

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Luciana Jankowsky

**ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS
OBTIDOS A PARTIR DE RESÍDUOS MADEIREIROS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luciana Jankowsky
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.


Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Campinas

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIDADE	BC
UF CAMPUS	UNICAMP
	J259a
V	EX
TOMBO BC/	66401
PROC.	16-123-06
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	09/02/06

bibid 374903

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

J259a

Jankowsky, Luciana

Atividade farmacológica de extratos obtidos a partir de resíduos madeireiros / Luciana Jankowsky. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Agentes antineoplásicos. 2. Resíduos vegetais. 3. Drogas antiulcerogênicas. 4. Hipnotismo. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Pharmacological activity from extracts obtained of lumber residue.

Palavras-chave em inglês: Antineoplastic agents; Wood waste; Antiulcer drugs; Hypnotism.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho, Graciela Muniz, Adriana Maria Nolasco.

Data da defesa: 22/11/2005.

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)

Profª. Dra. Graciela Ines Bolzon de Muniz

Assinatura

Assinatura

Profa. Dra. Adriana Maria Nolasco


Assinatura

Profa. Dra. Márcia Aparecida Antônio

Assinatura

Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Assinatura

"Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã, que com muito amor e paciência me auxiliaram em todos os momentos, sempre me inspirando e orientando."

"SEU AMOR

Deixe Seu amor agir em minha voz e descansar em meu silêncio.

Deixe-o atravessar meu coração e alcançar meus momentos.

Deixe Seu amor brilhar, como as estrelas, na escuridão de meu sono e amanhecer em meu despertar.

Deixe-o arder na chama de meus desejos e fluir nas correntezas de meu próprio amor.

Deixe-me levar Seu amor em minha vida como a harpa leva a música, e devolvê-lo por fim a Você com minha vida."

(Rabindranath Tagore)

"O impossível existe somente na mente dos acomodados."

Prof. Dr.IVALDO P. JANKOWSKY.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos Budas, pelo amor com que me conduziram neste caminho abençoado.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela paciência e orientação.

Aos meus pais, pelo suporte emocional e amor incondicional.

A minha irmã, Mayra, pelo amor, amizade, paciência e compreensão.

Aos queridos amigos e amigas Ligia, Ana Lydia, Cristina, Thiago, Daniel, Rafael, Fábio, Marcelo e Thomaz pelo carinho e amizade sinceros, nos melhores e piores momentos durante este trabalho.

A Marina e a Cristiana, pela ajuda e amizade.

A Sirlene Tinti e a Ana Possenti, pelos ensinamentos e pela amizade durante esses anos de trabalho.

As amigas Juliana, Marcilene, Marília, Érica, Márcia, Ana Lúcia, Carina, Alik, Calú, Karin e Luciana pela ajuda e companheirismo.

A Profa. Dra Mary Ann Foglio, pelo conselhos e alegria.

A querida Liliam Panagio, sempre prestativa e muito paciente.

Ao Prof. Dr. José Otávio Brito pelo auxílio e estímulo.

Aos funcionários do Laboratório de Química, Celulose e Energia, Esalq/USP, pela imprescindível ajuda.

A Ilsa, ao Rodney e todos os amigos da Divisão de Fitoquímica, pela paciência e carinho durante todo o desenvolver do trabalho.

Ao Sr. José Antonio Baggio e ao Eng. Marcos Ducatti, da Indusparquet Indústria e Comércio de Madeiras Ltda, pelo fornecimento dos resíduos utilizados neste trabalho, sempre nos atendendo com presteza e cordialidade.

Ao Dr. João P. Chimelo, pela identificação anatômica do material utilizado no presente trabalho.

A CAPES, pela concessão de uma bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade.

A todas as pessoas que ao longo destes anos, contribuíram, muitas vezes de forma anônima, para a concretização deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

RESUMO

O conhecimento sobre plantas medicinais constitui, inúmeras vezes, o único recurso terapêutico de diversas comunidades e a busca de novos compostos bioativos a partir da rica biodiversidade brasileira é uma estratégia com reflexos econômicos e sociais reconhecidamente positivos. Adicionalmente, parte da floresta tropical é explorada para a produção de madeira, gerando anualmente cerca de 10 milhões de toneladas de resíduos, nos diversos processos industriais de manufatura. Unindo a busca de princípios ativos com a possibilidade de uso dos rejeitos da indústria madeireira, a presente pesquisa teve por principal objetivo avaliar a potencial aplicação farmacológica do extrato bruto diclorometânico (EDB) e do extrato bruto etanólico (EBE), obtidos a partir dos resíduos de quatro espécies tropicais (*Tabebuia* sp, *Bowdichia nitida*, *Dipteryx odorata* e *Myroxylon balsamum*). Inicialmente todos os extratos foram testados para averiguar possível atividade anticâncer, em cultura de células tumorais humanas. O EBD de *Tabebuia* sp, na concentração de 2,5 µg/mL, apresentou ação citocida para as linhagens tumorais representativas de adenocarcinoma ovariano, melanoma e leucemia. O EBE da *B. nitida* demonstrou atividade citocida, na concentração de 25 µg/mL para as linhagens tumorais representativas de adenocarcinoma prostático, leucemia e melanoma. O EBD de *D. odorata*, na concentração de 25 µg/ml, apresentou atividade citocida seletiva para leucemia e carcinoma ovariano. O EBD de *M. balsamum* demonstrou ação citocida, na concentração de 25 µg/mL, para as linhagens tumorais representativas de melanoma, adenocarcinoma colorretal, prostático e renal, carcinoma mamário e mamário-resistente, leucemia. Entre os extratos ativos o EBD de *M. balsamum* foi selecionado para estudos em outros modelos experimentais. No teste geral de atividade em camundongos esse extrato apresentou atividade depressora do sistema nervoso central (SNC), chegando a produzir hipnose profunda, e atividade antinociceptiva. Em modelos de úlcera gástrica reduziu as ulcerações produzidas por antiinflamatório e etanol e, em ligadura de piloro reduziu a secreção ácida. A

atividade farmacológica do EBD de *M. balsamum* observada em diversos modelos experimentais pode ser consequência da variedade de compostos químicos presente no extrato, indicando a necessidade de estudos para determinação do mecanismo de ação e identificação dos princípios ativos.

Palavras Chave: resíduos madeireiros, atividade anticâncer, atividade antiulcerogênica, hipnose.

ABSTRACT

The knowledge about the use of medicinal plants is, innumerable times, the only therapeutic resource for several communities; and to search new bioactive compounds from Brazilian biodiversity is one strategy with positive economic and social consequences. Additionally, part of the tropical forest is explored for lumber and wood based products, generating annually about 10 million tons of residues, in the industrial manufacture processes. Joining the search of active principles with the possibility to use of lumber industry reject, the present research had as main objective to evaluate the potential for pharmacologic application of dichloromethane gross extract (EDB) and ethanol gross extract (EBE), extracted from residues of four tropical species (*Tabebuia* sp, *Bowdichia Nitida*, *Dipteryx odorata* e *Myroxylon balsamum*). Initially all the extracts had been tested to anticancer activity, in cultured human tumor cells. The EBD of *Tabebuia* sp, at concentration of 2,5µg/mL, presented cytocide activity to ovarium carcinoma, melanoma and leukemia. The EBE of *B. nitida* at 25µg/mL concentration showed cytocide activity to prostate adenocarcinoma, leukemia and melanoma. The EBD of *D. odorata*, at concentration of 25µg/ml, presented selective cytocide activity for leukemia and ovarium carcinoma. EBD of *M. balsamum* demonstrated cytocide action, at concentration of 25 µg/mL, to melanoma, leukimia, breast and breast-resistant carcinoma, prostate, colon and kidney adenocarcinoma. The EBD of *Myroxylon balsamum* was experimented in other models, resulting depressing activity on central nervous system (CNS), such as hypnosis; antinoceptive action and antiulcer action. The wide range of *M. balsamum* EDB could be attributed to its particular chemical composition. Those results stimulate the continuity of studies with lumber residues, in the search of new therapeutic drugs.

Key words: lumber residue, anticancer activity, antiulcer activity, hypnosis.

Índice	página
Dedicatória	iv
Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Abstract	x
Introdução	1
Objetivos	8
Material arbóreo	10
1. Ipê – <i>Tabebuia</i> sp (Bignoniaceae)	11
2. Sucupira – <i>Bowdichia nítida</i> (Spr.) Benth (Fabaceae)	11
3. Cumaru – <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae)	12
4. Cabreúva vermelha – <i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms (Fabaceae)	12
Material e métodos	14
1. Coleta e identificação dos resíduos	15
2. Obtenção dos extratos brutos	16
3. Ensaios farmacológicos	17
3.1. Teste “ <i>in vitro</i> ”	17
3.2. Testes “ <i>in vivo</i> ”	23
Resultados	31
1. Resultados dos ensaios da atividade anticâncer dos extratos brutos	32
2. Resultados da avaliação farmacológica do extrato bruto diclorometânico de <i>Myroxylon balsamum</i>	42
2.1. Teste de atividade geral (screening hipocrático)	42
2.2. Avaliação da atividade do Sistema Nervoso Central (SNC)	42
2.3. Atividade antinociceptiva	46
2.4. Atividade antulcerogênica	48

Discussão	55
Conclusões	73
Referências Bibliográficas	74
Apêndices	83

INTRODUÇÃO

No início do século XX os medicamentos de origem vegetal constituíam a base para a terapia medicamentosa, mas devido à rápida introdução de novas drogas através do desenvolvimento da síntese orgânica, atualmente cerca de 50% dos medicamentos são de origem sintética e cerca de 25% são originários de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal (Carvalho, 2001).

Segundo Maciel et al (2002), o conhecimento sobre plantas medicinais constitui, muitas vezes, o único recurso terapêutico para muitas comunidades; sendo este conhecimento valorizado e transmitido de geração a geração. Terapias convencionais, com tratamento medicamentoso elaborado através do processo industrial, podem apresentar restrições quanto a eficiência, manifestações de reações colaterais indesejadas (Rates, 2001) e o custo elevado (Maciel et al., 2002). Num país em desenvolvimento e com rica biodiversidade, seria razoável que a procura por novos medicamentos deva incluir também as plantas medicinais. Nos grandes centros urbanos e especialmente nas regiões mais pobres do país, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e até mesmo cultivadas em residências para consumo próprio (Maciel et al., 2002).

O Brasil com clima tropical tem cerca de 60% de sua extensão territorial coberta por florestas, divididas em tropicais (maior parte), cerrado e floresta atlântica. Tal variabilidade ambiental denota uma das mais elevadas taxas de biodiversidade e, especificamente para as florestas tropicais, uma enorme diversidade biológica e genética (Pavan-Fruehauf, 2000). Estima-se que cerca de 20% da biodiversidade mundial encontra-se nas florestas brasileiras (Suffredini et al., 2004), sendo a floresta tropical a que apresenta maiores probabilidades para a descoberta de novas drogas (Stepp, 2004).

Este quadro revela um potencial imenso para os estudos de plantas medicinais, pois se estima que a possibilidade de elaboração de novos medicamentos é proporcional ao número de espécies existentes (Pavan-Fruehauf, 2000). Visando otimizar o processo para obtenção de novos princípios ativos de origem natural, novas tecnologias têm sido introduzidas de forma a promover inovações na indústria farmacêutica (Seidl, 2002).

Para o estudo científico de plantas medicinais é preciso uma abordagem interdisciplinar, pois este envolve processos como seleção das espécies vegetais e estudos etnofarmacológicos, botânicos, agrônômicos, fitoquímicos e farmacológicos (Pavan-Fruehauf, 2000; Maciel et al., 2002). Ao iniciar uma pesquisa com plantas medicinais podem-se utilizar informações científicas e/ou de origem popular. O passo seguinte consiste na identificação das espécies, assim como sua disponibilidade para pesquisa, considerando fatores ambientais e ecológicos para sua execução. Economicamente, a conservação de plantas medicinais compreende aspectos sociais como as atividades relacionadas ao plantio, ao processo de comercialização e a melhoria nas condições básicas de assistência à saúde (Elisabetsky, 1987; Rates, 2001).

Sabe-se que a planta produz uma diversificada gama de substâncias diferentes, e apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica, portanto se faz necessário dispor de testes farmacológicos relativamente simples, mas sensíveis, para detectar a atividade procurada nos extratos e frações obtidos (Hamburger & Hostettmann, 1991). A procura de princípios ativos de origem vegetal apresenta limitações como sazonalidade, tempo de crescimento e quantidade de matéria bruta necessária para obtenção de doses mínimas dos extratos. Tais características ocasionam dificuldades no decorrer do desenvolvimento do estudo; sendo necessário procurar estratégias para solucionar ou, ao menos, amenizar o problema (Cragg & Newman, 1999). Adicionalmente, são citados como obstáculos a ampla variedade de compostos

químicos encontrados e a necessidade de reprodutibilidade da atividade dos extratos (Cordell, 2000).

Os princípios ativos podem ser obtidos a partir das diferentes partes do vegetal, como folhas, flores, raízes e caule. Nas espécies arbóreas tropicais o caule, ou tronco, usualmente é explorado para a obtenção de madeira, e raramente avalia-se a possibilidade da extração de substâncias químicas. Considerando as espécies vegetais arbóreas, o Brasil apresenta vantagens comparativas que ampliam consideravelmente o potencial para obtenção (identificação ou isolamento) de princípios ativos para fins medicinais. Como anteriormente salientado, as florestas brasileiras, notadamente a Floresta Tropical ou Amazônica, possuem a maior diversidade de espécies arbóreas do mundo. De acordo com Siqueira & Souza (1990), a Floresta Amazônica apresenta um volume de madeira entre 150 e 250 metros cúbicos por hectare, constituída, na maioria dos casos, de 300 a 1000 espécies diferentes.

A exploração comercial dessa riqueza natural é regulada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), órgão executor das políticas estabelecidas pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA). Uma das exigências legais é a execução de um Plano de Manejo Florestal Sustentável (Instrução Normativa número 4, de 04/03/2002, MMA).

O manejo sustentável pode ser conceituado como a administração da floresta para obtenção de benefícios econômicos e sociais, respeitando-se os mecanismos de sustentação do ecossistema (IBAMA, 2003). Na prática, esse conceito implica na extração constante de diferentes espécies arbóreas, predominantemente direcionadas para a produção de madeira serrada.

Na extração da tora são gerados resíduos florestais (folhas, galhos, frutos), e na produção da madeira serrada e na manufatura de seus produtos são gerados resíduos industriais ou madeireiros.

Esses resíduos (madeireiros) se destacam como uma fonte pouco explorada e, apesar do benefício social gerado pela indústria madeireira, agrega pouco valor ao produto final; por isso faz-se necessário a procura de alternativas para o aproveitamento desse material (Iwakiri, 2000). Uma vez que a manufatura de produtos a base de madeira está concentrada em um número reduzido de espécies (considerando-se a diversidade total), pode-se prever que o conveniente emprego dos resíduos dessas espécies na busca de princípios ativos poderá proporcionar vantagens, como por exemplo, a disponibilidade constante de considerável volume para a realização do processo extrativo e a subsequente avaliação farmacológica.

Os resíduos da industrialização da madeira, ilustrados na Figura 1, podem ser classificados em dois grupos (Borges, 1993):

- a) grossos: apresentam dimensões maiores como aparas, costaneiras, pontas, raspas, cavacos;
- b) finos: apresentam dimensões pequenas, como serragem.

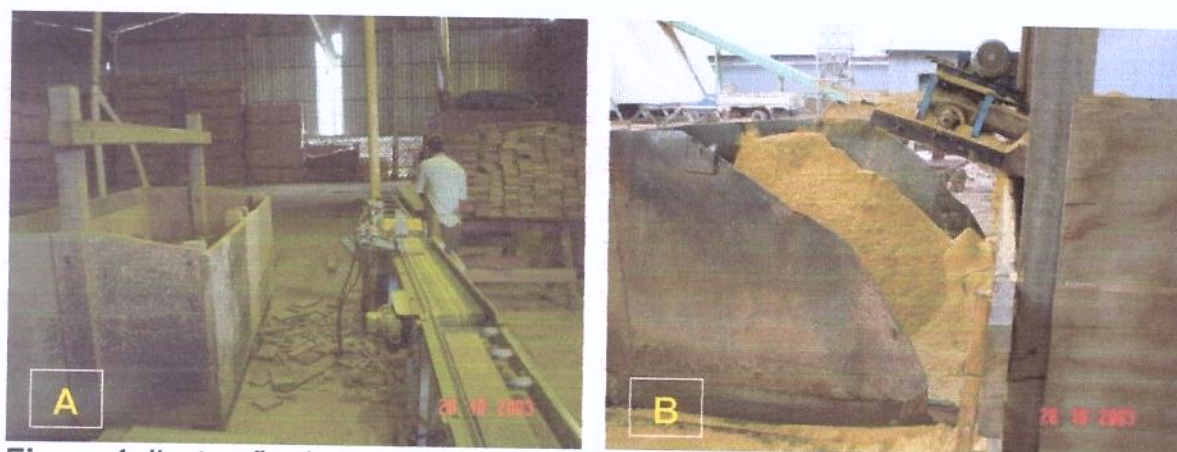


Figura 1. Ilustração dos resíduos madeireiros dos tipos grosso (A) e fino (B).

O consumo total de madeira em toras no Brasil é da ordem de 300 milhões de metros cúbicos por ano (Freitas, 2004). Cerca de 9,3% desse volume é representado por espécies tropicais, destinadas a produção de madeira serrada e produtos derivados (ABIMCI, 2003). Embora a participação percentual das espécies tropicais seja pequena, o processo de transformação mecânica em serrados é o que gera a maior quantidade de resíduos na indústria.

O índice de conversão de toras em madeira serrada é da ordem de 40 a 60% significando, em termos médios, que para cada metro cúbico de madeira produzido é gerada quantidade equivalente de resíduos, na forma de serragem, costaneira e outros pedaços menores. Esses resíduos, quando utilizados, destinam-se principalmente à queima para geração de energia (Iwakiri, 2000).

Adicionalmente, quando a madeira serrada é industrialmente transformada em outros produtos (como pisos, por exemplo), cerca de 50% do volume inicial é perdido na forma de resíduos, ao longo do processo de beneficiamento (Jankowsky, Luiz & Andrade, 2004).

A partir das informações de produção e consumo de madeira divulgadas pela ABIMCI (2003), pode-se estimar que anualmente são gerados 10 milhões de toneladas de resíduos de madeiras tropicais, sendo que aproximadamente 2,0% (0,2 milhões de toneladas) são gerados nas indústrias de pisos de madeira maciça.

A madeira é constituída basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Em adição a estes componentes principais, encontram-se compostos solúveis em água e em solventes orgânicos, intitulados extrativos; estes podem ser: 1. terpenos e derivados; 2. compostos fenólicos (flavanóides, estilbenos, quinonas, lignanas e taninos); 3. carboidratos; 4. compostos de nitrogênio (Lepage et al., 1986).

