tabela 4.5**). Os dados mostrados na tabela em relação aos órgãos correspondem à média \pm desvio padrão, da relação entre o peso dos órgãos e o peso dos animais estudados. Os valores dos índices hematológicos correspondem à contagem direta das células em equipamento Sysmex (modelo Poch-100iV Diff).

Tabela 4.5: Células do hemograma e peso dos órgãos (média \pm DV) dos animais do grupo não-tratado, tratado com doxorubicina e tratados com cubebina (12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg) durante 12 dias.

Órgãos	Controle negativo	Controle positivo	Cubebina (12,5mg/Kg)	Cubebina (25mg/Kg)	Cubebina (50mg/Kg)
Fígado (g)	0,048 \pm 0,002	0,045 \pm 0,006	0,047 \pm 0,003	0,045 \pm 0,005	0,050 \pm 0,003
Rins (g)	0,015 \pm 0,0008	0,014 \pm 0,0007	0,015 \pm 0,0007	0,015 \pm 0,001	0,014 \pm 0,0038
Baço (g)	0,005 \pm 0,0003	0,003 \pm 0,0005	0,005 \pm 0,0005	0,005 \pm 0,0001	0,007 \pm 0,005
Testículos (g)	0,007 \pm 0,0005	0,006 \pm 0,0004	0,007 \pm 0,0005	0,007 \pm 0,0006	0,007 \pm 0,0007
Células do Hemograma	Controle negativo	Controle positivo	Cubebina (12,5mg/Kg)	Cubebina (25mg/Kg)	Cubebina (50mg/Kg)
Leucócitos (10 ⁶ /μL)	5,17 \pm 1,57	1,57 \pm 0,53	3,65 \pm 0,67	4,12 \pm 0,90	4,7 \pm 1,95
Hemácias (10 ⁶ /μL)	10,27 \pm 0,49	9,63 \pm 0,76	10,00 \pm 0,89	10,19 \pm 0,25	9,21 \pm 1,73
Plaquetas (10 ³ /L)	1135,50 \pm 227,69	1789 \pm 301,99	1115,83 \pm 172,43	1144,17 \pm 62,51	926,83 \pm 369,09

Para facilitar a visualização das diferenças entre os grupos, os resultados hematológicos também foram plotados em gráficos (**Figura 4.4, Figura 4.5, Figura 4.6**).

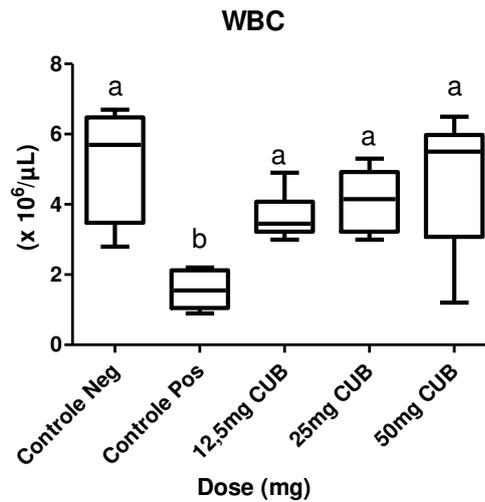


Figura 4.4: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem de leucócitos, WBC (10⁶μL).

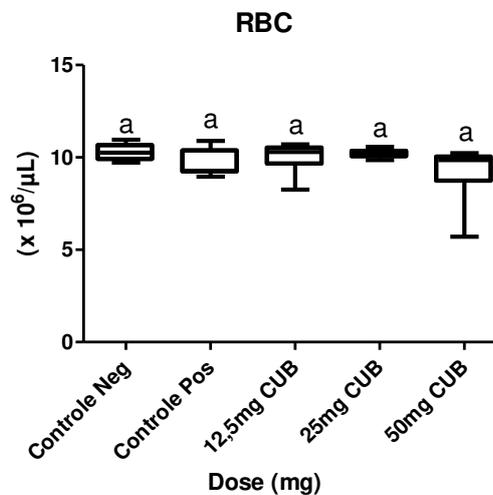


Figura 4.5: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem de hemácias, RBC (10⁶μL).

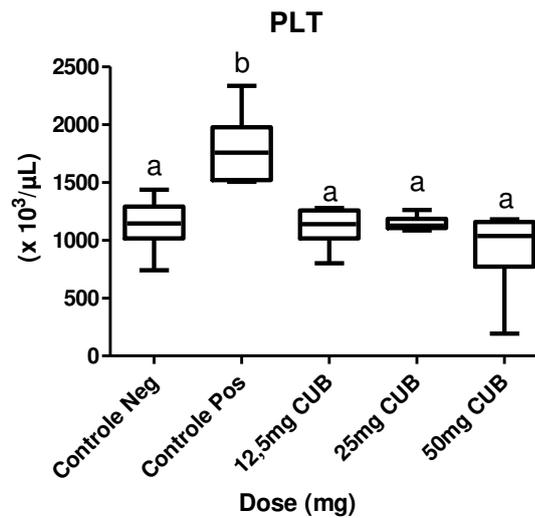


Figura 4.6: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem de plaquetas, PLT ($10^3/\mu\text{L}$).

Observando os gráficos pode-se notar que a doxorrubicina, como esperado, é bastante tóxica, causando diminuição drástica no número de leucócitos. A contagem de hemácias não demonstra diferença estatística significativa entre os grupos.

Esperava-se que houvesse uma diminuição na contagem absoluta de plaquetas no grupo tratado com doxorrubicina devido à mielosupressão que este quimioterápico induz. Entretanto, houve um aumento nesta contagem. Dessa forma, procedeu-se a avaliação do PDW, um parâmetro hematológico que indica heterogeneidade dos volumes plaquetários, conforme **Figura 4.7**.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Portanto, o grupo tratado com doxorrubicina apresentou aumento na contagem absoluta de plaquetas sem apresentar aumento da heterogeneidade dos volumes plaquetários.

