

Rafael Rosolen Teixeira Zafred

Avaliação das atividades farmacológicas dos extratos brutos
de *Astronium fraxinifolium* Schott. (Anacardiaceae)

Campinas
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAFAEL ROSOLEN TEIXEIRA ZAFRED

**“Avaliação das atividades farmacológicas dos extratos brutos de
Astronium fraxinifolium Schott. (Anacardiaceae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pelo candidato

Rafael Rosolen Teixeira Zafred

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Biociências e Tecnologia
de Produtos Bioativos na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.



Orientador: Dr. João Ernesto De Carvalho

CAMPINAS,
2014

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

Z13a Zafred, Rafael Rosolen Teixeira, 1987-
Avaliação das atividades farmacológicas dos extratos brutos de *Astronium fraxinifolium* Schott. (Anacardiaceae) / Rafael Rosolen Teixeira Zafred. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Astronium fraxinifolium*. 2. Cultura de células humanas. 3. Tumores. 4. Inflamação. 5. Carcinoma de Ehrlich. I. Carvalho, João Ernesto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the pharmacological activity of crude extracts of *Astronium fraxinifolium* Schott. (Anacardiaceae)

Palavras-chave em inglês:

Astronium fraxinifolium

Human cell culture

Tumors

Inflammation

Carcinoma, Ehrlich tumor

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Marcelo Lancelotti

Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Data de defesa: 01-08-2014

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

Campinas, 01 de agosto de 2014

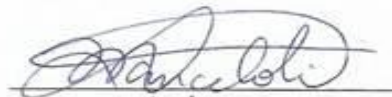
COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. João Ernesto De Carvalho



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti



Assinatura

Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves Da Silva



Assinatura

Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder



Assinatura

Dra. Fabiana Regina Nonato



Assinatura

RESUMO

Astronium fraxinifolium Schott., conhecido popularmente como “Gonçalo Alves”, é uma espécie vegetal característica de regiões tropicais e tem sua distribuição no Cerrado Brasileiro, possui o caule e as folhas ricos em substâncias tânicas. Relatos populares indicam a utilização de *A. fraxinifolium* no tratamento de diarreias, disenterias, como antisséptico, antimicrobiano, anti-hemorragico, cicatrizante, anti-inflamatório e antiulcerogênico. Devido o uso popular e a insuficiência de dados na literatura, este trabalho teve por objetivo avaliar as potenciais atividades farmacológicas desta espécie em modelos experimentais *in vitro* (atividade antiproliferativa em cultura de células) e *in vivo* (toxicidade aguda, modelos de nocicepção, inflamação e tumor sólido murino). Caules e folhas obtidos das coletas foram secos e triturados, o pó obtido foi utilizado para obtenção dos extratos por maceração mecânica e sistema Soxhlet. Estes foram avaliados conforme seu rendimento e demonstraram a presença de taninos hidrolisáveis, como compostos majoritários, e flavonoides. No teste realizado em cultura de células tumorais e não tumorais de diferentes origens os extratos apresentaram, em sua maioria, uma ação citostática na maior concentração testada (250 µg/mL). Por outro lado, nos testes relacionados com atividade antinociceptiva, o extrato bruto das folhas demonstrou atividade nas doses de 100 e 200 mg/kg no modelo da formalina em ambas as fases. Nos modelos inflamatórios (úlceras induzidas por indometacina, edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton), as doses de 100 e 200 mg/kg, no modelo de edema de pata induzido por carragenina, e as doses de 150 e 300 mg/kg, no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, demonstraram atividade anti-inflamatória. Considerando que aproximadamente 25% dos tumores estão relacionados com inflamações crônicas, o extrato das folhas de *A. fraxinifolium* foi avaliado no modelo experimental do tumor sólido de Ehrlich, demonstrando inibição do crescimento tumoral na dose de 100 mg/kg. Sendo assim, os resultados experimentais sugerem que o extrato bruto de *A. fraxinifolium* possui atividade anti-inflamatória, corroborando sua utilização popular, além de promover inibição do crescimento tumoral, indicando que os componentes do extrato podem atuar em outros processos além do inflamatório. Porém, outros estudos necessitam ser realizados para identificar a classe de compostos que promoveram as atividades farmacológicas da espécie.

ABSTRACT

Astronium fraxinifolium Schott., popularly known as "Gonçalo Alves", is a species characteristic of tropical regions with their distribution in the Brazilian Cerrado, has stems and leaves rich in tannic substances. Reported the use of folk medicinal indicate *A. fraxinifolium* in the treatment of diarrhea, dysentery, antiseptic, antimicrobial, antihemorrhagic, wound healing, anti-inflammatory and antiulcerogenic. Due to popular use and insufficient data in the literature, this study aimed to evaluate potential pharmacological activities of this species *in vitro* experimental models (antiproliferative activity in cell culture) and *in vivo* (acute toxicity, models of nociception, inflammation and tumor solid murine) The plant material (stems and leaves) was obtained from dried and crushed, the powder obtained was used to obtain the extracts, mechanical maceration and Soxhlet system. These were evaluated according to their yield and showed the presence of hydrolysable tannins, as main compounds, and flavonoids. Testing conducted on cultured tumor and non-tumor cells of different origins, the extracts showed mostly a cytostatic action at the highest concentration tested (250 µg/mL). Moreover, tests related antinociceptive activity of crude extract of the leaves showed activity at doses of 100 and 200 mg/kg in the formalin model in both phases. In inflammatory models (indomethacin-induced ulcer, paw edema induced by carrageenan and ear edema induced by croton oil), doses of 100 and 200 mg/kg in paw edema induced by carrageenan model, and the doses of 150 and 300 mg/kg, in the ear edema induced by croton oil model, demonstrated anti-inflammatory activity. Considering that approximately 25% of tumors are associated with chronic inflammation, the extract of *A. fraxinifolium* was evaluated in the experimental model of Ehrlich solid tumor, demonstrating inhibition of tumor growth at a dose of 100 mg/kg. Thus, experimental results suggest that crude extract of *A. fraxinifolium* has anti-inflammatory activity, confirming its popular use, and it promoted tumor growth inhibition indicating that extract compounds can act in addition to other inflammatory processes. However, other studies should be performed to identify the class of compounds that promoted the pharmacological activity of the species.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER	1
1.2. INFLAMAÇÃO	5
1.3. RELAÇÃO CÂNCER-INFLAMAÇÃO	8
1.4. ETNOBOTÂNICA E ETNOFARMACOLOGIA	12
1.5. FAMÍLIA ANACARDIACEAE	14
1.5.1. Gênero <i>Toxicodendron</i>	15
1.5.2. Gênero <i>Anacardium</i>	16
1.5.3. Gênero <i>Manfigera</i>	17
1.5.4. Gênero <i>Astronium</i>	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. GERAIS	22
2.2. ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	23
3.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	23
3.2.1. Preparação do material vegetal para extração	23
3.2.2. Extração por maceração dinâmica.....	24
3.2.3. Extração por sistema Soxhlet	25
3.2.4. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD).....	25
3.2.5. Identificação de flavonoides	26
3.2.6. Identificação de taninos totais e condensados	26
3.2.7. Identificação de taninos condensados.....	26
3.3. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	26
3.3.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais 26	
3.3.1.1. Cultivo celular.....	26
3.3.1.2. Preparo das suspensões celulares.....	27
3.3.1.3. Análise dos resultados <i>in vitro</i>	30
3.3.2. Testes de atividade farmacológica <i>in vivo</i>	31
3.3.2.1. Animais.....	31
3.3.2.2. Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i>	32
3.3.2.2.1. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos de <i>A. fraxinifolium</i>	32
3.3.2.3. Úlcera induzida por indometacina	33
3.3.2.4. Atividade antinociceptiva em modelo de algesia induzida pela formalina. 34	
3.3.2.5. Teste de atividade locomotora	35
3.3.2.5.1. Campo aberto (<i>Open field</i>)	35

3.3.2.5.2. Barra giratória (<i>Rotarod</i>)	35
3.3.2.6. Edema de orelha induzido por óleo de cróton	36
3.3.2.7. Edema de pata induzido por carragenina	37
3.3.2.8. Tumor sólido de Ehrlich	37
3.3.2.8.1. Preparação das células	37
3.3.2.8.2. Inoculação nos Animais	38
3.3.2.9. Análises dos resultados <i>in vivo</i>	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS	39
4.1. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	44
4.2.1. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais ...	44
4.3. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VIVO</i>	49
4.3.1. Toxicidade aguda	49
4.3.2. Úlcera induzida por indometacina	52
4.3.3. Atividade antinociceptiva em modelo de algesia induzida pela formalina	54
4.3.4. Teste de atividade locomotora	57
4.3.5. Edema de orelha induzido por óleo de cróton	59
4.3.6. Edema de pata induzido por carragenina	63
4.3.7. Tumor sólido de Ehrlich	66
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6. REFERÊNCIAS	74
7. ANEXOS	88

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."
(Arthur Schopenhauer)*

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."
(Madre Teresa de Calcutá)*

*"Aquilo que se faz por amor está sempre acima do bem e do mal."
(Nietzsche)*

Agradecimentos

A Deus, pela vida, sabedoria, paciência e autoconfiança.

À minha família, pelo amor incondicional, constante incentivo, por me proporcionar alegria em todos os momentos e por me apoiar nas minhas escolhas.

Ao Dr. João Ernesto de Carvalho, pela orientação, por me aceitar como aluno, pelas conversas, conselhos, paciência e por acreditar no meu trabalho.

À Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas, pelo apoio, pelas sugestões sempre tão significativas.

À Sirlene, pela preocupação, conversas, ajuda nos experimentos, pelos agradáveis momentos, por acreditar em mim e pela paciência em transmitir seu conhecimento.

À Dra. Fabiana Regina Nonato, por me aconselhar, apoiar, incentivar, mostrar novos caminhos na pesquisa, pelos experimentos juntos e ensinamentos.

À Karin Maia Monteiro, nossa veterinária, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, ajudas e sugestões.

À Ana Possenti, nossa bióloga, pelas conversas, disposição e ajuda nos experimentos.

À Dra. Mary Ann Foglio, pelas conversas, sugestões e ajuda na parte química.

Ao Dr. Luís Carlos Bernacci e ao pessoal do Herbário do IAC, pela colaboração e auxílio na coleta da planta estudada.

Ao Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva e Dra. Luciana Pereira Silva, pela amizade, conversas, sugestões e por me despertarem o prazer pela pesquisa.

Aos meus amigos da graduação Myrcea, João Guilherme (Pamonha), João Victor, Iatan e William, pela amizade, torcida e apoio.

Aos meus amigos de Campinas, Vaner (Vanin), Nádia, Celso, Fabrício, Rafael (Portuga), Karen, Tamiris, Mateus, Raphael, Alexsandra (Leka), Hector, Jussara, André, William (Markito), pelos momentos de descontração, conversas e apoio para seguir em frente.

Aos estagiários da Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Lucas, Jéssica, Lidiane, Marine, pela prontidão e auxílio nos experimentos.

Aos queridos amigos e colegas da Divisão de Farmacologia e Toxicologia e aos agregados: Adriana, Larissa, Paula Paiva, Giovanna Fiorito, Giovanna Longato, Paula Monteiro, Débora, Gabriela, Michelle, Vanessa, Mariana, Humberto, Ana Paula, Thaís, Lúcia, Yumi, Ícaro, Jamerson, e a todos com os quais convivi durante o período de desenvolvimento do Mestrado, agradeço pela convivência, sugestões e contribuições.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP), ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, pela estrutura e oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de Mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos.

Lista de figuras:

Figura 1. Características adquiridas pelas células tumorais	3
Figura 2. Novas características que favorecem a carcinogênese	4
Figura 3. Cascata inflamatória	6
Figura 4. Processo da carcinogênese induzido pela inflamação crônica	9
Figura 5. Fatores de riscos que contribuem para o processo de carcinogênese a partir de um processo inflamatório	11
Figura 6. Exemplar da espécie <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott..	21
Figura 7. Placa de 96 compartimentos utilizada nos testes de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	29
Figura 8. Cromatografia em camada delgada	40
Figura 9. Reação para indicação da presença de flavonoides	41
Figura 10. Reação para indicação da presença taninos totais e condensados	42
Figura 11. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do quimioterápico padrão doxorrubicina	44
Figura 12. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais dos extratos brutos de <i>A. fraxinifolium</i>	45
Figura 13. Úlcera induzida por indometacina	52

Figura 14. Teste da formalina	55
Figura 15. Campo aberto (<i>Open field</i>)	58
Figura 16. Barra giratória (<i>Rotarod</i>)	59
Figura 17. Edema de orelha induzido por óleo de cróton	60
Figura 18. Edema de pata induzido por carragenina	64
Figura 19. Massa tumoral	67
Figura 20. Porcentagem de inibição do crescimento tumoral	67
Figura 21. Variação da massa corpórea	68
Figura 22. Tumores sólidos de Ehrlich	70

Lista de tabelas:

Tabela 1. Alguns mediadores da inflamação aguda e suas ações sistêmicas7

Tabela 2. Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (DI)27

Tabela 3. Rendimento dos extratos brutos das folhas e das cascas do caule obtidos por (A) sistema Soxhlet e (B) maceração dinâmica39

Lista de quadros:

Quadro 1. Parâmetros para avaliação do índice de lesões ulcerativas (ILU)34

Quadro 2. Presença de classe de compostos após a eluição das CCD nas fases móveis (1) e (2) e aplicação dos reveladores41

Quadro 3. Quantificação das enzimas hepáticas a partir do soro plasmático diluído 40 vezes dos animais que receberam MFH pela via IP51

Lista de abreviações e siglas:

5-HETE: ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico;

5-HPETE: ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico;

5-LOX: lipo-oxigenase;

786-0: linhagem celular de adenocarcinoma de rim;

Ácido clorídrico SR: solução de 27,4 mL de ácido clorídrico concentrado em 100 mL de água destilada;

ADP: adenosina difosfato;

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidal;

ANOVA: teste estatístico de análise de variância;

B16-F10: linhagem celular de melanoma murinho;

C: controle de células;

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

CCD: cromatografia em camada delgada;

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

CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético;

CHO-K1: célula de ovário de *hamster* chinês;

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

CO₂: dióxido de carbono;

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

COX: enzima ciclo-oxigenase;

COX-1: enzima ciclo-oxigenase do tipo 1;

COX-2: enzima ciclo-oxigenase do tipo 2;

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas;

CRMV-SP: Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo;

DI: densidade de inoculação;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;

FDA: *Food and Drug Administration*;

HaCaT: linhagem celular de queratinócito humano;

HeLa: linhagem celular de carcinoma epitelial do colo do útero;

HETE: ácido hidroxi-eicosatetraenóico;

HIV: vírus da imunodeficiência humana;

HIV-1-RT: enzima transcriptase reversa presente no vírus da imunodeficiência humana;

HL-60: linhagem celular de leucemia mieloblástica aguda;

HPETE: ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico;

HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal;

IAC: Instituto Agronômico de Campinas;

IL-1: interleucina 1;

ILU: índice de lesões ulcerativas;

INCA: Instituto Nacional do Câncer;

IP: administração de substâncias pela via intraperitoneal;

K-562: linhagem celular de leucemia mielógena crônica;

LXA₄: lipoxina A₄;

LXB₄: lipoxina B₄;

LTA₄: leucotrieno A₄;

LTB₄: leucotrieno B₄;

LTC₄: leucotrieno C₄;

LTD₄: leucotrieno D₄;

LTE₄: leucotrieno E₄;

MCD: extrato bruto diclorometânico das cascas do caule de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por maceração mecânica;

MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma de mama;

MCH: extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por maceração mecânica;

MFD: extrato bruto diclorometânico das folhas de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por maceração mecânica;

MFH: extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de maceração mecânica;

mg/kg: miligramas por quilograma;

NCI: *National Cancer Institute*;

NCI-ADR/Res: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas;

NCI-H460: linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células;

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa-B;

NO: óxido nítrico;

NP/PEG: *natural product*/polietilenoglicol

OECD: *The Organisation for Economic Co-operation and Development*;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

OVCAR-3: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário;

p:v: massa/volume;

PBS: solução salina tamponada;

PC-3: linhagem celular de adenocarcinoma de próstata;

PGD₂: prostaglandina D₂;

PGE₂: prostaglandina E₂;

PGG₂: prostaglandina G₂;

PGH₂: prostaglandina H₂;

PGI₂: prostaglandina I₂;

rpm: rotações por minuto;

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

SCH: extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por sistema Soxhlet;

SFB: soro fetal bovino;

SFC: extrato bruto diclorometânico das cascas do caule de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por sistema Soxhlet;

SFD: extrato bruto diclorometânico das folhas de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por sistema Soxhlet;

SFH: extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Astronium fraxinifolium* obtido pelo processo de extração por sistema Soxhlet;

SRB: sulforrodamina B;

T: média das absorbâncias das células tratadas;

T₀: média das absorbâncias das células no tempo 0;

TCA: ácido tricloroacético;

TGO: transaminase glutâmica oxalacética;

TGP: transaminase glutâmica pirúvica;

TNF- α : fator de necrose tumoral- α ;

TO: administração de substâncias pela via tópica;

TXA₂: tromboxano A₂;

U251: linhagem celular de glioblastoma;

UACC-62: linhagem celular de melanoma;

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas;

UV: ultravioleta;

v:v: volume/volume;

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth fator*);

VO: administração de substâncias pela via oral;

$\mu\text{g/mL}$: microgramas por mililitro;

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é um processo resultante de alterações celulares, especialmente mutações, que causam danos sobre o mecanismo de controle da proliferação, da diferenciação e da morte celular, podendo afetar cerca de 200 tipos diferentes de células (Mesquita et al., 2009). O termo câncer é utilizado para discriminar um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que possuem em comum a divisão e o crescimento desordenado das células, com a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, por meio da migração celular pelos vasos sanguíneos e linfáticos (INCA, 2014; NCI-EUA, 2014). A rápida divisão dessas células tende a torná-las agressivas e incontroláveis, determinando formações de tumores ou neoplasias malignas. Por outro lado, os tumores benignos podem ser definidos como uma massa de células que se dividem vagarosamente e se assemelham ao tecido original (INCA, 2014).

Nos países desenvolvidos, o câncer é o segundo em número de mortes anuais, ficando atrás apenas para as patologias cardiovasculares. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano surgem cerca de 10 milhões de novos casos com seis milhões de óbitos em todo o mundo. Assim, a OMS estima que para o ano de 2030 serão 22 milhões de novos casos de câncer com 17 milhões de mortes. No Brasil, a estimativa é de 580 mil novos casos para o ano de 2014, sendo o câncer de próstata o mais incidente nos homens e nas mulheres o de mama, excetuando-se o câncer de pele do tipo não melanoma (INCA, 2014).

As causas do câncer podem ser relacionadas às alterações nas células somáticas por meio de fatores externos, hábito de vida e meio ambiente; ou internos, que na maioria das vezes, são pré-determinados geneticamente. Evidentemente, a interação de todos esses

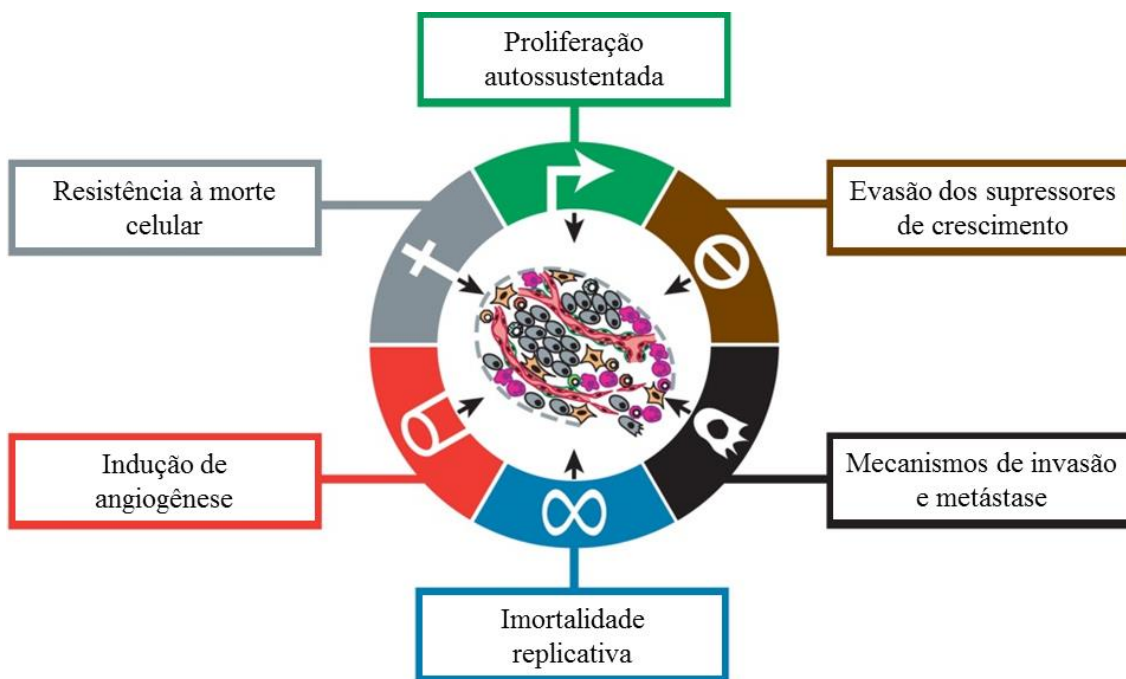
fatores pode potencializar a probabilidade das células normais sofrerem alterações malignas. Sendo assim, dentre as causas ambientais que mais contribuem para o desenvolvimento desta patologia estão o tabagismo, a exposição excessiva ao sol, o alcoolismo e o tipo de alimentação (INCA, 2014). Além disso, o aumento da expectativa de vida contribui para uma maior incidência de câncer, uma vez que as células são expostas por mais tempo aos agentes carcinogênicos e o decréscimo na eficiência dos mecanismos de reparo celular resultam em um acúmulo de mutações (Montesano e Hall, 2001).

Sendo assim, as células cancerosas são caracterizadas por ignorar os sinais externos e internos responsáveis pela regulação da proliferação celular e por evitar os processos de apoptose e diferenciação celular. São geralmente instáveis e deficientes no mecanismo de reparo de danos na molécula de DNA e no de correção de erros da replicação, resultando em um acúmulo de mutações no material genético (Ban e Kai, 2009). Além disso, são invasivas e capazes de sobreviver e proliferar em novos ambientes, produzindo metástases e angiogênese autossustentada (Terzian et al., 2007; Alberts et al., 2010).

No que diz respeito a sua etiologia, o câncer é um processo complexo onde células normais adquirem progressivamente um fenótipo neoplásico através de um processo denominado carcinogênese. Este é um processo multi-etapas, onde as células adquirem as características que favorecem o desenvolvimento tumoral e, conseqüentemente, podem atingir a malignidade (Hanahan e Weinberg, 2011). Essas características que conferem vantagens para o desenvolvimento e manutenção tumoral ficaram conhecidas como as características (*hallmarks*) do câncer. Dentre elas estão: a proliferação autossustentável, evasão de sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, reprogramação do

metabolismo energético, instabilidade genômica, evasão da destruição pelo sistema imune e inflamação associada ao tumor (Hanahan e Weinberg, 2011) (Figura 1).