Os resíduos gerados no processamento mecânico apresentam as mesmas características químicas da madeira original, desde que não tenham recebido nenhum tratamento físico ou químico; e a obtenção de princípios ativos ou compostos químicos com propriedades terapêuticas a partir desses resíduos constitui uma das alternativas mais promissoras para agregar valor aos produtos da exploração florestal e, assim, contribuir para viabilizar o manejo sustentável da floresta tropical.

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de utilização dos resíduos madeireiros na obtenção de princípios ativos, a atividade anticâncer dos extratos de Ipê (*Tabebuia* sp), Sucupira (*Bowdichia nitida*), Cumaru (*Dipteryx odorata*) e Cabreúva vermelha (*Myroxylon balsamum*) foram testadas em cultura de células tumorais humanas.

A avaliação da possível atividade antiproliferativa, em cultura celular, das espécies estudadas possibilita a seleção da(s) espécie(s) promissora(s) para dar continuidade ao estudo das demais atividades farmacológicas, tais como ação antinociceptiva, antiulcerogênica e atividade depressora do sistema nervoso central (SNC), realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP).

OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivos:

- Avaliar a atividade antiproliferativa de extratos de resíduos madeireiros em cultura de células tumorais humanas e identificar a espécie mais promissora;
- Avaliar atividade farmacológica antiulcerogênica, antinociceptiva e ação sobre o sistema nervo central da espécie promissora;
- Demonstrar a possibilidade do aproveitamento de resíduos madeireiros para busca de compostos ativos com atividades farmacológicas;
- Contribuir para a sustentabilidade do manejo florestal, pela possibilidade de agregar valor aos resíduos da indústria madeireira.

MATERIAL ARBÓREO

1. Ipê – *Tabebuia* sp (Bignoniaceae)

As diversas espécies do gênero *Tabebuia*, encontradas na floresta tropical são popularmente conhecidas como ipê (vulgarmente nominadas segundo a cor de suas flores, como roxo, amarelo, verde, branco) e muito utilizadas empiricamente por comunidades (Dinnen et al., 1997).

A madeira dessas espécies é extremamente pesada e dura ao corte, cerne pardo-acastanhado, geralmente uniforme e às vezes com reflexos esverdeados, textura fina a média, uniforme; grã direita ou revessa, sua superfície é medianamente lisa ao tato e pouco lustrosa, não apresenta odor ou sabor característicos (Manieri & Chimelo, 1989).

Espécies deste gênero apresentam na composição de seus metabólitos secundários uma quinona conhecida como lapachol (Renou, 2003), com já conhecidas atividades antiproliferativas (Dinnen, 1997; Renou, 2003). O lapachol é solúvel em solventes mais polares, como descrito por Renou (2003), que realizou uma extração com solventes por partição, utilizando o extrato aquoso obtido para os estudos de atividades antineoplásicas. Na procura por novas drogas antiproliferativas, um dos maiores enfoques encontra-se naquelas que promovem redução de metástases. O lapachol, segundo Balassiano et al (2005), em estudo realizado em cultura de células HeLa, demonstrou grande potencial para redução de metástase.

2. Sucupira – *Bowdichia nítida* (Spr.) Benth (Fabaceae)

Os caracteres gerais dessa espécie indicam uma madeira pesada e dura ao corte, alburno diferenciado, de 1 a 2 cm de largura, cerne pardo-acastanhado a castanho escuro, textura média a grossa, grã revessa, superfície de pouco brilho e

ligeiramente áspera ao tato, de aspecto fibroso acentuado, não apresenta odor ou sabor perceptíveis (Manieri & Chimelo, 1989).

A sucupira, é largamente utilizada na indústria madeireira. Devido a ocorrência de alergia por contato, estudos de sua composição química revelaram a presença de uma quinona, a 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (Hausen, 1978).

3. Cumaru – *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae)

Sua madeira é pesada, dura ao corte; alburno diferenciado do cerne, de 2 a 3 cm de largura; cerne de cor castanho-claro-amarelado, textura fina a média, grã revessa, superfície de pouco brilho e lisa ao tato, aspecto fibroso atenuado, não apresenta odor ou sabor perceptíveis (Manieri & Chimelo, 1989).

A madeira de *Dipteryx odorata*, popularmente conhecida como cumaru, é usualmente empregada em estruturas e na manufatura de pisos. Seus extrativos podem ser utilizados na produção de cigarros, perfumes, cosméticos (Jang et al., 2003). Apresenta em sua composição química, compostos do grupo dos flavonóides, tais como metoxixantocarina A, diterpenos, ácido dipterixico e seus demais componentes, com conhecida atividade quimiopreventiva, isoliquiritigenina, sulfuretina, entre outros. (Jang et al., 2003). Entre seus constituintes voláteis estão germacrene D, biociclogermacrene e espatulenol (Andrade et al., 2003). Recentemente foram isoladas, por HPLC, flavonas bioativas, a partir da cultura de calo de *Dipteryx odorata*. A 7-hidroxi-4',6'-demetoxiisoflavona foi eficaz contra *Trypanossoma cruzi* (Jannuario et al., 2005).

4. Cabreúva vermelha – *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (Fabaceae)

A espécie *Myroxylon balsamum* é caracterizada por uma madeira pesada, cerne castanho escuro a castanho avermelhado; textura média e uniforme, grã

geralmente revessa, superfície irregularmente lustrosa, odor característico balsâmico, agradável, gosto levemente adstringente (Manieri & Chimelo, 1989).

De seu tronco foram isolados isoflavonóides, flavononas, isoflavononas e de suas folhas foi isolado um triterpeno pentacíclico (Mathias, 2000). O exudado obtido através de lesões na árvore foi analisado quimicamente. Análise cromatográfica em camada delgada (CCD) demonstrou a presença dos ácidos benzóico e cinâmico, da valinina, benzoato de benzila, cinamato de benzila e nerolidol (Akisue, 1972a). O óleo essencial obtido do exudado contém ácido benzóico, vanilina, benzoato de benzila, cinamato de benzila, nerolidol e farnesol (Akisue, 1972b).

Estudos demonstraram potente atividade de *M. balsamum* para o tratamento de úlcera gástrica ocasionada por *Helicobacter pylori*. Outro componente, a cabreuva, apresentou ação citocida para bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus lutea* e *Bacterioides fragilis*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Saccharomyce cerevisiae* e *Candida albicans*) (Ohsaki et al., 1999). Segundo Simas (2004), no extrato hexânico, foi possível identificar uma ação larvicida sobre larvas de terceiro estágio do *Aedes aegypti*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS

Foram coletados resíduos do tipo grosso (peças de madeira que são descartadas no processo de industrialização), de *Tabebuia* sp, *Bowdichia nítida*, *Dypteryx odorata* e *Myroxylon balsamum*. Os resíduos de Ipê são provenientes da Berneke S.A., unidade de Cotriguaçu, Mato Grosso. Na região essa espécie é denominada de Ipê verde, devido à coloração da madeira. O material de Sucupira, Cumaru e Cabreúva foram obtidos na linha de produção da Indusparquet Ltda, indústria de pisos localizada no município de Tietê, São Paulo.

Os resíduos foram separados por gênero (no caso do Ipê) e por espécie, sendo todos devidamente etiquetados. De cada peça foi retirada uma amostra, destinada à identificação anatômica para confirmação da espécie. O restante do material foi processado para obtenção dos extratos brutos.



Figura 2. Coloração verde intensa de peças de Ipê (*Tabebuia* sp), após processamento mecânico, no pátio da indústria.

A identificação botânica, com base no exame macroscópico da estrutura anatômica da madeira, foi realizada por Chimelo¹. A análise anatômica dos resíduos de Ipê permitiu a identificação do gênero, mas não da espécie em si. Deve-se destacar que o material coletado apresentava intensa coloração esverdeada (ilustrado na Figura 2), provavelmente por conter elevado teor de extrativos.

A descrição da estrutura anatômica, para as madeiras consideradas, consta dos Apêndices 1 a 4.

2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Cada lote de resíduos, separado por espécies, foi manualmente picado e então transformado em serragem utilizando-se um moinho de facas. Foi coletada a fração que passou pela peneira de malha 40 (fração 40).

A serragem foi submetida ao processo de extração em soxhlet com diclorometano (solvente de média polaridade), por 8 horas. O solvente orgânico do extrato resultante foi eliminado sob vácuo numa temperatura de aproximadamente 40°C, dando origem a um resíduo denominado extrato bruto diclorometano (EBD).

O mesmo material, anteriormente extraído com diclorometano, foi retomado em etanol 95% (solvente de elevada polaridade) e extraído em soxhlet por 8 horas. O solvente orgânico foi posteriormente eliminado sob vácuo, à temperatura de aproximadamente 55°C até sua completa eliminação. O material resultante foi, a seguir, liofilizado fornecendo então o extrato bruto etanólico (EBE). O procedimento da extração é ilustrado no esquema da Figura 3.

¹ João Perez Chimelo, Doutor, pesquisador (aposentado) da Divisão de Produtos Florestais, Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT. Informe pessoal, 2004.

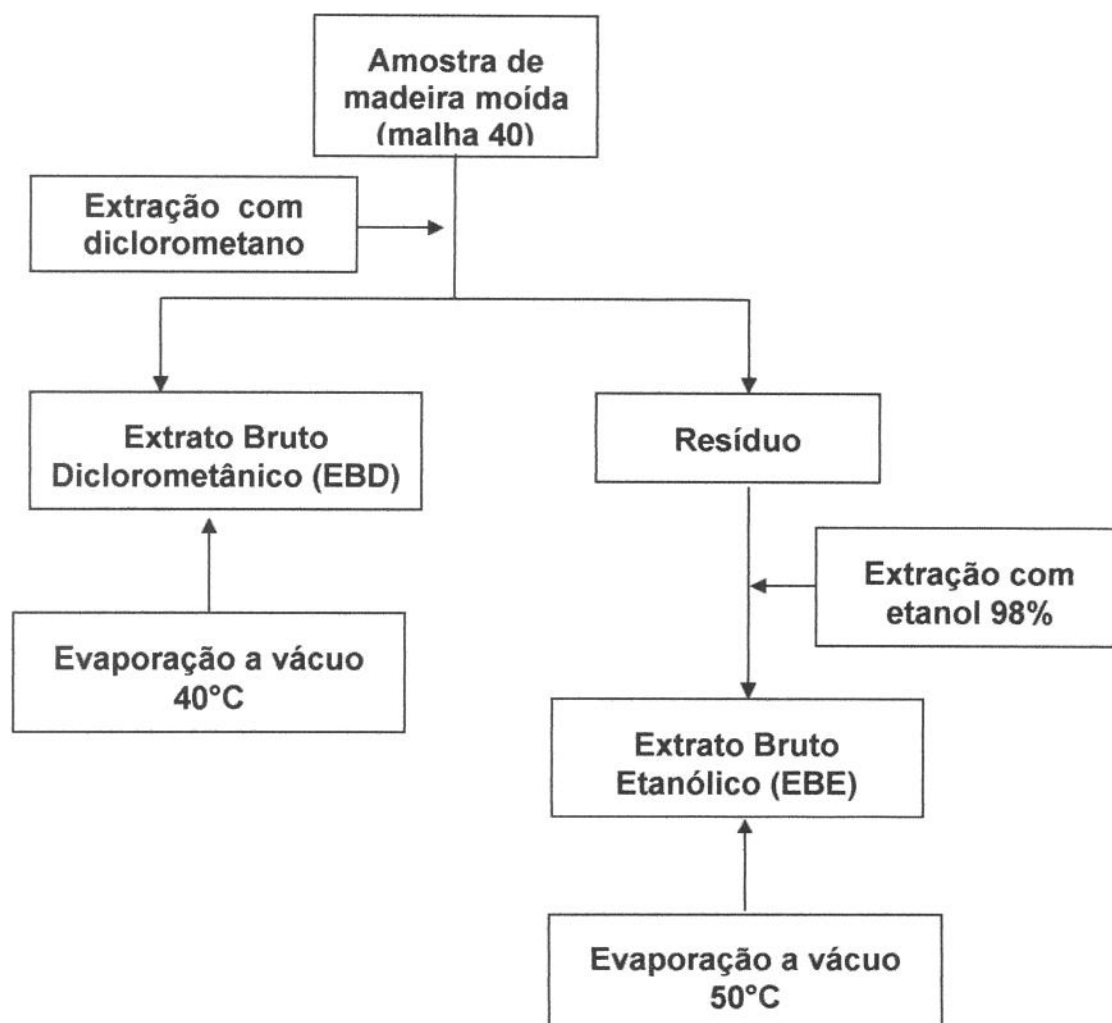


Figura 3. Fluxograma dos procedimentos de extração dos resíduos de madeira, para obtenção dos extratos em diclorometano e etanol.

3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

3.1. Teste “*in vitro*”

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram doadas pelo National Cancer Institute (NCI), EUA. Essas

linhagens foram enviadas congeladas para o CPQBA e são mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido.

Para descongelamento, o criotubo que contém as células foi mantido à temperatura ambiente, sendo seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL e o volume completado para 10 mL com uma solução contendo meio de cultura(RPMI-1640) e soro fetal bovino (SFB). O tubo foi centrifugado a 4°C e 2000 rpm, por 4 minutos e o sobrenadante aspirado. O “*pellet* celular” foi ressuspendido cuidadosamente para evitar a formação de grumos, com 5 mL de RPMI-1640/SFB. A solução celular foi transferida para frascos de manutenção de 25cm² (T25) com 5 mL de RPMI-1640 /SFB e incubada a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ e em ambiente úmido. As linhagens utilizadas neste projeto estão relacionadas na Tabela 1.

3.1.1. Plaqueamento de células

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada nas 9 linhagens tumorais humanas apresentadas na Tabela 1. No primeiro dia de experimento, foi feito o plaqueamento de células nas placas de 96 compartimentos. Cada linhagem celular foi inoculada em uma placa, totalizando 9 placas. Em uma outra placa, a placa controle (T0), foram inoculadas todas as linhagens celulares; seu desenho experimental encontra-se na Figura 4 .

Para células aderidas, cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessário a tripsinização, ou seja, o desprendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática. Após a aspiração do meio de cultura, foi adicionado 0,5 mL de tampão de Hank's banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido foi aspirado e então adicionado 0,5 mL de tripsina a 37°C. O frasco foi incubado de 25 a 30 segundos sendo logo em seguida banhado com 5 mL de meio

RPMI/SFB/gentamicina. A partir deste ponto, as células se apresentam em suspensão.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de atividade anticâncer, com as respectivas densidades de inoculação.

SIGLA	NOME	TIPO/ MORFOLOGIA	TECIDO DE ORIGEM	CARACTERÍSTICAS
UACC-62	Pele ou melanoma	Aderente/ Fibroblástica	Ectoderme	
MCF-7	Carcinoma mamário	Aderente/ Epitelial	Ectoderme	Produz proteínas semelhantes a insulina que se ligam a fatores de crescimento.
NCI-H460	Pulmão/ carcinoma de célula grande	Aderente/ Epitelial	Endoderme	Expressa altos níveis de COX-2, é deficiente em fator 1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico.
K-562	Leucemia mielóide crônica	Suspensão/ Linfoblástica	Mesênquima	Células altamente indiferenciadas, das série granulocítica.
OVCAR-03	Ovário/ Adenocarcinoma ovariano	Aderente/ Epitelial	Mesoderme	Possui receptores de estrógenos, andrógeno e progesterona.
PC-03	Próstata/ Adenocarcinoma prostático	Aderente/ Epitelial	Mesoderme	Exibe baixa atividade de fosfatase ácida e 5-alfa-redutase de testosterona.
HT-29	Cólon/ Adenocarcinoma colorretal	Aderente/ Epitelial	Endoderme	Alta expressão de receptores de uroquinase e antígenos p53.
786-0	Renal/ Adenocarcinoma de célula renal	Aderente/ Epitelial	Mesoderme	Produz peptídeo semelhante ao hormônio paratireoidiano.
NCI-ADR	Carcinoma mamário resistente	Aderente/ Epitelial	Ectoderme	Expressa, em altos níveis, o gene de resistência multidroga (MDR-1).

Os frascos foram agitados delicadamente e uma alíquota foi retirada e colocada na câmara de Neubauer para contagem do número de células. O número de células dos quatro quadrantes externos foi contado e a média aritmética determinada. Este valor foi multiplicado pelo fator de correção da câmara, equivalente a 10^4 , estipulando assim o volume que deverá ser inoculado nas placas de 96 compartimentos para a avaliação da atividade antiproliferativa.

De acordo com a densidade de inoculação de cada linhagem (determinadas previamente), foi calculada a quantidade de meio de cultura necessária para diluição das células a serem inoculadas. Esta diluição foi feita em tubos estéreis de 50 mL. Foram inoculadas 100 μ L de solução celular na placas de 96 compartimentos e a seguir incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

3.1.2. Avaliação da atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas

Os extratos e frações (amostras) foram diluídos em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL resultando em soluções estoque. Para a adição nas placas as amostras foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, para serem adicionadas nas placas de 96 compartimentos nas concentrações 0,25; 2,5; 25; 250 μ g/mL. Neste momento, foi realizada a fixação da placa T0, com a adição de 50 μ L de ácido tricloroacético a 50% (TCA) estimando assim, a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram colocadas.

As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, o experimento foi interrompido para a fixação das placas com a adição de 50 μ L de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora

a 4°C e então submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas a temperatura ambiente até a secagem completa.

O ensaio com sulforrodamina B (SRB) avalia a inibição de crescimento por um método colorimétrico que estima indiretamente o número de células presentes pela coloração da proteína celular. (Skehan et al., 1990)

As placas foram coradas pela adição de 50 µL de SRB (corante protéico) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1%. A seguir foram incubadas a 4 °C, por 30 minutos e então lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas em temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150 µL de Trizma Base (10µM). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em um leitor de microplacas a 560 nm (ELISA – Molecular Devices Versa Max Microplate Reader.) (Figura 4).

3.1.3. Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e, através das fórmulas descritas, determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IC.

Se $T \geq T_0$, mas $< C$, a droga será citostática e a fórmula utilizada é:

$$IC = 100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)].$$

Se $T < T_0$ a droga é citocida e a fórmula utilizada é:

$$IC = 100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)].$$

T é a média da absorbância da célula tratada; C é a do controle de célula; T₀ é a do controle das células no dia da adição das drogas. O resultado obtido será subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento.

As amostras serão consideradas ativas quando apresentam inibição de crescimento maior que 50% concentração dependente e apresentando seletividade para tipos celulares.