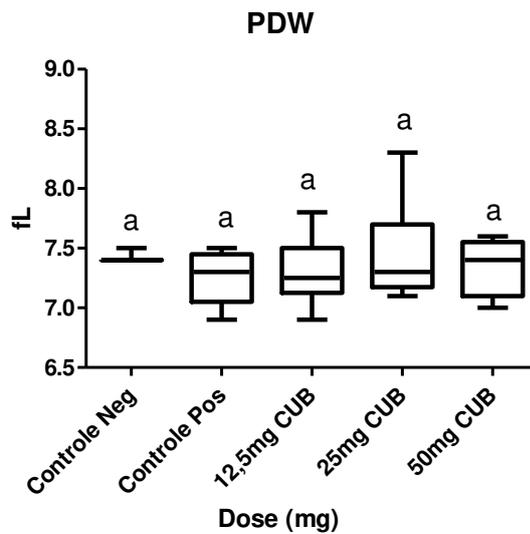


Figura 4.7: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a análise da heterogeneidade do volume plaquetário, PDW (fL).

De uma maneira geral, considerando todos os dados obtidos pode-se concluir que a doxorrubicina é bastante tóxica para os animais, conforme já esperado por relatos da literatura e a cubebina demonstra pouca ou nenhuma toxicidade.

Quanto à avaliação do leucograma

A contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico reflete o estado imune geral do organismo contra as células. O número de monócitos circulantes é influenciado por fatores quimiotáticos derivados do tumor. A razão entre linfócitos/monócitos pode ser um marcador para avaliar o estado imune do organismo e microambiente do tumor em alguns tipos de câncer (Shin *et al.* 2013).

Segundo Shin *et al.*, (2013) a associação entre alguns parâmetros como baixa contagem absoluta de linfócitos, alta contagem absoluta de monócitos e baixa razão entre linfócitos/monócitos está associada, de acordo com International Staging System (ISS) a um pior prognóstico em relação ao câncer.

No caso do estudo da atividade antitumoral *in vivo* da cubebina no tumor sólido de Ehrlich, analisando os parâmetros acima mencionados notamos: uma baixa contagem absoluta de linfócitos apenas no grupo tratado com doxorrubicina,

conforme **Figura 4.8**; em relação aos monócitos, o grupo tratado com cubebina 12,5mg/Kg apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle negativo e ao grupo tratado com cubebina 50mg/Kg (**Figura 4.9**); os grupos tratados com cubebina nas doses de 12,5mg/Kg e 25mg/Kg apresentaram uma razão linfócito/monócito estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle positivo (**Figura 4.10**).

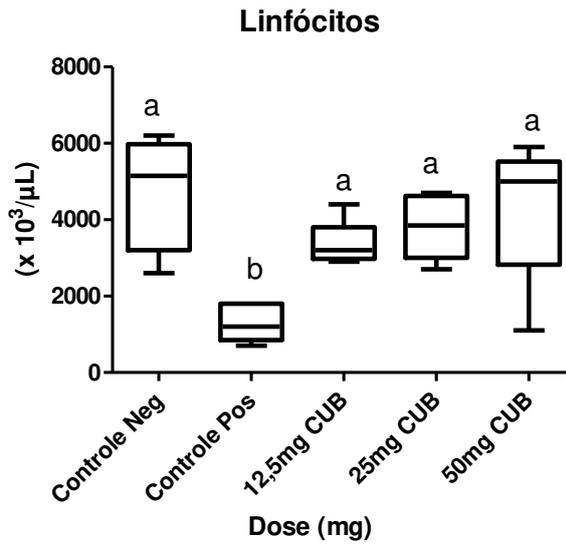


Figura 4.8: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem absoluta de linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$).

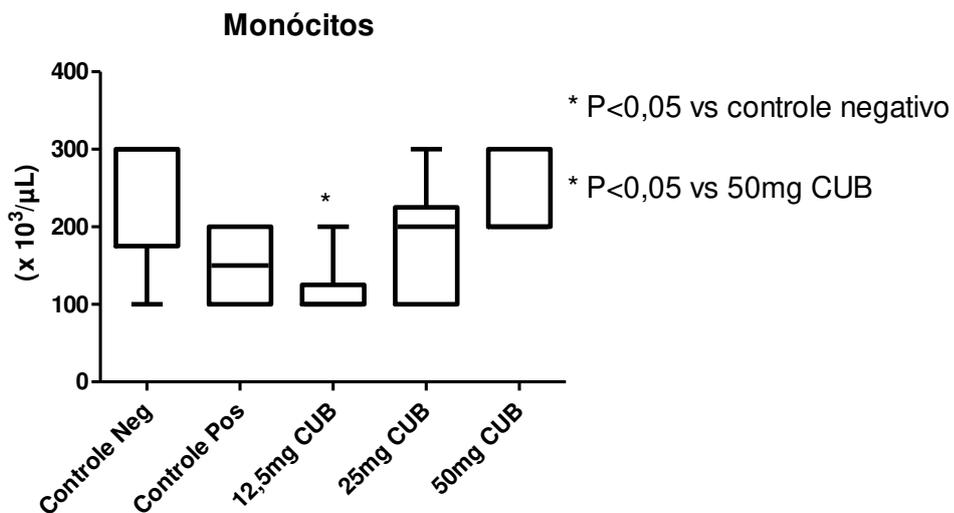


Figura 4.9: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a contagem absoluta de monócitos ($10^3/\mu\text{L}$).