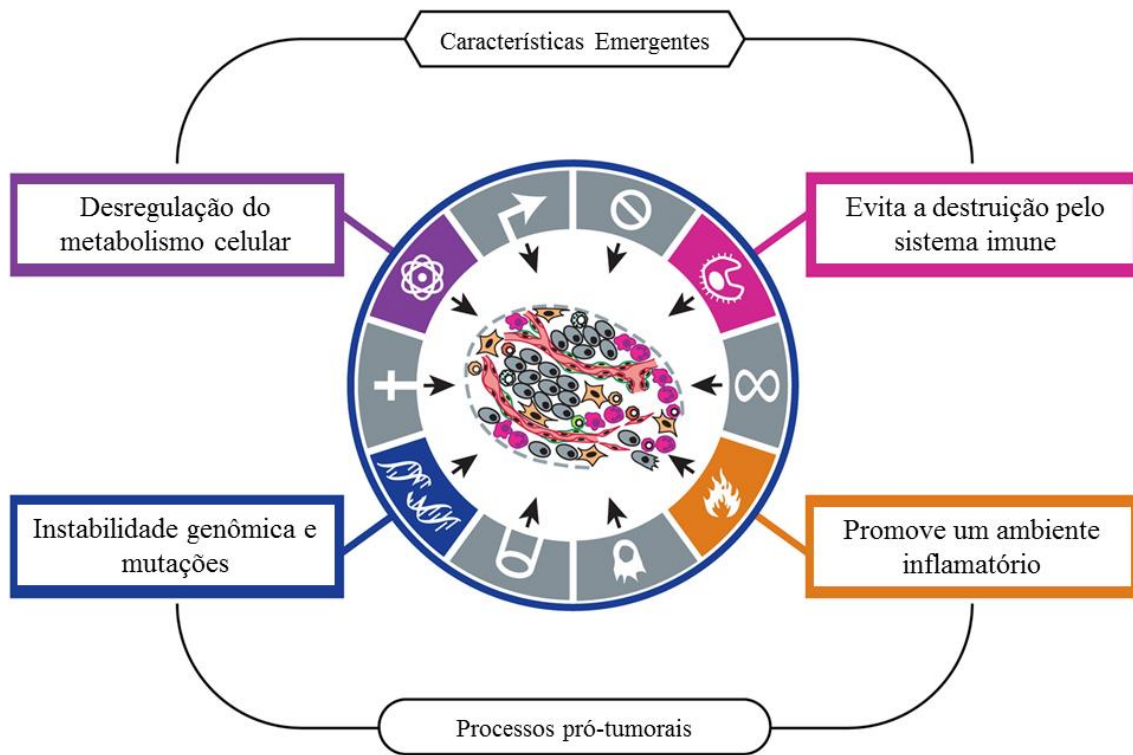
Figura 1. Características adquiridas pelas células tumorais.



Características adquiridas pelas células tumorais durante o processo de carcinogênese que facilitam a progressão tumoral. Adaptado de Hanahan, D. e Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144: 646-74, 2011.

Além dessas características, outras duas podem ser consideradas características emergentes: reprogramação do metabolismo celular e evasão da destruição pelo sistema imune. Outras duas podem ser classificadas como processos pró-tumorais: instabilidade genômica (que gera a diversidade genética que acelera a aquisição das demais características) e a inflamação associada ao tumor (que favorece e supre as características adquiridas). (Hanahan e Weinberg, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Novas características que favorecem a carcinogênese.



Novas características, emergentes e pró-tumorais, que favorecem células normais a adquirirem o fenótipo neoplásico no processo de carcinogênese. Adaptado de Hanahan, D. e Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144: 646-74, 2011.

Estas características podem ser traduzidas como respostas às barreiras ambientais, à proliferação e ao crescimento e conduzem a “transformação somática”, direcionada por uma sequência de mutações randômicas e alterações epigenéticas no DNA, afetando genes que controlam a proliferação e sobrevivência, fornecendo as características do fenótipo maligno (Gatenby e Gillie, 2008). Dentre as barreiras ambientais a serem transpostas estão: a perda do contato célula-célula, promoção inadequada do crescimento, senescência, hipóxia, acidose, isquemia, dentre outras; e cada barreira é vencida pela estratégia resultante das modificações genéticas consequentes dessas pressões seletivas. Dessa forma, existe um vasto consenso de que o câncer é uma doença genética e que o acúmulo de

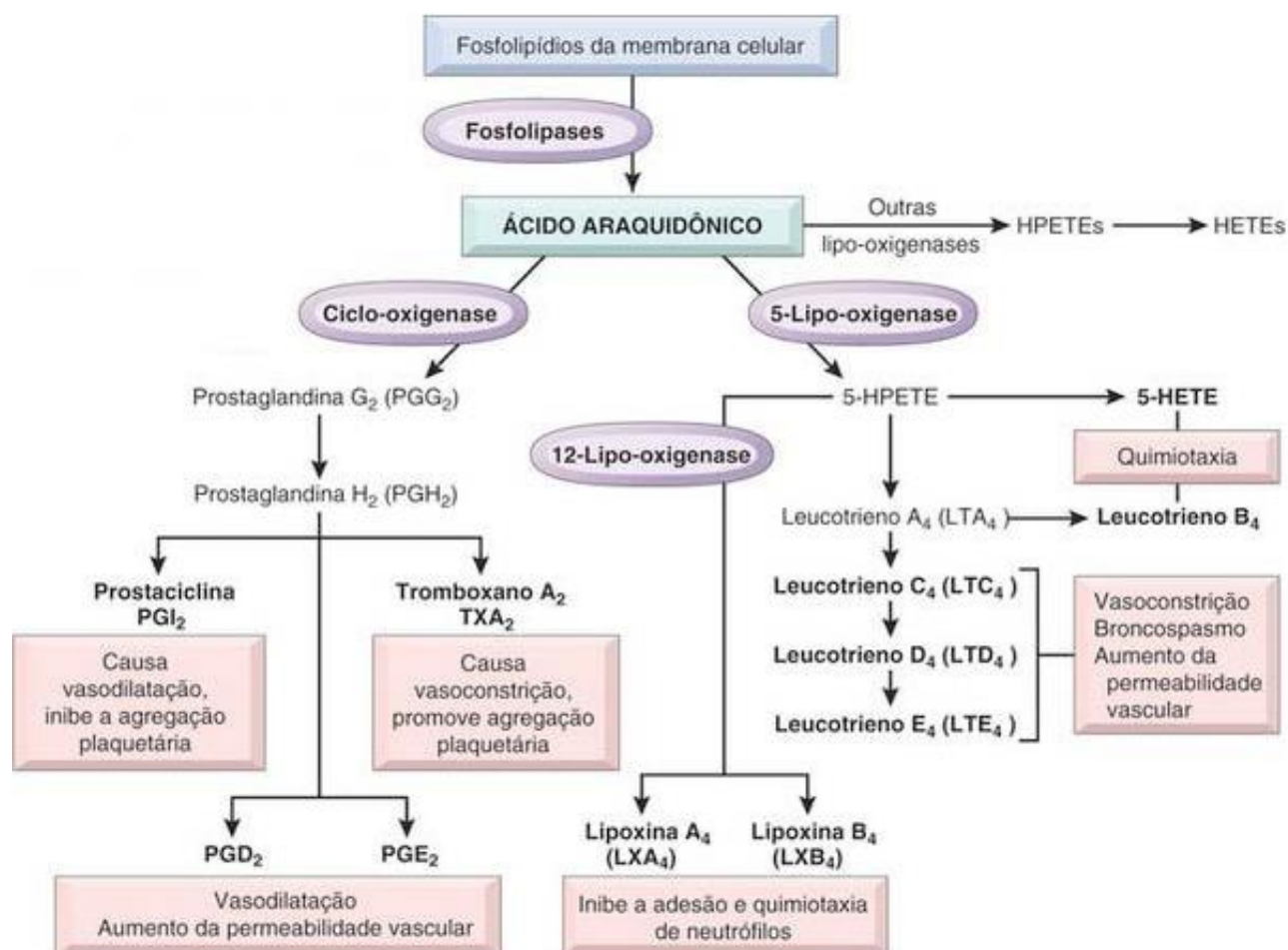
alterações genéticas é a base do surgimento e evolução do tumor (Weinberg, 2008; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012).

Dessa maneira, o processo de carcinogênese pode ser dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é o processo onde ocorrem as alterações genéticas e epigenéticas, ou seja, são as mudanças que definem a célula para a carcinogênese; a promoção é a etapa na qual as células ativadas expressam respostas alteradas que proporcionam uma vantagem seletiva, que lhes permite sobreviver e se desenvolver localmente; e progressão é a série de etapas em que o câncer, já estabelecido, acumula mais mutações para o caminho da malignidade (Ognjanovic e Hainaut, 2010).

1.2. Inflamação

A palavra inflamação é derivada do latim *inflammatio* que significa aceso, ardente, incendiado. O processo inflamatório é parte de uma resposta biológica complexa vascular e tecidual aos estímulos nocivos, tais como patógenos, traumas, agentes químicos ou qualquer outro estímulo que lese o tecido. Assim, a inflamação é uma tentativa de proteção do organismo para remover os estímulos nocivos e iniciar o processo de reparo (Guyton e Hall, 2006; Rainsford, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Cascata inflamatória.



Processo da cascata inflamatória a partir de uma lesão tecidual (inflamação aguda), destacando as principais enzimas, seus produtos e os efeitos causados. Robbins e Cotran. Patologia: As bases patológicas das doenças. 8ª Edição. Elsevier, Capítulo 2, p. 49-89, 2010.

O processo inflamatório se caracteriza por: vasodilatação local com o consequente aumento do fluxo sanguíneo; aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo a saída de grande quantidade de líquido para os espaços intersticiais; coagulação do líquido nos espaços intersticiais, devido às quantidades excessivas de fibrinogênio e outras proteínas que saíram dos capilares; migração de grande quantidade de granulócitos e monócitos para os tecidos e dilatação das células teciduais (Guyton e Hall, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Alguns mediadores da inflamação aguda e suas ações sistêmicas.

Mediador	Fonte	Ação
Bradicinina	Substrato plasmático	Dor
Prostaglandinas	Mastócitos	Vasodilatação, dor e febre
Leucotrienos	Leucócitos e mastócitos	Adesão e ativação plaquetária, bronco e vasoconstrição
Metabólitos de oxigênio	Leucócitos	Danos endotelial e tecidual
Óxido nítrico	Macrófagos	Vasodilatação e citotoxicidade
Interleucina 1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF-α)	Macrófagos	Reação da fase aguda e ativação endotelial
Citocinas	Leucócitos	Ativação dos leucócitos

Fonte: Guyton e Hall, 2006.

A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo. A inflamação combate, dilui ou isola o agente nocivo e desencadeia uma série de eventos que tentam eliminar o agente lesivo e reconstituir o tecido danificado. O reparo começa nas fases iniciais da inflamação, mas geralmente só é finalizado depois que a influência nociva foi neutralizada. Durante a fase de reparo, o tecido danificado é substituído por meio da regeneração de células parenquimatosas nativas, pelo preenchimento com tecido fibroso (cicatrização) ou, o que é mais comum, por uma combinação desses dois processos (Robbins et al., 2004).

A inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda se inicia rapidamente (em alguns segundos ou minutos) e tem uma duração relativamente curta, de alguns minutos a várias horas ou alguns dias; suas principais características são a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de

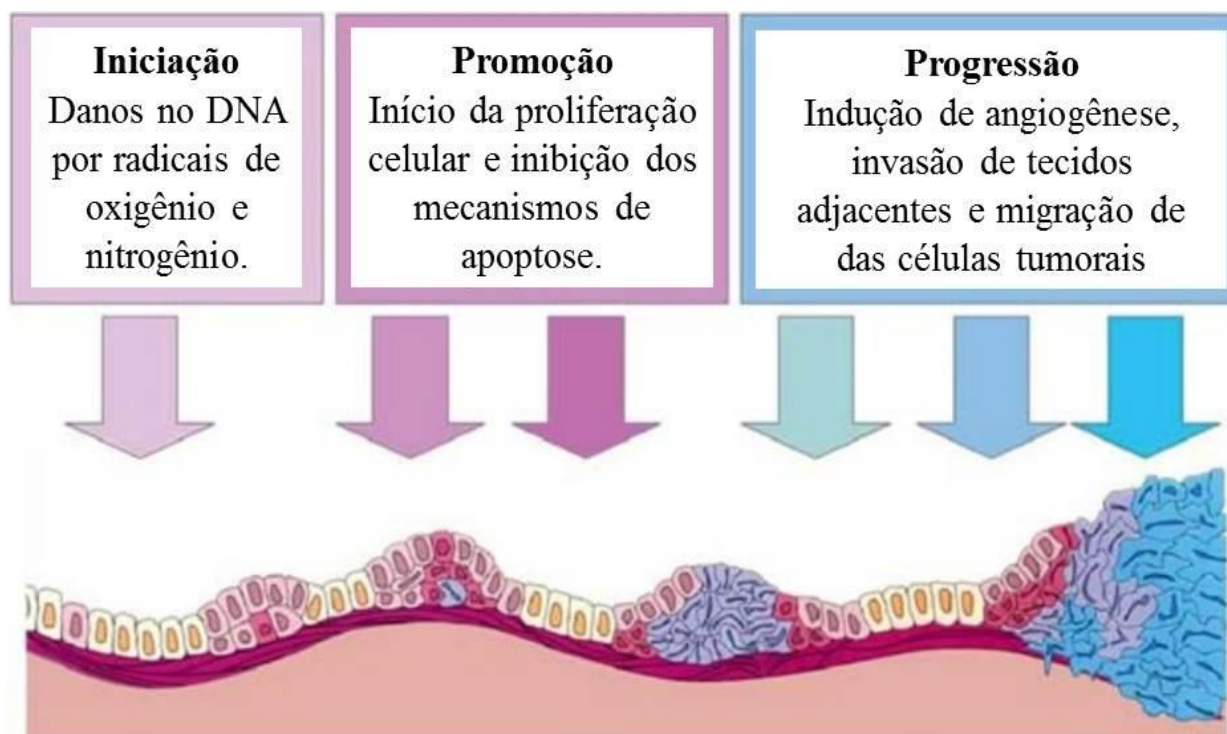
neutrófilos. A inflamação crônica tem uma duração maior e está histologicamente associada à presença de linfócitos e macrófagos, à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tissular (Robbins et al., 2004).

As reações vasculares e celulares da inflamação aguda e da crônica são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas e são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório. Tais mediadores, agindo solitariamente, em conjunto ou em sequência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução.

1.3. Relação Câncer-Inflamação

A resposta inflamatória possui um lado benéfico e outro maléfico. A inflamação aguda é uma resposta protetora imediata ao tecido danificado e, geralmente, beneficia o organismo e mantém a homeostase local. No entanto, inflamações crônicas, caracterizadas pela ativação das células imunes, em determinadas circunstâncias, podem desencadear eventos carcinogênicos, por exemplo, o estresse oxidativo resultante da inflamação crônica promove danos ao DNA e instabilidade cromossômica e, conseqüentemente, induz a transformação das células normais em células cancerígenas. Sendo assim, o processo inflamatório crônico contribui para a iniciação do tumor e o desenvolvimento tumoral, aumentando a proliferação de células tumorais e a resistência para apoptose. Além disso, estimula o processo de angiogênese e remodelação de tecidos, que contribuem para a invasão das células tumorais e promoção de metástases (Mannick et al., 1996; Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Kundu e Surh, 2012; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012; Zhang et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4. Processo da carcinogênese induzido pela inflamação crônica.



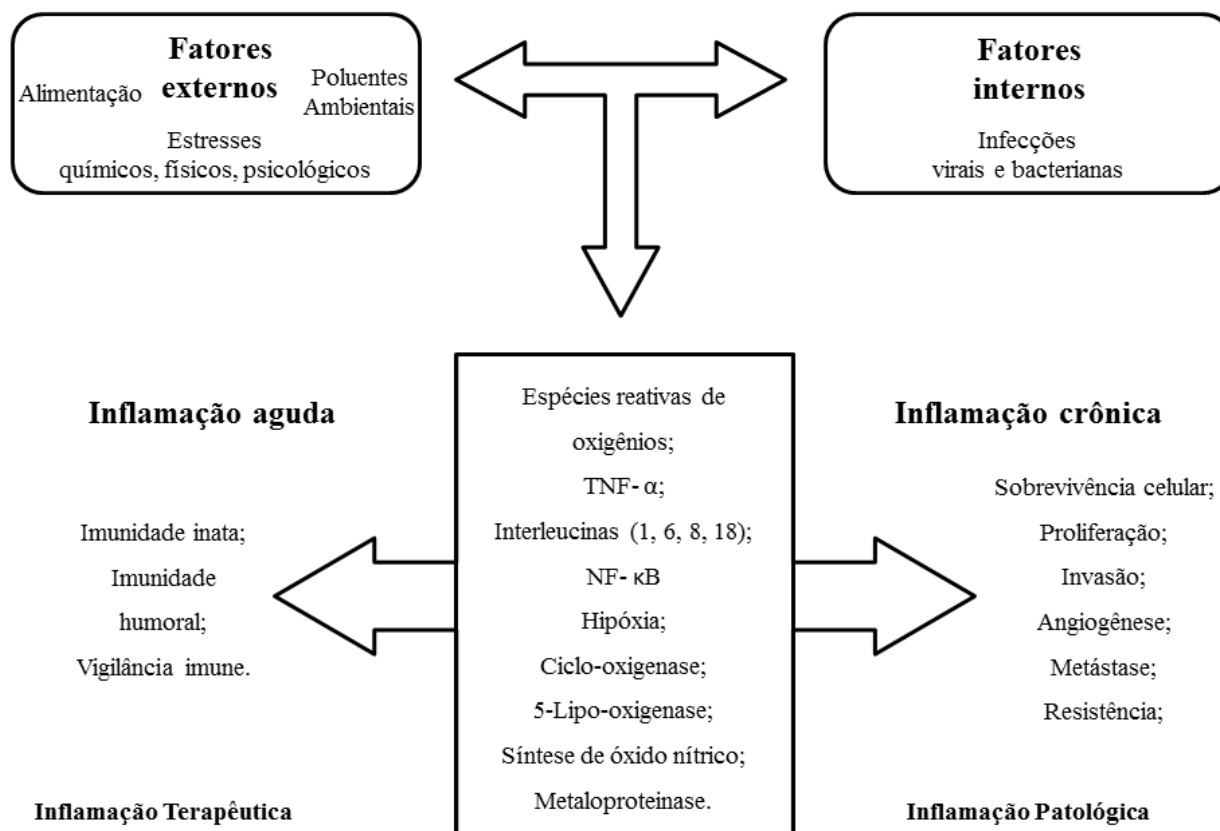
A sequência de desenvolvimento de um tumor, neste caso epitelial, é dividida nas etapas: iniciação, promoção e progressão, indicando a contribuição dos mecanismos inflamatórios para cada passo. Adaptado de Ognjanovic, S; Hainaut, P. *Inflammation in Carcinogenesis*. Elsevier, 2010.

Os tumores sólidos são heterogêneos e estruturas complexas onde suas células são envolvidas por uma matriz extracelular, constituída por células do sistema imune, inato e adaptativo, por células estromais, e por uma rede vascular. Esta diversidade celular se comunica por meio de contato físico direto ou de mediadores químicos, citocinas e quimiocinas, que conduzem o crescimento e progressão tumoral (Grivennikov et al., 2010; Kundu e Surh, 2012; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012). Considera-se que a inflamação contribui para cerca de 15% do peso total do tumor, porém este valor pode estar subestimado, pois a inflamação está presente em muitos cânceres causados por infecções ou exposição a agentes químicos e físicos. Em geral, independentemente do local, quanto mais

tempo persiste a inflamação crônica maior o risco de carcinogênese (Ognjanovic e Hainaut, 2010).

A relação câncer-inflamação não é pesquisa recente, Rudolf Virchow, em 1863, observou leucócitos infiltrados no tecido tumoral, sugerindo que o câncer poderia surgir a partir de um processo inflamatório crônico (Balkwill e Mantovani, 2001). Dados epidemiológicos indicam que mais de 25% de todos os cânceres estão relacionados a uma infecção crônica e a outros tipos de inflamação não resolvidos (Hussain e Harris, 2007; Mantovani et al., 2008; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012) (Figura 5).

Figura 5. Fatores de riscos que contribuem para o processo de carcinogênese a partir de um processo inflamatório.



Fatores de riscos que contribuem para o processo de carcinogênese a partir de um processo inflamatório. Estímulos, externos ou internos, promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios e ativação de fatores de transcrição que vão gerar uma resposta inflamatória aguda. Se esta não for resolvida, se tornará crônica e patológica, no qual os mesmos mediadores favorecerão o desenvolvimento tumoral. Adaptado de Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*, 72: 1605-21, 2006.

Esta relação câncer-inflamação pode ser notada em um trabalho de Rothwell e colaboradores (2011), que originalmente foi planejado para estudar a prevenção de doenças vasculares em pacientes com câncer. Os pacientes foram randomicamente divididos em grupos. Um grupo de pacientes receberam aspirina e outro placebo. Em oito ensaios, totalizando mais de 25.000 indivíduos, o grupo que recebeu aspirina teve redução significativa do número de mortes por câncer sólido relacionada com a duração do tratamento.

Os efeitos dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), tais como a aspirina, são justificados, pelo menos em parte, devido à inibição da enzima ciclo-oxigenase do tipo 2 (COX-2). Inibidores mais específicos da COX-2, como celecoxib, foram avaliados em um estudo randomizado de pacientes com extensas queratoses actínicas, precursor maligno de câncer de pele não melanoma. Onze meses após o início do estudo, as incidências basais e escamosas das células cancerígenas foram significativamente reduzidas no grupo que recebeu celecoxib (Elmets et al., 2010).

1.4. Etnobotânica e Etnofarmacologia

O conhecimento sobre as plantas medicinais, às vezes, representa o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos. Devido à cultura popular, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Amorozo e Gely, 1988; Prance, 1992).

O termo etnobotânica foi empregado pela primeira vez em 1895 por Harshberger, que embora não o tenha definido, apontou maneiras pelas quais poderia ser útil à investigação científica (Schultes, 1962). Desde então, várias definições podem ser encontradas para etnobotânica. Destacando-se as seguintes: a) “verdadeira botânica

científica voltada para o hábitat e uso de uma etnia específica” (Cardona, 1985); b) “estudo e conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal” (Posey e Ribeiro, 1986).

A ciência da etnobotânica aplicada aos estudos das plantas medicinais originou uma linha científica que consiste na exploração científica de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados por determinados grupos étnicos, denominada de etnofarmacologia (Bruhn, 1989; Prance, 1991). A etnobotânica enfoca dois fatores fundamentais: coleta e utilização medicinal da planta. O primeiro fator implica na região, época e estágios de desenvolvimento preferidos para coleta, envolve também, procedimentos especiais como preparação de exsiccatas. O depósito de exsicata em herbário credenciado é muito útil para evitar enganos com a espécie que está sendo estudada (Maciel et al., 2002).

As plantas são fonte de agentes terapêuticos e base para diversas drogas sintéticas, por exemplo, das drogas disponíveis para o tratamento de câncer de 1981-2010, 65% das moléculas utilizadas são de origem natural e/ou inspiradas na natureza e apenas 35% são sintéticas. Por outro lado, nos tratamentos de processos inflamatórios, apenas 27% das moléculas utilizadas são de origem natural e/ou inspiradas na natureza e 73% são sintéticas (Newman e Cragg, 2012).