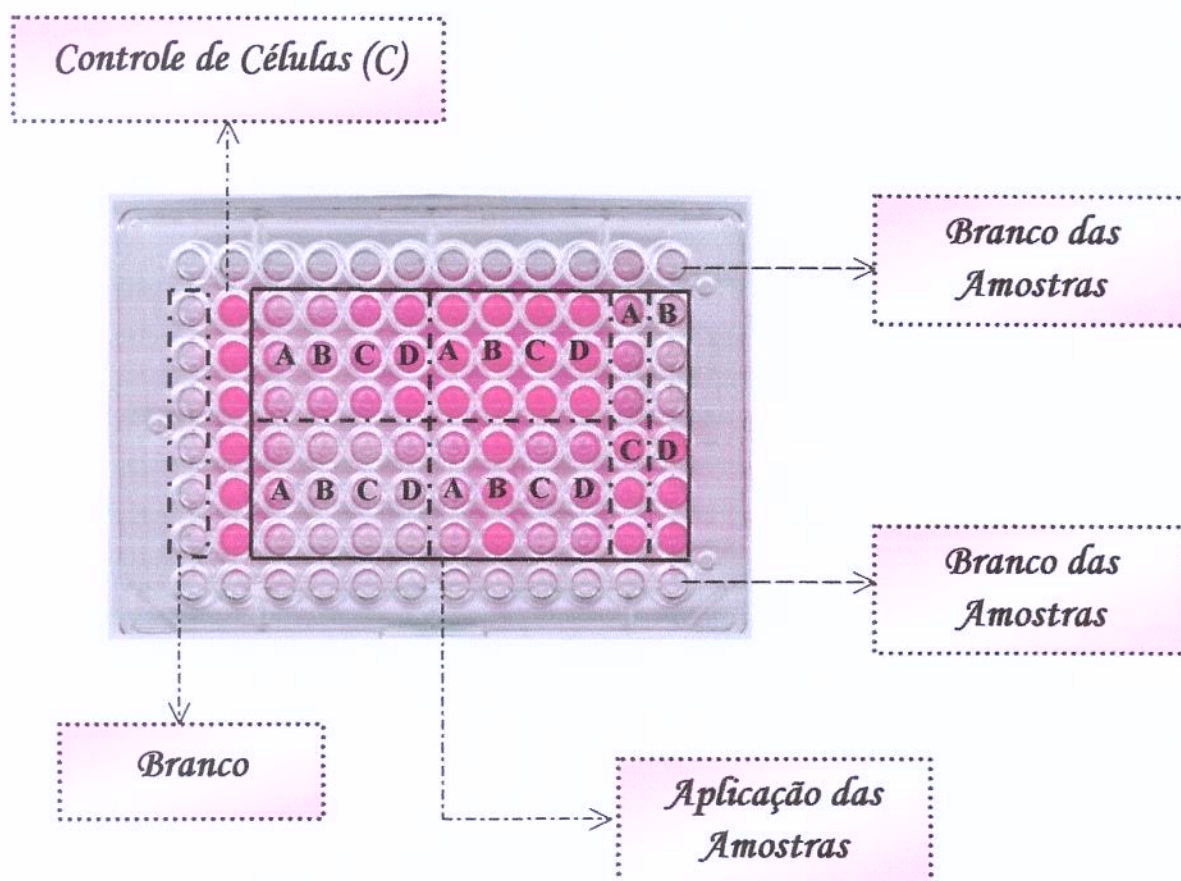


Figura 4. Esquema de uma placa de 96 compartimentos corada com SRB, onde A, B, C e D representam as amostras colocadas em triplicata nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

3.2. Testes “*in vivo*”

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos *wistar* machos, com peso corporal entre 200 e 250g; e camundongos *swiss* machos, pesando entre 30 e 35g.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB), da Unicamp; e somente utilizados em experimentos após um período mínimo de adaptação ao biotério, com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C ± 3, com água mineral e ração *ad libitum*.

3.2.1. Teste de atividade geral (*Screnning Hipocrático*)

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, pesando entre 30 e 35g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 12 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

O primeiro grupo experimental (controle negativo) foi tratado, via intraperitoneal, com solução salina (solução NaCl 0,9%, na concentração de 10 mL/kg). Os quatros demais grupos foram tratados, via intraperitoneal, com o extrato bruto diclometânico (EBD) de *Myroxylon balsanum* nas doses de 100, 300, 1000 e 2000 mg/kg.

No período de 5 horas subseqüentes aos tratamentos, foram observados os efeitos gerais da amostra sobre os diversos sistemas fisiológicos, tais como estado de consciência e disposição, o sistema motor, o tono muscular, reflexos, atividade sobre o sistema nervoso central e sistema autônomo. Os animais estavam constantemente em deambulação livre sobre uma superfície plana (Malone, 1977).

O período de observação estendeu-se por 15 dias, sendo diariamente analisados os efeitos gerais produzidos pelos extratos.

3.2.2. Avaliação da atividade no Sistema Nervoso Central (SNC)

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, pesando entre 30 e 35g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 12 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Cada grupo experimental recebeu, via intraperitoneal, o tratamento correspondente. O primeiro grupo, controle negativo, foi tratado com solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg), o segundo grupo, denominado controle positivo, recebeu o tratamento com fenobarbital (22 mg/kg); os demais grupos receberam o tratamento com o EBD de *M. balsamun* nas doses de 100, 300, 500 e 1000 mg/kg. Para avaliar o efeito hipno-sedativo de um anti-histamínico neste modelo, foi administrado a um grupo de animais, prometazina (100 mg/kg).

Após 30 minutos do tratamento os animais foram introduzidos, individualmente, em uma câmara previamente saturada, por 10 minutos, com 5 mL de éter etílico (agente indutor da ação hipno-sedativa). Para cada animal introduzido foram registrados os tempos de latência (TL) e a duração da hipnose (DH). O sono é caracterizado pela perda do reflexo postural do animal. Transcorridos 60 segundos após a perda do reflexo postural, o animal é removido da câmara e colocado em decúbito dorsal, para o registro da duração da hipnose, cujo término é registrado pela recuperação da postura normal (Vieira, 2001).

3.2.3. Atividade antinociceptiva

Teste de algesia induzida por calor

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, pesando entre 30 e 35g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 12 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Todos os grupos foram tratados pela via intraperitoneal. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina (solução NaCl 0,9%, na concentração de 10 mL/kg), o grupo controle positivo com morfina (20mg/kg) e os demais grupos foram tratados com EBD de *M. balsamum* nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg.

Decorridos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração os animais foram submetidos ao estímulo algico em placa quente, com temperatura controlada de $56,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Ao manifestarem reflexo doloroso característico (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras), o animal foi retirado da placa e o tempo para a reação registrado. (Woolfe & McDonald, 1944).

3.2.4. Atividade antiulcerogênica

Úlcera induzida por indometacina

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 24 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Cada grupo experimental recebeu, via oral, o tratamento correspondente. O primeiro grupo, controle negativo, foi tratado com solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg), ao segundo grupo, controle positivo, foi administrado uma suspensão

aquosa de cimetidina (na dose de 100 mg/kg). O último grupo recebeu o tratamento com o EBD de *M. balsamun* na dose de 1000 mg/kg.

Decorridos 30 minutos após os tratamentos, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de suspensão aquosa de indometacina, na dose de 30 mg/kg (Morimoto et al., 1990).

Após 4 horas da administração de indometacina, os grupos foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos removidos, abertos ao longo da maior curvatura e lavados com solução salina, para a realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado através da somatória dos pontos estabelecidos pelos parâmetros da Tabela 2, de acordo com a metodologia descrita por Gamberini et al. (1991).

Tabela 2. Parâmetros para o cálculo do Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) (Gamberini et al., 1991)

LESÕES (tipos)	PONTUAÇÃO
Até 10 petéquias	1 ponto
Até 20 petéquias	2 pontos
Até 30 petéquias	3 pontos
Úlceras de até 1 mm	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm	*n x 3
Hemorragia	1 ponto
Perda de pregas	1 ponto
Perda de coloração	1 ponto

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

A determinação da porcentagem de inibição do ILU, apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle, foi realizada através da equação:

$$\text{ILU (\%)} = [(\text{Média Controle} - \text{Média Tratado}) / \text{Média Controle}] \times 100$$

Úlcera induzida por etanol

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 24 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Cada grupo experimental recebeu, via oral, o tratamento correspondente. O primeiro grupo, controle negativo, foi tratado com solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg), e o controle positivo foi administrado com carbenoxolona (na dose de 200 mg/kg). O último grupo recebeu o tratamento com o EBD de *M. balsamun* na dose de 1000 mg/kg. Para avaliar a atividade de um agonista do receptor GABA_A, foi administrado diazepam a um grupo de animais, na dose de 2 mg/kg. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto (Robert, 1979).

Uma hora após administração de etanol os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo na curvatura maior e lavados com solução salina, para a realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o método usado no ensaio de úlcera induzida por indometacina (Gamberini et al., 1991).

Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀)

O modelo de úlcera induzida por etanol foi utilizado para a determinação da DE₅₀ de EBD de *M. balsamum*, através da construção de uma curva dose-efeito, sendo que os grupos foram tratados com doses crescentes do extrato bruto (100, 300 e 1000 mg/kg). O valor de DE₅₀ foi obtido através de cálculo de regressão linear.

Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 24 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Dos quatro grupos experimentais, dois grupos receberam a administração prévia de suspensão aquosa de indometacina, na dose de 5 mg/kg. Após 30 minutos, dois grupos (um deles previamente tratado com indometacina) receberam o tratamento com solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) e os outros dois grupos (um deles previamente tratado com indometacina) receberam o EBD de *M. balsamun* na dose de 300 mg/kg.

Transcorridos 30 minutos após os tratamentos, os animais receberam via oral 1,0 mL de etanol absoluto (Robert, 1979). Após uma hora da administração de etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da curvatura maior e lavados com solução salina, para a realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado de acordo com o método anteriormente descrito (Gamberini et al., 1991).

Estudo da participação de substâncias sulfidrílicas não protéicas sobre a citoproteção gástrica

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 24 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Cada grupo experimental recebeu, via oral, o tratamento correspondente. Os dois primeiros grupos, controles negativos, foram tratados com solução salina (NaCl

0,9%, 10 mL/kg), outros dois grupos receberam o tratamento com o EBD de *M. balsamun* na dose de 300 mg/kg. Um grupo de cada tratamento recebeu administração prévia, de 30 minutos, de N-etilmaleimida na dose de 10 mg/kg (via subcutânea, 2,5 mL/kg) (Szabo, 1981).

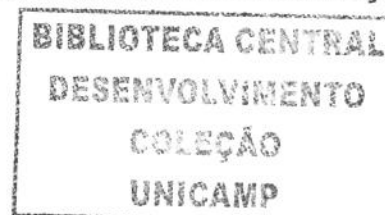
Transcorridos 30 minutos após os tratamentos, os animais receberam, por via oral, 1,0 mL de etanol absoluto (Robert, 1979). Após uma hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da curvatura maior e lavados com solução salina, para a realização de contagem e avaliação das lesões produzidas e o cálculo do ILU (Gamberini et al., 1991).

Ligadura de piloro

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250g, divididos em grupos de 06 animais. Por um período de 24 horas antecedentes ao experimento, os animais foram submetidos a jejum, com livre acesso a água.

Os grupos foram anestesiados com éter etílico, tricomizados na região abdominal. Em seguida foi realizada uma incisão para exposição do estômago e duodeno, procedido pela ligadura do piloro com linha cirúrgica de algodão. Após a ligadura, cada animal recebeu o tratamento correspondente, pela via intraduodenal; um grupo recebeu solução salina 0,9% (10mL/kg), outro recebeu uma suspensão aquosa de cimetidina (100mg/kg) e o último grupo recebeu o EBD de *M. balsamum* (300mg/kg). O abdômen foi suturado e após 4 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para remoção dos estômagos.

Em seguida foi determinado o volume do conteúdo estomacal, seu pH e a quantidade de íons H^+ (mEq/L.4h), através de titulação com solução de NaOH 0,1N, utilizando-se solução 0,1% de fenolftaleína como indicador. A concentração



de ácido total em mEq/L.4h foi calculada através da seguinte equação (Shay et al., 1945):

$$[\text{total de ácido}] = [\text{fator } 1,825 \times \text{vol. de NaOH (mL)}] / \text{volume gástrico (mL)}$$

3.2.5. Análise Estatística

Todos os resultados dos testes *in vivo* foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p < 0,05$ para que fosse considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguidos do Teste de Duncan, considerando-se o mesmo nível crítico.

RESULTADOS

1. RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DOS EXTRATOS BRUTOS

Todos os resultados são expressos na forma gráfica sendo que os gráficos resultantes dos ensaios da atividade anticâncer devem ser interpretados considerando as curvas de resposta obtidas a partir da relação da concentração da amostra (em $\mu\text{g/mL}$) e a porcentagem de inibição das células tumorais humanas "*in vitro*". Inibições ocorridas abaixo de 50% deverão ser consideradas como citostáticas, ou seja, que inibem o crescimento celular; abaixo de 0% deverão ser consideradas como citocidas, ou seja, que irão provocar morte celular.

A triagem da atividade anticâncer procura selecionar os extratos brutos com possível potencial para desenvolver um novo medicamento quimioterápico. De forma que os extratos brutos selecionados para a continuidade das avaliações devem apresentar atividade citocida, na menor concentração possível e, adicionalmente, seletiva para alguma das linhagens celulares tumorais. A triagem de substâncias de origem vegetal é uma ferramenta na descoberta de substâncias bioativas com propriedades medicinais e terapêuticas (Stepp & Moerman, 2001).

A doxorubicina (Figura 5) foi utilizada como controle positivo e portanto controle de qualidade do teste. Na concentração de $2,5 \mu\text{g/mL}$ apresentou atividade citostática para as linhagens de adenocarcinomas (renal e prostático), carcinoma mamário e pulmonar, melanoma e leucemia.

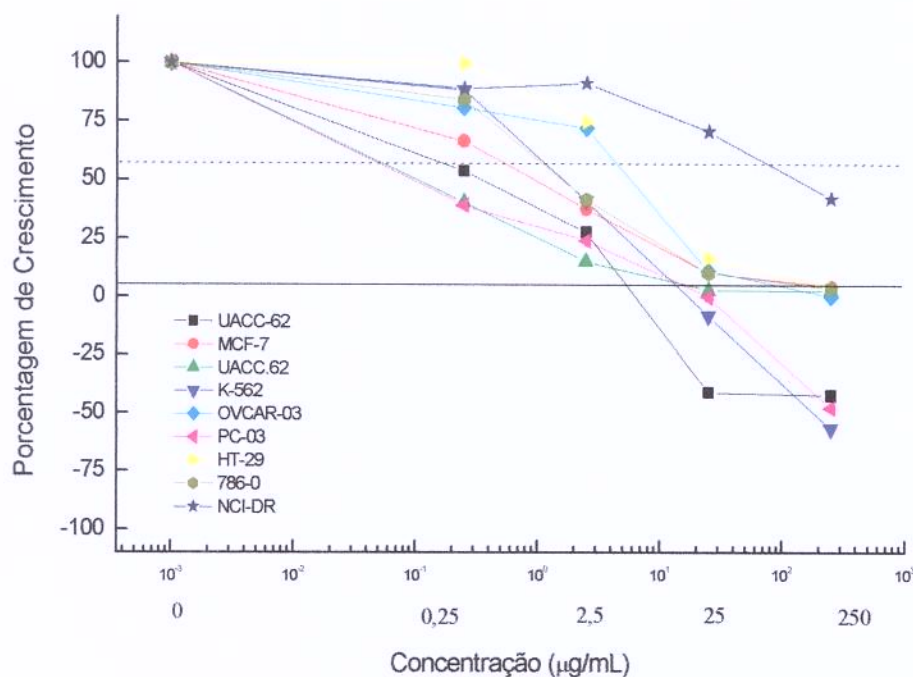


Figura 5. Curva concentração-resposta da doxorubicina sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Em 25 µg/mL foi citostático para os adenocarcinomas renal, colorretal e ovariano; na mesma concentração foi citocida para melanoma, leucemia e adenocarcinoma prostático. Na maior concentração (250 µg/mL) apresentou um perfil citostático para os adenocarcinomas renal e colorretal, carcinoma mamário e mamário resistente; para leucemia, melanoma, adenocarcinomas prostático e ovariano e, carcinoma pulmonar apresentou ação citocida.

A Figura 6 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico (EBD) de *Tabebuia* sp, sobre as linhagens celulares. Na

concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ o EBD promoveu uma ação citostática sobre duas das oito linhagens, o adenocarcinoma prostático e melanoma.

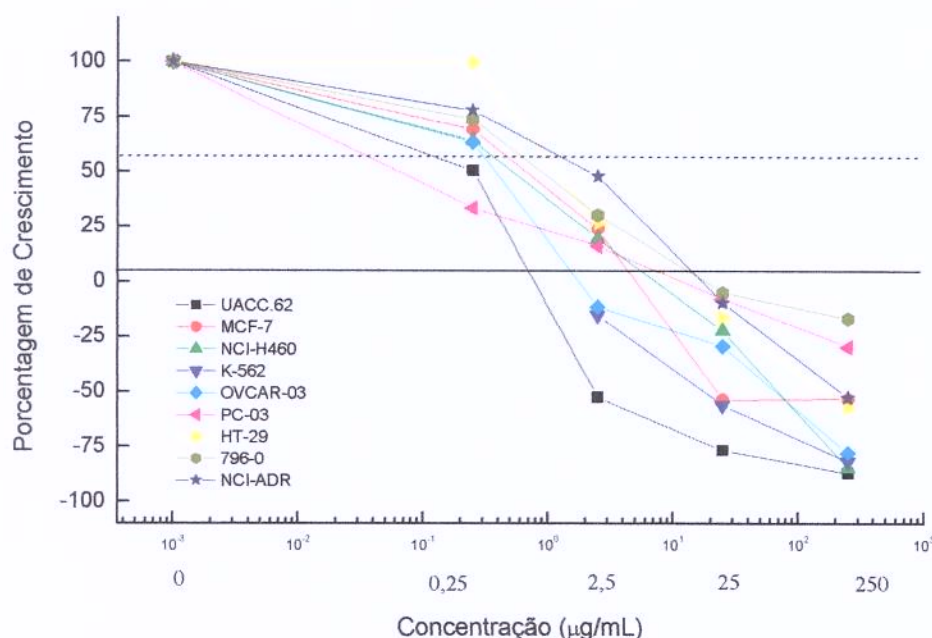


Figura 6. Curva concentração resposta do extrato bruto diclorometânico (EBD) de *Tabebuia* sp sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Em 2,5 $\mu\text{g/mL}$ o extrato provocou inibição do crescimento das linhagens dos adenocarcinomas colorretal, renal e prostáticos, carcinoma mamário, mamário resistente e pulmonar, contudo demonstrou ação citocida para o adenocarcinoma ovariano, leucemia e melanoma. Nas duas últimas concentrações (25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) o extrato promoveu morte celular de todas as linhagens. A análise do gráfico revela seletividade para a linhagem de melanoma.

A Figura 7 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico (EBE) de *Tabebuia* sp, sobre as linhagens celulares.