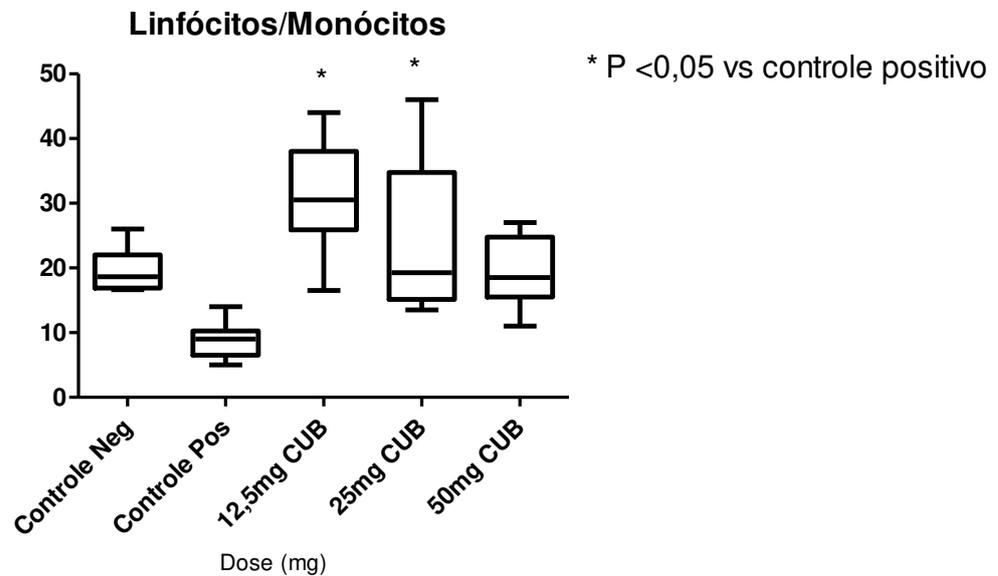


Figura 4.10: Gráfico mostrando as diferenças entre os grupos: controle negativo, controle positivo e grupos tratados com cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg para a razão linfócitos/monócitos.

Em vista dos gráficos acima e analisando os parâmetros supracitados pode-se inferir que o tratamento com cubebina pode ajudar a melhorar o prognóstico do câncer em animais tratados com esta substância. Os resultados foram melhores para os animais tratados com cubebina na dosagem de 12,5mg/Kg.

Quanto à evolução do tumor

Em relação ao desenvolvimento do tumor não houve variação estatística significativa entre os grupos controle negativo e controle positivo, nem tão pouco entre o grupo negativo e os grupos tratados com cubebina, conforme demonstrado na **Figura 4.11**.

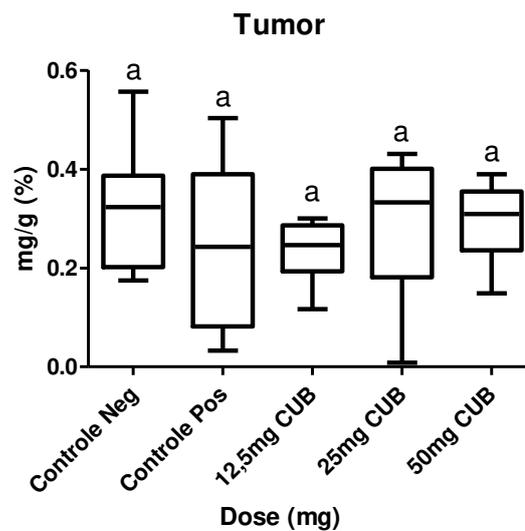


Figura 4.11: Tumor sólido de Ehrlich no grupo não-tratado (PBS, pH 7,0 + Tween 80 0,3%), no grupo tratado com doxorrubicina e nos grupos tratados cubebina (CUB) nas doses de 12,5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg. O tumor foi expresso como o peso do tumor dividido pelo peso corporal, multiplicado por 100. ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Como não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle negativo e positivo pode-se inferir que o teste não pode ser validado.

Existem três explicações plausíveis para o acontecido:

- O grupo controle negativo não apresentou o crescimento esperado do tumor, o que pode ter acontecido por algum desvio durante a inoculação das células tumorais;
- A doxorrubicina poderia não estar com a sua qualidade preservada.
- O número de animais ($n=6$) pode não ter sido suficiente para o estudo.

4.4 Conclusão

A cubebina é sabidamente uma substância bastante ativa, com atividades biológicas testadas e comprovadas em várias condições patológicas. Analisando o potencial citotóxico da cubebina nas linhagens celulares tumorais testadas, observa-se que a cubebina age provavelmente alterando o metabolismo, inibindo o crescimento celular- efeito citostático.

Levando em consideração os resultados obtidos no teste “*in vitro*”, que mostram um efeito citostático da cubebina, aliado aos resultados no teste não-clínico que demonstram a baixa ou nenhuma toxicidade da mesma, tem-se uma excelente expectativa.

Poderia ser útil como terapia adjuvante no tratamento de tumores. Em casos em que a cirurgia não é possível, a cubebina poderia ser utilizada como terapia anterior, a fim de reduzir o tamanho do tumor e torná-lo operável.

Também poderia ser utilizada concomitantemente com o quimioterápico a fim de melhorar o prognóstico e o estado imune geral do paciente.

Sem dúvida outros ensaios e outras considerações devem ser discutidos e realizados, contudo a cubebina parece nos dar uma expectativa positiva em relação ao tratamento de tumores.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO GERAL

5. Conclusão Geral

Isolou-se com sucesso uma lignana chamada cubebina, utilizando sistemas binários de solventes entre hexano e acetato de etila, o que otimizou o rendimento da cubebina em relação ao rendimento declarado em literatura.