Produtos naturais são produzidos a partir do metabolismo secundário dos organismos vivos em respostas aos estímulos externos, como mudanças nutricionais, agentes infecciosos e/ou competição com outros organismos. Tais metabólitos produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e animais podem apresentar grupos biologicamente ativos (Strohl, 2000). De fato, estes compostos são usados há séculos no tratamento de doenças humanas. Registros escritos, que datam de pelo menos 5000 anos

com os sumérios, bem como os registros arqueológicos, sugerem o uso de plantas medicinais em períodos anteriores (Raskin et al., 2002).

O número de novas moléculas químicas com base em produtos naturais ou produtos naturais derivados de compostos aprovados pela Agência dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), corresponde a aproximadamente 55% do total, considerando todas as doenças e os países no período de 1981 a 2010 (Newman e Cragg, 2012). Aproximadamente 30% de todos os medicamentos prescritos mundialmente contêm extratos de plantas ou de princípios ativos derivados de plantas superiores, resultando em 324 medicamentos atualmente em utilização (Newman e Cragg, 2012). Alguns exemplos que se destacam são a digoxina, glicosídeo cardíaco obtido da *Digitalis purpurea*, os anticolinérgicos alcaloides da *Atropa belladonna*, os analgésicos codeína e morfina da *Papaver somniferum*, o anti-hipertensivo reserpina da *Rauwolfia serpentina*, os antineoplásicos vimblastina e taxol, da *Cantharanthus roseus* e *Taxus brevifolia*, respectivamente (Cragg et al., 1997; Cragg e Newman, 1999; Newman e Cragg, 2003; Newman e Cragg, 2007, Newman e Cragg, 2012).

1.5. Família Anacardiaceae

A família vegetal Anacardiaceae é representada por 76 gêneros e 600 espécies, sendo que 25% dos gêneros contêm componentes tóxicos e são causadores de dermatite de contato severa. As espécies venenosas desta família estão restritas aos táxons Anacardieae, Rhoeae e Semecarpeae (Vogl e Mitchell, 1995; Vogl et al., 1996). A dermatite de contato provocada por essas plantas é atribuída principalmente aos compostos fenólicos e catecólicos ou à mistura destas substâncias, denominada de lipídios fenólicos. Estas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo

principalmente em espécies do gênero *Toxicodendron* (*Rhus*) (Tyman, 1979; Evans e Schmidt, 1980).

A origem dos lipídios fenólicos e derivados também foi objeto de investigação; além disso, espécies da família Anacardiaceae demonstraram-se promissoras nas buscas de substâncias bioativas. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Toxicodendron*, *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. *Mangifera*, *Toxicodendron* e *Anacardium* destacam-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e princípios ativos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólicos e derivados (Correia et al., 2006).

1.5.1. Gênero *Toxicodendron*

O gênero *Toxicodendron* é o maior da família Anacardiaceae, com cerca de 200 espécies catalogadas. Os estudos fitoquímicos demonstram que as espécies deste gênero são ricas em flavonoides, principalmente biflavonoides, com destaque para hinokiflavona, amentoflavona, agathisflavona, robustaflavona, rhusflavanona, succedaneaflavanona e rhusflavona (Lin e Chem, 1974a, 1974b; Lin et al., 1989).

Os flavonoides como o hinokiflavona, agathisflavona e robustaflavona atuam no mecanismo de replicação do vírus HIV, inibindo a enzima transcriptase reversa (HIV-1-RT) (Lin et al., 1997). Quando comparada com outros flavonoides, a hinokiflavona mostrou-se mais ativa na inibição da atividade pró-coagulante de monócitos humanos aderentes, estimulada por endotoxina e interleucina-1 β (Mesesane et al., 2000). Outros biflavonoides do gênero *Toxidendron* apresentaram atividades biológicas importantes,

como antimalárica (Ahamed et al., 2001), antiviral (Zembower, 1998) e citotóxica (Lin et al., 1989).

1.5.2. Gênero *Anacardium*

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa do Brasil, fonte de compostos químicos como ácidos fenólicos, quercetina, glicosídeos e taninos condensados. Os frutos apresentam lipídeos fenólicos que são conhecidos por serem potencialmente tóxicos (Cocon, 1988). Arya e colaboradores (1989) relataram a existência de flavonoides, tais como, kaempferol, miricetina e amentoflavona, assim como a presença de proantocianidinas.

A medicina popular usa a decocção ou o infuso das folhas para o tratamento de doenças gastrointestinais, úlceras na boca, problemas de garganta (Kudi et al., 1999; Akinpelu, 2001; Gonçalves et al., 2005) e hipertensão (Tchikaya et al., 2003). Os efeitos cardiovasculares do extrato aquoso das folhas de caju foram estudados sobre a pressão sanguínea arterial de coelho (Tchikaya et al., 2003). Já o efeito bactericida do extrato hidroalcoólico das folhas de caju foi descrito por Kudi e colaboradores (1999). Outro ensaio realizado por Gonçalves e colaboradores (2005), relatou a inibição *in vitro* do rotavírus humano (25%) e rotavírus símio (84,5%) pelo extrato aquoso das folhas de *A. occidentale*. O caju também exibiu atividade bactericida contra *Helicobacter pylori*, devido aos compostos fenólicos (Kubo et al., 1999). Úlceras da pele foram inibidas por um extrato de casca do fruto de *A. occidentale*. Seu efeito terapêutico pode estar relacionado à presença de taninos e flavonóides (Franca et al., 1996). Além disso, taninos condensados e hidrolisáveis isolados produziram efeitos anti-inflamatórios (Mota et al., 1985).

Lesões da mucosa gástrica induzida por diferentes modelos foram reduzidas pela quercetina, isolada dessa espécie, que elevou a quantidade de glicoproteínas neutras (Martin et al., 1993; Izzo et al., 1994; Di Carlo et al., 1999) que, por sua vez, facilitam a defesa contra agentes agressores (Delfosse, 2000). Além disso, também estimula a síntese da ciclo-oxigenase e de prostaglandina local (Marti-Bonmati et al., 1980). Outros mecanismos têm sido propostos que incluem a inibição da bomba de prótons gástrica, da via da lipo-oxigenase ou da peroxidação lipídica (Moroney et al., 1988; Alarcón de la Lastra et al., 1994; Di Carlo et al., 1999).

Outra espécie do gênero *Anacardium*, a *Semecarpus anacardium* Linn., é utilizada na medicina popular para o tratamento de câncer. O extrato de suas castanhas exibiu atividade antitumoral, devido à supressão de fatores angiogênicos e de hipóxia (fator-1 induzível por hipóxia alfa, fator de crescimento endotelial vascular e síntese de óxido nítrico) (Mathivadhani et al., 2007).

O óleo da castanha de *S. anacardium* também inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com artrite reumatoide (Singh et al., 2006) e manteve a glutatona no seu estado reduzido, restaurando as enzimas que diminuem o estresse oxidativo em carcinoma mamário experimental (Mathivadhani et al., 2007).

Além disso, esse óleo foi citotóxico em linhagens de leucemia mieloblástica aguda (HL-60), leucemia mielógena crônica (K-562), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de carcinoma epitelial do colo do útero (HeLa) (Chakraborty et al., 2004).

1.5.3. Gênero *Mangifera*

Mangifera indica L. (mangueira) é uma árvore que cresce em regiões tropicais e subtropicais do mundo. É comumente usada na medicina popular para uma ampla

variedade terapêutica (Coe e Anderson, 1996). Sua fitoquímica, em geral, apresenta triterpenos, flavonoides, fitoesteróis e polifenóis (Anjaneyulu et al., 1994; Khan et al., 1994). Sendo os terpenoides os mais presentes nesse gênero (Anjaneyulu et al., 1999).

Extratos da semente, folhas e cascas do tronco de *M. indica* demonstraram propriedades contra patógenos humanos (Engels et al., 2009; Sowmiya et al., 2009; Engels et al., 2010; Gupta et al., 2010; Engels et al., 2011), atividade antioxidante (Ribeiro et al., 2008; Soong e Barlow, 2006; Nithitanakool et al., 2009; Barreto et al., 2008; Kim et al., 2009), atividade antialérgica (Rivera et al., 2006), antitirosinase (Nithitanakool et al., 2009; Maisuthisakul et al., 2009) antineoplásica (Noratto et al., 2010) e diminuição da migração celular (Daud et al., 2010).

O extrato aquoso da casca do caule de *M. indica* apresentou atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. A atividade sequestrante de radicais livres de hidroxil e ácido hipocloroso inibiu a peroxidação dos fosfolípidos de cérebro de rato e os danos no DNA (Martinez et al., 2001; 2001).

Além disso, os efeitos analgésicos, imunomoduladores e anti-inflamatórios foram observados em diferentes modelos experimentais. A proteção contra a morte celular induzida pela ativação de células T humanas (Hernandez et al., 2006, 2007), a inibição da produção de eosinófilos e de migração celular (Sa-Nunes et al., 2006), a inibição da produção de IgG (Garcia et al., 2003), o efeito anti-histamínico (Rivera et al., 2006; Garcia et al., 2003), a inibição das isoformas da ciclo-oxigenase 2 e da enzima óxido nítrico sintase, do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), da interleucina-1 β , de granulócitos e fator de estimulação de colônias de macrófagos, do óxido nítrico, da fosfolipase A2, da prostaglandina E2, do leucotrieno B4 e da ativação por TNF do fator de transcrição nuclear

NF-kappaB (Garrido et al., 2001; 2004; 2004; 2005; 2006; Garcia et al., 2002; Béltran et al., 2004; Leiro et al., 2004).

O extrato de sementes de *M. indica* inibiu a permeabilidade de eletrólitos no intestino por meio da inibição da liberação de prostaglandinas. Os metabólitos secundários, tais como saponinas, flavonoides, glicosídeos, taninos e alcaloides presentes nas sementes de *M. indica* são antidiarreicos, inibindo a mobilidade intestinal. A redução da mobilidade intestinal pode ser devido à presença de taninos e ácido tânico no extrato de sementes de *M. indica* (Masibo e He, 2008; Sowmiya et al., 2009; Ezeigbo et al., 2012; Sharma et al., 2012).

1.5.4. Gênero *Astronium*

O gênero *Astronium* possui distribuição por toda a região neotropical, seus exemplares são arbóreos e os frutos possuem cálice persistente e acrescente resultando em um aspecto estrelado, característica que nomeia o gênero (Santin, 1991).

Espécies do gênero *Astronium* encontradas no Brasil, como *Astronium graveolens* Jacq., *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. (sinonímia *Myracrodruon urundeuva* Allemão) e *Astronium fraxinifolium* Schott., são utilizadas na medicina popular. As raízes e as cascas de *Astronium graveolens* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de alergias, processos inflamatórios, diarreia e úlceras (Hernández et al., 2012). Além disso, o extrato metanólico das folhas de *A. graveolens* foi avaliado de acordo com suas atividades antioxidantes, demonstrando potente atividade antioxidante devido ao alto teor de polifenóis, como 1,2,3,4,6 penta-O-galoil-D-glucopiranosose e o ácido cafeoilquínico. Outros grupos químicos presentes no extrato metanólico das folhas de *A. graveolens* foram capazes

de atuar sobre componentes do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Hernández et al., 2014).

Astronium urundeuva é utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas ginecológicos e dermatológicos (Matos, 1989). Além disso, estudos desta espécie demonstraram atividade antiulcerogênica (Rao et al., 1987), no trânsito gastrointestinal (Menezes e Rao, 1988), anti-inflamatória (Viana et al., 1997; Viana et al., 2003), antioxidante (Desmarchelier et al., 1999), antimicrobiana (Raposo et al., 2002) analgésica (Viana et al., 1997; Viana et al., 2003) e imunomodulatória (Deharo et al., 2004).

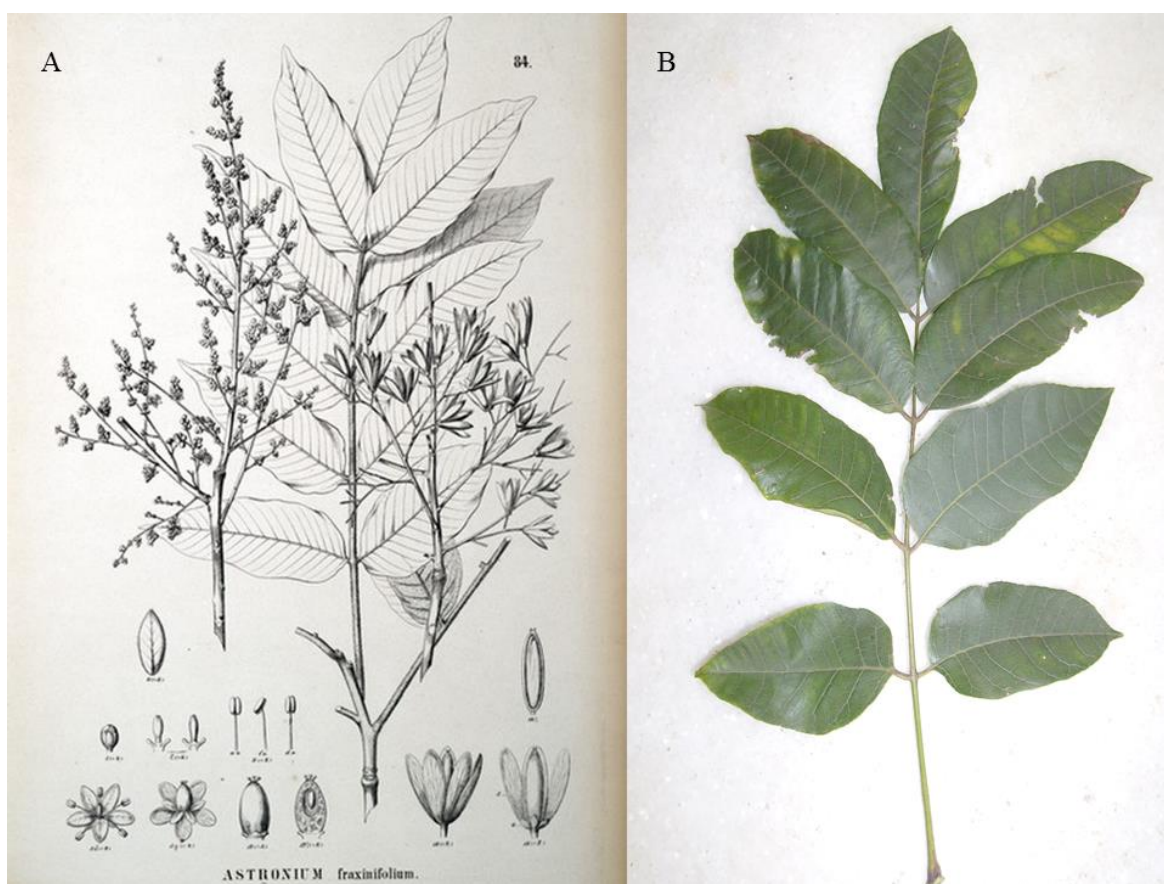
Investigações sobre os compostos químicos dessas duas espécies indicaram a presença de taninos hidrolisáveis como galotaninos com graus de polimerização de sete a 13 unidades de galoil, além de destacar outras classes de taninos hidrolisáveis tais como ésteres hexaidrodifenil de glucose e alguns derivados de ácido gálico (da Silva et al., 2011).

Astronium fraxinifolium (Figura 6) é distribuída no Cerrado Brasileiro e conhecida popularmente como “Gonçalo Alves”, apresenta caule rico em substâncias tânicas (Leite, 2002). Suas cascas são utilizadas na forma de decocto para o tratamento de inflamações gástricas e vaginais (Matos, 1989) e indicadas por Cruz (1982) no tratamento de diarreias e disenterias devido as suas propriedades adstringentes.

Além disso, também na medicina popular, é utilizada como antisséptico, antimicrobiano, anti-hemorragico, cicatrizante, anti-inflamatório, antiulcerogênico, além de combater a febre, melhorar o desenvolvimento dos dentes das crianças (Leite, 2002; Macedo e Ferreira, 2004). O extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *A. fraxinifolium* demonstrou potencial mutagênico pelo teste SMART e em raízes de *Allium cepa*, promovendo o aumento no número de danos cromossômicos (Zafred e Silva, 2011).

Os resultados demonstrados nos estudos mutagênicos, os relatos populares da utilização terapêutica, o conhecimento das atividades farmacológicas do gênero *Astronium* e da família Anacardiaceae e os poucos estudos sobre as propriedades farmacológicas dos constituintes químicos de *A. fraxinifolium* incentivaram os estudos desta espécie em relação as suas atividades antineoplásica, antiulcerogênica, analgésica e anti-inflamatória.

Figura 6. Exemplar da espécie *Astronium fraxinifolium* Schott.



(A) Exemplar de exsicata da espécie *Astronium fraxinifolium*. Retirada da Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 09 Mar. 2014. (B) Exemplar coletado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) para realização dos experimentos. Fonte: Próprio autor.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade farmacológica dos extratos brutos diclorometânico e hidroalcoólico das cascas do caule e das folhas de *Astronium fraxinifolium* Schott.

2.2. Específicos

- Determinar os rendimentos dos processos extrativos de folhas e de caules;
- Avaliar o potencial antiproliferativo dos extratos em cultura de células tumorais e não tumorais;
- Determinar a toxicidade aguda dos extratos obtidos;
- Avaliar o potencial antiulcerogênico em modelo de lesões induzidas por indometacina;
- Avaliar o potencial antinociceptivo em modelo experimental de nocicepção induzida pela formalina;
- Avaliar o potencial efeito sedativo na atividade locomotora e coordenação motora pelo modelo do campo aberto (*Open field*) e barra giratória (*Rotarod*);
- Avaliar o potencial anti-inflamatório em modelos de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton;
- Avaliar o potencial antitumoral em modelo experimental de câncer induzido pelas células de Ehrlich.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material vegetal

As cascas de *A. fraxinifolium*, cedidas gentilmente para a utilização no projeto de pesquisa, foram coletadas na região urbana do município de Uberlândia/MG, em colaboração com o Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, da Universidade Estadual Paulista, Campus Assis, de maneira sustentável e sem causar impacto ambiental aos espécimes coletados.

As folhas de *A. fraxinifolium* foram coletadas de um espécime pertencente à Coleção de Árvores e Palmeiras Ornamentais Monjolinho, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), através de colaboração com o Dr. Luís Carlos Bernacci. A exsicata dessa espécie está depositada no Herbário do IAC sob a numeração IAC 52956.

Por ser espécie nativa, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), nos termos Deliberação 246/2009, emitiu autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, com a finalidade de pesquisa científica, viabilizando os estudos propostos com a espécie (Processo 010143/2014-9).

3.2. Preparação dos extratos vegetais

3.2.1. Preparação do material vegetal para extração

A obtenção dos extratos brutos foi realizada na Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), sob supervisão da Dra. Mary Ann Foglio.

As folhas de *A. fraxinifolium* foram selecionadas e colocadas para secar em estufa de ar forçado na temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante um período total de 24 horas, sendo estas

divididas em oito horas diárias. Após a secagem, o material vegetal foi triturado e armazenado em frascos de vidro âmbar.

As lascas do caule foram moídas em moinho de facas e o pó obtido armazenado em frascos de vidro âmbar.

3.2.2. Extração por maceração dinâmica

O material vegetal resultante dos processos de trituração foi submetido à extração por maceração dinâmica com diclorometano na proporção de 1:5 de material vegetal e solvente (p:v), tanto para as folhas quanto para as cascas do caule, durante uma hora e meia. Após o tempo estimado, a solução foi filtrada para novo processo de extração. Esse procedimento foi repetido por três vezes e o volume final reunido e armazenado em frascos de vidro âmbar. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo com auxílio de um evaporador rotativo (Rotavapor R-215, Buchi – Switzerland) em temperatura de aproximadamente 40°C, fornecendo o extrato bruto diclorometânico das folhas (MFD) e das cascas do caule (MCD).

Os resíduos vegetais do processo de extração com diclorometano foram submetidos a uma nova extração com solução hidroalcoólica (etanol:água) (70:30; v:v). O processo de extração foi repetido novamente por três vezes e o volume final reunido e armazenado em frascos de vidro âmbar. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo com auxílio de um evaporador rotativo em temperatura de aproximadamente 40°C seguido de liofilização, fornecendo o extrato bruto hidroalcoólico das folhas (MFH) e das cascas do caule (MCH).

3.2.3. Extração por sistema Soxhlet

Da mesma forma, esse material vegetal (folhas e cascas do caule) foi submetido a um processo de extração por sistema Soxhlet com o solvente diclorometano na proporção de 1:10 de material vegetal e solvente (p:v), durante um período total de 24 horas, sendo estas divididas em oito horas diárias. A seguir, o solvente orgânico foi eliminado em um evaporador rotativo sob vácuo (Rotavapor R-215, Buchi – Switzerland) em temperatura de aproximadamente 40°C, fornecendo o extrato bruto diclorometânico das folhas (SFD) e das cascas do caule (SCD).

Os resíduos vegetais deste processo foram submetidos a uma nova extração com solução hidroalcoólica (etanol:água) (70:30; v:v), e o processo de extração repetido novamente por 24 horas, sendo estas divididas em oito horas diárias. O solvente orgânico foi eliminado em um evaporador rotativo sob vácuo (Rotavapor R-215, Buchi – Switzerland) em temperatura de aproximadamente 40°C e o resíduo aquoso liofilizado, fornecendo o extrato bruto hidroalcoólico das folhas (SFH) e das cascas do caule (SCH).

3.2.4. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por CCD foram efetuadas em cromatofolhas comerciais (Merck 5554), utilizando como fases móveis: (1) diclorometano:metanol (98:2; v:v); (2) butanol:ácido acético:água destilada (4:1:5; v:v:v). Após o término da eluição, as cromatoplasmas foram observadas em câmera de UV, nos comprimentos de onda de 254nm e 366nm para revelar possíveis compostos com duplas ligações conjugadas. Em seguida, a cromatoplasma eluída com a fase móvel (1) solução de anisaldeído/H₂SO₄, para terpenos e diterpenos; (2) solução de Dragendorff, para alcaloides; (3) solução de cloreto férrico 2%, para taninos e (4) solução de difenilaminoborato (NP) acompanhada de solução de macrogol (PEG).

3.2.5. Identificação de flavonoides

Em 70 mg do extrato de MFH, adicionou-se 10 mL de água destilada, cloreto de magnésio e entre 100-200 mL de ácido sulfúrico. A presença de coloração vermelha indica reação positiva para flavonoides (Farmacopeia Brasileira, 2010).

3.2.6. Identificação de taninos totais e condensados

Em 70 mg do extrato MFH, adicionou-se 10 mL de água destilada e duas a quatro gotas de solução de cloreto férrico a 1% (p/v) em metanol. O desenvolvimento de coloração cinza-escura indica reação positiva para taninos totais (Farmacopeia Brasileira, 2010).

3.2.7. Identificação de taninos condensados

Em 70 mg do extrato MFH, adicionou-se 10 mL de água destilada, 0,5 mL de vanilina a 1% (p/v) em metanol e 1 mL de ácido clorídrico SR (27,4 mL de ácido clorídrico concentrado em 100 mL de água destilada). O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva para taninos condensados (Farmacopeia Brasileira, 2010).

3.3. Testes de atividade farmacológica *in vitro*

3.3.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais

3.3.1.1. Cultivo celular

As células foram cultivadas em frascos de 25cm² (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Durante os experimentos, uma solução de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 10 mL/L RPMI 1640) foi adicionada

ao meio de cultura. Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell[®]), a 37°C, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + 5% SFB e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

Tabela 2. Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (DI).