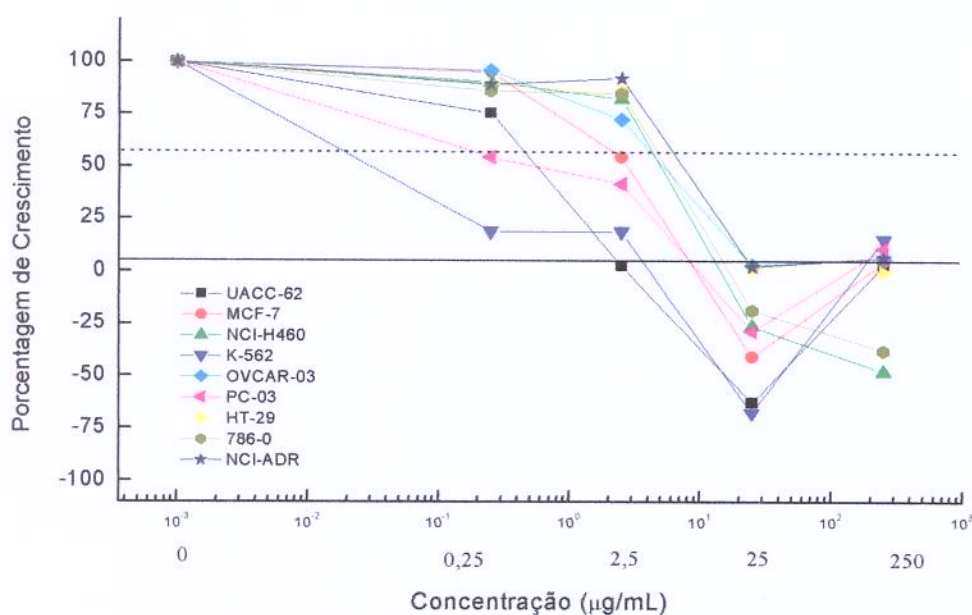


Figura 7. Curva concentração resposta do extrato bruto etanólico (EBE), para *Tabebuia* sp, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Nota-se atividade citostática na concentração de 0,25 µg/mL para leucemia e adenocarcinoma prostático. Em 25 µg/mL o extrato foi citostático para leucemia, adenocarcinoma prostático e carcinoma mamário; para a linhagem de melanoma foi citocida. Em 25 µg/mL foi citocida para todas as linhagens. Em 250 µg/mL foi observada uma atividade citostática para adenocarcinomas prostático e ovariano, leucemia, carcinoma mamário resistente, as demais linhagens sofreram ação citocida.

A Figura 8 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico (EBD) de *Bowdichia nitida*, sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou uma atividade citostática, nas concentrações de 0,25 e 2,5 µg/mL, para as linhagens de leucemia e adenocarcinoma prostático; as demais linhagens não sofreram ação significativa.

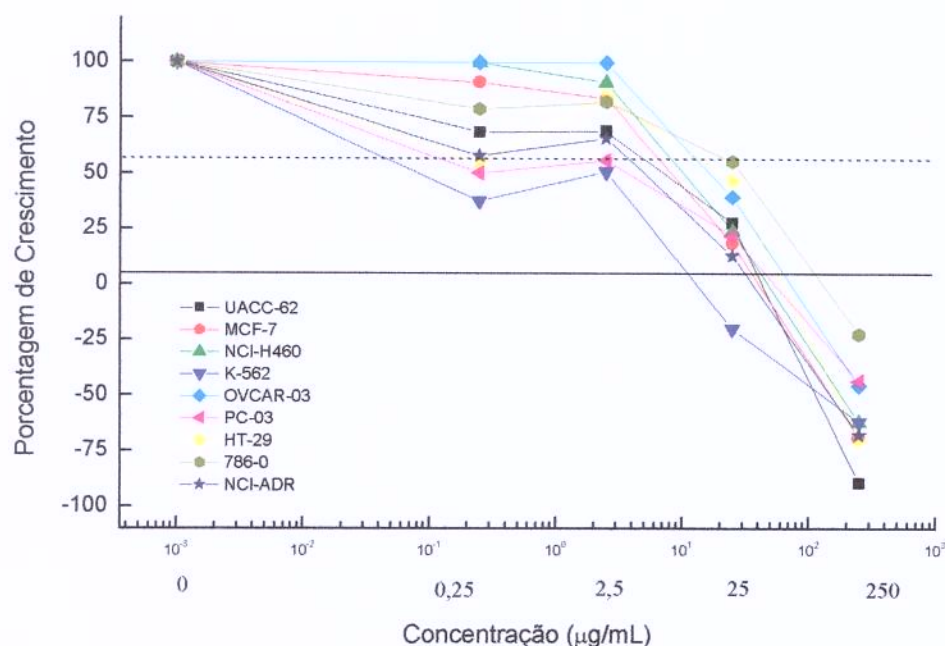


Figura 8. Curva concentração resposta do extrato bruto diclorometico (EBD), para *Bowdichia nitida*, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Na concentração de 25 µg/mL este extrato demonstrou atividade citostática para oito das nove linhagens, com exceção de leucemia que demonstrou sofrer ação citocida. Em 250 µg/mL o extrato apresentou um perfil citotóxico, pois provocou morte de todas as linhagens, em diferentes porcentagens de inibição.

A Figura 9 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico (EBE) de *Bowdichia nitida*, sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou atividade citostática, na concentração de 0,25 µg/mL, para o adenocarcinoma prostático e colorretal, carcinoma mamário e leucemia.

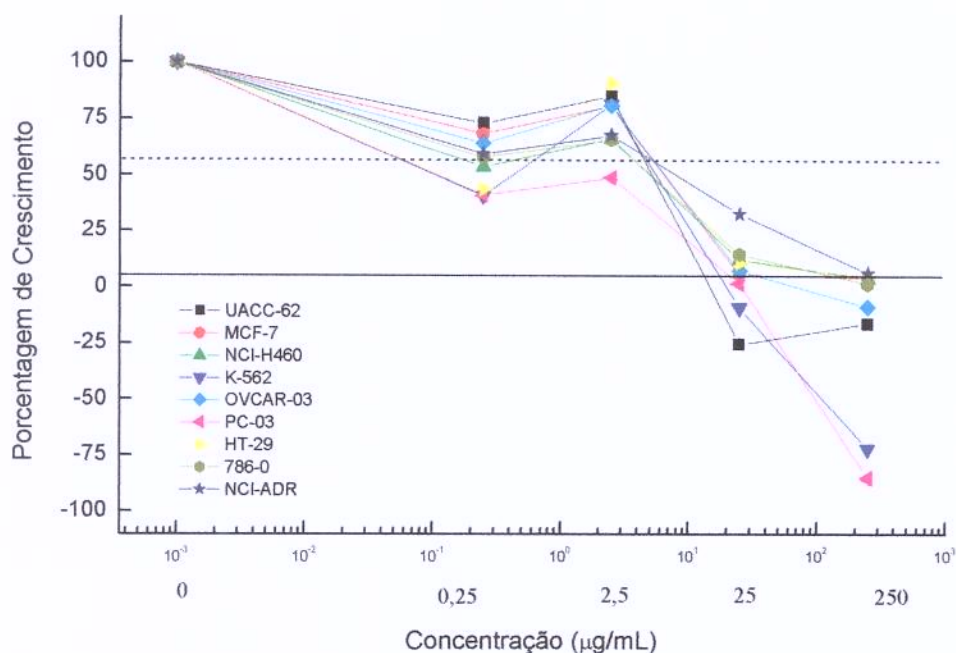


Figura 9. Curva concentração resposta do extrato bruto etanólico (EBE), para *Bowdichia nitida*, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Na concentração seguinte (2,5 µg/mL) demonstrou um perfil citostático somente para o adenocarcinoma prostático. Em 25 µg/mL o EBE foi citocida para melanoma, leucemia e para o adenocarcinoma prostático; para as outras linhagens o extrato foi citostático. Em 250 µg/mL, o carcinoma mamário resistente sofreu ação citostática, nas oito linhagens restantes nota-se atividade citocida do extrato.

A Figura 10 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico (EBD) de *Dipteryx odorata*, sobre as linhagens celulares.

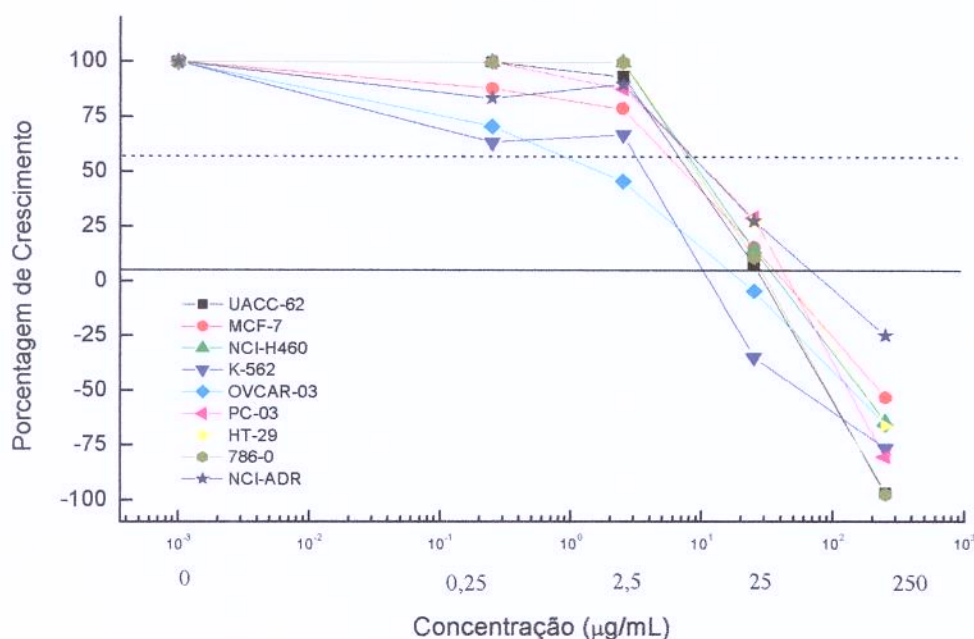


Figura 10. Curva concentração resposta do extrato bruto diclorometânico (EBD), para *Dipteryx odorata*, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Na concentração de 2,5 µg/mL este extrato apresentou atividade citostática somente sobre a linhagem de adenocarcinoma ovariano, as linhagens restantes não sofreram nenhuma ação significativa. Em 25 µg/mL, para leucemia e adenocarcinoma ovariano, nota-se uma ação citocida, as demais tiveram somente atividade citostática. Em 250 µg/mL o extrato foi citotóxico, promovendo morte celular de todas as linhagens.

A Figura 11 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico (EBE) de *Dipteryx odorata*, sobre as linhagens celulares.

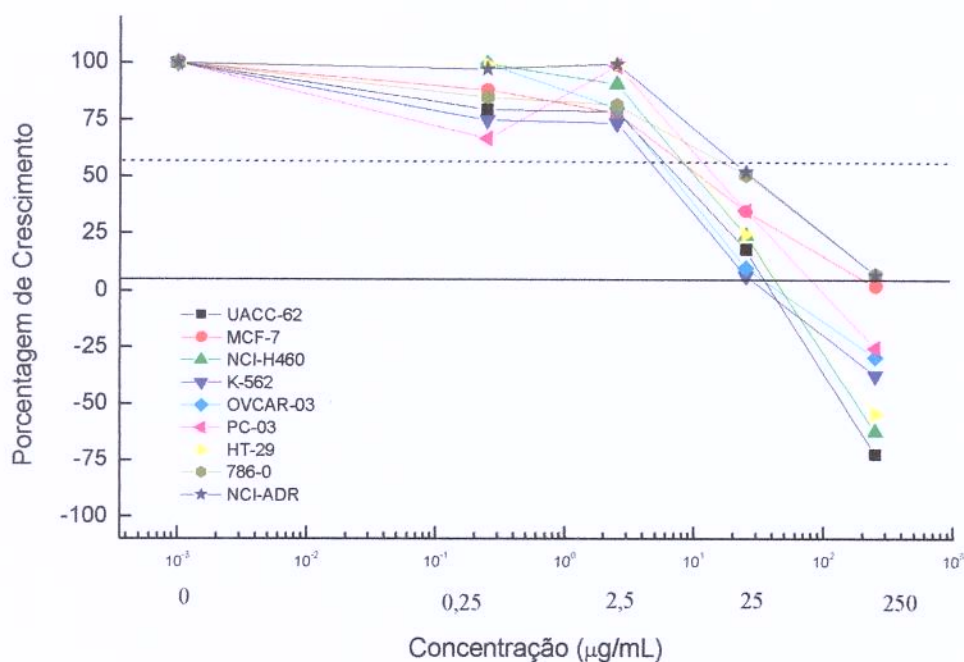


Figura 11. Curva concentração resposta do extrato bruto etanólico (EBE), para *Diptoryx odorata*, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

A análise da curva concentração-resposta deste extrato demonstrou uma ação citostática para todas as linhagens tumorais, na concentração de 25 µg/mL. Na concentração de 250 µg/mL sua atividade sobre as linhagens foi citocida, com exceção do adenocarcinoma renal e do carcinoma mamário resistente.

A Figura 12 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto diclorometânico (EBD) de *Myroxylon balsamum*, sobre as linhagens celulares.

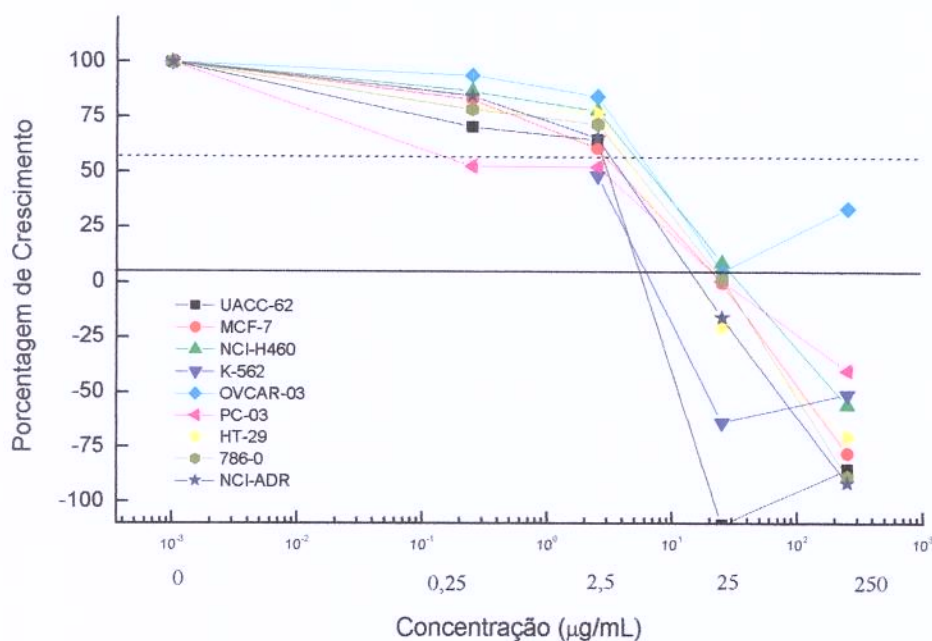


Figura 12. Curva concentração resposta do extrato bruto diclorometano (EBD), para *Myroxylon balsamum*, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

Na concentração de 0,25 µg/mL nota-se uma atividade citostática unicamente sobre o carcinoma mamário. Em 2,5 µg/mL a atividade citostática é observada em leucemia e carcinoma mamário. A concentração de 25 µg/mL do extrato provocou ação citostática sobre adenocarcinoma ovariano e carcinoma pulmonar, nas demais linhagens observou-se ação citocida. Na última concentração do extrato, ocorreu inibição do crescimento da linhagem do adenocarcinoma ovariano, sendo que nas oito linhagens restantes nota-se ação citocida.

A Figura 13 representa a curva concentração-resposta do extrato bruto etanólico (EBE) de *Myroxylon balsamum*, sobre as linhagens celulares.

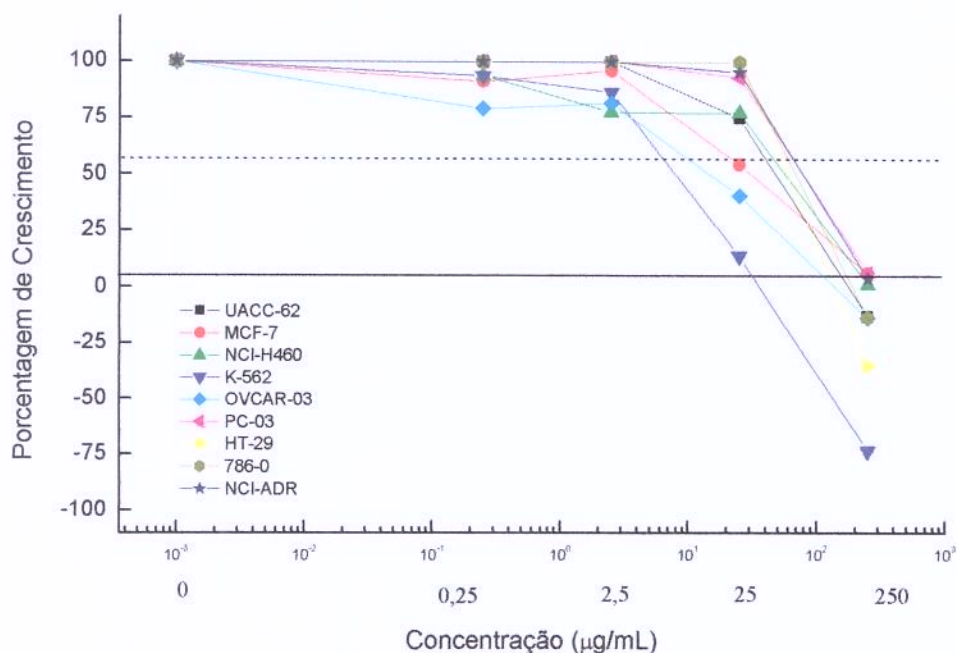


Figura 13. Curva concentração resposta do extrato bruto etanólico (EBE), para *Myroxylon balsamum*, sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

A análise da curva demonstra uma atividade citostática do extrato na concentração de 25 µg/mL sobre o carcinoma mamário, adenocarcinoma ovariano e leucemia. Em 250 µg/mL o EBE de *M. balsamum* promoveu inibição do crescimento do adenocarcinoma prostático, carcinoma mamário e mamário resistente, sobre as demais linhagens a ação produzida foi citocida.

2. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO DICLOMETÂNICO DE *Miroxylon balsamum*

2.1. Teste de atividade geral (*Screnning* Farmacológico)

O EBD de *M. balsamum*, nas doses de 100, 300, 1000 e 2000 mg/kg, produziu sinais de toxicidade quando comparado aos animais controle. Os animais tratados com o extrato pela via intraperitoneal, apresentaram, nas doses de 100 e 300 mg/kg, alterações leves de coordenação motora, sedação, relaxamento muscular. Nas doses de 1000 e 2000 mg/kg os animais manifestaram, após 20 minutos, hipnose, hipotermia e anestesia geral, que persistiram até o final do período de observação de 4 horas.

Durante a observação por quinze dias, todos os animais, mantidos em ambiente controlado (com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C, com água mineral e ração *ad libitum*) mantiveram seu estado normal; nesse período nenhum óbito foi registrado.