As técnicas de caracterização demonstraram que a o composto isolado se trata realmente da cubebina e a mesma foi doseada no extrato bruto de *Piper cubeba*. O doseamento demonstrou que a cubebina representa 10% do extrato.

Analisando o potencial citotóxico da cubebina nas linhagens celulares tumorais testadas, observa-se que a cubebina possui um efeito citostático, inibindo o crescimento celular.

Os resultados obtidos no teste “*in vivo*” demonstraram a baixa ou nenhuma toxicidade da cubebina, podendo ser útil como terapia adjuvante no tratamento de tumores.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- ABOUL-ENEIN, H.Y., KLDAPNA, A., KRUK, I., 2011. Radical scavenging ability of some compounds isolated from *Piper cubeba* towards free radicals. **Luminescence** 26, 202–207.
- AAS, J.A.; GRIFFEN, A.L.; DARDIS, S.R.; LEE, A.M.; OLSEN, I; DEWHIRST, F.E., 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J. Clin. Microbiol.** 46: 1407–1417.
- ACHIKE F.I.; KWAN C.Y., 2003. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 30: 605–615.
- ANVISA. (29 de Maio de 2003). Acesso em 16 de Outubro de 2015, disponível em Agência Nacional de Vigilância Sanitária: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES
- ANVISA (26 de Maio de 2014). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acesso em 16 de Outubro de 2015, disponível em http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rdc002613_05_2014.pdf?MOD=AJPERES
- BASTOS, J.K., ALBUQUERQUE, S., SILVA, M.L.A., 1999. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica** 65, 541–544.
- BASTOS, J.K., CARVALHO, J.C., de SOUZA, G.H., PEDRAZZI, A.H., SARTI, S.J., 2001. Antiinflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **J. Ethnopharmacol.** 75, 279–282.
- BATES, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotominae and flies. **Int J Parasitol** 37(10):1097–106.doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- BODIWALA, H.S., SINGH, G., SINGH, R., DEY, C.S., SHARMA, S.S., BHUTANI, K.K., SINGH, I.P., 2007. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines** 61, 418–421.
- CARVALHO, M. T. M.; REZENDE, K. C. S.; EVORA, P. R. B.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; CELOTTO, A. C., 2013. The Lignan (-)-Cubebin Inhibits Vascular Contraction and Induces Relaxation Via Nitric Oxide Activation in Isolated Rat Aorta. **Phytotherapy Research**. Res. 27: 1784–1789
- CHAN-BACAB, M.J.; PENA-RODRIGUES, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat Prod Rep** 18:674–688.
- CHEVILLE, N. F., 1994. Introdução à Patologia Veterinária. 1ª edição. São Paulo: Manole. p. 556.
- COIMBRA, H. dos S.; ROYO, V. de A.; de SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; de SOUZA, G.H.B.; da SILVA, R.; DONATE, P.M.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K., 2004. Analgesic and anti-inflammatory activities of (-)-o benzyl cubebin, a (-)-cubebin derivative ,obtained by partial syntesis. **Boll. Chim. Farmac.** - Anno 143 - n. 2 Marzo 2004.

- COURA, J.C., 2009. Present situation and new strategies for Chaga's disease chemotherapy – a proposal. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz**. 104, 549-554.
- De FRANCISCHI, J.N., 2005. **A Farmacologia em nossa vida**. Editora UFMG, p. 40, Belo Horizonte.
- DAGLI, M. L. Z., 1989. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. Universidade de São Paulo. p.148.
- De REZENDE, A.A.A., SILVA, M.L.A., TAVARES, D.C., CUNHA, W.R., REZENDE, K.C.S., BASTOS, J.K., LEHMANN, M., De ANDRADE, H.H.R., GUTERRES, Z.R., SILVA, L.P., SPANO, M.A., 2011. The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.** 49, 1235–1241.
- De REZENDE, A.A.A.; MUNARI C.C.; De OLIVEIRA P.F.; FERREIRA N.H.; TAVARES D.C.; SILVA M.L.A.; REZENDE K.C.S.; SPANO M.A., 2013. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology** 55: 645-652.
- DI STASI, L.C., 1996. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. Saúde**. Editora UNESP, São Paulo, Brasil, p. 230.
- ELFAHMI, RUSLAN, K., BATTERMAN, S., BOS, R., Oliver, K., WORDENBEG, H.J., 2007. Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. **Biochem. Syst. Ecol.** 35, 397–402.
- ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. 1993. *The status of ethnopharmacology in Brazil*. Journal of Ethnopharmacology, 38, 137-143.
- EHRlich, P., 1906. Experimentelle carcinoma studien an Mäusen. Königliches Anstalt für Experimentelle Therapie. p. 78-80.
- ESPERANDIM, V.R.; FERREIRA, D. S.; REZENDE, K.C.S.; CUNHA, W.R.; SARAIVA, J.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A; ALBUQUERQUE, S., 2013. Evaluation of the in vivo therapeutic properties of (-)-cubebin and (-)-hinokinin against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology** 133: 442-446
- ESPERANDIM, V.R.; FERREIRA, D. S.; SARAIVA, J.; SILVA, M.L.A; COSTA, E.V.; PEREIRA, A.C.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S., 2010. Reduction of parasitism tissue by treatment of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* with lignano lactones. **Parasitol Res** 107: 525-530.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M. *et al.*, GLOBOCAN 2012 1.0. International Agency for Research on Cancer, 2013, <http://globocan.iarc.fr/>.
- HARDMAN, J. G., MOLINOFF, P.B., GILMAN, A. G., 1996. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 453-454.
- HOIBY J.S.; CIOFU, N.O.; JOHANSEN, H.K., 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. **Int. J. Oral. Sci.** 3: 55–65.
- IMPOTENCE, 1992. **NIH Consens Statement**, n. 10, p. 1.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H., RAMAN, A., 2004. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 90:33-38.