Linhagens Celulares		Nome	DI (x10 ⁴ células/mL)
Linhagens tumorais	Cólon	HT-29	5,0
	Glioblastoma	U251	3,0
	Leucemia	K-562	6,0
	Mama	MCF-7	6,0
	Melanoma Murino	B16-F10	4,0
	Ovário	OVCAR-3	7,0
	Ovário com fenótipo de resistência	NCI-ADR/Res	5,0
	Pulmão	NCI-H460	4,0
	Próstata	PC-3	4,5
	Rim	786-0	3,0
Linhagens não tumorais	Queratinócito humano	HaCaT	3,0
	Ovário de <i>hamster</i> chinês	CHO-K1	3,0

3.3.1.2. Preparo das suspensões celulares

Os experimentos de atividade antiproliferativa dos extratos brutos de *A. fraxinifolium* foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks e colaboradores (1991). O crescimento celular foi determinado por espectrofotometria, utilizando-se o corante proteico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich[®]) e as análises foram baseadas na

metodologia de triagem *in vitro* para drogas anticâncer desenvolvida pelo *National Cancer Institute*, EUA, que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (NCI60) (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006). De modo diferente de outros métodos, este protocolo inclui a determinação da densidade celular no tempo 0 (momento de adição das amostras), o que possibilita o cálculo da concentração que inibe totalmente o crescimento celular (Shoemaker, 2006). No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com o meio RPMI contendo 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (10 mL/L), em suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 2). Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T₀), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

As amostras dos extratos brutos foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura RPMI com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina, o que evitou a toxicidade do DMSO. As amostras dos extratos brutos de *A. fraxinifolium* foram adicionadas nas microplacas (cinco amostras por microplaca) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido (Figura 7). Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

Diagrama de uma placa de 8x12 poços para o teste de imunofluorescência indireta. A placa é organizada em 8 linhas (A-H) e 12 colunas (1-12).

As colunas 1 e 2 contêm o **Meio de Cultura** (linhas A-H) e **Células (C)** (linhas B-G).

As colunas 3-12 contêm as amostras, agrupadas em 4 pares de colunas (3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12). Cada poço contém uma amostra com uma concentração numérica (250, 25, 2,5 ou 0,25).

As amostras são coloridas:

- Amostra 1 (verde)
- Amostra 2 (laranja)
- Amostra 3 (azul)
- Amostra 4 (verde-claro)
- Amostra 5 (vermelho)

As setas indicam a leitura das amostras (colunas 3-12) e o controle das células (colunas 1-2).

No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T₀ foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma-Aldrich®) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal correspondente ao tempo 0. Após 48 horas de tratamento, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (p:v) e incubadas por 1 hora, a 4°C. Em seguida, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para a remoção dos resíduos

de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após isso, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa para a adição de 50 µL/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich®) a 0,4% (p:v) dissolvido em ácido acético a 1% (v:v) e, a seguir, incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos. As placas foram então lavadas por quatro vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v:v) e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de trizma base (10 µM, pH 10,5) (Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

3.3.1.3. Análise dos resultados *in vitro*

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas abaixo, foi determinado o crescimento celular (em porcentagem) de cada linhagem celular em função das concentrações de cada amostra testada.

Se $T > C$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T_0 \leq T < C$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

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

Sendo T a média das absorbâncias das células tratadas, C o controle de células e T_0 a média das absorbâncias das células no tempo 0. Esses resultados foram expressos em curvas de crescimento celular para cada linhagem em função da concentração da amostra empregando-se software *Origin 8.0* (OriginLab Corporation).

3.3.2. Testes de atividade farmacológica *in vivo*

3.3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c e Swiss, machos e fêmeas, e ratos da linhagem Wistar, machos, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP). Os grupos experimentais foram acondicionados no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), com temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro:escuro 12h:12h e com água e ração *ad libitum*. Os cuidados dos animais e os protocolos de pesquisas estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e sob a orientação da médica veterinária Karin Maia Monteiro (CRMV–SP 19683). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob as numerações: 3029-1; 3030-1; 3362-1; 3363-1; 3364-1; 3463-1; 3464-1.

Para os testes com a administração única dos extratos brutos de *A. fraxinifolium* por via oral, os animais foram submetidos a um período mínimo de jejum (camundongos por quatro horas e ratos por oito horas), com acesso livre a água, possibilitando total esvaziamento gástrico e não interferência da alimentação na absorção dos princípios ativos dos extratos brutos de *A. fraxinifolium*. Além disso, para total absorção e distribuição sistêmica dos extratos de *A. fraxinifolium*, os modelos experimentais se iniciaram uma hora após a administração.

3.3.2.2. Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

O teste de toxicidade aguda foi baseado na OECD 425/2008 - *Acute Oral Toxicity: Up-and-Down-Procedure*, com modificações para administração via intraperitoneal (IP) da substância teste.

Camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram separados em grupo de cinco animais e um indivíduo de cada grupo recebeu o extrato bruto, tanto pela via de administração intraperitoneal como pela oral, na dose de 1000 mg/Kg uma única vez. Após a administração, os animais foram observados continuamente por um período de quatro horas para avaliar alterações comportamentais e sinais de toxicidade da amostra e, posteriormente, por um período de 24 horas. Se não ocorressem alterações comportamentais e nem sinais de toxicidade da amostra dentro desse intervalo de tempo, o restante do grupo receberia a mesma dose e seria observado por quatro horas. Após este período, os animais foram observados clinicamente por 14 dias com sua massa corpórea mensurada no 7º dia. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados e seus órgãos (fígado, baço, rins, coração e pulmão) analisados macroscopicamente e suas massas mensuradas.

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

3.3.2.2.1. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos de *A. fraxinifolium*

Inicialmente, utilizou-se grupos com três animais (n=3), se estes animais não fossem a óbito o grupo era completado para cinco animais (n=5). As doses dos extratos brutos foram aplicadas uma única vez em progressão ordenada, ou seja, um animal de cada vez e

iniciando pela dose de maior concentração. Foram utilizadas as doses de 500 mg e 1000 mg/kg dos extratos brutos MCH e MFH, sendo utilizado como controle negativo o veículo (PBS, pH 7), utilizado para solubilização dos extratos.

Os animais foram observados continuamente por período inicial de 4 horas, contados após a aplicação e, diariamente, por período de 14 dias. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade exploratória reduzida, sonolência), alteração na respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade (Litchfield e Wilcoxon, 1949; Lapa et al., 2008).

3.3.2.3. Úlcera induzida por indometacina

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (n=6/grupo), pesando entre 200-250g. Os grupos foram separados randomicamente em: controle negativo, tratado com veículo (PBS, pH 7) na dose de 10 mL/kg; controle positivo, tratado com suspensão aquosa de ranitidina na dose de 50 mg/kg e os tratados com os extratos brutos (MCH e MFH) de *A. fraxinifolium* nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg; todos os grupos receberam o tratamento pela via oral. Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal recebeu indometacina, na dose de 30 mg/kg, via subcutânea. Após quatro horas da administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em água destilada, para realização da contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado por meio da somatória dos parâmetros descritos a seguir (Quadro 1), de acordo com metodologia descrita por Carlini (1988).

Quadro 1. Parâmetros para avaliação do índice de lesões ulcerativas (ILU).

Parâmetro	Pontuação
Perda de pregas da mucosa	Um ponto
Descoloração da mucosa	Um ponto
Edema	Um ponto
Hemorragia	Um ponto
Petéquias (pontos de lesão)	Dois pontos (até 10 petéquias)
	Três pontos (mais que 10 petéquias)
Úlceras	*n x dois pontos
	* n x três pontos
	* n x quatro pontos

* onde n refere-se ao número de lesões observadas.

3.3.2.4. Atividade antinociceptiva em modelo de algesia induzida pela formalina

Este modelo, inicialmente descrito por Dubuisson e Dennis (1977), consiste em injetar uma substância irritante, neste caso uma solução de formalina (formaldeído:PBS) na concentração de 2,5% no espaço subcutâneo da pata traseira de camundongos, determinando o surgimento de alterações comportamentais que são traduzidas por respostas motoras características que permitem avaliar a intensidade da resposta nociceptiva ao estímulo químico. A resposta nociceptiva é medida pelo tempo que o animal permanece lambendo, agitando e/ou mordendo a pata com solução de formalina.

Os grupos foram separados randomicamente (n=6), o controle positivo foi tratado pela via intraperitoneal (morfina 5 mg/Kg), enquanto que o controle negativo (veículo: PBS, pH 7) e os grupos experimentais (MFH: 50, 100 e 200 mg/kg) foram tratados pela via oral. Após 30 minutos, o controle positivo recebeu uma injeção da solução de formalina e, após uma hora, os demais grupos receberam a mesma injeção.

Logo após a injeção da solução de formalina, os animais foram colocados sob campânulas de vidro e observados individualmente. O tempo que o animal passa lambendo,

mordendo e/ou agitando vigorosamente a pata que contém a solução de formalina foi cronometrado durante um período de 30 minutos. Os primeiros 5 minutos após a injeção da solução de formalina correspondem à fase de sensibilidade dolorosa de caráter neurogênico e, a partir de 15 minutos, tem início a fase de sensibilidade dolorosa de caráter inflamatório (Hunskar e Hole, 1987).

3.3.2.5. Teste de atividade locomotora

3.3.2.5.1. Campo aberto (*Open field*)

Camundongos machos da linhagem Swiss (n=5/grupo) foram divididos em grupos para avaliar os possíveis efeitos do MFH de *A. fraxinifolium* sobre a atividade locomotora. Os animais foram tratados com diferentes doses de MFH de *A. fraxinifolium* (100, 200 e 400 mg/Kg) e veículo (PBS, pH 7, 10 mL/kg). Após uma hora, os camundongos foram colocados individualmente em uma caixa de madeira (45x45x20 cm) com o chão dividido em nove quadrados iguais (15x15 cm). O número de quadrados ultrapassados com as quatro patas foi medido no intervalo de tempo de três minutos. O resultado foi expresso com a média de quadrados ultrapassados no intervalo de tempo de três minutos por grupo tratado.

3.3.2.5.2. Barra giratória (*Rotarod*)

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss (n=5/grupo) para avaliar se o MFH de *A. fraxinifolium* possui atividade relaxante muscular ou sedativa não específica. O aparelho de *Rota Rod* consiste em uma barra de três centímetros de diâmetro subdividida em cinco compartimentos. A barra faz um movimento de rotação constante de 16 rotações por minuto. Para o desafio, os animais foram selecionados 24 horas antes,

sendo excluídos aqueles que não permaneciam na barra por dois períodos consecutivos de 120 segundos.

Os animais foram tratados com MFH nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg ou veículo (PBS, pH 7) na dose de 10 mL/kg, pela via oral, uma hora antes do início do desafio. O tempo de permanência máxima do animal na barra giratória foi mensurado até 120 segundos. O desafio foi repetido por três vezes consecutivas, mesmo se o animal caísse da barra giratória ou completasse o tempo de permanência máxima. Os resultados foram expressos com o tempo médio que os animais mantiveram-se na barra giratória em cada grupo.

3.3.2.6. Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Grupos de camundongos machos da linhagem Swiss (n=6/grupos), receberam pré-tratamento com o MFH uma hora antes do agente irritante (Óleo de cróton – Sigma-Aldrich®) por duas vias de administração: tópica (TO) e oral. Para uso tópico, o extrato foi diluído em solução de acetona:água destilada (70:30; v:v) (acetona 70%) na proporção massa de extrato/mL. Para o tratamento oral, o extrato foi diluído em PBS, pH 7. O controle negativo recebeu o veículo (acetona 70% tópico na orelha direita ou PBS via oral) e o controle positivo recebeu dexametasona (Sigma-Aldrich®) (5 mg/kg intraperitoneal ou 5 mg/mL TO).

Após uma hora do tratamento, 20 µL da suspensão de óleo de cróton (5%) diluído em acetona 70% foi aplicada na orelha direita, enquanto que a orelha esquerda foi tratada apenas com o veículo. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e fragmentos de sete milímetros de diâmetro foram retirados de cada orelha. O

edema induzido pelo óleo de cróton foi avaliado pela diferença de massa entre as orelhas do mesmo animal.

3.3.2.7. Edema de pata induzido por carragenina

Os experimentos foram conduzidos de acordo com Posadas e colaboradores (2004) e Nunes e colaboradores (2007), com algumas modificações. O volume basal da pata traseira direita de camundongos Swiss (n=8/grupo) foi avaliado em aparelho de hidropletismômetro (Ugo Basile®) e, então, os grupos foram divididos randomicamente e tratados pelas vias intraperitoneal e oral, sendo: controle negativo (veículo – PBS, pH 7), controle positivo (dexametasona – Sigma-Aldrich®, 5 mg/kg) e três grupos experimentais tratados por via oral nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com MFH. Após 30 minutos, a inflamação foi induzida através da injeção de 30 µL de carragenina 3% (Sigma-Aldrich®) no coxim plantar da pata traseira direita nos grupos que receberam o tratamento intraperitoneal; já os grupos que receberam o tratamento via oral, a indução foi realizada uma hora após o tratamento. A seguir, o edema produzido pela carragenina foi avaliado após 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo determinado pela diferença entre o volume medido e o volume basal.

3.3.2.8. Tumor sólido de Ehrlich

3.3.2.8.1. Preparação das células

As células de tumor de Ehrlich foram mantidas na sua forma ascítica, no peritônio dos camundongos, por passagens semanais com 5×10^5 células/animal. Para tanto, as células foram descongeladas, ressuspensas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm (*Centrifuge 5403*, Eppendorf®), 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular

novamente ressuspensionado em PBS, em volume suficiente para preparar a suspensão celular na densidade de inoculação de 5×10^5 células/animal. Dois animais foram inoculados (doadores) e, após cinco ou seis dias, foram sacrificados, o líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, para preparo da suspensão de manutenção da linhagem ou para preparo da suspensão de trabalho.

3.3.2.8.2. Inoculação nos Animais

Para os experimentos foram utilizados camundongos fêmea da linhagem BALB/c (n=7/controle negativo e positivo; n=8/grupos experimentais). As células foram preparadas na densidade de 1×10^5 células/animal, em PBS com pH 7 e, a seguir, foram inoculados 60 μ L/animal no tecido celular subcutâneo do dorso do animal (flanco). Posteriormente, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: controle negativo (veículo – PBS), controle positivo (doxorubicina – 3 mg/kg) e os grupos tratados com MFH (100, 200 e 400 mg/kg). Os tratamentos tiveram início no 4º dia após o inóculo das células, ou seja, quando o tumor se tornou palpável. Os animais foram tratados por via oral diariamente por 14 dias. A evolução do peso corporal foi determinada através da pesagem dos animais a cada três dias. No 14º dia, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical para a retirada do tumor e dos órgãos (útero, ovário, rins, fígado, baço, coração e pulmão), que foram pesados e avaliados macroscopicamente.

A taxa de inibição do tumor (%) foi calculada pela fórmula: taxa de inibição = $[(A - B) / A] \times 100$, onde A: média do peso do tumor do controle negativo, B: média do peso do tumor do grupo experimental.

3.3.2.9. Análises dos resultados *in vivo*

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguida do teste de comparação de média, o teste de Tukey (para uma via) ou Bonferroni (para duas vias). Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância e representados por: (1) $p < 0,05$, *; (2) $p < 0,01$, **; (3) $p < 0,001$, ***. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 5.00, San Diego Califórnia, EUA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e análise dos extratos

A tabela 3 apresenta os resultados referentes ao rendimento dos processos de extração.

Tabela 3a. Rendimento dos extratos brutos das folhas e das cascas obtidos por sistema Soxhlet.

	Cascas do caule	Folhas
Diclorometânico	3,0%	7,5%
Etanol 70%	6,8%	7,4%

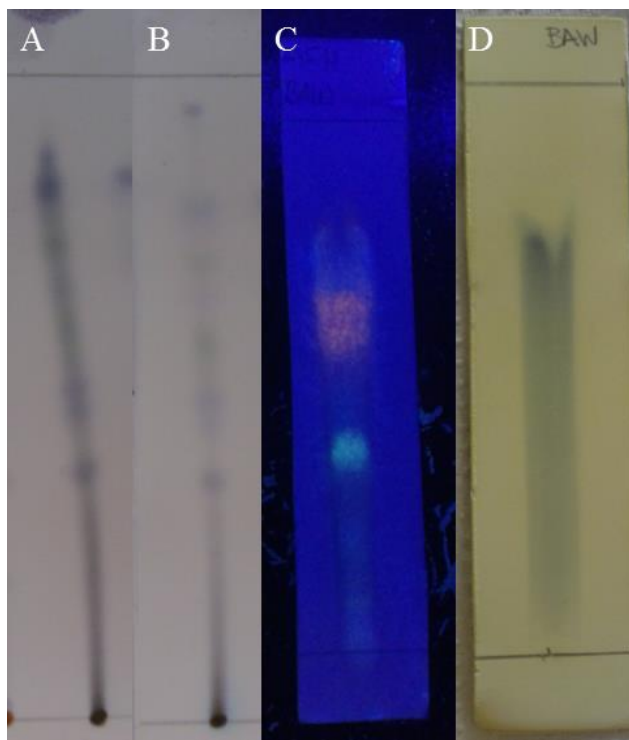
Tabela 3b. Rendimento dos extratos brutos das folhas e das cascas do caule obtidos por maceração dinâmica.

	Cascas do caule	Folhas
Diclorometânico	6,6%	7,0%
Etanol 70%	3,8%	7,5%

As CCD contendo extrato bruto diclorometânico das folhas, em ambas as extrações, eluídas na fase móvel (1) apresentaram resultado positivo para reação com solução de anisaldeído/ H_2SO_4 . Aquelas que continham extratos brutos das cascas do caule e das folhas, por maceração dinâmica, e foram eluídas na fase móvel (2) apresentaram resultado positivo

para a solução de NP-PEG (somente o MFH), indicando a presença de flavonoides e a solução de cloreto férrico 2% (ambos os extratos, MCH e MFH), sugeriram a presença de taninos. (Figura 8) (Quadro 2).

Figura 8. Cromatografia em camada delgada



Cromatografias em camada delgada (CCD) dos extratos brutos de *A. fraxinifolium* eluídas em diferentes fases móveis e reveladas para diferentes grupos de compostos. As CCD dos extratos SFD (A) e MFD (B) eluídas na fase móvel diclorometano:metanol e reveladas com solução de anisaldeído/H₂SO₄. CCD do MFH eluída na fase móvel com butanol:ácido acético:água destilada (C) e reveladas com solução de NP-PEG e observada sob luz UV (254 nm); (D) revelada com solução de cloreto férrico 2%.

Quadro 2. Presença de classe de compostos após a eluição das CCD nas fases móveis (1) e (2) e aplicação dos reveladores.

Revelador	Tipo de extração							
	SCD	SCH	SFD	SFH	MCD	MCH	MFD	MFH
Solução de anisaldeído/H₂SO₄	-	-	+	-	-	-	+	-
Solução de Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-PEG	-	-	-	-	-	-	-	+
Solução de cloreto férrico 2%	-	-	-	-	-	+	-	+

(+) indica a presença da classe de compostos após reação com revelador;

(-) não indica a presença da classe de compostos após reação com revelador;

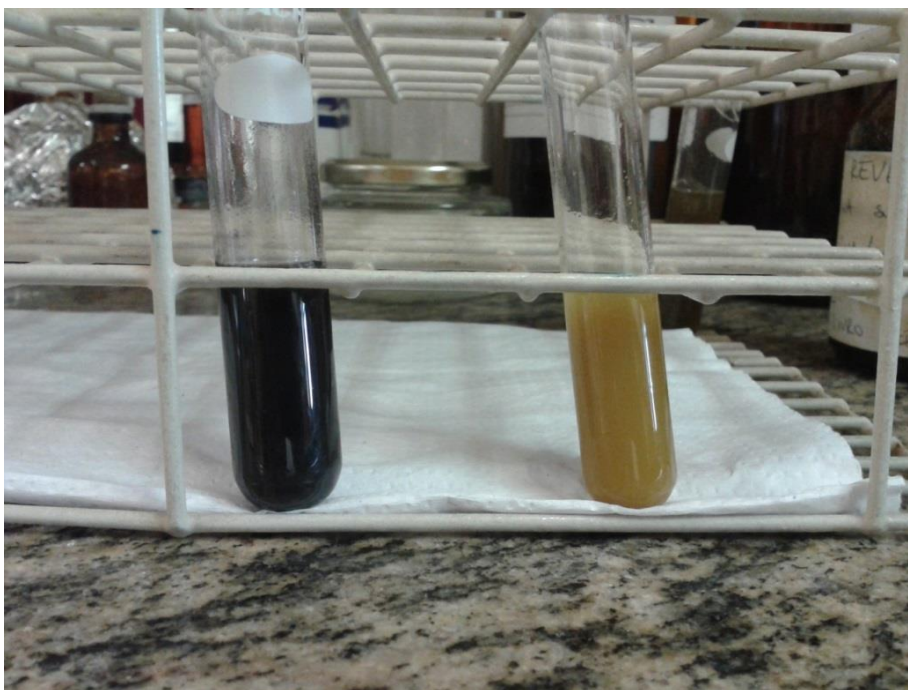
Como o extrato MFH de *A. fraxinifolium* apresentou resultado positivo para as reações com solução de NP-PEG e de cloreto férrico 2%, foi realizado o método de identificação de compostos descrito na Farmacopeia Brasileira (2010) para validar os resultados obtidos nas CCD (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Reação para indicação da presença de flavonoides .



Reação para a indicação de presença de flavonoides no extrato MFH. À direita, o tubo de ensaio que recebeu os reagentes para a reação de indicação de flavonoides; à esquerda, tubo de ensaio contendo o extrato MFH sem adição dos reagentes.

Figura 10. Reação para indicação da presença de taninos totais e condensados.



Reação para indicação da presença de taninos totais e condensados do extrato MFH. O tubo de ensaio à esquerda recebeu os reagentes para indicação de taninos da amostra; à direita, o tubo de ensaio recebeu os reagentes para indicação de taninos condensados.

Na figura 9, o tubo de ensaio da esquerda contendo o extrato bruto recebeu os reagentes para a reação de indicação de flavonoides, enquanto o da direita somente o extrato. Nota-se que ocorreu a mudança de coloração, desenvolvendo a coloração avermelhada que indica reação positiva para a presença de flavonoides.

Na figura 10, o tubo de ensaio da esquerda recebeu os reagentes para a indicação da presença de taninos totais, enquanto o da direita os reagentes para a indicação da presença de taninos condensados. A presença da coloração cinza-escuro indicou reação positiva para taninos totais na amostra, por outro lado, a reação para a presença de taninos condensados foi negativa, pois não houve mudança da coloração para o avermelhado.

Os testes para identificação dos principais grupos de compostos químicos presentes em espécies vegetais revelaram a presença de flavonoides e de taninos hidrolisáveis, sendo estes os compostos majoritários do MFH de *A. fraxinifolium*. Geralmente, extrações de taninos hidrolisáveis podem ser realizadas com soluções aquosas de acetato de etila, de acetona, de etanol e de metanol (Hatano et al., 1988; Okuda et al., 1989; Quideau e Feldman, 1996; Harborne e Williams, 2000; Mueller-Harvey, 2001; Arapitsas et al., 2007; Markom et al., 2007; García-Estévez et al., 2010; Gironi e Piemonte, 2011; Okuda e Ito, 2011). Extrações com metanol são mais eficientes para obtenção de taninos de baixa massa molecular, no caso de partes vegetais que possuem elevada quantidade de enzimas, como a casca do tronco ou o fruto, enquanto que a acetona é a preferida para os taninos de alta massa molecular (Okuda et al., 1989; Mueller-Harvey, 2001).