2.2. Avaliação da atividade no Sistema Nervoso Central (SNC)

Este teste buscou avaliar a potencialização do EBD de *M. balsamum* (nas doses de 100, 300, 500 e 1000 mg) do efeito anestésico do éter etílico. O grupo experimental tratado com diazepam (3 mg/kg) apresentou um aumento de 136,8%, em comparação com o grupo salina, no tempo de duração da hipnose.

Dos animais tratados com o EBD de *M. balsamum*, somente o grupo que recebeu a dose de 300 mg/kg, apresentou exacerbação na duração da hipnose (148,33%) superior aos grupos salina e diazepam. O grupo tratado com a dose de 100 mg/kg não apresentou atividade significativa, comparado com o grupo salina.

Em 500 mg/kg nota-se, em comparação com o grupo salina, uma exarcebação do potencial indutor de sono em 92,31% (Figura 14).

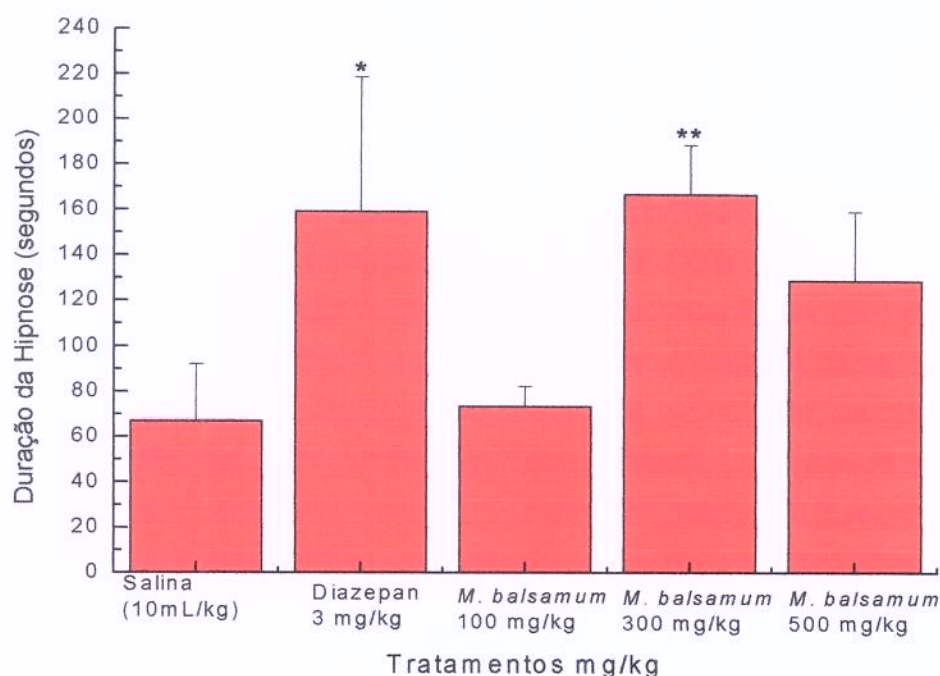


Figura 14. Efeito hipnótico em grupos previamente tratados com salina (10 mL/kg), diazepam (3 mg/kg) e *M. balsamum*, administrados via intraperitoneal, em modelo de atividade hipno-sedativa induzida por éter etílico, nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg. Os resultados são expressos em média ($\pm$ erro padrão) de 05 animais por grupo experimental. ANOVA_(4,15) = 8,34. $p < 0,0001$. Teste de Duncam: * $p < 0,001$.

O grupo experimental tratado com o EBD de *M. balsamum*, após 20 minutos da administração via intraperitoneal, mostrou-se sob estado anestesiado (Figuras 15 e

16), não sendo possível registrar os tempos de perda de reflexo postural e duração da hipnose.



Figura 15. Foto registrada durante a execução do teste de ação hipno-sedativa; demonstrando atividade hipnótica do EBD de *M. balsamum* (na dose de 1000 mg/kg) em animais dispostos em decúbito dorsal.



Figura 16. Foto registrada durante a execução do teste de ação hipno-sedativa; demonstrando atividade hipnótica do EBD de *M. balsamum* (na dose de 1000 mg/kg).

Na seqüência foram avaliados dois princípios ativos, o diazepam (3 mg/kg) e a prometazina (100 mg/kg), para comparar suas atividades depressoras do SNC. Comparados com o grupo salina observou-se um acréscimo de 136,8% (diazepam) e 1828% (prometazina). ANOVA $(2,10) = 14,3$. $p < 0,001$. Teste de Duncam: prometazina $p < 0,001$.

2.3. Atividade antinociceptiva

Neste modelo experimental se observa as reações dos animais ao estímulo nociceptivo ao calor. Os animais tratados com o EBD de *M. balsamum* nas doses de 100 e 300 mg/kg não apresentaram aumento no tempo de reação ao estímulo álgico térmico após 30, 60, 90 e 120 minutos decorridos do tratamento via intraperitoneal.

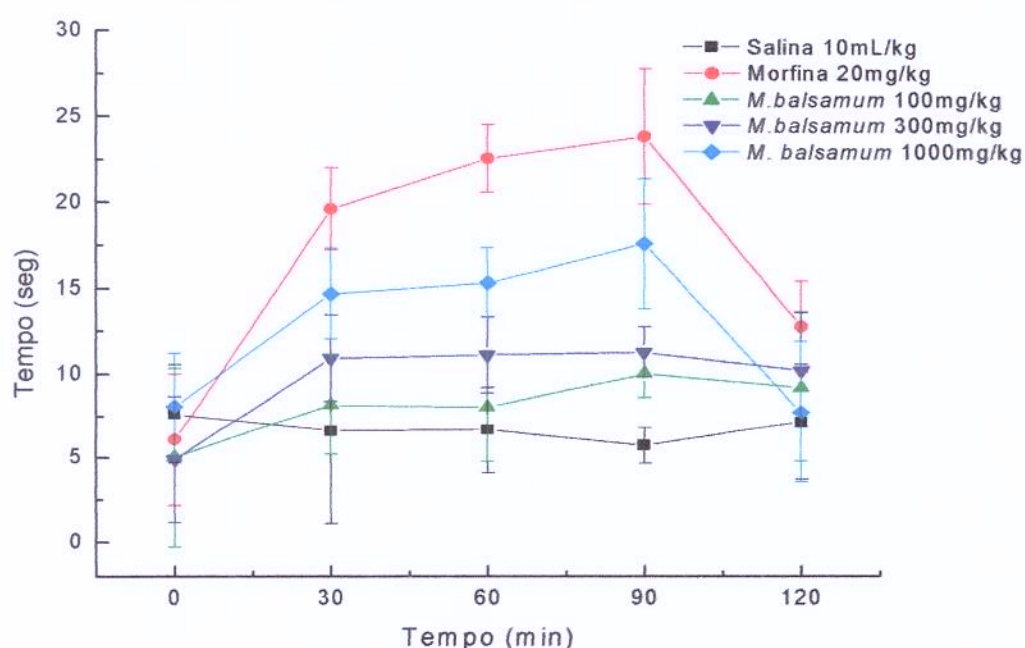


Figura 17. Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados pela via intraperitoneal com salina (10 mL/Kg), morfina 20 mg/kg) e com EBD de *M. balsamum* (nas concentrações de 100 mg/kg; 300mg/kg e 1000mg/kg). Os resultados são expressos em média ($\pm$ erro padrão) de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: $F_{(4,25)}$: Basal: 1,4 $p < 0,01$; 30 min: 7,1 $p < 0,001$; 60 min: 4,8 $p < 0,001$; 90 min: 7,15 $p < 0,001$; 120 min: 2,3 $p < 0,001$.

Na concentração de 1000 mg/kg do EBD de *M. balsamum* apresentaram aumento no tempo de reação de 123,4%; 130,8%; 214% e 8,4% após 30, 60, 90 e 120 minutos, respectivamente. A morfina, utilizada como controle positivo, produziu um aumento, no tempo de reação dos animais, de 198,3%; 239,5%; 317% e 79% decorridos 30, 60, 90 e 120 minutos.

2.4. Atividade antiulcerogênica

2.4.1. Úlcera induzida por Indometacina

Neste modelo experimental (Figura 18), o EBD de *M. balsamum*, na dose de 1000 mg/kg, reduziu o ILU em 52,7%. A cimetidina, utilizada como controle positivo na concentração de 100 mg/kg, promoveu uma redução do ILU em 93,3%.

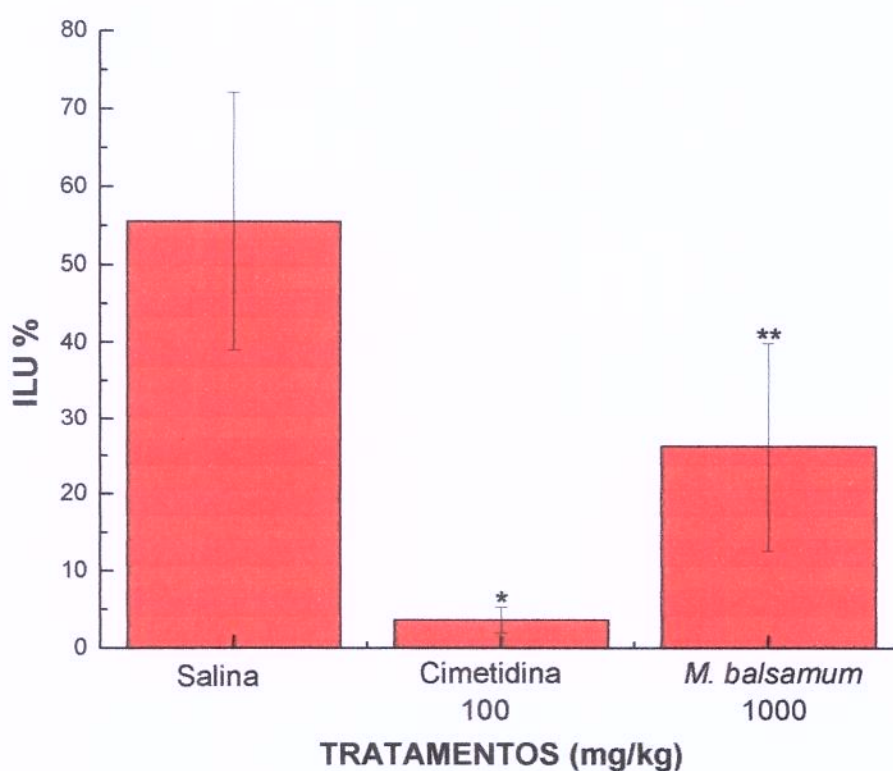


Figura 18. Efeito da administração oral do EBD de *M. balsamum* e cimetidina em modelo de úlcera induzida por indometacina. $ANOVA_{(2,14)} = 25,2$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$ ** $p < 0,01$.

2.4.2. Úlcera induzida por Etanol

Neste modelo experimental (Figura 19) o EBD de *M. balsamum*, na dose de 1000 mg/kg, reduziu o ILU em 88,2%. A carbenoxolona, utilizada como controle positivo na concentração de 200 mg/kg, promoveu uma redução do ILU em 85,7%.

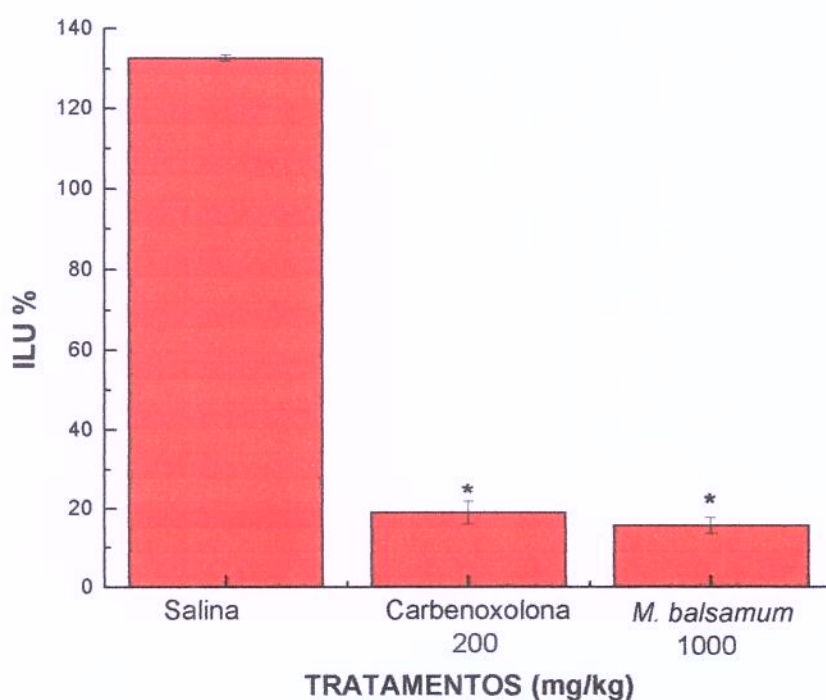


Figura 19. Efeito da administração oral do EBD de *M. balsamum* e carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados são expressos em média ($\pm$ erro padrão) de 06 animais por grupo experimental. ANOVA_(2,15) = 18,5 $p < 0,001$. Teste de Duncam: * $p < 0,001$.

2.4.3. Úlcera induzida por etanol (grupo tratado com diazepam)

Na Figura 20 observa-se que a carbenoxolona reduziu o ILU em 94,7%. Já no grupo tratado oralmente com *M. balsamum* (300 mg/kg) a redução foi de 90,9%. O diazepam não produziu efeito antiulcerogênico.

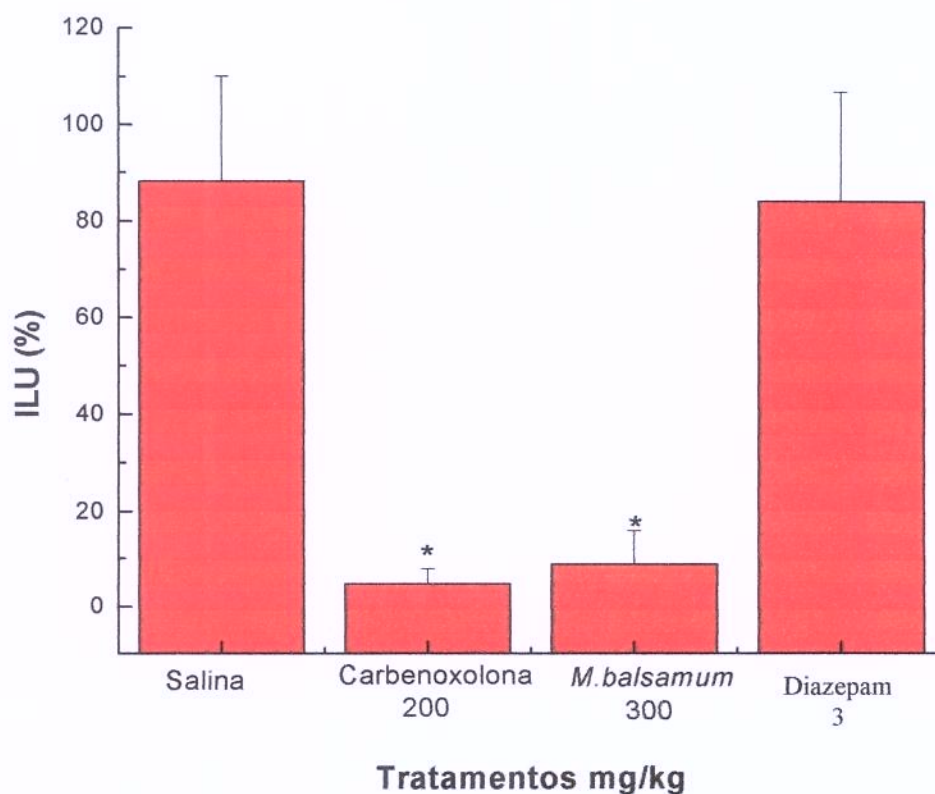


Figura 20. Efeito da administração oral do EBD de *M. balsamum* e carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados são expressos em média ($\pm$ erro padrão) de 06 animais por grupo experimental. ANOVA_(5,30) = 51,2 $p < 0,001$. Teste de Duncam: * $p < 0,001$.

2.4.4. Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀)

O efeito antiulcerogênico apresentado pelo EBD de *M. balsamum*, em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, quando administrado oralmente nas concentrações de 100, 300 e 1000 mg/kg não possibilitou a determinação da DE₅₀ por regressão linear. Os resultados na Figura 19 demonstram uma redução do ILU das doses utilizadas, 100, 300 e 1000 mg/kg, em 91,1%, 95,2% e 92,3%, respectivamente.

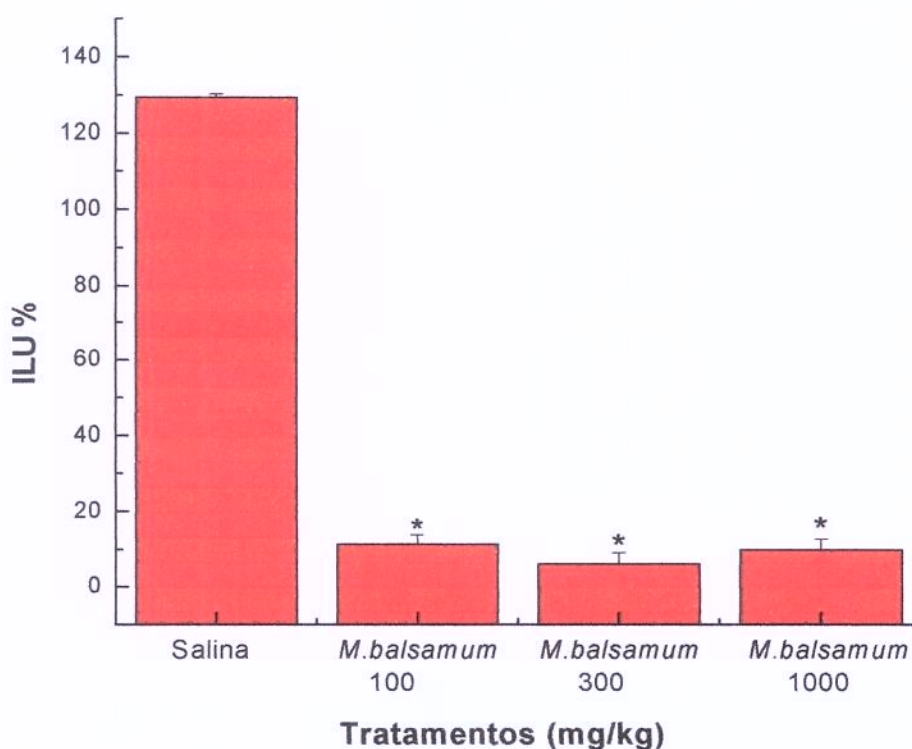


Figura 21. Efeito do EBD de *M. balsamum*, administrado via oral, em modelo de úlcera induzida por etanol para a determinação da DE₅₀, nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Os resultados são expressos em média ($\pm$ erro padrão) de 06 animais por grupo experimental. ANOVA _(3,19) = 15,5. $p < 0,001$. Teste de Duncam: $*p < 0,001$.