IWAMOTO, L.H.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; MONTEIRO, P.A.; RUIZ, A.L.T.G.; SOUSA, I.M.O.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; RODRIGUES, R.A.F. Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/948737>

JUNQUEIRA, A.P.F., PERAZZO, F.F., SOUZA, G.H.B., MAISTRO, E.L., 2007. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an in vivo mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology** 30, 656–663.

KEAWPRADUB, N.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; HOUGHTON, P.J., 1999. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Planta Medica* v. 65, p. 311-315.

MADY, E. A., 2002. Antitumor and biochemical effects of *Echiscoloratus* Crude venon on Ehrlich ascite carcinoma cells in vivo. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. Vol. 8, p. 283-296.

MAGALHAES, L.G., de SOUZA, J.M., WAKABAYZASHI, K.A., LAURENTIS, R.S., VIMHOLIS, A.H., REZENDE, K.C., SIMARO, G.V., BASTOS, J.K., RODRIGUES, V., ESPERADIM, V.R., FERREIRA, D.S., CROTTI, A.E., CUNHA, W.R., SILVA, M.L., 2012. In vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.** 110, 1747–1754.

MAINENTI, P; ROSA, L.E.B., 2008. Carcinogênese química experimental em glândulas salivares – revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Vol. 54(2), p. 167-174.

MAISTRO, E.L., NATEL, A.V., de SOUZA, G.H., PERAZZO, F.F., 2011. Genotoxic effects of (–)-cubebin in somatic cells of mice. **J. Appl. Toxicol.** 31, 185–189.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.I., 2006. An update on Chaga's disease human American trypanosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 100, 663-677.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GROODICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M., 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Cell Lines. *Journal of National Cancer Institute*. v. 83, p. 757-766.

MORAES, M. C. B., LAGO, L. C., *QUIM. NOVA*, 26(2003)556

MUKHERJEE, P.K., PONNUSANKAR, S., PANDIT, S., HAZAM, P.K., AHMMED, M., MUKHERJEE, K., 2011. Botanicals as medicinal food and their effects on drug metabolizing enzymes. **Food Chem. Toxicol.** 49, 3142–3153.

PACHECO, A.G.; SILVA, T.M.; MANFRINI, R.M.; SALLUM, W.S.T.; DUARTE, L.P.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A.F. de C., 2010. Estudo químico e atividade antibacteriana do caule de *Aristolochia esperanzae* kuntze (aristolochiaceae). **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 8, 1649-1652.

- PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, W. R., 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain, Behavior and Immunity*. Vol. 17, p. 43-54.
- PANDEY, J.K., SINGH, D.K., 2009. Molluscicidal activity of *Piper cubeba* Linn., *Piper longum* Linn. And *Tribulus terrestris* Linn. And their combinations against snail *Indoplanorbis exustus* Desh. *Indian J. Exp. Biol.* 47, 643–648.
- PARKINGTON, H.C.; COLEMAN, H.A.; TARE, M., 2004. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. **Pharmacol Res** 49: 509–514.
- PERAZZO, F.F.; RODRIGUES, I.V.; MAISTRO, E.L.; SOUZA, S.M.; NANAYKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T; SOUZA, G.H.B. Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae). *Pharmacognosy Journal* 5 (2013) 13-16
- PESSUTO M.B.; DA COSTA I.C.; DE SOUZA A.B.; NICOLI F.M.; DE MELO J.C.P.; PETEREIT F.; LUFTMANN H., 2009. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. es Reiss. **Química Nova** 32(2) 412-416.
- RASSI, Jr.; A, RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A., 2010. Chagas's disease. **Lancet** 375, 1388-1402
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. & TYLER, V. R. **Farmacognosia e Farmacobioteconologia**. (Pharmacognosy and Pharmacobioteconology). Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo, Brasil, Editora Premier, 1997
- RUBIN, R; FARBER, J.L. *Patologia*. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- RUBINSTEIN, L.V.; SHOEMAKER, K.D.; PAULL, R.M.; SIMON, S.; TOSINI, P.; SKEHAN, D.A.; SCUDIERO, A.; MONKS, M.; BOYD, M.R., 1990. Comparison Of In Vitro Anticancer-Drug-Screening. *Journal of The National Cancer Institute*. v.82, p.1113-1118.
- SARAIVA, J; VEGA, C; ROLON, M.; da SILVA, R.; SILVA, M.L.A.; DONATE, P.M.; BASTOS, J.K.; GOMEZ-BARRIO, A.; de ALBUQUERQUE, S., 2007. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res** 100:791-795.
- SARAIVA, J.; SIQUEIRA, C.M., SILVA, C.H.T.P., BARRETO, V.B., TUDELLA, V.G., SILVA, R., ANDRADE, E.S.M.L., DORTA, D.J., BASTOS, J.K., UYEMURA, S.A., de ALBUQUERQUE, S., CURTI, C., 2009. Cubebin and derivatives as inhibitors of mitochondrial complex I. Proposed interaction with subunit B8. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.** 24, 599–606.
- SELWITZ, R.H.; ISMAIL, A.I.; PITTS, N.B. 2007. Dental caries. *The Lancet*. 369: 51–59.
- SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J., 2000. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters*. Vol. 74, p. 111-115.
- SERPI, R., 2003. Mechanism of benzo(a)pyrene-induced accumulation of p53 tumor suppressor protein in mouse. (Finlândia): Faculty of Medicine, University of Oulu.
- SILVA, M.L., COIMBRA, H.S., PEREIRA, A.C., ALMEIDA, V.A., LIMA, T.C., COSTA, E.S.,