Tian e colaboradores (2009) demonstraram que, para a técnica de extração por sistema Soxhlet utilizando como solvente acetato de etila, a extração foi mais efetiva para galotaninos de elevada massa molecular, enquanto que o etanol forneceu resultados médios e de amplo espectro, pois foi capaz de extrair todos os galotaninos presentes. Porém, dados da literatura demonstram que não existe um único processo de extração que possa ser universalmente utilizado para todos os taninos hidrolisáveis e para todos os tipos de amostras (Arapitsas, 2012).

Além disso, os resultados obtidos com as análises dos extratos brutos das cascas e das folhas de *A. fraxinifolium* estão de acordo com os dados encontrados na literatura. Espécies do gênero *Astronium* (*A. graveolens* e *A. urundeuva*) possuem elevadas quantidades de polifenóis, flavonoides e taninos, sendo, para o último, taninos hidrolisáveis como majoritários (da Silva et al., 2011; Hernández et al., 2014).

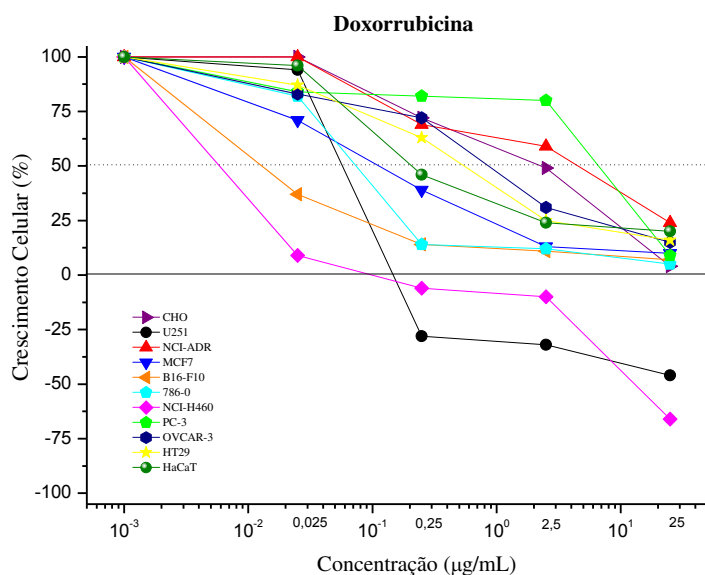
Portanto, o processo de escolha para extração dos compostos químicos presentes nos órgãos vegetais de *A. fraxinifolium* foi a maceração dinâmica, pois é uma forma de extração mais branda quando comparada ao sistema Soxhlet, utilizando solução aquosa de etanol.

4.1. Testes de atividade farmacológica *in vitro*

4.2.1. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais

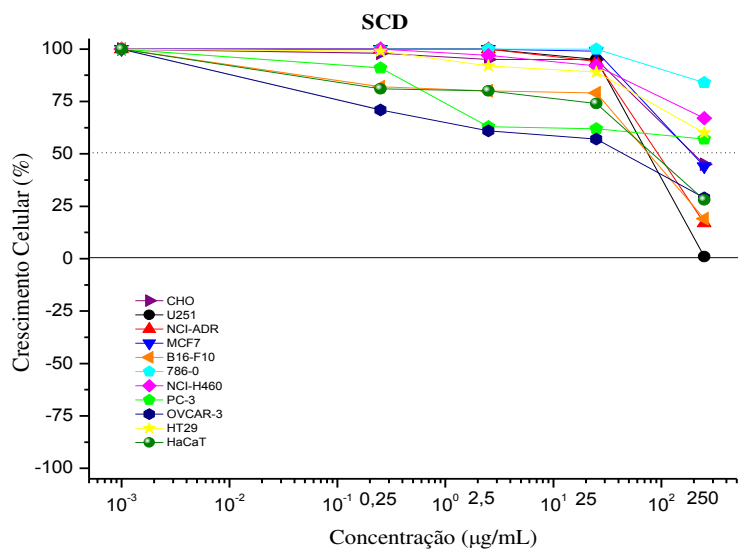
Os resultados da atividade antiproliferativa da doxorrubicina, dos extratos brutos das folhas e das cascas do caule de *A. fraxinifolium* em cultura de células tumorais e não tumorais estão apresentados nas figuras 11 e 12.

Figura 11. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do quimioterápico padrão doxorrubicina.

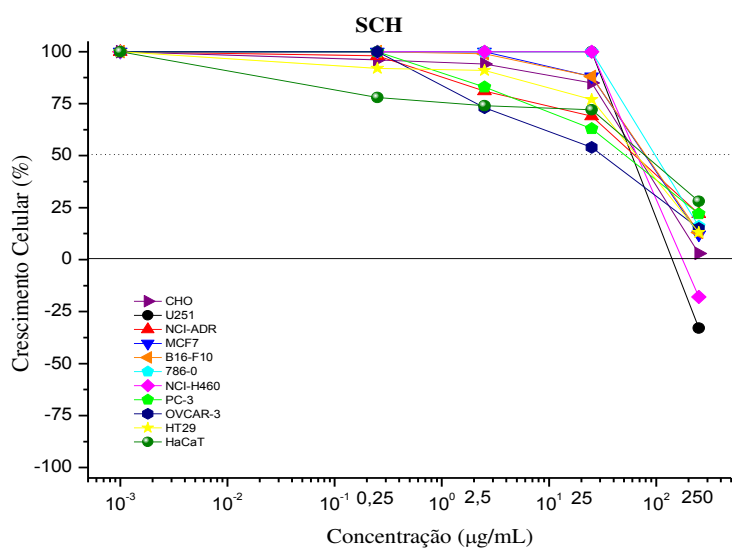


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do quimioterápico padrão doxorrubicina após 48 horas de tratamento.

Figura 12. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais dos extratos brutos de *A. fraxinifolium*.

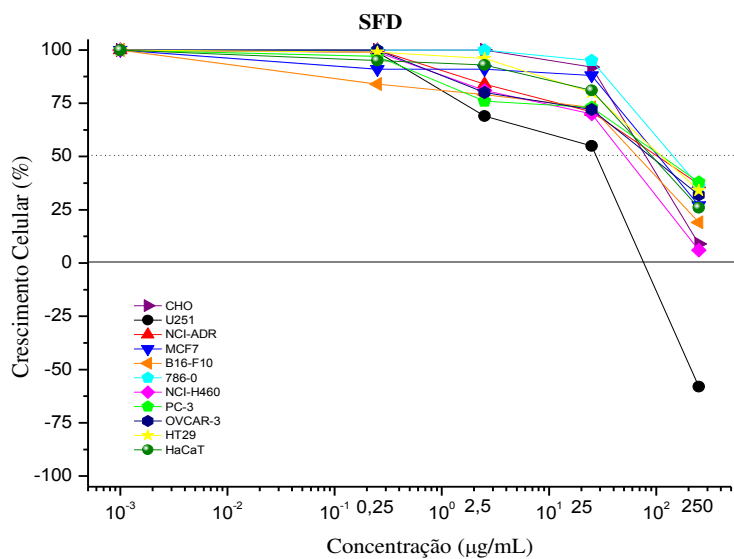


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das cascas do caule obtido por sistema Soxhlet com diclorometano (SCD), após 48 horas de tratamento.

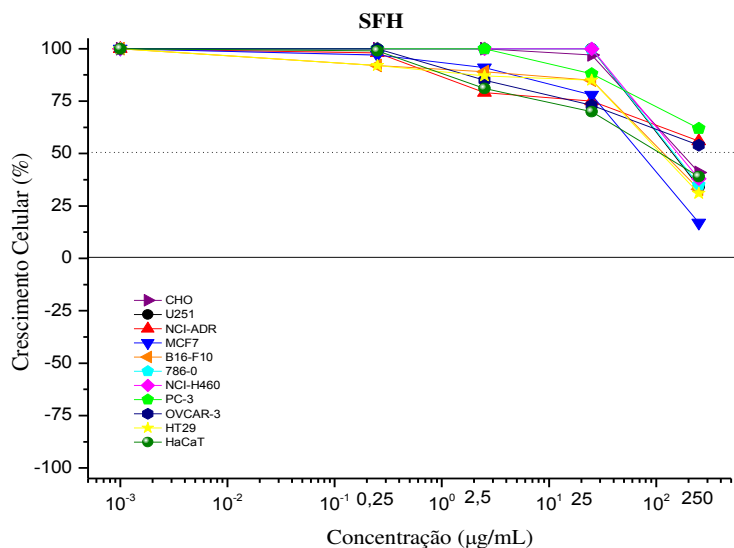


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das cascas do caule obtido por sistema Soxhlet com solução hidroalcoólica (SCH), após 48 horas de tratamento.

Figura 12 (cont.). Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais dos extratos brutos de *A. fraxinifolium*.

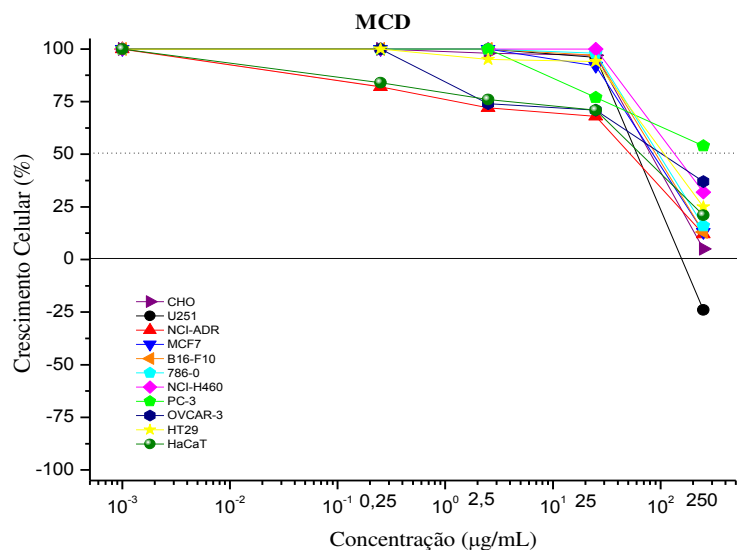


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das folhas obtido por sistema Soxhlet com diclorometano (SFD), após 48 horas de tratamento.

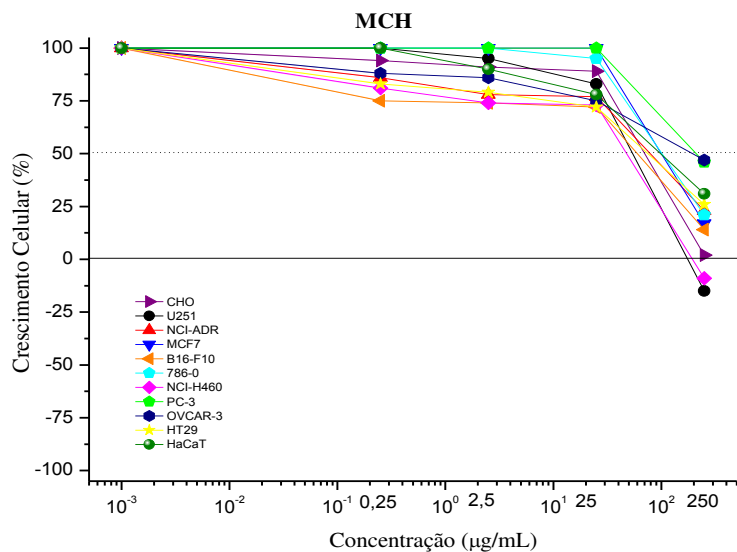


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das folhas obtido por sistema Soxhlet com solução hidroalcoólica (SFH), após 48 horas de tratamento.

Figura 12 (cont.). Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais dos extratos brutos de *A. fraxinifolium*.

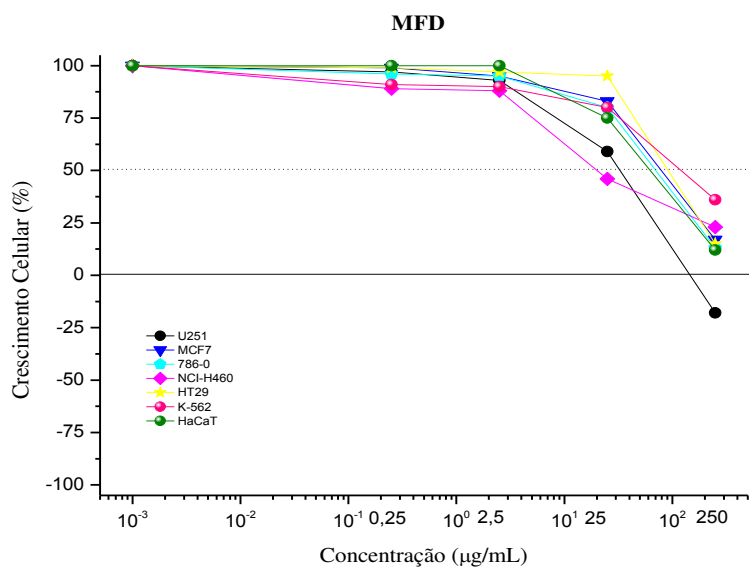


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das cascas do caule obtido por maceração dinâmica com diclorometano (MCD), após 48 horas de tratamento.

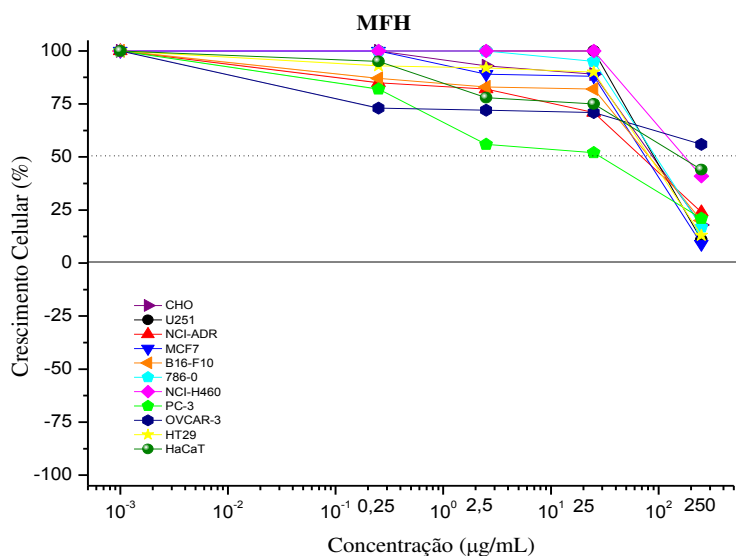


Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das cascas do caule obtido por maceração dinâmica com solução hidroalcoólica (MCH), após 48 horas de tratamento.

Figura 12 (cont.). Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais dos extratos brutos de *A. fraxinifolium*.



Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das folhas obtido por maceração dinâmica com diclorometano (MFD), após 48 horas de tratamento.



Perfil de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e não tumorais do extrato bruto das folhas obtido por maceração dinâmica com solução hidroalcoólica (MFH) após 48 horas de tratamento.

A análise dos perfis da atividade antiproliferativa em células tumorais humanas demonstraram que não houve diferença significativa entre os métodos de extração e os solventes utilizados e, de maneira geral, a inibição do crescimento celular ocorreu somente na concentração mais elevada (250 µg/mL), sugerindo que os extratos brutos de *A. fraxinifolium* podem conter substâncias com atividade citostática. No entanto, o processo de isolamento biomonitorado poderá confirmar esta atividade.

4.3. Testes de atividade farmacológica *in vivo*

4.3.1. Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com o protocolo internacional da OECD 425/2008, com algumas modificações para a administração da substância pela via IP.

Foram utilizados grupos com três animais (n=3), se estes animais não fossem a óbito, o grupo era completado para cinco animais (n=5). As doses dos extratos brutos foram aplicadas uma única vez em progressão ordenada, ou seja, um animal de cada vez e iniciando pela maior dose. Foram administradas as doses de 500 mg e 1000 mg/kg dos extratos brutos MCH e MFH de *A. fraxinifolium*, sendo como controle negativo o veículo (PBS, pH 7), utilizado para solubilização dos extratos brutos.

Os animais foram observados continuamente por período inicial de quatro horas, após a aplicação das amostras, e diariamente, por um período de 14 dias. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade exploratória reduzida, sonolência), alteração na respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade (Litchfield e Wilcoxon, 1949; Lapa et al., 2008).

Pela via oral (VO), a maior dose testada (1000 mg/kg) dos extratos MCH e MFH de *A. fraxinifolium* não promoveram sinais de toxicidade durante as primeiras quatro horas de observação, sendo assim, o restante do grupo recebeu a mesma dose. Durante o período de observação de 14 dias, os animais não apresentaram alterações de comportamento, sinais de toxicidade e variação do peso corpóreo. Após 14 dias, os animais foram submetidos à eutanásia, seus órgãos (coração, pulmão, fígado, rins, baço, útero, ovários) foram analisados macroscopicamente e pesados. Os órgãos não apresentaram sinais de toxicidade e variação significativas.

Pela via de administração intraperitoneal (IP), os animais que receberam extrato bruto das cascas do caule de *A. fraxinifolium* (MCH) na dose de 1000 mg/kg apresentaram sinais sugestivos de nocicepção abdominal (contorções abdominais) nas primeiras duas horas e diminuição do comportamento exploratório. Durante o período de 14 dias, não houve alterações comportamentais, sinais de toxicidade e alteração do peso corpóreo. Após a eutanásia, seus órgãos não apresentaram sinais de toxicidade e a variação de peso entre eles não foi estatisticamente significativa.

Todavia, os animais tratados com extrato das folhas de *A. fraxinifolium* (MFH) pela via intraperitoneal na dose de 1000 mg/kg apresentaram sinais de nocicepção abdominal (contorções abdominais), diminuição do comportamento exploratório, ptose e morte em um período de 24 horas. Sendo assim, a dose foi reduzida pela metade (500 mg/kg), que induziu sinais de contorções abdominais, diminuição do comportamento exploratório e ptose.

Os sinais de toxicidade que os extratos MCH e MFH de *A. fraxinifolium* produziram, quando administrados pela IP, podem estar relacionados com a presença dos taninos nas amostras, que por essa via de administração produzem efeitos hepatotóxicos.

Pela via oral, os extratos não apresentaram sinais de toxicidade, pois por esta via os taninos não apresentam biodisponibilidade.

A morte dos animais que receberam MFH de *A. fraxinifolium* nas doses de 1000 mg/kg e 500 mg/kg pode estar relacionada com os taninos que, quando administrados por vias que não sofrem metabolismo de primeira passagem ou diretamente na cavidade intraperitoneal, ocasionam uma quebra significativa de polirribossomas hepáticos, inibindo a incorporação de aminoácidos nas proteínas. Além disso, ligam-se às proteínas provocando sua precipitação e contribuindo com os efeitos tóxicos (Chung et al., 1998).

A hepatotoxicidade do MFH de *A. fraxinifolium* pode ser comprovada com a análise bioquímica do soro plasmático de dois dos três primeiros animais que receberam a amostra, por meio da dosagem da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e transaminase glutâmica oxalacética (TGO). O sangue foi coletado em microtubos de 1,5mL e, após a sua coagulação, o soro plasmático foi retirado com o auxílio de uma micropipeta, diluído 40 vezes, e uma alíquota de 20 µL dessa solução foi utilizada para a leitura em aparelho de análise química clínica Reflotron® Plus (Quadro 3).

Quadro 3. Quantificação das enzimas hepáticas a partir do soro plasmático diluído 40 vezes dos animais que receberam MFH pela via IP.

Soro plasmático		TGP	TGO
500 mg/kg	Animal 01	948 U/L	572 U/L
	Animal 02	1112 U/L	668 U/L
1000 mg/kg	Animal 01	3792 U/L	3724 U/L
	Animal 02	3544 U/L	3412 U/L

Em virtude dos sinais de toxicidade observados após a administração do MCH e MFH de *A. fraxinifolium* pela via de administração IP, a continuidade dos experimentos *in vivo* foi realizada utilizando-se da via de administração oral para ambos os extratos de *A. fraxinifolium*.

4.3.2. Úlcera induzida por indometacina

Os resultados deste modelo experimental estão apresentados nas figuras abaixo de acordo com o índice de lesões ulcerativas (ILU) (Figura 13).

Figura 13. Úlcera induzida por indometacina.

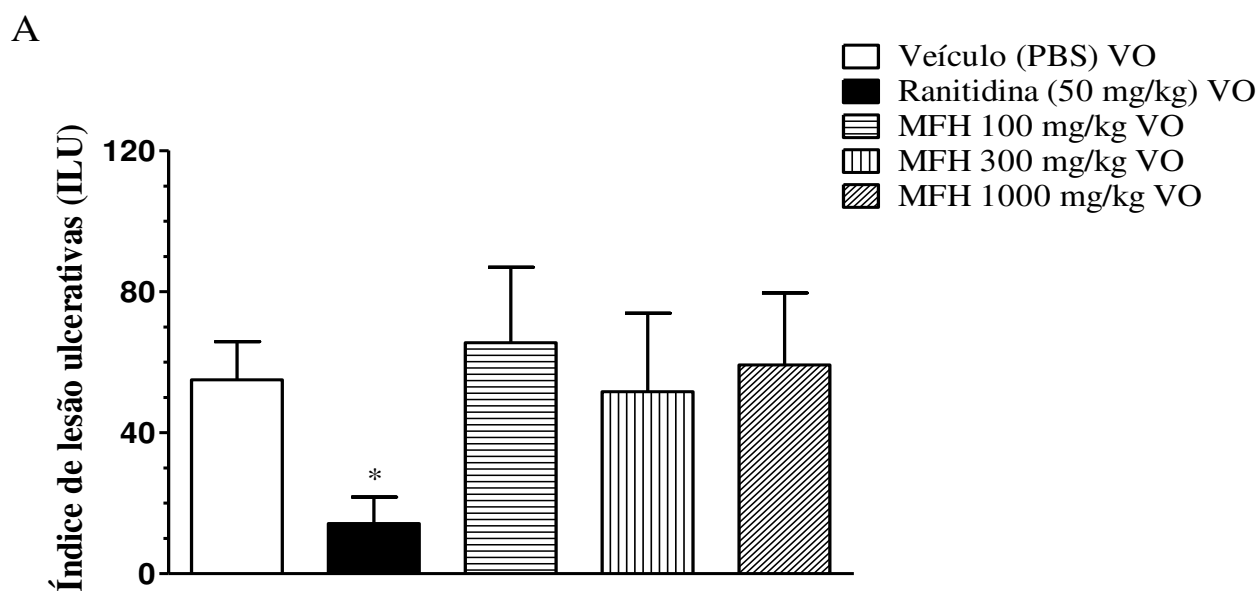
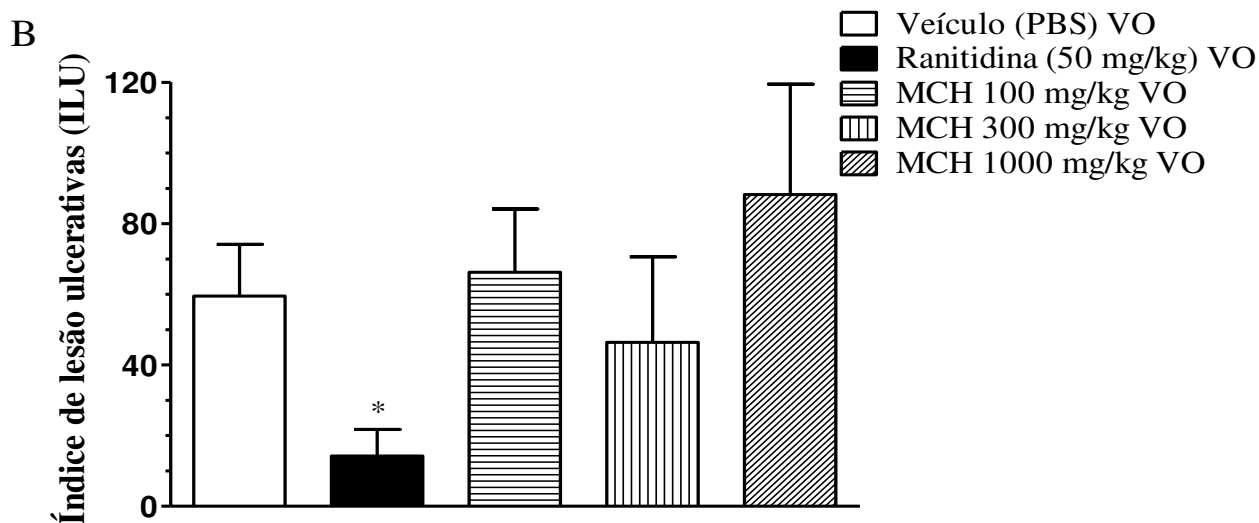


Figura 13 (cont). Úlcera induzida por indometacina.