2.4.5. Avaliação da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica

Na Figura 22 pode-se observar que, em comparação com o grupo salina, os animais tratados com salina e indometacina apresentaram um aumento do ILU em 17,9%. Os grupos tratados com *M. balsamum* e indometacina e *M. balsamum* não apresentaram diferença no ILU (inibição de 93,6% e 91,9%, respectivamente).

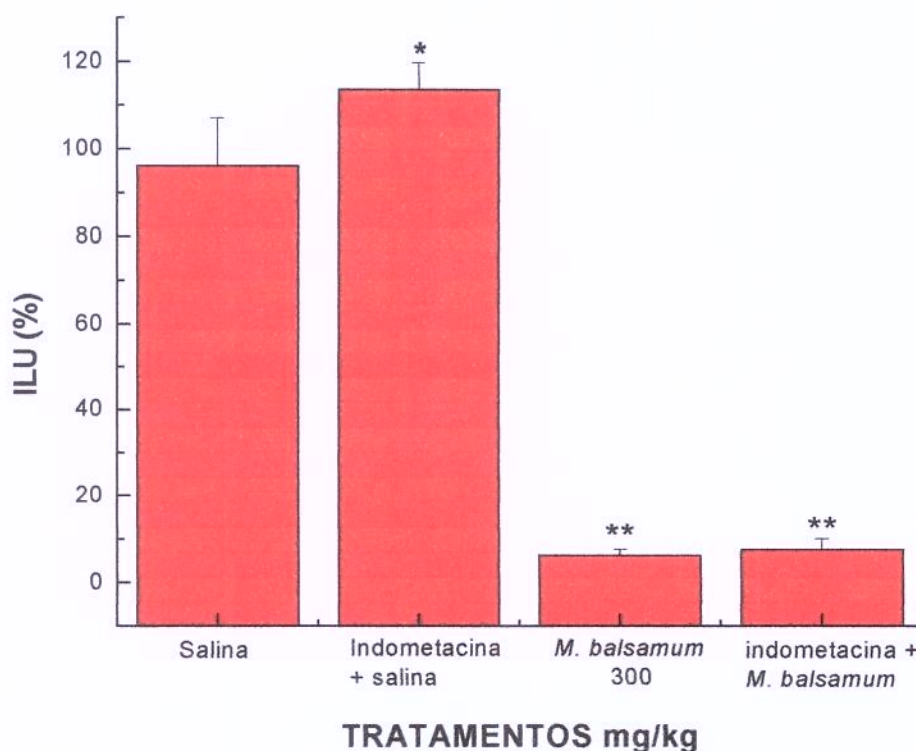


Figura 22. Efeito do EBD de *M. balsamum* na dose de 300 mg/kg, via oral, em modelo de úlcera induzida por etanol, para verificação da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica, em ratos previamente tratados com indometacina (via subcutânea). ANOVA_(3,18) = 87,7. $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,1$ ** $p < 0,001$.

2.4.6. Avaliação de substâncias sulfidrílicas não proteicas sobre a citoproteção gástrica

Em comparação com o grupo salina (Figura 23), os animais tratados com salina e NEM apresentaram um aumento da ILU em 87,6%. Os grupos tratados com *M. balsamum* e NEM e *M. balsamum* não apresentaram diferença estatística no ILU (inibindo em 96,6% e 92,6%, respectivamente).

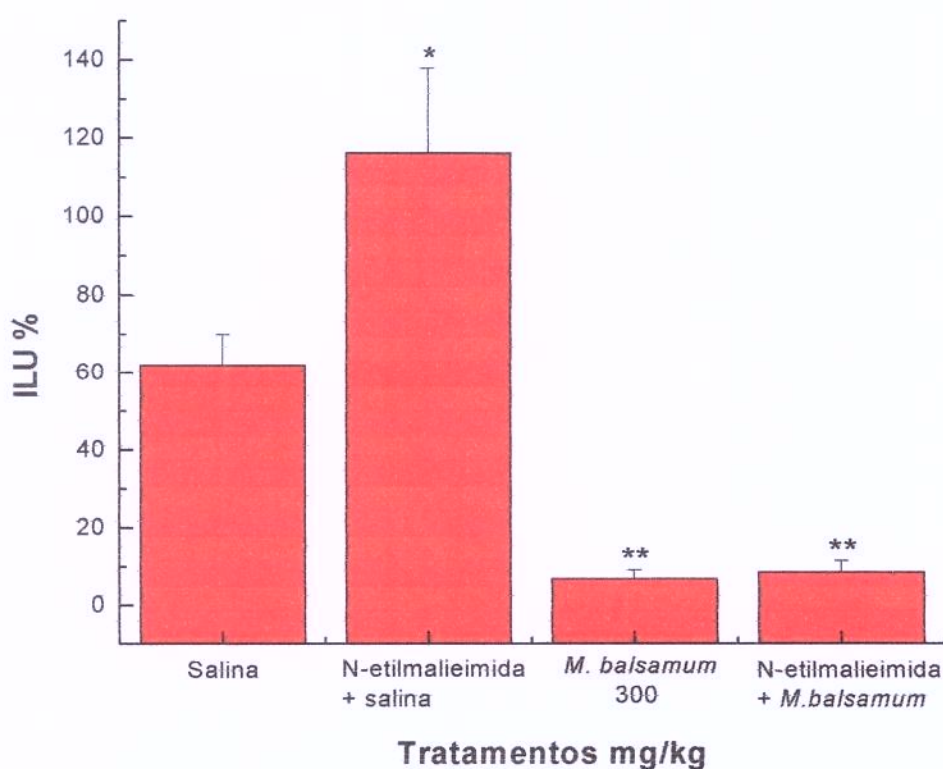


Figura 23. Efeito do EBD de *M. balsamum* na dose de 300 mg/kg, via oral, em modelo de úlcera induzida por etanol, para verificação da participação de substâncias sulfidrílicas não protéicas na citoproteção gástrica, em ratos previamente tratados com NEM. ANOVA_(5,28) = 42,9. $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$ ** $p < 0,001$.

2.4.7. Avaliação da inibição da secreção gástrica por ligadura de piloro

Neste modelo de ligadura de piloro o EBD de *M. balsamum* (300 mg/kg) reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H^+ em 42% e 36%, respectivamente (Tabela 3). A cimetidina (controle positivo, na dose de 100 mg/kg) não alterou o volume de secreção gástrica, mas reduziu a concentração de íons H^+ em 56,2%. Os resultados são expressos através da média $\pm$ desvio padrão da média do volume de secreção gástrica e da concentração de íons H^+ .

Tabela 3. Efeito da administração intraduodenal do EBD de *M. balsamum* e da cimetidina, em modelo de ligadura de Píloro.

TRATAMENTOS	DOSE (mg/kg)	pH	VOLUME (mL)	[H^+]
Salina	---	$1,80 \pm 0,83$	$2,84 \pm 0,61$	$1,78 \pm 0,41$
Cimetidina	100	$3,75 \pm 1,70^*$	$2,68 \pm 1,00$	$0,78 \pm 0,15^*$
<i>M. balsamum</i>	300	$3,00 \pm 0,63$	$1,65 \pm 0,94$	$1,14 \pm 0,57^*$

ANOVA: pH: $F_{(2,12)} = 3,92$ $p < 0,05$; Volume: $F_{(2,12)} = 0,83$ $p > 0,05$; H^+ : $F_{(2,12)} = 5,92$ $p < 0,05$.

Teste de Duncan: $*p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O crescimento contínuo na ocupação do solo, decorrente da expansão agrícola ou da grilagem de terras, acarreta redução na biodiversidade, alterações climáticas e o enfraquecimento, cultural e econômico das populações locais. Por outro lado, a cadeia produtiva dos produtos manufaturados a partir da madeira tropical representa parcela significativa da economia nacional, gerando emprego e renda no cenário interno e, divisas no comércio externo. A exploração racional da floresta tropical implica na elaboração de um projeto de manejo florestal sustentável, que deve ser aprovado pelo órgão regulador.

Tal projeto deve promover o desenvolvimento de técnicas que irão garantir a exploração contínua e a produção sustentável de madeira e outros produtos, contribuindo para manter a terra produtiva, aumentando a rentabilidade, produção, segurança no trabalho, e redução na geração de resíduos florestais. Contudo, o processo industrial de manufatura ainda gera quantidade significativa de resíduos, mesmo quando a exploração da floresta é feita de acordo com os preceitos legais e ambientais. O presente trabalho teve como princípio indicar uma possibilidade de uso para os rejeitos da industrialização, os resíduos grossos de quatro espécies florestais utilizadas na indústria madeireira, que foram processados para extração de seus princípios ativos e subsequente teste de atividade farmacológica.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a cada ano surgem dez milhões de casos novos de câncer e cinco milhões de óbitos. Estima-se que a partir do ano 2020 surgirão anualmente vinte milhões de casos de neoplasias malignas e cerca de 70% dos pacientes estarão residindo em países onde há precariedade em recursos para o controle do câncer. No Brasil o câncer é a segunda causa de óbitos, acometendo aproximadamente cem mil indivíduos por ano (Ministério da Saúde, 2000).

Em células sadias, a proliferação é controlada através do ciclo celular, que possui mecanismos de checagem (*checkpoints*), regulados por genes específicos, em

cada fase do ciclo celular. No decurso desse processo ocorrem reparos, quando da ocorrência de lesões no DNA (Alberts et al., 2002). Segundo Bulavim (2001), uma proteína da família quinase, a Cdc2, é a principal enzima regulatória durante a transição da fase G2 para a fase M do ciclo celular. No decorrer do ciclo, esta seria fosforilada, permitindo assim a transição de fases. Para o arresto em G2 (quando no DNA da célula é detectada mutação) é necessária uma estabilização nos locais de fosforização dessa enzima, contudo este não seria o único mecanismo envolvido nesse processo. Proteínas específicas como a p38 e a quinase Chk1 participam, juntamente com a Cdc2, desse mecanismo. Caso não ocorra o arresto celular, outro mecanismo é acionado, o da morte celular por apoptose.

Conforme Susin (1998), apoptose é um processo de indução da morte celular, cuja ativação de processos catabólicos e enzimas, que antecedem a citólise, permitem sua identificação, reconhecimento e digestão por suas células vizinhas. A mitocôndria está diretamente veiculada a este processo (Green, 1998; Susin, 1998; Takeyama et al., 2002). Em casos onde lesões, ou mutações do DNA, que são incitadas por processos endógenos e/ou exógenos, acumulam-se (processo este que envolve falha no mecanismo de reparo do DNA) ocorre a proliferação e progressão celular (Setlow, 2001; Izumi et al., 2003) iniciando uma neoplasia.

Células neoplásicas, através de produção de ácidos metabólicos (gerados pela glicólise) e de ácido láctico, aumentam o efluxo de prótons reduzindo o pH intracelular e conseqüentemente impedem a apoptose (Izumi et al., 2003). Células tumorais demonstram determinadas características (Macdonald & Ford, 2000) diferenciando-as das células normais:

- (1) fatores de crescimento: células tumorais são capazes de secretar seus próprios fatores de crescimento, estimulando desta forma sua proliferação independente de células vizinhas saudáveis;

- (2) junção celular: células tumorais não dependem de contato com a superfície do meio extracelular para crescerem;
- (3) cultura "*in vivo*": células tumorais crescem, freqüentemente, umas sobre as outras enquanto as células normais, que possuem inibição por contato, formam uma monocamada;
- (4) aderências: células tumorais apresentam menor aderência quando comparadas com células sadias;
- (5) proliferação: células tumorais proliferam descontroladamente.

Desta forma, a célula cancerígena pode ser caracterizada pela perda de função, em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, de sua capacidade de invadir os tecidos adjacentes e metástase (Brentani et al., 1998; Simpson et al., 1998).

A metodologia de triagem em cultura de células tumorais humanas, preconizada pelo National Cancer Institute (NCI/EUA) e realizada na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, permite a avaliação de substâncias químicas, inclusive de origem vegetal, em diversos tipos de câncer, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade (Skehan et al., 1990). A atividade que se procura identificar neste método de triagem é uma resposta dependente da concentração, bem como ação citocida em baixas concentrações e para linhagens específicas, ou seja, seletividade. As amostras selecionadas de resíduos grossos correspondem a quatro das espécies arbóreas mais comumente utilizadas na indústria de pisos de madeira.

O EBD de *Tabebuia* sp, na concentração de 2,5 µg/mL, apresentou ação citocida para as linhagens de adenocarcinoma ovariano, melanoma e leucemia. Uma atividade citocida em baixa concentração, para somente três das nove linhagens, é um perfil desejado para um extrato bruto, pois demonstra seu potencial para um possível agente quimioterápico. Seu EBE também apresentou ação citocida (em 25 µg/mL) para todas as linhagens tumorais. O gênero *Tabebuia* apresenta em sua composição química uma quinona conhecida como lapachol, cuja atividade anticâncer foi muito relatada (Dinnen, 1997; Renou, 2003). O EBD melhor demonstra melhor perfil na atividade anticâncer, pois sua ação indica potência em baixa concentração.

Através dos resultados do teste de atividade anticâncer foi possível averiguar que a extração (tanto com o solvente diclorometano como o etanólico) do resíduo de *Tabebuia* sp não promoveu uma separação adequada do(s) composto(s) ativo(s), já que ambos os extratos brutos demonstram determinado grau de atividade. Isto pode ocorrer devido ao fato do(s) composto(s) com atividade apresentarem estrutura química similar, o que confere pouca diferença de polaridade, não permitindo desta forma uma separação apropriada.

O EBE da *B. nitida* demonstrou atividade citocida, na concentração de 25 µg/mL para as linhagens de adenocarcinoma prostático, leucemia e melanoma. A seletividade para três linhagens demonstra um possível potencial para estudos posteriores, tanto fitoquímicos quanto farmacológicos. Já seu EBD não apresentou atividade anticâncer significativa. O EBD, na concentração de 250 µg/mL, promoveu morte de todas as linhagens, em porcentagem de crescimento distintas. Isto indica uma ação citotóxica, ou seja, que provoca morte celular sem nenhuma seletividade. A análise dos gráficos dos extratos brutos demonstra um perfil de atividade anticâncer similar, possivelmente por não ocorrer uma separação adequada de seu(s) composto(s) químico(s).

A espécie *D. odorata* teve, neste teste, melhor atividade com o extrato bruto diclorometânico, já que na concentração de 25 µg/mL apresentou atividade citocida seletiva para leucemia e ademocarconoma ovariano. Jang et al. (2003) relatam a presença de flavonóides em sua composição química, compostos que notoriamente apresentam atividade anticâncer. Os gráficos de ambos os extratos brutos demonstram atividade, repetindo o comportamento observado nas espécies *Tabebuia* sp e *B. nitida*.

O EBD de *M. balsamum* demonstrou ação citocida, na concentração de 25 µg/mL, para as linhagens de melanoma, adenocarcinomas (colorretal, renal e pulmonar), carcinomas mamário e mamário resistente, e leucemia. Seu EBE foi citotóxico para todas as linhagens tumorais na concentração mais elevada (250 µg/mL). O resultado com o EBE não é condizente com o perfil da atividade procurada para dar continuidade aos ensaios fitoquímicos e farmacológicos, pois apresentou atividade citotóxica para todas as linhagens, na maior concentração utilizada. A análise, dos gráficos dos extratos brutos, demonstra melhor perfil de separação do(s) composto(s) químico(s).

Para obter ação citocida seletiva para células tumorais e não para as células sadias, é necessário conhecer os diversos mecanismos intracelulares que controlam e regulam as mesmas. Muitos mecanismos de controle intracelular são capazes de conter e até mesmo eliminar uma célula tumoral. Os medicamentos quimioterápicos atuam mimetizando ou inibindo mecanismos celulares, entretanto é necessário conhecimento prévio dos mesmos, especialmente para se determinar a maneira como o medicamento atua sobre o organismo (tanto para as células tumorais como as células sadias). Esse conhecimento proporciona vantagens na procura e no desenvolvimento de medicamentos, pois indica as possíveis formas de se encontrar ação citocida seletiva para as células tumorais.

Dentre tais mecanismos, está a ação da proteína envolvida na regulação do ciclo celular, a supressora de tumor p53; cujas funções abrangem inibir o crescimento celular, induzir arresto do ciclo celular, assim como apoptose. Sua estabilidade é regulada por uma segunda proteína, a MDM2, que intervém na ubiquinação da p53, permitindo desta forma seu reconhecimento e conseqüente degradação por proteossomo (Vousden, 2002). Mutações no gene *TP53* ou defeitos nas vias de sinalização para a p53 acabam por inibir a atividade dessa proteína, aumentando a malignidade do tumor (Vousden & Lu, 2002).

Estudos evidenciam uma elevada expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), em tumores de próstata (Patel et al., 2005) e tumores de cólon (Dong et al., 2005). Esta enzima está envolvida na geração de radicais livres, aumento da proliferação celular, diminuição do processo apoptótico, indução e manutenção da angiogênese (Masferrer et al., 2000; Kirschenbaum et al., 2001; Myers et al., 2001; Sjodahl, 2001), assim como no crescimento, viabilidade e controle da metástase do tumor (Masferrer et al., 2000; Yamamoto & Viale, 2003).

A atividade antiproliferativa produzida pelos extratos analisados pode decorrer de uma ação específica sobre quaisquer desses mecanismos mencionados, entre outros. Os extratos são produzidos através de extração por fluxo contínuo (aparelho denominado Soxhlet), utilizando-se de solventes com polaridades diferentes. O primeiro solvente (diclorometano) é de polaridade intermediária (mais apolar), já o etanol 98% apresenta uma polaridade mais elevada (mais polar). Portanto, cada extrato produzido apresentará compostos químicos com diferentes polaridades, conforme a característica do veículo extrator.

As atividades encontradas durante o estudo farmacológico poderão ser ocasionadas por uma, ou mais, das substâncias químicas presentes nos extratos. Como a primeira extração produz um extrato bruto, ou seja, que contém muitas substâncias químicas, é possível supor que um mesmo extrato apresente

atividade em mais de um dos modelos de estudo farmacológico; sendo que tais atividades podem ser promovidas por substâncias diferentes.

Assim, para prosseguimento dos estudos de avaliação farmacológica, foi selecionada a espécie *Myroxylon balsamum*, em função do perfil apresentado no teste anticâncer de cultura de células tumorais humanas e, adicionalmente, tratar-se de uma espécie arbórea muito utilizada na indústria madeireira, gerando abundante resíduo grosso, por ser pouco explorada para a obtenção de princípios ativos de origem vegetal e ter caracteres organolépticos como odor e textura oleosa (indicativos de lipossolubilidade). Na sequência foi avaliada a atividade farmacológica (testes de ação hipno-sedativa, antinocicepção e antiulcerogênci) do extrato bruto diclorometânico (EBD) de *M. balsamum*.