- VINHOLIS, A.H., ROYO, V.A., SILVA, R., FILHO, A.A., CUNHA, W.R., FURTADO, N.A., MARTINS, C.H., CARVALHO, T.C., BASTOS, J.K., 2007. Evaluation of Piper cubeba extract, (–)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Phytother. Res.** 21, 420–422.
- SILVA, M.L., MARTINS, C.H., LUCARINI, R., SATO, D.N., PAVANB, F.R., FREITAS, N.H., ANDRADE, L.N., PEREIRA, A.C., BIANCO, T.N., VINHOLIS, A.H., CUNHA, W.R., BASTOS, J.K., SILVA, R., Da SILVA FILHO, A.A., 2009. Antimycobacterial activity of natural and semisynthetic lignans. **Z. Naturforsch.** C 64, 779–784.
- SILVA, M.L.A.; CICARELLI, R.M.B.; PAULETTI, P.M.; LUZ, P.P.; REZENDE, K.C.S.; JANUARIO, A.H.; da SILVA, R.; PEREIRA, A.C.; BASTOS, J.K.; de ALBUQUERQUE, S.; MAGALHAES, L.G.; CUNHA, W.R., 2011. Trypanosoma cruzi: evaluation of (–)-cubebin derivatives activity in the messenger RNAs processing. **Parasitol res** 109: 445-451
- SILVA, M. L., CUNHA, W., ALBUQUERQUE, S., CIUFFI, K., CALEFI, P., NASSAR, E., *et al.* (2009). Patente Nº PCTBR200900043. Patente no Exterior.
- SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. de, MENTZ, L.A., -PETROVICK, P.R., 1999. Farmacognosia: da Planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / Ed. da UFSC, p. 821.
- SINIGAGLIA, M., LEHMANN, M., BARUMGARDT, P., AMARAL, V.S., DIHL, R.R., REGULY, M.L., De ANDRADE, H.H.R., 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. **Mutat. Res.** 607, 225–230.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; , SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 82, no. 13, pp. 1107–1112.
- SHIN, S-J.; ROH, J.; KIM, M.; JUNG, M.J.; KOH, Y.W.; PARK, S-S.; YOON, D.H.; SUH, C.; PARK, C-J.; CHI, H.S.; HUH, J.. 2013. Prognostic Significance of Absolute Lymphocyte Count/Absolute Monocyte Count Ratio at Diagnosis in Patients with Multiple Myeloma. *The Korean Journal Of Pathology*, vol 47: 526-533
- SOUZA, G.H.B.; da SILVA FILHO, A.A.; PEREIRA, A.C.; de A.ROYO, V.; e SILVA M.L.A.; da SILVA, M.L.A.; da SILVA, R.; DONATE, P.M.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K., 2004. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (–)-O-acetyl,(–)-O-methyl, (–)-O-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (–)-cubebin. *II Farmaco* 59: 55–61.
- SOUZA, V.A.; SILVA, R.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SOUZA, G.H.B.; FILHO, A.A. da S.; GRANDO, M.D., DONATE, M.D.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A., 2005. Trypanocidal activity of (–)-cubebin derivatives against free amastigote forms of Trypanosoma cruzi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15: 303-307.
- STEWART, H.L.; SNELL, K.C; DUNHAM, L. J; SCHLYEN, S. M., 1959. Transplantable and Transmissible Tumors of Animals. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. p. 378.
- STORPIRTIS, S., GONÇALVES, J. E., CHIANN, C., & GAI, M. N. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STUTZ, A.; GOLENBOCK, D.T.; LATZ, E., 2009. Science in medicine: Inflammasomes: too big to miss. **The Journal of Clinical Investigation**, 119(12), 3502-3511

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M., 1991. Assays for Bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). London Academic Press.

TANZER, J.M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A.M., 2001. The micro-biology of primary dental caries in humans. **J. Dent. Educ.** 65: 128–137.

TRÉDAN, O.; GALMARINI, C.M.; PATEL, K.; TANNOCK, I.F. “Drug resistance and the solid tumor microenvironment,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 99, no. 19, pp. 1441–1454, 2007.

USIA, T., WATABE, T., KADOTA, S., TEZUKA, Y., 2005. Metabolite-cytochrome P450 complex formation by methylenedioxyphenyl lignans of *Piper cubeba*: mechanism-based inhibition. **Life Sci.** 76, 2381–2391.

USIA, T., IWATA, H., HIRATSUKA, A., WATABE, T., KADOTA, S., TEZUKA, Y., 2006. CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. **Phytomedicine** 13,67–73.

VAINIO, H; MAGEE, P; MCGREGOR, D; MCMICHAEL, AJ., 1992. **Mechanisms of carcinogenesis in risk identification**. Lyon: International Agency for Research on Cancer. p. 8-54.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART M.O.F.; MOURA J.B.F.; MANFREDINI V.; BENFATO M.S.; KUBOTA L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30(5), 1323 -1338.

YAM, J., KREUTER, M., DREWE, J., 2008. *Piper cubeba* targets multiple aspects of the androgen-signalling pathway. A potential phytotherapy against prostate cancer growth? **Planta Medica** 74, 33–38.

YUNCKER, T. G. 1972. The piperaceae of Brasil I – *Piper*: Group I, II, III, IV. *Hoehnea* 2: 19-366.