Índice de lesões ulcerativas (ILU) induzidas por indometacina dos animais tratados com o fármaco antiulcerogênico ranitidina e doses crescentes do extrato de *A. fraxinifolium* (A) MFH e (B) MCH, administrados pela via oral.

A indometacina, derivado indólico, é uma droga anti-inflamatória não esteroide (AINEs), utilizada na clínica para diversos tipos de doenças inflamatórias, como osteoartrite e gota. Experimentalmente, é um fármaco utilizado para indução de lesões gástricas, devido ao seu potencial ulcerogênico relacionado à sua elevada potência anti-inflamatória pela inibição da enzima ciclo-oxigenase do tipo 1 (COX-1) e ciclo-oxigenase do tipo 2 (COX-2). Os distúrbios gastrointestinais, gastrite e úlceras produzidos por esse grupo de medicamentos (AINEs) é consequência da inibição da COX-1, responsável pela síntese de prostaglandinas que estimulam a produção do muco gastrotetor. Porém, diversos estudos demonstraram que ambas isoformas estão envolvidas no processo de citoproteção da mucosa gástrica (Suleyman et al., 2010).

A ciclo-oxigenase é a enzima responsável por catalisar a primeira etapa de síntese do ácido araquidônico em seus metabólitos: prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, que em condições fisiológicas é mediada pela isoforma COX-1. Porém, em processos inflamatórios, a isoforma COX-2 é rapidamente induzida, tornando-se a principal responsável por esse processo. Assim, a inibição conjunta dessas duas isoformas leva à formação de lesão na mucosa gástrica pela redução da barreira mucoprotetora (Suleyman et al., 2010).

Em trabalho realizado por Rao e colaboradores (1987), o extrato aquoso de *A. urundeuva* reduziu o ILU em modelo de úlceras induzidas por aspirina em ratos. No entanto, os resultados apresentados na figura 13, sugerem que os extratos hidroalcoólicos de cascas e folhas de *A. fraxinifolium* não reduziram as lesões ulcerativas produzidas pela indometacina.

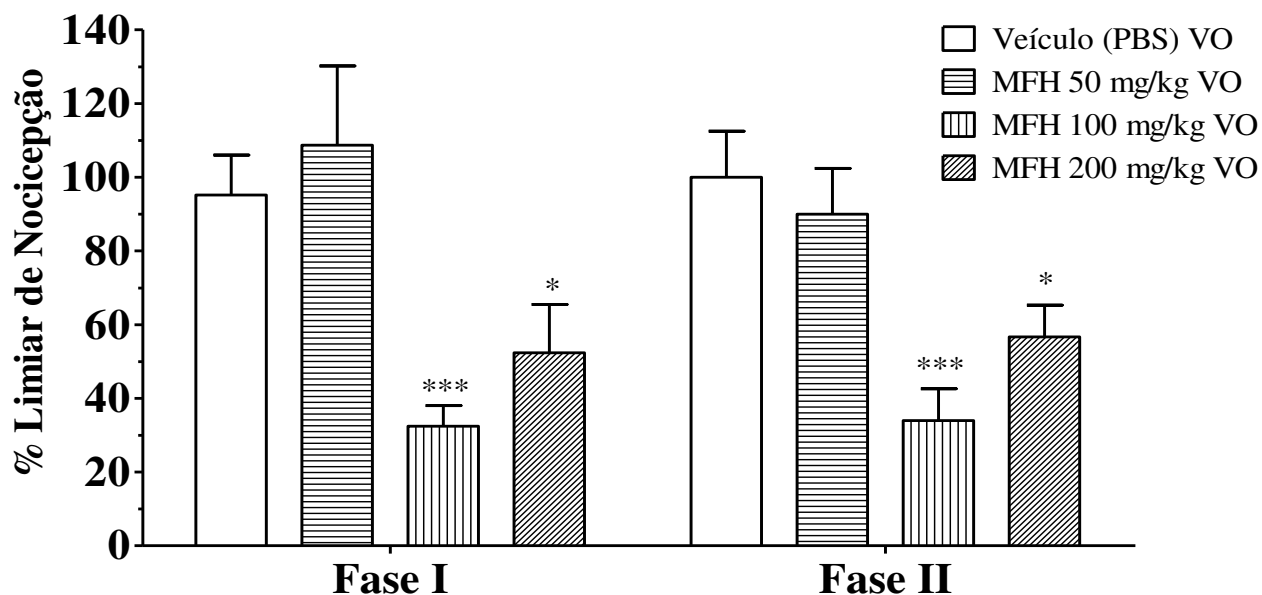
A atividade antiulcerogênica descrita na medicina popular para essa espécie é consequência da presença dos taninos que, precipitando proteínas na mucosa gástrica, colaboram com os processos de citoproteção.

Sendo assim, como não ocorreram diferenças significativas entre os efeitos produzidos pelos extratos de folhas e caule, a sequência dos estudos para identificar a possível atividade farmacológica foi realizada somente com o extrato obtido das folhas.

4.3.3. Atividade antinociceptiva em modelo de algesia induzida pela formalina

Este experimento analisou a possível atividade antinociceptiva do MFH pela algesia induzida pela injeção intraplantar de formalina. A figura 14 apresenta a resposta comportamental dos animais em duas fases distintas, a primeira (Fase I) correspondente à dor neurogênica e a segunda (Fase II) à dor inflamatória.

Figura 14. Teste da formalina.



Teste da formalina, representando as duas fases (fase I, dor neurogênica; fase II, dor inflamatória) induzidas com injeção de formalina de acordo com a redução do limiar de nocicepção com diferentes doses de MFH, administrado pela via oral.

O teste da formalina é um modelo de dor persistente comumente utilizado na triagem de novos agentes para o tratamento da dor pós-operatória. Apesar do uso disseminado do teste da formalina na pesquisa de novas drogas analgésicas, as informações quanto aos mecanismos que estão por trás dos comportamentos defensivos produzidos pelo formol é extremamente limitado (Shields et al., 2010). A injeção de formalina na pata dos animais induz comportamentos que podem ser mensurados, como lambear, morder ou sacudir as patas (Dubuisson e Dennis, 1977).

As respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase ou fase I), e por um período mais prolongado (segunda fase ou fase II), de atividade comportamental aumentada, que pode durar até uma

hora (Hunskaar e Hole, 1987). Há um consenso de que os comportamentos da fase I resultam da ativação aguda dos nociceptores pela formalina, enquanto os comportamentos da fase II são impulsionados, em parte, pela sensibilização central dos neurônios secundários da medula espinhal (Tjølsen et al., 1992).

O período entre as fases é denominado intervalo de quiescência. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros cinco minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo Aδ e pela liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina, sendo relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina (Hunskaar e Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992; Taylor et al., 1995; McCall et al., 1996; Puig e Sorkin, 1996; Taylor et al., 1997).

Viana e colaboradores (1997 e 2003) avaliaram a atividade nesse modelo experimental de uma fração rica em taninos catéquicos e chalconas diméricas, extraída do caule de *A. urundeuva* (*M. urundeuva*), administrada pelas vias IP e VO, que apresentaram efeito anitnociceptivo significativo em ambas as fases do processo. Nota-se que as doses de 100 e 200 mg/kg do extrato das folhas de *A. fraxinifolium* também promoveram redução da resposta comportamental ao estímulo nociceptivo em ambas as fases desse processo (figura 14).

A inibição na segunda fase do processo nociceptivo nas doses de 100 e 200 mg/kg de MFH sugere atividade anti-inflamatória, provavelmente por inibição da COX, pois parte dos mediadores inflamatórios, responsáveis pelo estímulo nociceptivo causado no local da

aplicação da formalina, são provenientes da conversão do ácido araquidônico em eicosanoides pela COX (Euchenhofer et al., 1998).

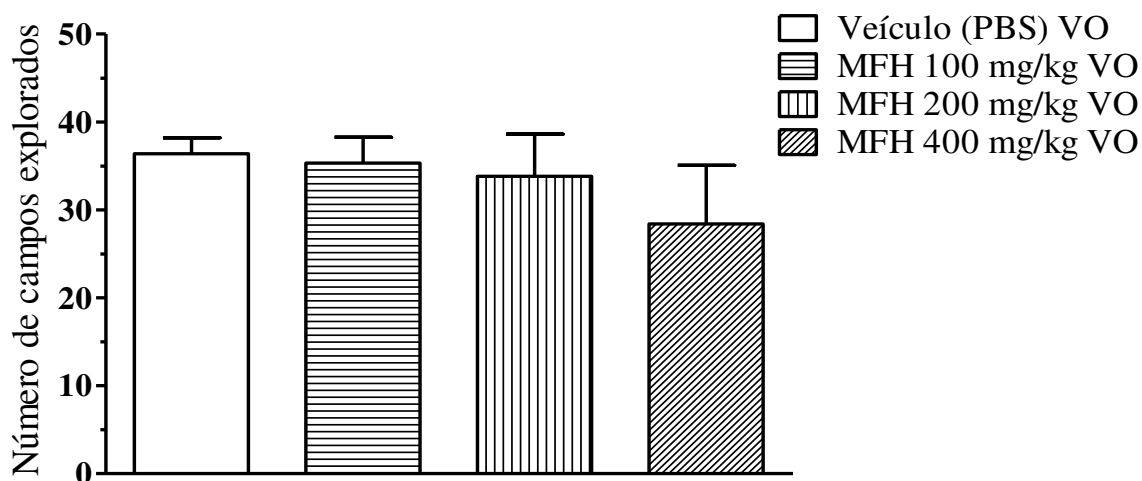
Como o teste da formalina é realizado através da avaliação de características comportamentais relacionadas com a nocicepção, substâncias que possuem atividade depressora do sistema nervoso central ou relaxante muscular podem produzir resultados falsos positivos. Sendo assim, os testes de atividade locomotora, exploratória e de coordenação motora foram realizados com o objetivo de avaliar o comportamento dos animais após a administração do MFH de *A. fraxinifolium* e validar os resultados obtidos no teste da formalina.

4.3.4. Teste de atividade locomotora

O modelo experimental do campo aberto avaliou se o MFH de *A. fraxinifolium* interfere na atividade exploratória e locomotora dos animais após o tratamento pela via oral.

De acordo com os resultados apresentados na figura 15, pode-se concluir que, nas doses e via de administração utilizada, o extrato bruto das folhas (MFH) não induziu alterações na atividade locomotora dos animais.

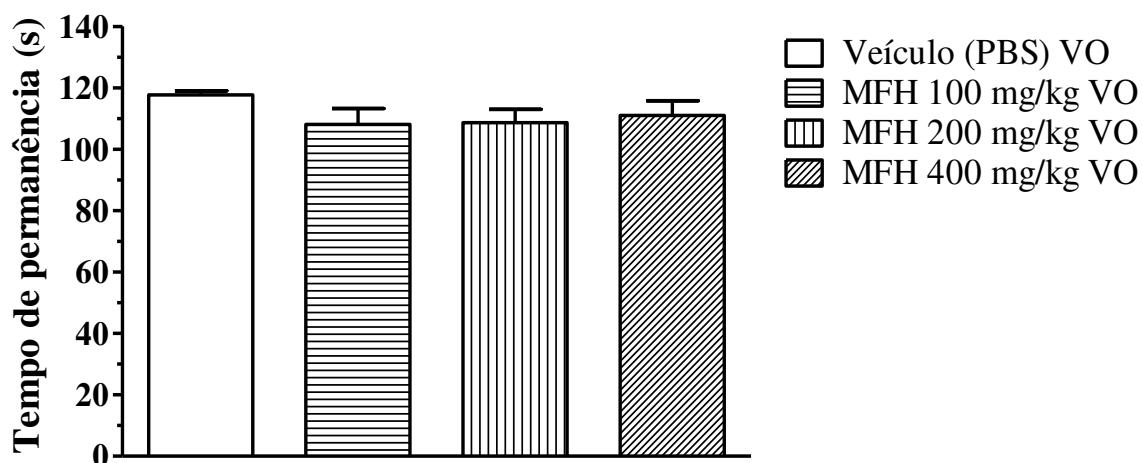
Figura 15. Campo aberto (*Open field*)



Atividade exploratória dos animais em campo aberto (*Open field*), representados pela média de campos explorados durante um intervalo de tempo de três minutos após uma hora da administração, por via oral, do MFH de *A. fraxinifolium* em diferentes doses.

Por outro lado, o modelo experimental da barra giratória avaliou se o MFH de *A. fraxinifolium* produz efeito sobre o tônus muscular, sobre a coordenação motora e ou sedação. Após a administração oral, pode-se concluir através dos tempos de permanência na barra giratória, que esse extrato não produziu alteração sobre esses parâmetros (figura 16).

Figura 16. Barra giratória (*Rotarod*)



Tempo médio de permanência, em segundos, de animais sobre a barra giratória (*Rotarod*) após uma hora do tratamento, por via oral, de diferentes doses MFH de *A. fraxinifolium*.

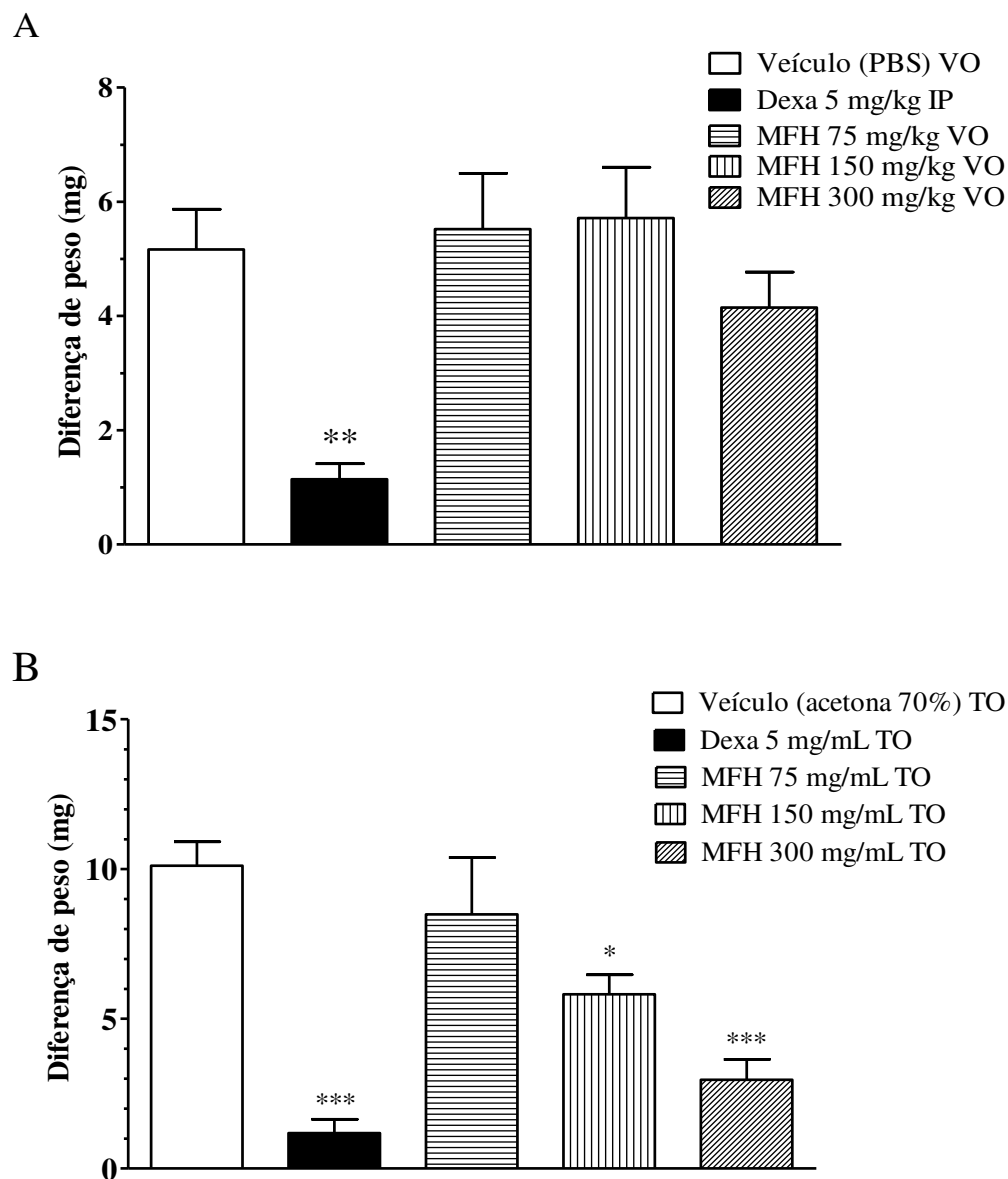
Estes testes comportamentais de atividade exploratória, locomoção e coordenação motora corroboram a provável atividade antinociceptiva do MFH de *A. fraxinifolium*, observada no teste da formalina, pois os animais tratados com as doses do MFH, efetivas no modelo de algesia induzida por formalina, não demonstraram alterações significativas sobre a atividade locomotora (Figuras 15 e 16).

4.3.5. Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Neste experimento a atividade do MFH foi avaliada por duas vias de administração: tópica (TO) e oral. Os resultados foram expressos de acordo com a média das diferenças

dos pesos de porções iguais obtidas das orelhas (tratada e não tratada) do animal e estão apresentados a seguir (Figuras 17a e 17b).

Figura 17. Edema de orelha induzido por óleo de cróton.



Edema de orelha induzido por óleo de cróton representado pelas médias das diferenças dos pesos das orelhas com inflamação induzida em comparação às orelhas não inflamadas dos animais tratados com o fármaco anti-inflamatório dexametasona (Dexa, IP ou TO) e diferentes doses do MFH de *A. fraxinifolium* pela (A) via oral (B) e tópica.

O modelo do edema de orelha induzido em ratos e em camundongos tem sido amplamente utilizado como triagem de compostos com potencial ação anti-inflamatória, tanto por ação sistêmica quanto ação tópica. A indução do edema de orelha pode ser feito por meio de diferentes agentes irritantes (óleo de cróton, capsaicina, ácido araquidônico, fenol, histamina) e permite avaliar os mecanismos de ação relacionados (Gábor, 2000).

O óleo de cróton é composto por ésteres de forbol, sendo o 12-O-tetracanoilphorbol-13-acetato (TPA) majoritário. Estes provocam repostas inflamatórias locais e hiperproliferativas, assemelhando-se a algumas doenças cutâneas (Marks, 1990; Gábor, 2000; Gábor, 2003). A aplicação tópica do óleo de cróton induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema nas primeiras duas horas. Entre a quarta e sexta hora é verificado a aderência dos leucócitos polimorfonucleares na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos. O aumento da espessura da orelha, decorrente do extravasamento celular, atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir atingindo os valores basais após 24 horas. No entanto, a infiltração máxima de leucócitos polimorfonucleares no tecido é atingida somente 24 horas após a aplicação tópica do óleo de cróton (Young et al., 1983).

O processo inflamatório se inicia com a ativação da proteína quinase C, devido ao TPA. Esta, por sua vez, promove a ativação de outras cascatas enzimáticas que conduzem à liberação de fator de ativação de plaquetas e de ácido araquidônico. A consequência desses eventos promove aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração de leucócitos polimorfonucleares, liberação de histamina, serotonina e síntese de eicosanóides inflamatórios pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX), 5-lipooxigenase (5-LOX) e citocinas, como prostaglandina E2 e o TNF α (Rao et al., 1993; Puignero e Queralt, 1997; Ferrandiz et al., 1996; Wang et al., 2001; Murakawa et al., 2006).

A aplicação do MFH de *A. fraxinifolium* foi realizada de duas maneiras: via tópica ou oral. A figura 17a demonstra que a administração oral não apresentou diferenças significativas entre os grupos tratados com MFH de *A. fraxinifolium* em relação ao grupo controle negativo. Todavia, o grupo que recebeu dexametasona (5 mg/kg) apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado oralmente com PBS. Por outro lado, os grupos que receberam a administração tópica do extrato MFH de *A. fraxinifolium* na orelha apresentaram uma redução significativa na média da diferença dos pesos das orelhas para os grupos tratados com as doses de 150 mg/mL e 300 mg/mL, em relação ao grupo controle negativo (Figura 17b).