O teste de atividade geral (screening hipocrático) possibilita a avaliação dos efeitos do extrato ou droga estudados sobre o estado de consciência e disposição, sobre a capacidade exploratória, coordenação motora, tônus muscular, sistema reflexo e possível ação sobre o sistema nervoso central (SNC) e autônomo. Os resultados preliminares, sobre os possíveis efeitos do extrato no organismo, permitem um direcionamento das investigações científicas posteriores (Malone, 1977). Nos primeiros 15 minutos é avaliada a capacidade exploratória, ou seja, o animal explora o local, um ambiente novo, o que é medido através da ambulação. Entre os 15 e 60 minutos posteriores é avaliada a atividade motora do animal, isto é, ele já conhece o ambiente e não explora mais, e sim se movimenta (Carlini & Burgos, 1979).

Como descrito previamente na análise organoléptica do extrato em questão, o odor e textura oleosa indicam a presença de componente(s) químico(s) lipossolúvel(is), capaz(es) de transpor a barreira hematoencefálica, proporcionando atividade direta sobre o SNC; conforme observado no teste de atividade geral. O EBD de *M. balsamum* produz depressão do SNC. Uma

substância química ou um fármaco, para atuar sobre o SNC, necessita transpor a lenta difusão proporcionada pelas células endoteliais (ricas em junções de oclusão) e a barreira hematoencefálica, que separa o SNC da periferia (Rang et al., 2003). A lipossolubilidade é um fator determinante para a difusão passiva de qualquer substância para o SNC; sendo sua passagem proporcional às características lipossolúveis da mesma.

Com o objetivo de explorar os resultados preliminares obtidos a partir da realização do "screening" hipocrático buscou-se avaliar as ações específicas sobre o SNC (atividade hipno-sedativa) e antinociceptiva.

O estado de anestesia pode corresponder a diversos graus de imobilidade, amnésia, hipnose, ação antinociceptiva, relaxamento muscular e depressão dos reflexos autônomos, dependendo do procedimento clínico. Para se obter tal estado é preciso utilizar de mecanismos endógenos do organismo, mimetizando suas ações. Os receptores ligados a canais iônicos, como os receptores para γ -ácido aminobútrico (GABA), glicina, serotonina-3 (5-HT₃) e nicotínicos para acetilcolina (ACh), apresentam ação dita inibitória. Tais receptores, uma vez expostos a pequenas quantidades de seus agonistas endógenos, permitem um influxo de íons, promovendo uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica neuronal e impossibilitando a ação de neurotransmissores excitatórios (Krasowski & Harrison, 1999).

A capacidade do EBD de *M. balsamum* de induzir sedação e/ou hipnose foi avaliada através da indução de sono por éter etílico. A escolha do éter etílico como agente indutor do sono segue os mesmos princípios gerais dos agentes barbitúricos, ou seja, os efeitos são mediados via o complexo de receptores GABA_A (Chambers et al. 1978; Krasowski & Harrison, 1999; Jenkins et al., 2001).

Os receptores para o γ -ácido aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório presente em aproximadamente 30% das sinapses, é responsável por regular o estado de vigília, ansiedade, tensão muscular, atividade epileptogênica e funções da memória no sistema nervoso central. Sobre esses receptores, compostos por subunidades α , β , γ , δ e ϵ , atuam os medicamentos benzodiazepínicos e barbitúricos, utilizados no tratamento de ansiedade e insônia (Rang et al., 2003; Beason, 2004). As ações alostéricas sobre as subunidades dos receptores determinam o perfil clínico do medicamento, independentemente do grupo farmacológico em que se encontram.

Para a execução do teste foram utilizadas doses padronizadas de 100, 300, 500 e 1000 mg/kg. Em todas as doses foi observada a duração da hipnose, não sendo possível registrar o tempo de latência, devida a rápida ação do EBD sobre o SNC. Na dose de 1000 mg/kg, que apresentou a atividade mais intensa do EBD, os animais já não apresentam reflexo postural após 15 minutos da administração do extrato, encontrando-se em estado hipnótico e hipotérmico, que durou aproximadamente 3,5 horas após a administração (Figuras 15 e 16). As manifestações físicas descritas para a dose de 1000 mg/kg do EBD de *M. balsamum* podem ser descritas como um estado de anestesia geral.

Muitos medicamentos que promovem relaxamento muscular, diminuição da ansiedade e hipnose são capazes de promover uma atividade antinociceptiva, através de retardamento da transmissão de impulsos nervosos das fibras nociceptivas do tipo C por inibição da propagação de neurotransmissores excitatórios. Todavia não foi determinado o mecanismo de ação preciso através do qual o EBD de *M. balsamum* ocasionou o estado de depressão do SNC.

O teste da placa quente (hot plate) mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico (temperatura constante de $56,4 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) (Woolfe & MacDonald, 1944). Este teste proporciona uma detecção de analgésicos de ação central, como

os opióides (Rates & Barros, 1994). O EBD de *M. balsamum*, na dose de 1000 mg/kg, apresentou uma resposta similar à da morfina (agente opióide utilizado como controle positivo na realização do teste). A ação antinociceptiva pode ser promovida através da depressão do SNC, a níveis do córtex e do hipocampo no SNC e não de atividade específica das vias nociceptivas.

Prosseguindo com as avaliações farmacológicas, o EBD de *M. balsamum* foi avaliado em modelos experimentais para atividade antiulcerogênica. A secreção ácida no lúmen estomacal tem a função fisiológica de promover uma etapa do processo digestivo. Após estímulos, visuais e olfativos, ou ingestão de alimentos, o sistema entérico e o nervo vago promovem a liberação de neurotransmissores e hormônios, como acetilcolina (ACh), gastrina e histamina, que ocasionarão a ativação de bombas H^+/K^+ -ATPase e, conseqüentemente, a secreção ácida (Aihara et al., 2003).

A gastrina, liberada pelas células antrais G e através da estimulação do nervo vago, com conseqüente liberação de ACh, estimula a liberação de histamina de células enterocormafins similares (enterochromaffin like, ECL) e mastócitos, que em conjunto atuam promovendo aumento da secreção ácida. Após a diminuição do pH intragástrico ocorre a liberação de somostatina, pelas células antrais D, inibindo a liberação de gastrina (Aihara et al., 2003).

A defesa da mucosa gastroduodenal em virtude da constante redução do pH luminal está subdivida em pré-epitelial, epitelial e subepitelial. Através de fatores endógenos como prostaglandinas (PGs), glutathione reduzida (substâncias sulfidrilas não protéicas), óxido nítrico, ativações dos receptores proteinase-ativadas (PAR 1 e 2 por proteases) promovem hiperemia, aumento de secreção de muco e de bicarbonato de sódio, assim como a inibição da secreção ácida (Kaunits & Akiba, 2004). Através desses inúmeros processos é possível a manutenção fisiológica do trato gastrointestinal (TGI), contudo esse ténue

equilíbrio pode ser rompido por fatores como estresse, ingestão contínua de bebidas alcoólicas ou medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, e infecção por *Helicobacter pylori*, provocando o aparecimento de gastrites ou úlceras pépticas.

Nos estudos envolvendo o mecanismo de ação para uma droga antiulcerogênica, existem duas possibilidades. O primeiro refere-se aos mecanismos que aumentam a resistência das células da mucosa gástrica contra fatores agressivos, como o ácido clorídrico, a pepsina, a ingestão de etanol e o uso de medicamentos antiinflamatórios não esteroidais e /ou que limitam o acesso destes agentes às células da mucosa. O segundo refere-se aos mecanismos que regulam o processo de secreção ácida gástrica (Allen et al., 1993).

Na ocorrência de uma injúria periférica o organismo reage promovendo reações em cascata, que liberam substâncias químicas que agem localmente, ocasionando um processo inflamatório e hiperalgesia, na tentativa de restaurar o tecido lesionado. Os prostanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas) são produzidos através da ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) sobre os fosfolípidos de membrana dando origem ao ácido araquidônico (Samad et al., 2002). Os agentes antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs) tem como mecanismo de ação a inibição da enzima ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1e 2) e conseqüentemente da síntese de PGs (Vane, 1998).

Peskar (2001) demonstrou que durante a estimulação vagal as prostaglandinas PGE₂ e PGF_{2α} são liberadas em maior quantidade, promovendo aumento da proteção da mucosa gástrica; possivelmente por inibir a ativação leucocitária (Harada et al., 1999). O primeiro método empregado foi a indução de úlcera por indometacina que abrange os estudos de mecanismos de citoproteção e secreção ácida gástrica. O extrato de *M. balsamum*, administrado via oral na concentração de 1000 mg/kg, reduziu o ILU em 52,7%.

No modelo de úlcera induzida por indometacina, a dose inicialmente utilizada foi de 1000 mg/kg. Após a realização de uma curva dose-resposta (DE50%) com as doses empregadas no teste de atividades sedativas-hipnóticas; o resultado obtido demonstra uma atividade antiulcerogênica estatisticamente igual entre as doses administradas, sendo dessa forma selecionada a dose que demonstrou melhor perfil hipno-sedativo (300 mg/kg).

O modelo seguinte foi o de úlcera induzida por etanol absoluto, que avalia a ativação de fatores denominados citoprotetores da mucosa gástrica (Robert, 1979). O etanol tem como principal mecanismo ulcerogênico a precipitação das proteínas presentes no muco gastroprotetor. Também é considerado um agente irritante da mucosa gástrica, promove a depleção da substância endógena sulfidril não protéica, encontrada no estômago e que desempenha papel importante na citoproteção neutralizando os radicais livres (Oliveira et al., 2004). O extrato promoveu redução do ILU em 88,2% e a carbenoxolona reduziu o ILU em 85,7%. Aparentemente o EBD exerce maior atividade nesse modelo experimental, em comparação com o modelo de úlcera induzida por indometacina, pois reduziu o ILU em 88,2%.

A análise dos resultados iniciais, em modelos antiulcerogênicos, demonstrou um elevado potencial do EBD de *M. balsamum* em inibir a formação de úlceras gástricas agudas. Podem-se inferir possíveis mecanismos que promoveriam tal atividade, exarcebação na produção de substâncias sulfidrílicas não proteicas ou de prostaglandinas, inibição da secreção ácida, atividade anticolinérgica do EBD ou ação sobre receptores de histamina, particularmente em receptores H₂; sendo necessário a realização de testes adicionais para averiguar qual o mecanismo preciso do EBD que promove a ação antiulcerogênica encontrada.

Estudos realizados em modelos experimentais de indução de úlcera por estresse, o uso de diazepam reduziu a formação de úlceras (Kunchandy & Kulkarni, 1987; Mediratta et al., 2001; Gabry et al., 2002). O EBD de *M. balsamum* promoveu

depressão do SNC, característica compartilhada com medicamentos benzodiazepínicos como o diazepam, e redução do ILU em modelos de úlceras induzidas por indometacina e etanol absoluto. Para averiguar uma possível inter-relação entre o mecanismo depressor do SNC e antiulcerogênico (sobre os modelos de úlceras previamente executados) do EBD, realizou-se novamente um teste de úlcera induzida por etanol absoluto, onde o EBD apresentou melhor ILU, incluindo um grupo experimental tratado com diazepam, na mesma dose utilizada nos estudos de depressão do SNC (3 mg/kg).

O grupo tratado com diazepam promoveu um aumento na formação de úlceras, enquanto o EBD continuou a inibir o mesmo processo. Tal comportamento do diazepam pode ser explicado pelo envolvimento do neurotransmissor GABA no processo de regulação do sistema gastroprotetor, estimulando a liberação de gastrina e diminuindo na liberação de somatostatina, na mucosa gástrica (Ekblad et al., 2000), sendo que sua capacidade de inibir a formação de úlceras se restringe ao modelo experimental de úlcera induzida por estresse. Esse resultado descarta o mecanismo de ação gastroprotetor do EBD de *M. balsamum* através de interação com o receptor GABA, conferindo indícios que esta atividade sobre o TGI ocorre por outro mecanismo. Contudo não descarta uma possível ação sobre o receptor GABA_A, no SNC, promovendo assim o estado anestésico observado anteriormente.

Prosseguindo os estudos para determinar o mecanismo de ação antiulcerogênico realizou-se um teste para averiguar a possível intensificação na produção de PGs, que aumenta a proteção da mucosa gástrica através do aumento da produção do muco protetor. Neste modelo a indometacina (10 mg/kg) é administrada subcutâneamente para inibir a síntese de PGs, sem provocar ulceração da mucosa gástrica. Após administração dos tratamentos e do etanol absoluto, se houver diminuição da atividade antiulcerogênica provavelmente o mecanismo de ação envolve a participação de PGs. No entanto os resultados obtidos

demonstram que o extrato continuou a promover proteção gástrica, excluindo a participação da via das PGs do mecanismo antiulcerogênico do EBD.

O ensaio subsequente visou verificar a participação de substâncias sulfidrílicas não proteicas (glutathione reduzida) na citoproteção gástrica. Notoriamente é conhecido que a concentração elevada de glutathione reduzida, encontrada na mucosa gástrica, apresenta atividade antioxidante impedindo a ação de radicais livres sobre a mucosa, assim como reduz a permeabilidade vascular (Szabo, 1981). Neste modelo os grupos experimentais são previamente tratados com um agente alquilante das substâncias sulfidrílicas não proteicas, a N-etilmaleimida, ocasionando inativação das mesmas (Takeuchi et al., 1989), em seguida a úlcera é induzida por etanol absoluto. O tratamento com o EBD continuou a promover proteção da mucosa gástrica, indicando que seu mecanismo de citoproteção não envolve a participação dessas substâncias.

Para averiguar a hipótese de uma atividade anti-secretora, o extrato foi ensaiado em modelo de ligadura de piloro, que possibilitou a avaliação de parâmetros como volume e concentração de íons H^+ do conteúdo gástrico. Esse resultado sugere uma ação anti-secretora do EBD de *M. balsamum*.

Uma ação anti-secretora pode ocorrer por inibição das bombas H^+/K^+ -ATPase (como o omeprazol), por antagonismo de receptores H_2 da histamina (como a ranitidina ou cimetidina) (Aihara et al., 2003), ou ainda por uma atividade anticolinérgica. Conforme citado anteriormente, um extrato bruto contém inúmeros compostos químicos. O EBD do *M. balsamum* apresentou atividade anticâncer, depressora do SNC, antinociceptiva e antiulcerogênica; porém é possível que cada uma das atividades observadas tenha sido decorrente da ação de uma ou mais substâncias químicas presentes no extrato bruto, não indicando necessariamente um único princípio ativo produzindo simultaneamente esses efeitos.

Analisando todos os resultados obtidos pode-se inferir que a atividade farmacológica do EBD de *M. balsamum*, observada em diversos modelos experimentais, pode ser consequência da variedade de compostos químicos presente no extrato, indicando a necessidade de estudos complementares para determinação do mecanismo de ação e identificação dos princípios ativos.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o estudo de atividade farmacológica com extratos brutos obtidos a partir de resíduos madeireiros é uma possibilidade promissora, tanto na identificação de princípios ativos como na agregação de valor à atividade florestal. Indicam também, a necessidade do aprofundamento nas pesquisas visando avaliar a geração de resíduos nos diferentes processos de transformação, separação dos mesmos e outras possibilidades de uso.

Para incentivar a utilização dos resíduos madeireiros na procura de novos princípios ativos com atividade terapêutica é preciso elaborar um plano de gestão envolvendo todas as fases do processo de industrialização da madeira, estabelecendo um perfil para a geração de resíduos. Seria necessário identificar as regiões com concentrações de resíduos que viabilizem a extração em grande escala de compostos ativos assim como estabelecer um procedimento que permita otimizar a identificação e separação dos mesmos, sem que estes sofram algum tipo de processo químico ou físico, que poderia provocar alterações químicas de sua composição original.

Para isso seria necessário estabelecer uma parceria com a indústria madeireira, sendo que tal procedimento proporcionaria vantagens para todos os envolvidos e, ainda, auxiliaria a contornar obstáculos encontrados durante a execução desse trabalho, como por exemplo, a identificação correta da espécie do resíduo.

Em algumas espécies, como as do gênero *Tabebuia*, por exemplo, é muito difícil a identificação precisa apenas com base na análise macroscópica da estrutura anatômica. A associação com a indústria poderia auxiliar na identificação precisa das espécies, com a coleta de material para identificação botânica, e na possibilidade da seleção das toras a partir da extração florestal. Outro possível benefício seria a possibilidade de selecionar o resíduo que será destinado à extração, contornando problemas como a aplicação prévia de algum tratamento químico ou físico ou mistura de várias espécies durante a produção dos resíduos.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos na presente pesquisa, permite concluir:

- ✿ Os extratos obtidos a partir de resíduos florestais demonstraram atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas; com destaque para EBD e EBE de *Tabebuia* sp, EBE de *Bowdichia nitida*, EBD de *Diptoryx odorata* e EBD de *Myroxylon balsamum*.
- ✿ A espécie selecionada, *Myroxylon balsamum* (EBD), apresentou atividade anticâncer, depressora do SNC, atividade antinociceptiva e antiulcerogênica.
- ✿ A atividade farmacológica do EBD de *Myroxylon balsamum* pode ser consequência da variedade de compostos químicos presente no extrato, indicando a necessidade de estudos para determinação do mecanismo de ação e identificação dos princípios ativos.
- ✿ Esses resultados estimulam a continuidade dos estudos com resíduos madeireiros, na busca de novos fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMCI (Associação Brasileira da Indústria de Madeira Processada Mecanicamente) – Estudo setorial 2003 produtos de madeira sólida. **ABIMCI**, Curitiba, 2003. 68 p.
- Aihara, T. et al. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease; past, present, and future. **Pharmacology and Therapeutics**, 98: 109-27. 2003.
- Akisue, G. Caracterização física e química do bálsamo e análise qualitativa de alguns componentes. **Revista Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, 10(1):73-96. 1972a.
- Akisue, G. Caracterização física e química do óleo essencial do bálsamo e análise qualitativa de alguns componentes. **Revista Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, 10(2): 151-65. 1972b.
- Alberts, B. et al. Controle do ciclo celular e morte celular. In: Fundamentos da biologia celular: uma introdução a biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 585-95.
- Allen, A. et al. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiol. Rev**, 73: 823-57. 1993.
- Andrade, E.A.A. et al Volatile constituents of the flowers of *Dipteryse odorata* (Aubl) Willd. **Journal of Essencial Oil Reserch**, 15(3): 211-12. 2003
- Balassiano, I.T. et al. Demonstration of lapachol as a potencial drug for reducing câncer metastasis. **Oncol Rep.**, 13(2): 329-33. Fev 2005.
- Bandeira, P.N. et al. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* MARCH. **Química Nova**, 25(3): 1078-80, 2002.
- Beason, A.N. The benxodiazepine site of the GABAA receptor: am old target with new potential? **Sleep Medicine 5 Suppl**, S9-S15. 2004.
- Borges, A.S. et al. considerações energéticas e econômicas sobre resíduos de madeira processados em serraria. Anais, 7. **Congresso Florestal Brasileiro**, SBS-SBEF, set, 1993.
- Brentani, R.R.; Chammas R.; Coelho F.R.G. Mecanismos de invasão e metástases. In: Brentani, M.N.; Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P., ed. – **Bases da Oncologia**. 1ª ed., São Paulo, Livraria e Editora Marina, p. 91-98, 1998.

- Bulvarin, D.V. et al. p38 and chk1 kinases: different conductors for the G2/M checkpoint symphony. **Current Opinion in Genetics & Development**. 12: 92-7, 2002. Disponível em: <http://www.elsevier/scienc.com/>
- Carlini, E.A.; Burgos, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e o clorobenzapam. **Rev Assoc Bras Psiq São Paulo**, 1(3): 25-31, 1979.
- Carvalho, J.E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: Mercadante, A.Z. et al. ed. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas** vol II. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, p.196-202 2001.
- Chambers, D.M.; Jefferson, G.C.; Ruddick, C.A. Halothane-induce sleeping time in the mouse: its modification by benzodiazepines. **Eur J Pharmacol**, 50(2): 103-112, 1978.
- Cordell, G.A. Biodiversity and drug Discovery: a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, 55: 463-80, 2000.
- Cragg, G.M.; Newman, D.J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, 17(2): 153-163, 1999.
- Dinnen, R.D.; Ebisuzaki K. The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a flkore product. **Anticancer Research**, 17(2A): 1027-33, 1997.
- Dong, M. et al. Cytoplasmic phospholipase A₂ levels correlate with apoptosis in human colon tumorigenesis. **Clin. Cancer Res.**, 11(6):2265-71. 2005.
- Ekblad, Q.M.; Sundler, F. Innervation of the gastric mucosa. **Microscopy Research and Technique**, 48: 241-57. 2000.
- Elisabetsky, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, 39(8): 697-702, 1987.
- Freitas, A.R. Valorização dos recursos florestais da Amazônia. In: A Engenharia Brasileira e o Desenvolvimento Integrado e sustentável da Amazônia, segundo seminário. Brasília, 11 de novembro, 2004. (Consulta em <http://www.sbs.org.br/downloads>). 2004.
- Gabry, K.E. et al. Marked suppression of gastric ulcerogenesis and intestinal responses to stress by a novel class of drugs. **Mol. Psychiatry**. 7 (5): 474-83, 433. 2002.

- Gamberini, M.T. et al. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem Ins Oswaldo Cruz**, 86:Suppl. II, 137-139, 1991.
- Gonçalo, S. Allergic contact dermatitis from *Bowdichia nitida* (sucupira) wood. **Contact Dermatitis**, 26(3): 205. 1992.
- Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Scienc.** 281:1309-12, 1998.
- Hamburguer M.; Hostettmenn K. bioactivity in plants: the link between photochemistry and medicine. **Phytochemistry**, 30(12): 3864-74, 1991.
- Harada, N. et al. Gastric prostacyclin (PGI₂) prevents stress-induced gastric mucosal injury in rats primarity by inhibiting leukocyte activation. **Prostaglandin & Other Lipid Mediators**, 57: 291-303. 1999.
- Hausen, B.M. Sensitizing capacity of naturally occusing quinines. V. 2.6 – dimethoxy-p-benzoquinone: occurrence ond significance as a contact allergen. **Contact Dermatitis**, 4(4): 204-13. 1978.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e do Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Manejo Florestal Sustentado. Disponível em: <http://www2.ibama.gov.br/flores/manflor/conceito.htm>. Acesso em 18 abril 2003.
- Iwakini, S. et al. Resíduos de serraria na produção de painéis de madeira aglomerada de Eucalipto. **Scientia Agrária**, 1(12): 23-8, 2000.
- Izumi, H. et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. **Cancer Treatment Review**.29: b41-9, 2003.
- Jang, D.S. et al. Potencial câncer chemopreventive constituintes of the seeds of *Diptoryx odorata* (tonka bean). **Journal of Natural Products**, 66(5): 583-87.2003.
- Jankowsky, I.P.; Luiz, M.G.; Andrade, A. Pisos de Madeira maciça – agregando valor e qualidade ao produto. In: IX Encontro Brasileiro em Madeiras e Estruturas de Madeiras, Anais (mídia eletrônica). Cuiabá, julho de 2004. 2004.
- Januario, A. H. et al. Isolation and structure determination of bioactive isoflavones from callus culture of *Diptoryx odorata*. **Chem. Pharm. Bull (Tokyo)**, 53(7): 740-2. 2005.
- Jenkins, A. et al. Evidence for a common binding cavity for tree general anesthetics within the GABA_A receptor. **The Journal of Neuroscience**, 21: 1-4. 2001.

- Katori, M.; Majima, M. Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors, **Nippon Yakurigaku Zasshi**, 109(6): 247-258, 1997.
- Kaunitz, J.D.; Akiba, Y. Gasduodenal mucosal defense role of endogenous mediators. **Curr. Opin. Gastroenterol**, 20: 526-32. 2004.
- Kirschenbaum, A. et al. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. **Urology**, 58 (2^A): 127-131, 2001.
- Konturek, S.J.; Pawlik, W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Digestive Diseases and Sciences**, 31(2): 6S-19S, 1986.
- Krasoeski, M.D.; Harrison, N.L. General anaesthetic action on ligand-gated ion channels. **Cell. Mol. Life Sci.**, 55: 1278-1303. 1999.
- Kunchandy, J.; Kulkarni, S.K. Involvement of central type benzodiazepine and GABAA receptor in the protective effect of benzodiazepines in stress-induced gastric ulcer in rats. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 285(1): 129-36. 1987.
- Lepage, E.S. Química da madeira. Lepage ES et al. **Manual de preservação da madeira**. São Paulo: IPT, v. 1, p. 69-96. 1986.
- Macdonald F.; Ford C.H.J. **Molecular biology of cancer**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. p. 1-34.
- Maciel, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3): 429-38, 2002.
- Maia, R.M. et al. Triterpenos da resina de *Protim heptaphyllum* MARCH (BOURSEACEAE): caracterização de misturas binárias. **Química Nova**, 23(5): 624-26, 2000.
- Maineieri, C.; Chimelo, J.P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas: São Paulo. 1989.
- Malone, M.H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. IN: *New Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, ed. By H. Wagner and P Wolf, pp.24-53, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
- Masferrer, J.L. et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Research**, 60: 1306-1311, 2000.

- Mathias, L. et al. A new pentacyclic triterpane isolated from *Myroxylon balsamum* (syn. *Muroxylon peruiferum*). *J. Braz. Chem. Soc.*, 2(11): 195-98. 2000.
- Mediratta, P.K.; Sharma, K.K.; Rana, J. Development of differential tolerance to the sedative and anti-stress effects of benzodiazepines. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 45(1): 111-5. 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil.. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. (Online). Disponível: <http://inca.org.br/epidemiologi/estimativa2000> (7 de outubro de 2000).
- Morimoto, Y. et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesion and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japan J Pharmacol.*, 57: 495-505, 1991.
- Myers, C.; Koki, A. Pamukcu, R.; Wechter, W.; Padley, R. Proapoptotic Anti-Inflammatory Drugs. *Urology*, 57(Suppl 4A): 73-76, 2001.
- Ohsaki, A. et al. Microanalysis of a selective potent anti-helicobacter pylori compound in a brazilian medicinal plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of analogues. *Bioorgania & Medicinal Chemistry Letters*, 9:1109-12. 1999.
- Oliveira, F.A. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium hetaphyllum* in mice rats. *Pharmacological Research*, 49: 105-11. 2004.
- Otuki, M.F. et al. Avaliation of the anti-nociceptive action caused by the fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium Kleinii*. *Life Scienc*, 69: 2225-36, 2001.
- Patel, M.I. et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin. Cancer. Res.*, 11(5): 1999-2007. 2005.
- Pavan-Fruehaug, S. Plantas medicinais de mata-atlântica: manejo sustado e amostragem. São Paulo: **Annablume: Fapesp**, p. 25-8. 2000.
- Peskar, B.M. Neural aspects of prostaglandin involvemnte in gastric mucosal defense. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52(4): 555-68. 2001.
- Rang, H.P. et al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. 5 ed. 2004
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613, 2001.

- Rates, S.M.K.; Barros, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Ver Bras Farm**, 75(2): 31-34, 1994.
- Renou, S.G. et al. Monoarylhydrazones of alpha-lapchone: synthesis, chemical properties and antineoplásica acitivity. **Pharmazie**, 58(10): 690-5, 2003.
- Robert, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, 77: 761-767, 1979.
- Robert, A. et al. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptative cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am J Physiol**, 245: G113-G121, 1983.
- Schianterelli, P. et al. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneim – rsch/ Drug res**, 32(3): 230-235, 1982.
- Segura, L. et al. Antiinflammatory activity of Anthurium cerrocampanense Croat in rats and mice. **J. Ethnopharmacol**, 61: 243-248, 1998.
- Seidl, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **An Acad Bras Cienc Mar**, 74(1):145-50, 2002.
- Setlow, R.B. Humam cancer: etiologic agents/dose responses/DNA repair/ cellular and animal models. **Mutat. Res.**, 477(1-2): 1-6. 2001.
- Siani, A.C. et al. Evaluation of anti-inflammatory-releted acitivity of essecial oils from de leaves and resin of species of Protium. **Journal of Ethnopharmacology**, 66: 57-69. 1999.
- Simas, N.K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvídica de Myroxylon balsamum (óleo vermelho) e de terpenóides e fenil propanóides. **Quim. Nova**, 27(1): 46-49. 2004.
- Simpson, A.J.G.; Caballero, O.L.; Dani, S.U. Oncogenes e genes supressores. In: Brentani, M.N.; Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P., ed. – **Bases da Oncologia**. 1ª ed., São Paulo, Livraria e Editora Marina, p. 53-70, 1998.
- Siqueira, J.D.; Souza, M.F. Os sistemas de manejo florestal para a Amazônia. In: 6º Congresso Florestal Brasileiro, Campos de Jordão, 1990. Anais, São Paulo: SBS/SBEF, Vol. 3, p.78-84. 1990.
- Sjödahl, R. Extent, Mode and Dose Dependence of Anticancer Effects. **Am J Med**, 110(1A): 66S-69S. 2001.

- Skehan, P. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82: 1107-1112. 1990.
- Stepp, J.R. The role of weeds as sources of pharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, 92(2-3):163-6 Jun. 2004.
- Stepp, J.R.; Moerman, D.E. The importance of weeds in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. 75: 19-26. 2001.
- Suffredini, I.B. et al. Screening of Antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Braz. J. Med. Biol Res**, 37(3): 379-84. Mar, 2004.
- Susin, S.A. et al. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1366: 151-65, 1998.
- Sussunaga, G.S. et al. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**, 72: 709-11. 2001.
- Szabo, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, 214: 201-201. 1981.
- Takeuchi, K. et al. Role of sulfhydryls in mucosal injury by ethanol relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 248(2): 836-41. 1989.
- Takyama, N. et al. Role of the mitochondria permeability transition and cytochrome c release in hydrogen peroxide induced apoptosis. **Experimental cell research**. 274: 16-24, 2002.
- Tubaro, A. et al. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, 17:347-349. 1985.
- Vane, J.R.; Botting, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Int J Tissue React**. 20(1):3-15. 1998.
- Vieira, R.A. Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayennensis* (gervão-roxo). Dissertação de mestrado, farmacologia, UFSC. 2001.
- Vousden, K.H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim. Biophys. Acta**, 1602(1): 47-59. 2002.
- Vousden, K.H.; Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews Cancer**, 594-604. 2002.

- Woolfe, G.; MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **J Pharmacol Exp Ther**, 800:300-307. 1944.
- Yamamoto, D.S.; Viale, P. H. Cyclooxygenase-2: from arthritis treatment to new indications for the prevention and tretmente of cancer. **Clin. J. Oncol. Nurs**, 7(1): 21-29, 2003.

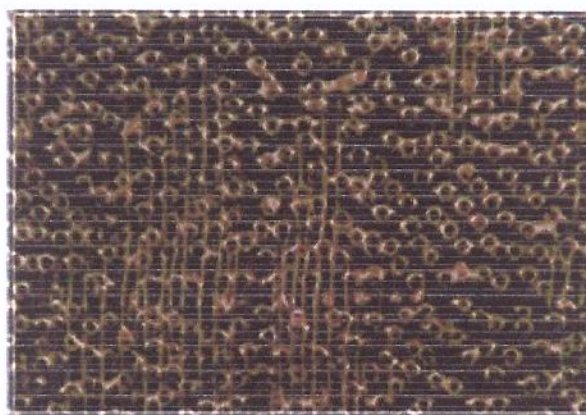
APÊNDICES

Apêndice 1. Descrição da estrutura anatômica da madeira de Ipê (*Tabebuia* sp).

Descrição anatômica macroscópica: Parênquima axial distinto sob lentes; aliforme com pequenas aletas, às vezes confluyente, seriado, estratificado. Raios visíveis sob lente nas faces transversal e radial; na face longitudinal tangencial nota-se o listrado de estratificação; poucos; baixos; homocelulares; óleo resina presente. Vasos visíveis sob lente; predominantemente solitários (91%); médios; pouco numerosos; pontuações intervasculares. Estratificação distinta sob a lente. Camadas de crescimento delimitadas pelo parênquima marginal e por zonas fibrosas.



Superfície tangencial



Superfície transversal (10x)

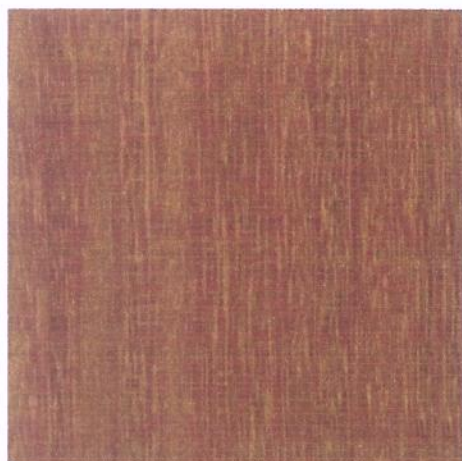
Ocorrência: Brasil: Amazônia Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Goiás. Outros: América Latina.

Fontes: Manieri e Chimelo (1989);

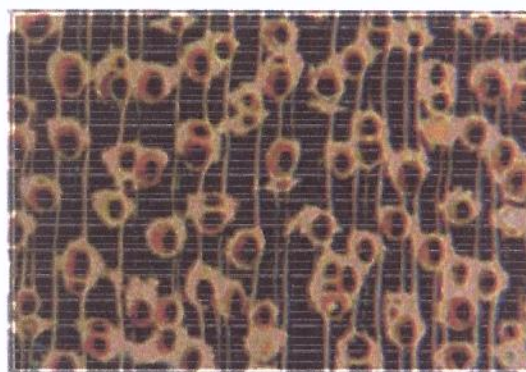
<http://www.ipt.br/areas/dpf/propriedades/>

Apêndice 2. Descrição da estrutura anatômica da madeira de Sucupira (*Bowdichia nítida*).

Descrição anatômica macroscópica: Parênquima axial notado a olho nu, aliforme de extensão losangular; seriado; óleo resina e cristais romboidais em séries cristalíferas presentes. Fibras libriformes, estreitas predominantemente;. Vasos solitários predominantes; óleo resina presente; elementos vasculares muito curtos a curtos; pontuações intervasculares alternas, ovaladas a irregulares; hemocelulares e heterocelulares; estratificação e óleo-resina presentes. Estratificação do parênquima axial, radial e elementos vasculares. Camadas de crescimento indistintas.



Superfície tangencial



Superfície transversal (10x)

Ocorrência: Brasil: Floresta tropical.

Fontes: Manieri e Chimelo (1989);

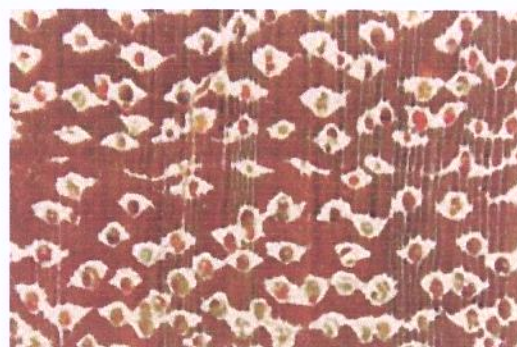
<http://www.ipt.br/areas/dpf/propriedades/>

Apêndice 3. Descrição da estrutura anatômica da madeira de Cumaru (*Dipteryx odorata*).

Descrição anatômica macroscópica: parênquima axial: visível sob lente, paratraqueal aliforme de extensão losangular, ocasionalmente confluyente. Raios: visíveis apenas sob lente no topo e na face tangencial, finos, numerosos, estratificados (3 mm por mm). Vasos: visíveis a olho nu, pequenos a médios; poucos; porosidade difusa; solitários, geminados, e múltiplos de 3 a 6; obstruídos por óleo-resina. Camadas de crescimento: pouco distintas, demarcadas por zonas fibrosas.



Superfície tangencial



Superfície transversal (10x)

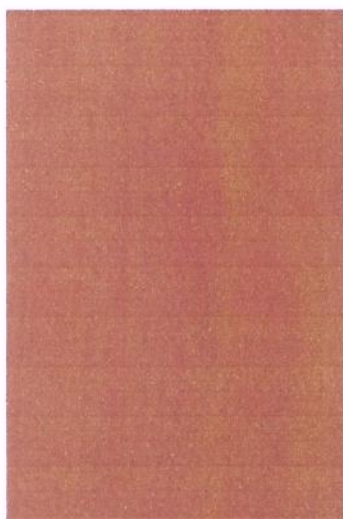
Ocorrência: Brasil: Amazônia. Outros países: Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela.

Fontes: Manieri e Chimelo (1989);

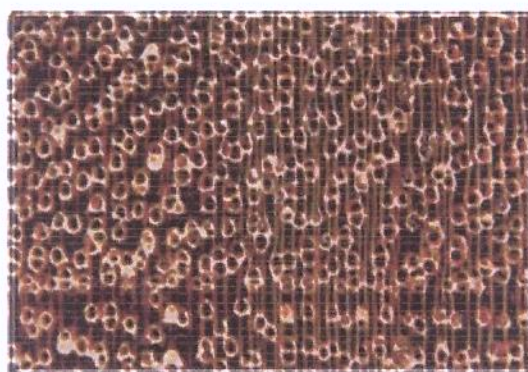
<http://www.ipt.br/areas/dpf/propriedades/>

Apêndice 4. Descrição da estrutura anatômica da madeira de Cabreúva (*Myroxylon balsamum*).

Descrição anatômica macroscópica: Parênquima axial pouco contrastado, visível sob lente, paratraqueal escasso, vasocêntrico; marginais ocasionalmente presentes em finas linhas tangenciais, usualmente interrompidas; cristais poucos, solitários. Raios no topo, muito finos, numerosos, distintos sob lente; face tangencial em disposição estratificada; heterocelulares; numerosos; óleo-resina avermelhado presente; pequenos cristais nas células marginais. Vasos vistos a olho nu; numerosos; pequenos a médios; pontuações intervasculares. Estratificação presente. Camadas de crescimento indistintas.



Superfície tangencial



Superfície transversal (10x)

Ocorrência: Brasil: Pará, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão. Outros: México, Argentina e Paraguai.

Fontes: Manieri e Chimelo (1989);

<http://www.ipt.br/areas/dpf/propriedades/>