CAPÍTULO 7

ANEXOS

7. Anexos**Modelo experimental: EHRLICH SÓLIDO FLANCO****Evolução de peso corporal****Amostra: cubebina****Tabela 7.1:** Evolução de peso corporal dos animais tratados com PBS + DMSO (controle negativo).

Dia pós-inóculo (19/05)		3	6			9			
Data		22/05	25/05			28/05			
<i>PBS + DMSO (controle negativo)</i>									
Grupo	Animal			ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	
1	A	1	26,88	28,70	1,82	6,77	29,44	0,74	2,58
		2	27,74	28,25	0,51	1,84	29	0,75	2,65
		3	25,53	26,79	1,26	4,94	26,23	-0,56	-2,09
	B	4	26,54	27,82	1,28	4,82	28,38	0,56	2,01
		5	25,13	26,20	1,07	4,26	27,11	0,91	3,47
		6	22,44	25,48	3,04	13,55	25,77	0,29	1,14
	média	25,71	27,21	1,50	6,03	27,65	0,45	1,63	
	desvio	1,85	1,25	0,79	3,66	1,51	0,49	1,81	

Dia pós-inóculo (19/05)		12			15					
Data		31/05/2015			03/06/2015					
<i>PBS + DMSO (controle negativo)</i>										
Grupo	Animal		ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	ganho total (15d)	% (de ganho total)	
1	A	1	30,58	1,14	3,87	30,93	0,35	1,14	4,05	15,07
		2	29,84	0,84	2,90	30,31	0,47	1,58	2,57	9,26
		3	27,92	1,69	6,44	27,59	-0,33	-1,18	2,06	8,07
	B	4	29,11	0,73	2,57	29,12	0,01	0,03	2,58	9,72
		5	27,54	0,43	1,59	28,31	0,77	2,80	3,18	12,65
		6	26,71	0,94	3,65	26,72	0,01	0,04	4,28	19,07
	média	28,61	0,96	3,50	28,83	0,21	0,73	3,12	12,31	
	desvio	1,47	0,39	1,51	1,61	0,36	1,28	0,81	3,82	

Obs.: Em 03/06 - animal # 3 início de ulceração

Tabela 7.2: Evolução de peso corporal dos animais tratados com doxorrubicina (controle positivo).

Data		22/05/2015	25/05/2015	28/05/2015					
<i>Doxorrubicina (controle positivo)</i>									
Grupo	Animal			ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	
2	A	1	26,67	26,61	-0,06	-0,22	27,17	0,56	2,10
		2	25,12	25,81	0,69	2,75	26,05	0,24	0,93
		3	26,30	26,85	0,55	2,09	26,55	-0,30	-1,12
	B	4	23,64	23,86	0,22	0,93	23,16	-0,70	-2,93
		5	26,60	26,30	-0,30	-1,13	25,51	-0,79	-3,00
		6	26,61	27,17	0,56	2,10	27,46	0,29	1,07
	média	25,82	26,10	0,28	1,09	25,98	-0,12	-0,49	
	desvio	1,22	1,20	0,36	1,38	1,55	0,51	1,99	

Dia pós-inóculo (19/05)		12	15							
Data		31/05/2015	03/06/2015							
<i>Doxorrubicina (controle positivo)</i>										
Grupo	Animal		ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	ganho total (15d)	% (de ganho total)	
2	A	1	28,2	1,03	3,79	27,77	-0,43	-1,52	1,10	4,12
		2	25,55	-0,5	-1,92	25,43	-0,12	-0,47	0,31	1,23
		3	25,06	-1,49	-5,61	24,12	-0,94	-3,75	-2,18	-8,29
	B	4	22,24	-0,92	-3,97	22,87	0,63	2,83	-0,77	-3,26
		5	25,49	-0,02	-0,08	23,96	-1,53	-6,00	-2,64	-9,92
		6	27,33	-0,13	-0,47	25,82	-1,51	-5,53	-0,79	-2,97
	média	25,64	-0,34	-1,38	24,99	-0,65	-2,41	-0,83	-3,18	
	desvio	2,06	0,79	3,00	1,73	0,77	3,07	1,30	4,91	

Obs.: Em 31/05 - animal # 4 - tumor muito reduzido; em 03/06 - animais # 6 e 7 com diarreia e piloereção.

Tabela 7.3: Evolução de peso corporal dos animais tratados com cubebina (dose 12,5 mg/Kg).

Dia pós-inóculo (19/05)		3	6	9					
Data		22/05/2015	25/05/2015	28/05/2015					
<i>Cubebina (dose 12,5 mg/Kg)</i>									
Grupo	Animal			ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	
3	A	1	24,86	25,31	0,45	1,81	25,58	0,27	1,07
		2	24,91	24,74	-0,17	-0,68	26,38	1,64	6,63
		3	26,57	25,85	-0,72	-2,71	27,99	2,14	8,28
		4	27,26	26,85	-0,41	-1,50	27,52	0,67	2,50
		5	26,01	26,86	0,85	3,27	27,12	0,26	0,97
	B	6	24,89	26,30	1,41	5,66	26,62	0,32	1,22
			25,75	25,99	0,23	0,97	26,87	0,88	3,44
		média							
	desvio	1,02	0,85	0,74	2,90	0,86	0,74	2,92	

Dia pós-inóculo (19/05)		12	15							
Data		31/05/2015	03/06/2015							
<i>Cubebina (dose 12,5 mg/Kg)</i>										
Grupo	Animal		ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	ganho total (15d)	% (de ganho total)	
3	A	1	26,26	0,68	2,66	26,59	0,33	1,26	1,73	6,96
		2	27,33	0,95	3,60	27,63	0,3	1,10	2,72	10,92
		3	28,96	0,97	3,47	29,61	0,65	2,24	3,04	11,44
		4	28,63	1,11	4,03	28,9	0,27	0,94	1,64	6,02
		5	28,2	1,08	3,98	28,56	0,36	1,28	2,55	9,80
	B	6	27,69	1,07	4,02	26,41	-1,28	-4,62	1,52	6,11
			27,84	0,98	3,63	27,95	0,10	0,37	2,20	8,54
		média								
	desvio	0,97	0,14	0,48	1,29	0,63	2,27	0,59	2,25	

Obs.: Em 03/06 - animais # 2, 3 e 7 início de ulceração.