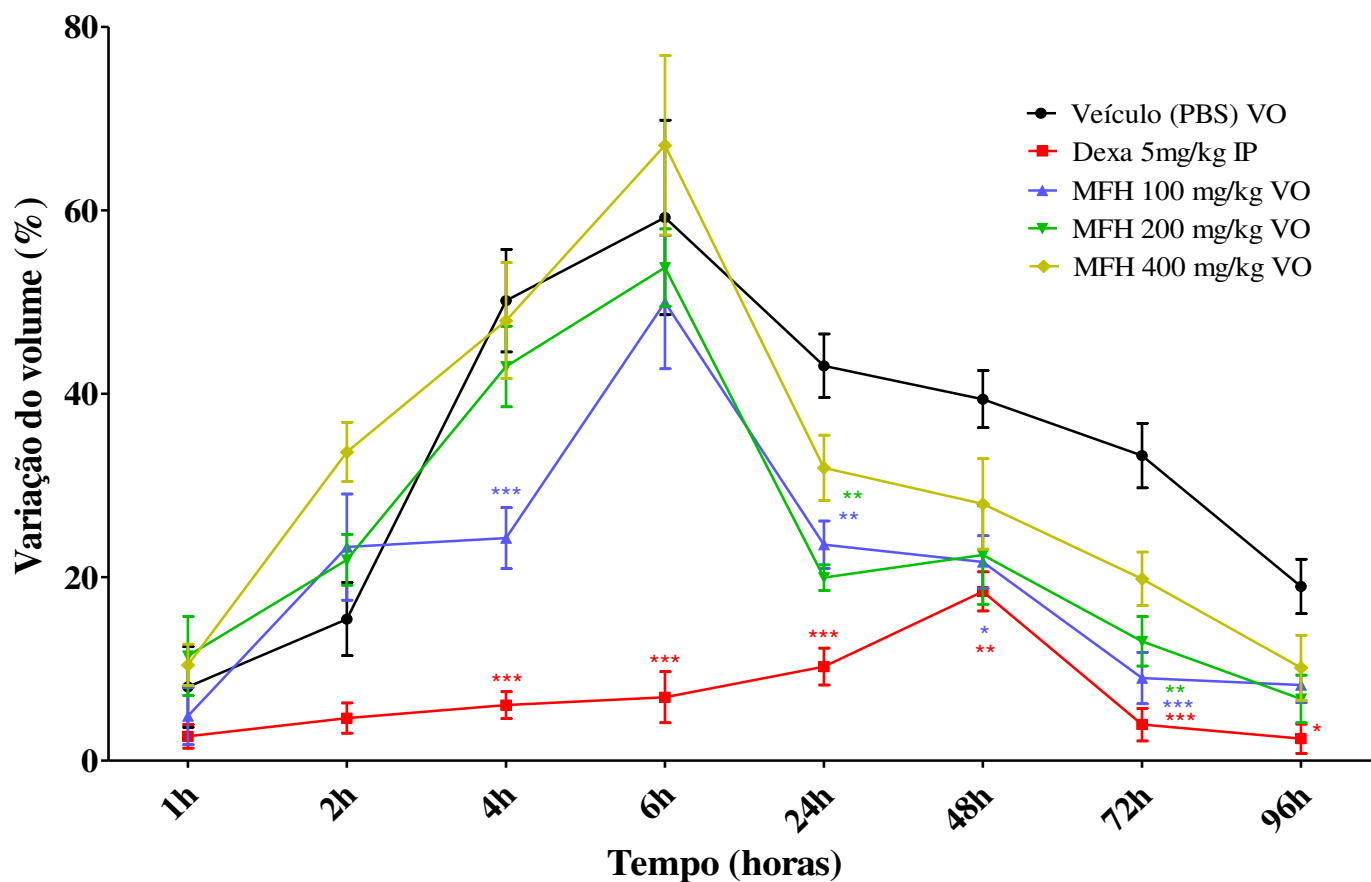
O resultado pode ser justificado, uma vez que a administração do MFH de *A. fraxinifolium* topicamente permite uma maior concentração dos compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória no sítio da inflamação (Gábor, 2000). Além disso, os AINEs e moléculas que possuem atividade semelhante são efetivos na inibição do edema induzido por óleo de cróton quando administrados topicamente, porém não apresentam efeito quando administrados por via oral (Carlson et al., 1985, Green e Shuster, 1987).

Além disso, Deharo e colaboradores (2004) demonstraram que o extrato hidroalcoólico do caule de *A. urundeuva* (*M. urundeuva*) possui atividade inibitória da ADP, o que indica que a atividade anti-inflamatória pode estar relacionada com a inativação da via da COX. Dessa maneira, os resultados sugerem que a possível atividade anti-inflamatória dos compostos do MFH de *A. fraxinifolium* atuam de maneira semelhante aos compostos de *A. urundeuva* (*M. urundeuva*) com a conversão do ácido araquidônico em mediadores inflamatórios pela via da COX.

4.3.6. Edema de pata induzido por carragenina

Para verificar se a redução do edema produzida pela aplicação tópica do MFH de *A. fraxinifolium* foi consequência de interação local com o óleo de cróton ou ação dos componentes do extrato com atividade anti-inflamatória, o MFH de *A. fraxinifolium* foi avaliado em outro modelo de edema de pata induzido por carragenina, após administração oral. Neste modelo, o volume da pata injetada com carragenina foi determinado em diferentes tempos e o resultado foi expresso como variação do volume da pata (figura 18).

Figura 18. Edema de pata induzido por carragenina.



Edema de pata induzido por carragenina representado com a variação média do volume das patas de camundongos que receberam injeção intraplantar de carragenina para indução da inflamação, tratados com o anti-inflamatório dexametasona (Dexa), por via IP, e diferentes doses de MFH de *A. fraxinifolium*, por via oral.

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é amplamente utilizado para triagem de compostos que possuem ação semelhante aos AINEs, sendo aceito como ferramenta para investigação de novas drogas anti-inflamatórias (Posada et al., 2004).

O aumento da permeabilidade vascular que, conseqüentemente, promove o extravasamento de exsudato através do compartimento intersticial intravascular forma o edema, característica essencial da inflamação aguda (Aller et al., 2007). A indução do edema por carragenina em camundongos possui uma resposta bifásica, na qual a primeira fase tem início após a injeção de carragenina e permanece por até seis horas, com um pico inflamatório, geralmente após quatro horas da indução. A segunda fase inicia-se após as seis horas e se estende por até 96 horas, com picos de inflamação entre 48 e 72 horas (Seibert et al., 1994; Posada et al., 2004).

Durante a primeira fase do edema, há a participação de serotonina, histamina, fosfolipase A2, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico (NO), enquanto que os mediadores na segunda fase produzem um edema dependente da mobilização celular (neutrófilos, monócitos e macrófagos), aumento da expressão de COX-2 e na liberação de prostaglandinas e diminuição da produção de NO (Fröde et al., 2001; Nunes et al., 2007; Pedernera et al., 2010).

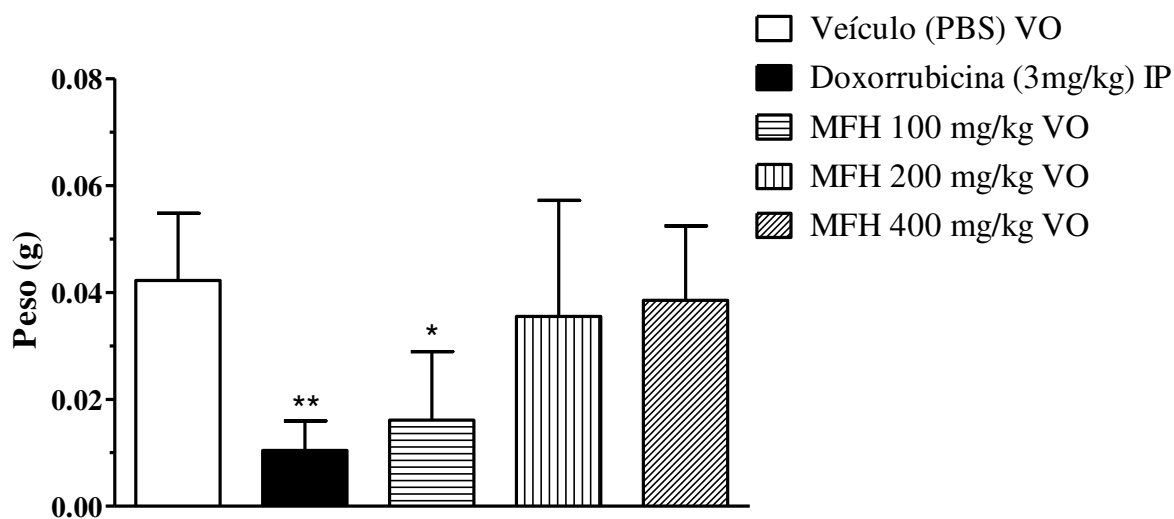
Os resultados obtidos (figura 18) sugerem que o extrato de *A. fraxinifolium*, nas doses de 100 e 200 mg/kg, produziu redução significativa do edema somente na segunda fase do processo inflamatório, quando a fase celular do processo é mais intensa. Viana e colaboradores (1997) obtiveram resultados semelhantes quando administraram oralmente uma fração rica em taninos extraídos da casca de *A. urundeuva* (*M. urundeuva*). Nesse trabalho, a fração rica em taninos inibiu de maneira significativa a migração de leucócitos dependentes e independentes da resposta inflamatória e de neutrófilos.

4.3.7. Tumor sólido de Ehrlich

Este experimento avaliou o MFH de *A. fraxinifolium* no modelo tumoral de Ehrlich sólido de flanco. Células tumorais foram inoculadas no tecido subcutâneo do flanco dos animais e o desenvolvimento tumoral foi acompanhado por 14 dias de tratamento, bem como os sinais clínicos dos animais. Neste modelo experimental, dose de 100 mg/kg reduziu significativamente o desenvolvimento tumoral (Figura 19). Em relação à porcentagem de redução do peso tumoral, os tratamentos apresentaram 75,24%, 61,90%, 15,90% e 27,75% de redução no peso tumoral para doxorrubicina (3 mg/kg) e para o extrato das folhas de *A. fraxinifolium* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente (Figura 20).

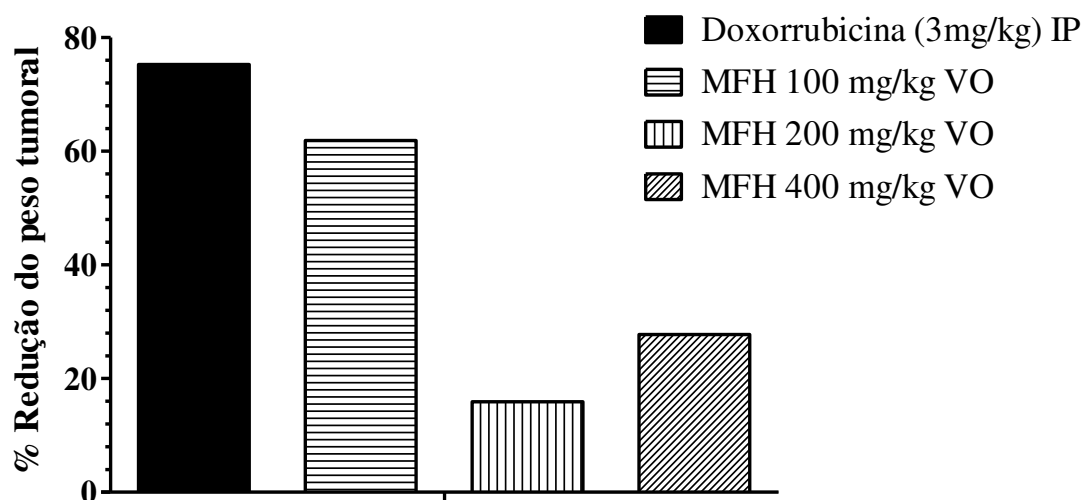
Além disso, o controle de massa corpórea dos animais, a cada três dias, avaliou os possíveis efeitos tóxicos da amostra e auxiliou na readaptação das doses de acordo com a massa corpórea dos animais (Figura 21). Ao final do 14º dia, os animais foram eutanasiados para retirada do coração, pulmão, fígado, rins, baço, útero e ovário que, a seguir, foram pesados e avaliados macroscopicamente para identificação de possíveis efeitos tóxicos durante o período de tratamento. Porém, nenhum dos parâmetros avaliados demonstrou diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle negativo.

Figura 19. Massa tumoral.



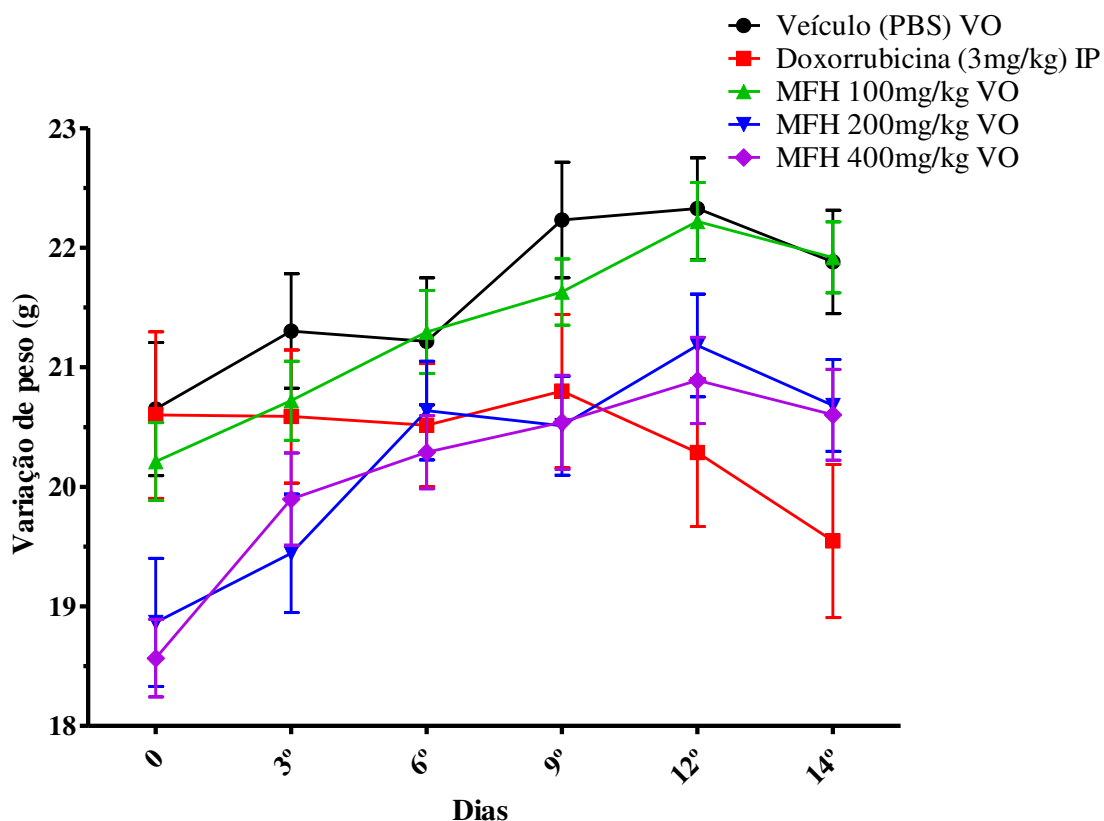
Massa tumoral representada pelo peso médio tumoral dos animais tratados com o quimioterápico doxorubicina, pela via intraperitoneal, e diferentes doses do MFH de *A. fraxinifolium*, pela via oral.

Figura 20. Porcentagem de inibição do crescimento tumoral.



Porcentagem de inibição do crescimento tumoral dos grupos tratados com o quimioterápico doxorubicina, pela via intraperitoneal, e diferentes doses de MFH de *A. fraxinifolium*, pela via oral, em comparação com o grupo controle negativo, tratado com PBS.

Figura 21. Variação da massa corpórea.



Variação da massa corpórea dos animais, aferidas a cada três dias, no decorrer dos dias experimentais do tumor sólido de Ehrlich com diferentes tratamentos; doxorrubicina, pela via intraperitoneal, e MFH de *A. fraxinifolium* em diferentes doses, pela via oral.

O câncer é um grupo de doenças que têm em comum o crescimento celular desregulado. Modelos experimentais de câncer transplantável possuem a vantagem de serem de baixo custo, fácil reprodutibilidade e acessibilidade (Cespedes et al., 2006).

O Tumor de Ehrlich é um tumor sólido, derivado de adenocarcinoma de mama murino, com características agressivas e de rápido crescimento, podendo se desenvolver nas formas ascítica e sólida, dependendo do local de inoculação (Segura et al., 2000; Nascimento et al., 2006; Silva et al., 2006; Gomes et al., 2008; Sakai et al., 2010). Além

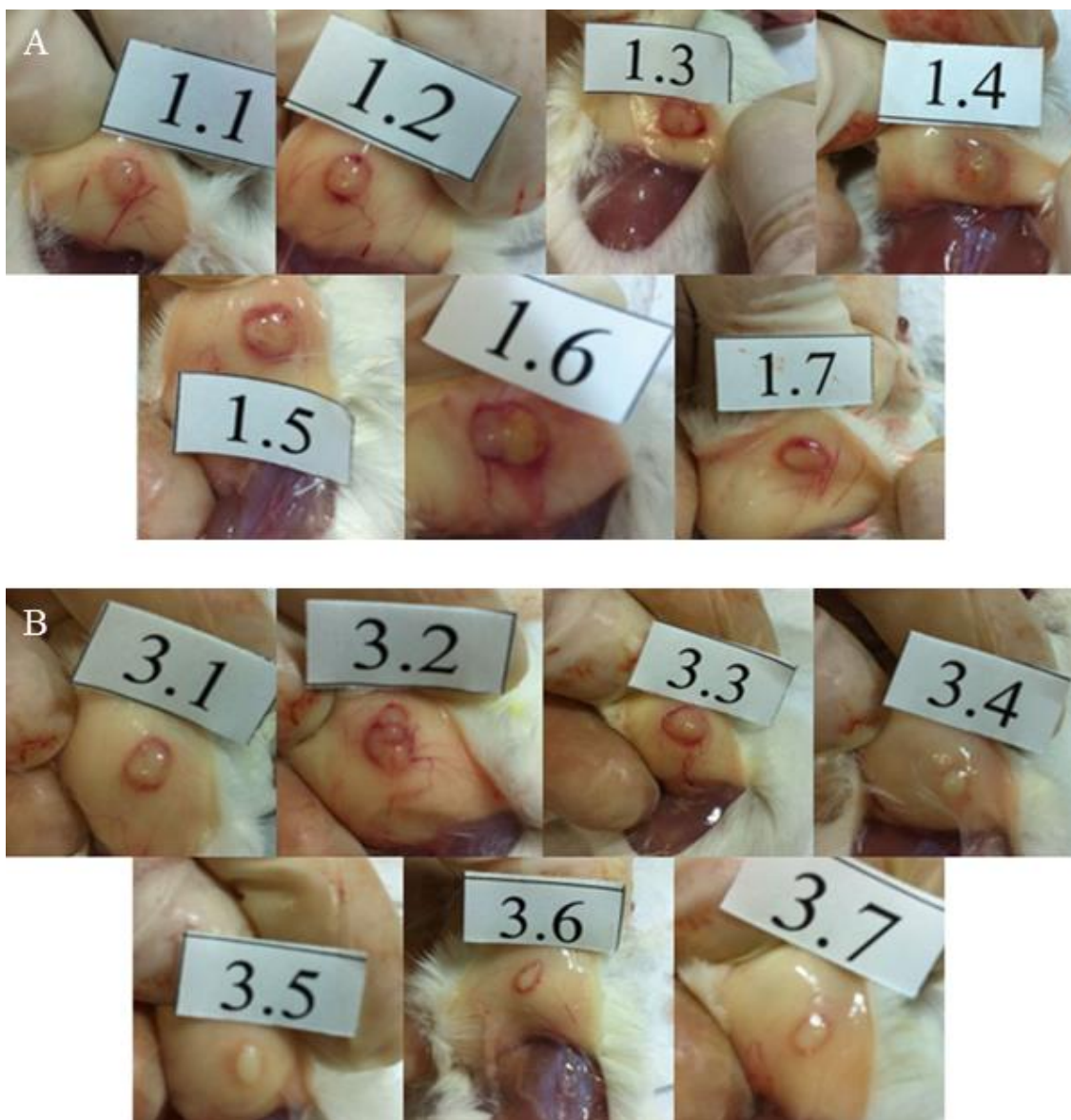
disso, o tumor de Ehrlich é indiferenciado, transplantável, com hiperdiploidia e sem antígeno específico de tumor. Assemelha aos tumores humanos, que são os mais sensíveis à quimioterapia, por ser indiferenciado e tem uma taxa de crescimento rápida (Ozaslan et al., 2011).

Diante disso, o modelo do câncer de Ehrlich confere vantagens quanto ao conhecimento prévio da quantidade e características iniciais da inoculação e, também, o rápido desenvolvimento do tumor torna o experimento com menor tempo de duração (Stewart, 1959).

O tumor sólido de Ehrlich foi inoculado no flanco dos animais, pois dessa maneira pode-se avaliar a atuação sistêmica do extrato de *A. fraxinifolium*. Nota-se que na menor dose (100 mg/kg) o extrato apresentou maior inibição do crescimento tumoral (Figura 19). Além do mais, mediadores inflamatórios, como interleucina-1 e TNF- α , participam de ambos os processos e contribuem para o processo da angiogênese (Aggarwal et al., 2006; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012).

Compostos que atuam no processo inflamatório podem atuar nesta via, consequentemente, o tumor não forma uma rede vascular e não é nutrido pelo sangue oxigenado, que resulta no não desenvolvimento tumoral. De acordo com os resultados obtidos em modelos de edema de orelha e de pata, pode-se sugerir que o extrato atuou no processo inflamatório presente no ambiente tumoral diminuindo seu crescimento. A figura 22 mostra os tumores nos animais, os tumores representados na figura 22a são os tratados com PBS, já os tratados com a dose de 100 mg/kg estão na figura 22b. Nota-se, visualmente, que ao redor dos tumores do grupo tratado com PBS ocorreu maior prevalência de vasos sanguíneos, enquanto que nos tratados com a dose de 100 mg/kg do MFH houve menor prevalência dos vasos sanguíneos ao redor.

Figura 22. Tumores sólidos de Ehrlich.



Tumores sólidos de Ehrlich inoculados no tecido subcutâneo do dorso dos animais que foram tratados, por via oral, com (A) PBS e (B) MFH de *A. fraxinifolium* na dose de 100 mg/kg.

Angiogênese é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são gerados a partir dos vasos pré-existentes. É uma parte integrante de ambos os processos de desenvolvimento e de numerosas patologias, que podem incluir o crescimento de tumores e metástases e

doenças inflamatórias. Plantas e compostos naturais com atividade antioxidante, também têm sido referidos como possuir propriedades anti-angiogênicas, devido à regulação de mediadores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Aisha et al., 2012). Além disso, grupos químicos presentes no extrato metanólico das folhas de *A. graveolens* foram capazes de atuar sobre fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Hernández et al., 2014).

Outras espécies do gênero *Astronium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* (*M. urundeuva*), demonstraram potente ação antioxidante. A atividade antioxidante pode ser relacionada com os teores de compostos polifenólicos dos extratos (Desmarchelier et al., 1999; Hernández et al., 2014). Além disso, a atividade antioxidante poderia desempenhar um papel importante na atividade anti-inflamatória (Desmarchelier et al., 1999).

Sendo assim, os dados demonstrados sugerem que o MFH de *A. fraxinifolium* atue em mediadores químicos que desempenham funções tanto em processos inflamatórios quanto em processos de desenvolvimento tumoral. Esses dados preliminares sugerem o aprofundamento dos estudos visando à identificação das vias comuns envolvidas nos efeitos anti-inflamatórios e antitumorais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na obtenção dos extratos brutos do caule e das folhas de *A. fraxinifolium*, o extrato de folhas possuiu melhor rendimento em relação ao de caule em ambos os métodos de extração. Sendo que, para o extrato de folhas, os métodos de extração demonstraram pouca diferença no rendimento entre eles. Assim, o método de extração por maceração dinâmica foi o escolhido por ser uma extração branda e de maior facilidade em relação ao sistema Soxhlet.

As análises realizadas por CCD indicaram a presença de flavonoides e taninos, sendo estes compostos majoritários nos extratos brutos. A avaliação por testes de colorimetria demonstrou reação positiva para flavonoides e para taninos hidrolisáveis no MFH.

No teste de atividade antiproliferativa em linhagens tumorais e não tumorais, os extratos brutos de caules e folhas de *A. fraxinifolium* demonstraram um perfil de atividade citostática nos diferentes tipos extração.

No modelo de úlcera induzido por indometacina, os MCH e MFH de *A. fraxinifolium* não demonstraram atividade gastroprotetora quando comparados com o grupo sem tratamento.

No modelo de antinocicepção, o MFH de *A. fraxinifolium* promoveu a diminuição do estímulo nociceptivo induzido pela formalina em ambas as fases, dor neurogênica e dor inflamatória, quando comparado com o grupo que não recebeu nenhum tratamento.

Nos modelos de inflamação, o MFH *A. fraxinifolium* demonstrou atividade quando administrado pela via tópica no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, por outro lado, não demonstrou atividade quando administrado pela via oral. No modelo de

edema de pata induzido por carragenina, o MFH de *A. fraxinifolium* demonstrou atividade anti-inflamatória e reduziu o edema dos grupos tratados.