Tabela 7.4: Evolução de peso corporal dos animais tratados com cubebina (dose 25 mg/Kg).

Dia pós-inóculo (19/05)		3	6			9			
Data		22/05/2015	25/05/2015			28/05/2015			
<i>Cubebina (dose 25 mg/Kg)</i>									
Grupo	Animal			ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	
4	A	1	23,84	24,53	0,69	2,89	24,76	0,23	0,94
	2	23,47	23,93	0,46	1,96	24,33	0,40	1,67	
	3	26,03	26,19	0,16	0,61	26,57	0,38	1,45	
	4	23,87	24,56	0,69	2,89	24,91	0,35	1,43	
	5	25,10	26,00	0,90	3,59	27,05	1,05	4,04	
	6	24,15	26,30	2,15	8,90	27,29	0,99	3,76	
			24,41	25,25	0,84	3,47	25,82	0,57	2,21
	média								
		0,96	1,028	0,63	2,60	1,29	0,33	1,22	
	desvio								

Dia pós-inóculo (19/05)		12			15					
Data		31/05/2015			03/06/2015					
<i>Cubebina (dose 25 mg/Kg)</i>										
Grupo	Animal		ganho (3d)	%		ganho (3d)	%	ganho total (15d)	% (de ganho total)	
4	A	1	25,94	1,18	4,77	26,45	0,51	1,97	2,61	10,95
	2	25,07	0,74	3,04	25,88	0,81	3,23	2,41	10,27	
	3	28,38	1,81	6,81	28,49	0,11	0,39	2,46	9,45	
	4	26,46	1,55	6,22	26,97	0,51	1,93	3,10	12,99	
	5	27,88	0,83	3,07	27,86	-0,02	-0,07	2,76	11,00	
	6	28,98	1,69	6,19	29,59	0,61	2,10	5,44	22,53	
			27,12	1,30	5,02	27,54	0,42	1,59	3,13	12,86
	média									
		1,52	0,41	1,52	1,37	0,29	1,11	1,06	4,45	
	desvio									

Obs.: Em 31/05 - animal # 1 - tumor muito reduzido; em 03/06 - animal # 6 início de ulceração.

Tabela 7.5: Evolução de peso corporal dos animais tratados com cubebina (dose 50 mg/Kg).

Dia pós-inóculo (19/05)		3		6		9			
Data		22/05/2015		25/05/2015		28/05/2015			
<i>Cubebina (dose 50 mg/Kg)</i>									
Grupo	Animal			ganho (3d)	%	ganho (3d)	%		
5	B	1	26,21	27,56	1,35	5,15	28,8	1,24	4,50
		2	25,89	25,98	0,09	0,35	27	1,02	3,93
	C	3	24,85	25,18	0,33	1,33	25,81	0,63	2,50
		4	25,95	26,72	0,77	2,97	27,55	0,83	3,11
	D	5	25,31	25,75	0,44	1,74	26,28	0,53	2,06
		6	27,01	27,83	0,82	3,04	28,04	0,21	0,75
	média		25,87	26,50	0,63	2,43	27,24	0,74	2,81
	desvio		0,74	1,05	0,41	1,53	1,11	0,34	1,23

Dia pós-inóculo (19/05)		12		15		<i>Obs.: Em 03/06 - animais # 4, 5 e 7 início de ulceração.</i>				
Data		31/05/2015		03/06/2015						
<i>Cubebina (dose 50 mg/Kg)</i>										
Grupo	Animal		ganho (3d)	%	ganho (3d)	%	ganho total (15d)	% (de ganho total)		
5	B	1	29,51	0,71	2,47	30,22	0,71	2,41	4,01	21,61
		2	28,27	1,27	4,70	27,91	-0,36	-1,27	2,02	7,55
	C	3	28,05	2,24	8,68	26,6	-1,45	-5,17	1,75	6,87
		4	28,52	0,97	3,52	28,44	-0,08	-0,28	2,49	12,37
	D	5	27,53	1,25	4,76	27,04	-0,49	-1,78	1,73	5,75
		6	29,05	1,01	3,60	29,18	0,13	0,45	2,17	8,03
	média		28,48	1,24	4,62	28,23	-0,26	-0,94	2,36	10,36
	desvio		0,71	0,48	1,97	1,35	0,66	2,32	0,78	5,44



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação do efeito do extrato bruto de Piper cubeba (Piperaceae) e cubebina sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich." (protocolo nº 3693-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa / Carla Costa e Silva Scarpa Pereira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

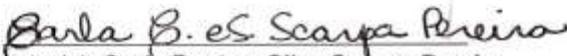
Campinas, 15 de dezembro de 2014.

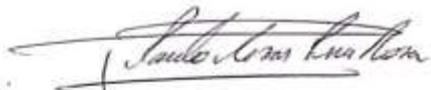
Fátima Alonso
Secretária Executiva

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolada do extrato bruto de Piper cubeba (Piperaceae)"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 04/01/2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Carla Costa e Silva Scarpa Pereira**
RG n.º 11463689 SSPMG

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Paulo César Pires Rosa**
RG n.º 578370761