No teste do tumor sólido de Ehrlich de flanco, o MFH de *A. fraxinifolium* promoveu uma regressão do crescimento tumoral. Sendo o tumor sólido de Ehrlich um modelo de câncer inflamatório, os resultados corroboram os dados demonstrados nos modelos de inflamação.

Porém, esses resultados sugerem a necessidade de testes complementares para a avaliação dos compostos que atuam nas atividades anti-inflamatória e antitumoral.

6. REFERÊNCIAS

- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical Pharmacology*, 72: 1605-21.
- Ahamed MS, Galal AM, Ross SA, Ferreira D, Elsohly MA, Ibrahim ARS, Mossa JS, El-Feraly FS. (2001). A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea* *Phytochemistry*, 58: 599-602.
- Aisha AFA, Salah KMA, Alrokayan SA, Ismail Z, Majid AMSA. (2012). Evaluation of antiangiogenic and antioxidant properties of *Parkia speciosa* Hassk extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25:7-14.
- Akinpelu DA. (2001). Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia*, 72: 286-287.
- Alarcón de la Lastra C, Martín MJ, Motilva V. (1994). Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*, 48: 56-62.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2010). *Biologia Molecular da célula*. 5ª edição, Artmed, Porto Alegre, 1396p.
- Aller MA, Arias JL, Arias JI, Sánchez-Patán F, Arias J. (2007). The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. *Medical Hypotheses*, 68: 202-209.
- Amorozo MCM, Gély A. (1988). Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais*, 4: 47-131.
- Anjaneyulu V, Babu IS, Connolly JD. (1994). 29-Hydroxymangiferonic acid from *Mangifera indica*. *Phytochemistry*, 35: 1301-1303.
- Anjaneyulu V, Satyanarayana P, Viswanadham KN, Jyothi VG, Rao KN, Radhika P. (1999). Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry*, 50: 1229-1236.
- Arapitsas P, Menichetti S, Vincieri FF, Romani A. (2007). Hydrolyzable Tannins with the Hexahydroxydiphenoyl Unit and the m-Depsidic Link: HPLC DAD-MS identification and model synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 48-55.
- Arapitsas P. (2012) Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135: 1708-1717.
- Arya R, Babu V, Ilyas M. (1989). Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. *Journal of the Indian Chemical Society* 66: 67-68.

Balkwill F, Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 357: 539–545.

Ban N, Kai M. (2009). Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *British Journal of Cancer*, 101: 363-371.

Barreto JC, Trevisan MT, Hull WE, Erben G, de Brito ES, Pfundstein B, Würtele G, Spiegelhalder B, Owen RW. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 5599-5610.

Béltran AE, Alvarez Y, Xavier FE, Hernanz R, Rodriguez J, Núñez AJ, Alonso MJ, Salices M. (2004). Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *European Journal of Pharmacology*, 499: 297–305.

Bruhn JG. (1989). The use of natural products in modern medicine. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 1: 117-130.

Cardona GR. *La Foresta di Piume-Manuale di Etnoscienza*; Laterza: Roma, 1985; p. 193.
Carlini EA. (1988). Estudos da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa) e outras. Editora: Central de Medicamentos, CEMEP/AFIP, Brasília, 87p.

Carlson RP, O'Neill-Davis I, Chang J, Lewis AJ. (1985). Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions*, 17: 197-204.

Cespedes MV, Casanova I, Parreno M, Manges R. (2006). Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 8: 318–329.

Chakraborty S, Roy M, Taraphdar AK, Bhattacharya RK. (2004). Cytotoxic effect of root extract of *Tiliacora racemosa* and oil of *Semecarpus anacardium* nut in human tumor cells. *Phytotherapy Research*, 18: 595–600.

Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. (1998). Tannins and Human Health: a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 421-464.

Cocon JM. (1988) *Food Toxicology, Principles and Concepts*. Marcel Dekker, New York, 313–319.

Coe FG, Anderson GL. (1996). Screening of medicinal plants used by the Garifuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 53: 29–50.

Correia SJ, David JP, David JM. (2006). Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, 29: 1287-1300.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60: 52-60.

Cragg GM, Newman DJ. (1999) Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation*, 17: 153-163.

Cruz GL. Dicionário das plantas úteis no Brasil. 1982. Co-editada em Difusão Editorial. Rio de Janeiro, RJ.

da Silva VC, Napolitano A, Eletto D, Rodrigues CM, Pizza C, Vilegas W. (2011). Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 17: 365–375.

Daud NH, Aung CS, Hewavitharana AK, Wilinon AS, Pierson JT, Roberts-Thomson SJ, Shaw PN, Monteith GR, Gidley MJ, Parat MO. (2010). Mango extracts and the mango component mangiferin promote endothelial cell migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5181-5186.

Deharo E, Baelmansa R, Gimenezb A, Quenevoc C, Bourdya G. (2004). *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. *Phytomedicine*, 11: 516-522.

Delfosse M. (2000). Ulc`ere peptique et Reflux gastro-oesophagien. *Journal Pharmaceutique de Belgique*, 55: 33–39.

Desmarchelier C, Lisboa Romão R, Coussio J, Ciccica G. (1999). Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 69–77.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of a natural therapeutic drug. *Life Sciences*, 64: 337–353.

Dubuisson D, Dennis SG. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4: 161-74.

Elmets CA, Viner JL, Pentland AP, Cantrell W, Lin HY, Bailey H, Kang S, Linden KG, Heffernan M, Duvic M, Richmond E, Elewski BE, Umar A, Bell W, Gordon GB. (2010). Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer with celecoxib: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 102: 1835–1844.

Engels C, Ganzle MG, Schieber A. (2010). Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high-speed countercurrent chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 775-780.

Engels C, Knodler M, Zhao YY, Carle R, Ganzle MG, Schieber A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7712-7718.

Engels C, Schieber A, Ganzle MG. (2011). Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from Mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2215- 2223.

Evans FJ, Schmidt RJ. (1980) *Planta Medica*, 38: 289-316.

Euchenhofer C, Maihöfner C, Brune K, Tegeder I, Geisslinger G. (1998). Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat. *Neuroscience Letters*, 248: 25–28.

Ezeigbo I, Ezeja M, Madubuike K, Ifenkwe D, Ukwani Ia, Udeh N, Akomas S. (2012). Antidiarrhoeal activity of leaf methanolic extract of *Rauwolfia serpentina*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2: 430-432.

Farmacopeia Brasileira. (2010) 5ª Edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 1448p.

Ferrandiz ML, Gil B, Sanz MJ, Ubeda A, Erazo S, González E, Negrete R, Pacheco S, Paya M, Alcaraz MJ. (1996). Effect of bakuchiol on leucocyte functions and some inflammatory responses in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48: 975–980.

Franca F, Lago EL, Marsden PD. (1996). Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29: 229–232.

Fröde TS, Souza GE, Calixto JB. (2001). The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, 13: 162–168.

Gábor M. (2000). *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 335p.

Gábor M. (2003). Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. *Inflammation protocols*, New Jersey: Humana Press, p.129-131.

Garcia D, Delgado R, Ubeira F, Leiro J. (2002). Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin. *International Immunopharmacology*, 2: 797–806.

Garcia D, Escalante M, Delgado R, Ubeira FM, Leiro J. (2003). Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytotherapy Research*, 17: 1203–1208.

Garcia D, Leiro J, Delgado R, Sanmartin ML, Ubeira FM. (2003). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytotherapy Research*, 17: 1182–1187.

García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Alcalde-Eon, C. (2010). Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, 660: 171–176.

Garrido G, Blanco-Molina M, Sancho R, Macho A, Delgado R, Muñoz E. (2005). An aqueous stem bark extract of *Mangifera indica* (Vimang) inhibits T-cell proliferation and TNF-induced activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Phytotherapy Research*, 19: 211–215.

Garrido G, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Núñez-Sellés AJ. (2004). Protection against septic shock and suppression of tumor and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (Vimang): Role of mangiferin isolated from extract. *Pharmacological Research*, 50: 165–172.

Garrido G, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez-Sellés AJ, Morales MA. (2001). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytotherapy Research*, 15: 18–21.

Garrido G, González D, Lemus Y, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R. (2006). Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition on eicosanoids production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine*, 13: 412–418.

Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, Quintero G, Delporte C, Núñez-Sellés A, Delgado R. (2004). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Pharmacological Research*, 50: 143–149.

Gatenby RA, Gillie, RJ. (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8: 56-61.

Gironi F, Piemonte V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*, 89: 857–862.

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Hovell AMC, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto AC, Fernandes PD. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 179-184.

Goncalves JLS, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MMFS, Romanos MTV, Santos NSO, Wigg MD. (2005). *In vitro* anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 403–407.

Green CA, Shuster S. (1987). Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 24: 381–384.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140: 883–899.

Gupta C, Garg AP, Gupta S. (2010). Antimicrobial and phytochemical studies of fresh ripe pulp and dried unripe pulp of *Mangifera indica* (AMCHUR). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5: 75-80.

Guyton AC, Hall JE. (2006). *Tratado de Fisiologia Médica*, 11ª Edição. São Paulo, Editora Elsevier, 1152p.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

Harborne JB, Williams CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481–504.

Hatano T, Yoshida T, Okuda T. (1988). Chromatography of tannins: III. Multiple peaks in high-performance liquid chromatography of some hydrolyzable tannins. *Journal of Chromatography A*, 435: 285–295.

Hernández P, Delgado R, Walczak H. (2006). *Mangifera indica* L. extract protects T cells from activation-induced cell death. *International Immunopharmacology*, 6: 1496–1505.

Hernandez P, Rodriguez PC, Delgado R, Walczak H. (2007). Protective effect of *Mangifera indica* L. polyphenols on human T lymphocytes against activation-induced cell death. *Pharmacological Research*, 55: 167–173.

Hernández V, Malafronte N, Mora F, Pesca MS, Aquino RP, Mencherini T. (2014). Antioxidant and antiangiogenic activity of *Astronium graveolens* Jacq. leaves. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 28: 917-922.

Hernández V, Mora F, Meléndez P. (2012). A study of medicinal plant species and their ethnomedicinal values in Caparo Barinas, Venezuela. *Emirates Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 128–132.

Hunskar S, Hole K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30: 103-114.

Hussain SP, Harris C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*, 121: 2373–2380.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>, acesso em 10/03/2014.

- Izzo AA, Di Carlo G, Mascolo N, Autore G, Capasso F. (1994). Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytotherapy Research*, 6: 179–181.
- Khan MA, Nizami SS, Khan MNI, Azeem SW, Ahmed Z. (1994). New triterpenes from *Mangifera indica*. *Journal of Natural Products*, 57: 988–991.
- Kim Y, Lounds-Singleton AJ, Talcott ST. (2009). Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 115: 989-993.
- Kudi AC, Umoh JU, Eduvie LO, Gefu J. (1999). Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 225–228.
- Kubo J, Lee JR, Kubo I. (1999). Anti-Helicobacter pylori Agents from the Cashew Apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 533-537.
- Kundu JK, Surh YJ. (2012). Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 52: 2013–2037.
- Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MAS, Lima TCM. (2008). Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5ª. Ed. Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM.
- Leiro J, García D, Arranz JA, Delgado R, Sanmartín ML, Orallo F. (2004). An Anacardiaceae preparation reduces the expression of inflammation-related genes in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 4: 991–1003.
- Leite EJ. (2002). State of knowledge on *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 5: 63-77.
- Lin YM, Chen FC, Lee KH. (1989). Hinokiflavone, a cytotoxic principle from *Rhus succedanea* and the cytotoxicity of the related biflavonoids. *Planta Medica*, 55: 166-168.
- Lin YM, Chen FC. (1974a). Agathisflavone from the drupes of *Rhus succedanea* *Phytochemistry*, 13: 657-658.
- Lin YM, Chen FC. (1974b). Robustaflavone from the seed-kernels of *Rhus succedanea* *Phytochemistry*, 13: 1617-1619.
- Lin YM, Zembower DE, Flavin MT, Schure RM, Anderson HM, Korba BE, Chen FC. (1997). Robustaflavone, a naturally occurring biflavanoid, is a potent non-nucleoside inhibitor of hepatitis B virus replication *in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7: 2325-2328.
- Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 09 Mar. 2014.

- Litchfield Jr. JT, Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96: 99-113.
- Macedo MI, Ferreira AR. (2004). Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14: 40-44.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25: 429-438.
- Maisuthisakul P, Gordon MH. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*, 117: 332-341.
- Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ET, Mera R, Miller MJ, Correa P. (1996). Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Research*, 56: 3238-3243.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454: 436-444.
- Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H, Jahim JM. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn. Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52: 487-496.
- Marks F, Fürstenberger G. (1990). The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11: 2085-2092.
- Marti-Bonmati E, Aliño SF, Lloris JM, Esplugues J (1980). Effects of cimetidine, atropine and prostaglandin E2 on rat mucosal erosions produced by intragastric distension. *European Journal of Pharmacology*, 68: 49-53.
- Martin MJ, Motilva V, Alarcon de la Lastra, C. (1993). Quercetin and naringenin: Effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Phytotherapy Research*, 7: 150-153.
- Martinez G, Candelario-Jalil E, Giuliani A, León OS, Sam S, Delgado R, Núñez-Sellés AJ. (2001). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) reduces ischemia-induced neuronal loss and oxidative damage in the gerbil brain. *Free Radical Research*, 35: 465-473.
- Martinez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez-Sellés AJ (2001). Effect of *Mangifera indica* L. extract (QF808) on protein and hepatic microsomes peroxidation. *Pharmacological Research*, 15: 581-585.
- Masibo M, He Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 309-319.

- Mathivadhani P, Shanthi P, Sachdanandam P. (2007). Effect of *Semecarpus anacardium* nut extract on ECM and proteases in mammary carcinoma rats. *Vascular Pharmacology*, 46: 419–426.
- Matos FJA. (1989). *Plantas Medicinais. Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do Brasil. Vol.01.* UFCE, Fortaleza, 394p.
- McCall WD, Tanner KD, Levine JD. (1996). Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neuroscience Letters*, 208: 45–48.
- Menezes AM, Rao VS (1988). Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21: 531–533.
- Mesesane IB, Yeboah SO, Liebscher J, Mügge C, Abegaz BM. (2000). A bichalcone from the twigs of *Rhus pyroides*. *Phytochemistry*, 53: 1005-1008.
- Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tilleguin F, Espindola LS. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 439–445.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766.
- Montesano R, Hall J. (2001). Environmental causes of human cancer. *European Journal of Cancer*, 37: 67-87.
- Moroney MA, Alcaraz MJ, Folder RA, Carey F, Hoult SRS. (1988). Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by anti-inflammatory flavonoid-glycoside and related aglycone flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40: 787–792.
- Mota MLR, Thomas G, Barbosa JM. (1985). Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 13: 289–300.
- Mueller-Harvey I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3–20.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukuda Y. (2006). Involvement of necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-o-tetradecaoylphorbol-13-acetate (TPA)- induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology*, 71: 1331–1336.
- Nascimento FR, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro ESB, Guerra RNM. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*, 78: 2650-2653.

NCI-EUA, Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Disponível em: <http://www.cancer.gov>, acesso em 10/03/2014.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022–1037.

Newman DJ, Cragg GM. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70: 461–477.

Newman DJ, Cragg GM. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75: 311–335.

Nithitanakool S, Pithayanukul P, Bavovada R, Saparpakorn P. (2009). Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules*, 14: 257-265.

Nithitanakool S, Pithayanukul P, Bavovada R. (2009). Antioxidant and hepatoprotective activities of Thai mango seed kernel extract. *Planta Medica*, 75: 1118-1123.

Noratto GD, Bertoldi MC, Krenek K, Talcott ST, Stringheta PC, Mertens-Talcott SU. (2010). Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 4104-4112.

Nunes FP, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa-e-Silva MC. (2007). Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, 49: 1090-1098.

Ognjanovic S, Hainaut P. (2010). Inflammation in Carcinogenesis. *Comprehensive Toxicology*, 14: 401–415.

Okuda T, Ito H. (2011) Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16: 2191–2217.

Okuda T, Yoshida T, Hatano T. (1989) Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica*, 55: 117–122.

Ozaslan M, Karagoz ID, Kilic IH, Guldur ME. (2011). Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 10: 2375–2378.

Pedernera AM, Guardia T, Calderón CEG, Rotelli AE, de la Rocha NE, Saad J R, López Verrilli MA, Aseff SG, Pelzer LE. (2010). Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. *Inflammopharmacology*, 18: 253-260.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. (2004). Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142: 331-338.

Posey DA, Ribeiro BG. (1986). Suma Etnológica Brasileira-1. Etnobiologia; Editora Vozes, Petrópolis, p.302.

Prance GT. (1991). What is ethnobotany today? Journal of Ethnopharmacology, 32: 209–216.

Prance GT. (1992). Out of the Amazon; HMSO: London. 27: 188–188.

Puig S, Sorkin LS. (1996). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. Pain, 64: 345–355.

Puignero V, Queralt J. (1997). Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. Inflammation, 21: 431–442.

Quideau S, Feldman KS. (1996). Ellagitannin Chemistry. Chemical Reviews, 96: 475–504.

Rainsford KD. (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century. Subcellular Biochemistry, 42: 3–27.

Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. Inflammation, 17: 723–741.

Rao VSN, Viana GSBV, Menezes AMS, Gadelha MGT. (1987). Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 20: 803–805.

Raposo MJ, Melo Jr EJM, Neto JAL, Diniz MFA, Marcelino, Jr CAC, Sant'ana AEG. (2002). Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. Phytomedicine, 9: 109–116.

Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology, 20: 522–531.

Ribeiro SMR, Barbosa LCA, Queiroz JH, Knodler M, Schieber A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Food Chemistry, 110: 620–626.

Rivera DG, Balmaseda IH, León AA, Hernández BC, Montiel LM, Garrido GG, Cuzzocrea S, Hernández RD. (2006). Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 58: 385–392.

Robbins SL, Contran, RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2004). Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Elsevier, 1616p.

Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. (2011). Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*, 377: 31–41.

Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quinteiro-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli ML, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. (2010). Translocator protein (18kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 626: 131–138.

Santin DA. (1991). *Astronium nelson-rosae* - nova espécie de Anacardiaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 14:103-106.

Sa-Nunes A, Rogério AP, Medeiros AI, Fabris VE, Andreu GP, Rivera DG, Delgado R, Faccioli LH. (2006). Modulation of eosinophil generation and migration by *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *International Immunopharmacology*, 6: 1515–1523.

Schultes RE. (1962). The role of the ethnobotanist and explorer of the Northwest Amazon and Northern Andes. *Lloydia*, 25, 257–266.

Seibert K, Zhang Y, Leahy, K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson, PC (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 12013–12017.

Segura JA, Barbero LG, Márquez J. (2000). Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Journal Immunology Letter*, 74: 111-115.

Sharma P, Vidyasagar G, Bhandari A, Singh S, Bhadoriya U, Ghule S, Dubey, N. (2012). A pharmacological evaluation of antidiarrhoeal activity of leaves extract of *Murraya koenigii* in experimentally induced diarrhoea in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2: 230-233.

Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI. (2010). Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain*, 151: 422–429

Shoemaker RH. (2006). The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6: 813-823.

Silva LA, Nascimento KA, Maciel MC, Pinheiro MT, Sousa PR, Ferreira SC, Azevedo AP, Guerra RN, Nascimento FR. (2006). Sun flower seed oil-enriched product can inhibit Ehrlich solid tumor growth in mice. *Chemotherapy*, 52: 91–94.

Singh D, Aggarwal A, Mathias A, Naik S. (2006). Immunomodulatory activity of *Semecarpus anacardium* extract in mononuclear cells of normal individuals and rheumatoid arthritis patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 398–406.

Soong YY, Barlow PJ. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97: 524-530.

Sowmiya S, Soundarapandian P, Rajan S. (2009). Bioactive studies of *Mangifera indica* against bacteria isolated from urine samples. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 1: 139-143.

Spector WG, Willoughby DA. (1963). The inflammatory response. *Bacteriological Reviews*, 27: 117–154.

Stewart HL. (1959). The Cancer Investigator. *Cancer Research*, 19: 804-818.

Strohl WR. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, 5: 39-41.

Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z. (2010). Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. *Inflammation*, 33: 224-234.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. (1995). Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *The Journal of Neuroscience*, 15: 7575–7584.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. (1997). Early nociceptive events influence the temporal profile, but not the magnitude, of the tonic response to subcutaneous formalin: effects with remifentanyl. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280: 876–83.

Tchikaya FO, Datte VJ, Bantsiele GB, Offoumou AM. (2003). Effets Pharmacologiques de l'extrait aqueux de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) sur la pression sanguine artérielle de Lapin et sur l'artère aorte de cobaye. *Revue de Medecine et Pharmacopée Africaine*, 17: 41–46.

Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR, Coelho J. (2007). Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44: 96-102.

Tian F, Li B, Ji B, Zhang G, Luo Y. (2009). Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis* LWT. *Food Science and Technology*, 42: 1289–1295.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51: 5–17.

Tyman JHP. (1979). Non-isoprenoid long chain phenols. Chemical Society Reviews, 8: 499-537.

Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. (2012) Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Current Pharmaceutical Design, 18: 3831–3852.

Viana GSBV, Bandeira MAM, Matos FJA. (2003). Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemao. Phytomedicine, 10: 189-195.

Viana GSBV, Bandeira MAM, Moura LC, Souza MVP, Matos FJA, Ribeiro RA. (1997). Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. Phytotherapy Research, 11: 118-122.

Vogl O, Mitchell JD. (1996). Oriental lacquer .11. botany and chemistry of the active components of poisonous Anacardiaceae. Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry, 33: 1581-1599.

Vogl O, Qin M, Mitchell JD. (1995). Oriental lacquers .7. botany and chemistry of japanese lacquer and the beauty of the final art-objects. Cellulose Chemistry and Technology, 29: 273-286.

Wang HQ, Kim MP, Tiano HF, Langenbach R, Smart RC. (2001). Protein kinase C-alpha coordinately regulates cytosolic phospholipase A(2) activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. Molecular Pharmacology, 59: 860–866.

Weinberg RA. (2008). A biologia do câncer. 1ª edição, Editora: Artmed, Porto Alegre, 864p.

Young JM, Wagner B, Spires DA. (1983). Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. Journal of Investigative Dermatology, 80: 48-52.

Zafred RRT, Silva LP. (2011). Genotoxicidade do extrato etanólico de caule de *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae). Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Assis, São Paulo.

Zembower DE, Lin Y, Flavin MT, Chen F, Korba BE. (1998). Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. Antiviral Research, 39: 81-88.

Zhang R, Kang KA, Kim KC, Na SY, Chang WY, Kim GY, Kim HS, Hyun JW. (2013). Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. Genetics, 524: 214–219.

7. ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada
Avaliação das atividades farmacológicas dos extratos brutos de *Astronium fraxinifolium* Schott.
(Anacardiaceae)

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e
biossegurança.

Tem autorização da seguinte Comissão:

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 3029-1; 3030-1; 3362-1; 3363-
1; 3364-1, Instituição: Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização
dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese
ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do
aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Rafael Rosolen T. Zafred
Aluno: Rafael Rosolen Teixeira Zafred

João Ernesto de Carvalho
Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

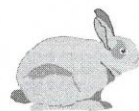
Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da atividade locomotora dos animais após administração dos extratos brutos de *Astronium fraxinifolium*" (protocolo nº 3463-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Rafael Rosolen Teixeira Zafred, 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 06 de agosto de 2014.

Campinas, 06 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da atividade antitumoral dos extratos brutos de *Astronium fraxinifolium*" (protocolo nº 3464-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Rafael Rosolen Teixeira Zafred, 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 06 de agosto de 2014.

Campinas, 06 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva