

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS – PPGCN  
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN

HELAINÉ MIRELLI DE ALMEIDA

INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA ENTRECASCA E DA  
FOLHA DE *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. SOBRE O CRESCIMENTO  
DE CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

MOSSORÓ – RN

2016

HELAINÉ MIRELLI DE ALMEIDA

INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA ENTRECASCA E DA  
FOLHA DE *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. SOBRE O CRESCIMENTO  
DE CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Naturais, da Faculdade de Ciências Exatas e  
Naturais da Universidade do Estado do Rio  
Grande do Norte como requisito parcial  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Naturais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dayseanne Araújo  
Falcão.

MOSSORÓ – RN

2016

**Catálogo da Publicação na Fonte.  
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.**

Almeida, Helaine Mirelli De

Influência dos extratos hidroalcoólicos da entrecasca e da folha de *Pseudobombax marginatum* (st. Hill) rob. sobre o crescimento de células de câncer cervical. / Helaine Mirelli De Almeida – Mossoró, RN, 2016.

74 f.

Orientador(a): Prof. Dra. Dayseanne Araújo Falcão.

Dissertação (Mestrado) Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Campus Central. Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,

1. *Pseudobombax marginatum*. 2. Citotoxicidade. 3. Inflamação. e. I. Falcão, Dayseanne Araújo. II. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. III. Título.

UERN/ BC

CDD 581.634

HELAINÉ MIRELLI DE ALMEIDA

INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA ENTRECASCA E DA  
FOLHA DE *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. SOBRE O CRESCIMENTO  
DE CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Naturais, da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade do Estado do Rio  
Grande do Norte.

Aprovada, em 17 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dayseanne Araújo Falcão (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francisca Marta Machado Casado de Araújo

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, a quem sou muito grata por este presente maravilhoso que é a vida! Agradeço-lhe também por todas as coisas que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fez chegar aonde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou.

A professora Dayseanne Falcão, orientadora, companheira, amiga, mãe. Agradeço pelos ensinamentos, paciência e dedicação, por não permitir que eu desista da vida científica. Quando ‘crescer’, eu quero ser como você.

Ao professor Ramiro Camacho e aos colegas Fábio Mesquita e Vanusa Albuquerque, pela imensa ajuda no processo de coleta e identificação da Embiratanha. Fábio, espero que um dia você me perdoe pelos óculos novinhos que você perdeu na FLONA.

Aos funcionários da FLONA, Mauro Guimarães, Zé Holanda, Canindé, Seu Francisco e Irmão Zé, pelo grandioso apoio desprendido durante as coletas da Embiratanha.

Ao professor Alexandre Barbuto, a colega Sarah e a todos do laboratório de Tumores – USP pela oportunidade de aprendizado, que foi extremamente valiosa para mim, e pela incansável ajuda e colaboração.

A professora Lourdes Isaac, a seu esposo Chuck e a sua filha Sara, que me acolheram com muito carinho e gentileza. Em especial a professora Lourdes, que com brandura me orientou, ensinou e acompanhou a execução de todo o trabalho experimental. Obrigada!

A todos do laboratório de Complemento - USP, que me dedicaram uma parte de seu tempo, me receberam e me ajudaram a desenvolver esse trabalho. Sem vocês, não seria possível essa realização. Grata!

As professoras Ana Paula Lepique, Alessandra Pontillo e a todos dos laboratórios de Imunomodulação e Imunogenética, que viabilizaram os experimentos *in vitro*. Obrigada pela colaboração, orientação e conselhos.

A professora Luciana Bertini e a todos do Laboratório de química do Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN), campus Apodi/RN, pelo imenso apoio e auxílio nas análises fitoquímicas.

A todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN/UERN), funcionários e professores.

A todos os meus colegas que fazem parte do PPGCN/UERN, pela amizade, troca de conhecimento e colaboração em todos os momentos do curso. Especialmente, a Adriana Wandermurem, até hoje não sei pronunciar esse sobrenome. Em você encontrei uma amizade e companheirismo, fortalecido pelas dúvidas, dificuldades, problemas e alegrias compartilhadas nesse projeto.

As minhas mães, pelo amor incondicional e por me ensinar valores que não se perderão jamais. A minha mãe, Maria Nazareth e a minha avó Francisca Leite (*in memoriam*), que sempre estiveram ao meu lado encorajando-me a continuar, sendo meu alicerce, meu apoio. Amo demais!

Aos meus familiares agradeço todo o amor, carinho, compreensão, ajuda e apoio nas realizações das tarefas. Obrigada pela força Ely! Finalmente poderá dizer que faço mestrado.

Ao meu cachorro, Preto, que foi meu companheiro inseparável em todos os momentos e madrugadas da construção deste trabalho.

Ao meu namorado maravilhoso, Diêgo Pires, meu melhor amigo, meu companheiro e grande incentivador de meus projetos. Teria muito a escrever para dizer o quanto é especial na minha vida!

A todos os meus amigos, que me "aturam" e escutaram cotidianamente o meu drama particular chamado Mestrado. Em especial a Linda-Lee, que me incentivou e me mostrou que não devemos desistir jamais, não importa os obstáculos que surjam em seu caminho.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram. O meu carinho e gratidão pela força e confiança. Que Deus abençoe a todos!

Obrigada.

## RESUMO

Na região Potiguar a *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob., é uma espécie vegetal amplamente usada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Apesar de ser frequentemente usada para inflamação na coluna vertebral, úlceras e gastrites, essa planta tem sido pouco explorada quanto suas propriedades biológicas e medicinais. Assim, este trabalho objetivou avaliar o potencial antitumoral e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da entrecasca (EHE) e da folha (EHF) dessa espécie. A citotoxicidade de EHE e EHF sobre células cancerígenas (HeLa e SiHa) e células normais (Fibroblastos) foi realizada pelos métodos de redução do MTT, de exclusão do azul de tripano e de hemólise. O estudo também avaliou a ação anti-inflamatória de EHE através da produção da Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por monócitos. A análise fitoquímica qualitativa revelou a presença de fenóis, taninos, saponinas, esteroides livres, alcaloides e flavonoides para ambos os extratos. O teor de fenóis totais foi de  $72,21 \pm 4,39$  e  $214,76 \pm 3,66$  mg GAE/g para EHE e EHF, respectivamente. Ambos os extratos, produziram um efeito citotóxico dose-dependente. EHE foi mais ativo somente sobre as células SiHa, enquanto EHF foi tóxico para todas as linhagens, apresentando maior atividade sobre HeLa e SiHa nas doses de 20 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . EHE e EHF não apresentaram ação hemolítica nos ensaios de citotoxicidade por hemólise. A curva de crescimento após 72 horas demonstrou que a multiplicação celular das linhagens tumorais tratadas com EHE foi significativamente menor em relação ao controle. Entretanto, Fibroblastos expostos a EHE nas concentrações de 20 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle nas primeiras 24 horas. Todas as linhagens celulares submetidas à ação de EHF apresentaram uma proliferação inferior à do grupo controle na curva de crescimento. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, monócitos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e EHE por um período de 3 horas reduziram a produção de IL-1 $\beta$  para  $7,66 \pm 0,82$  e  $3,75 \pm 0,15$  pg mL $^{-1}$  nas concentrações de 20 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O grupo controle, estimulado apenas com LPS, apresentou  $12,91 \pm 0,60$  pg mL $^{-1}$  de IL-1 $\beta$ , enquanto o soro humano saudável, utilizado com controle negativo, mostrou  $1,27 \pm 0,71$  pg mL $^{-1}$ . Ambos os extratos de *P. marginatum* demonstraram citotoxicidade seletiva e moderada sobre células tumorais nas menores concentrações avaliadas. EHE apresentou efeito sobre a produção de IL-1 $\beta$ , indicando atividade anti-inflamatória. No entanto, outros estudos são necessários para a investigação da atividade biológica de *P. marginatum*.

**Palavras-Chave:** *Pseudobombax marginatum*; citotoxicidade; inflamação.

## ABSTRACT

*Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob., is a medicinal plant largely used by Brazilian Potiguar region population as treatment for many diseases. This medicinal plant is frequently used for spinal inflammation, ulcers and gastritis, but it has been little explored as for its biological and medicinal properties. This study aimed to test the anticancer, cytotoxic and anti-inflammatory profile of the inner bark (HE) and leaf (HF) hydroalcoholic extracts of *P. marginatum* throughout *in vitro* tests. The cytotoxicity of HE and HF on cancer cells (HeLa and SiHa) and healthy cells (fibroblasts) was assessed by MTT reduction methods, trypan blue exclusion and hemolysis tests. This study analyzed the HE anti-inflammatory activity by Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production. The phytochemical screening detected the presence of phenols, tannins, saponins, steroids, alkaloids and flavonoids not only HE but HF. The total phenol determination of HBE and HLE were  $72,21 \pm 4,39$  and  $214,76 \pm 3,66$  mg GAE/g of crude extract, respectively. Both extracts produced a dose-dependent cytotoxic effect. HE was more active on just SiHa line, while HF showed more activity on SiHa and HeLa cells on 20 and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentrations. Both, HE and HF exhibit no hemolytic activity on hemolysis cytotoxicity assay. The cell growth was carried out during 72 hours and the analysis revealed that tumor cells exposed to HE presented lower cellular growth when compared to control group. However, fibroblasts cells showed similar growth to the control group at 20 and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , within 24 hours. All cell lines treated with HF exhibited a lower proliferation profile when compared to control group. During anti-inflammatory activity evaluation, monocytes stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and HE (20 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentrations) for 3 hours reduced the IL-1 $\beta$  production at  $7,66 \pm 0,82$  and  $3,75 \pm 0,15$   $\text{pg mL}^{-1}$ , respectively. The monocytes stimulated with LPS produced  $12,91 \pm 0,60$   $\text{pg mL}^{-1}$  IL-1 $\beta$ , while healthy human serum (negative control) produced  $1,27 \pm 0,71$   $\text{pg mL}^{-1}$ . The *P. marginatum* extracts exhibited selective and moderate cytotoxicity on tumor cells at lower concentrations. The HE inhibited the IL-1 $\beta$  production, indicating an anti-inflammatory activity. However, further studies are necessary to investigate the biological activity of *P. marginatum*.

**Keywords:** *Pseudobombax marginatum*; cytotoxicity; inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b> – <i>Pseudobombax marginatum</i> : árvore, tronco, folha, flor e fruto.....	22
<b>Figura 02</b> – Processo de transformação de células normais em neoplasias malignas. ....	26
<b>Figura 03</b> – Resposta inflamatória induzida por citocinas, como TNF e IL-1, e quimiocinas produzidas por macrófagos ativados. ....	28
<b>Figura 04</b> – Floresta Nacional de Assú. Mapa do Estado do Rio Grande do Norte, com destaque para área da FLONA no município de Assú.....	32
<b>Figura 05</b> – Produção do Extrato Hidroalcoólico de <i>P. marginatum</i> . ....	33
<b>Figura 08</b> – Ensaio colorimétrico do MTT (Mosmann, 1983). ....	39
<b>Figura 09</b> – Método de exclusão do azul de tripano.....	40
<b>Figura 10</b> – Ensaio de hemólise em tubos (WALL <i>et al.</i> , 1952).....	41
<b>Figura 11</b> – Isolamento e tratamento de monócitos do sangue periférico humano. PBMC = Células mononucleares do sangue periférico; LPS = Lipopolissacarídeo.....	42
<b>Figura 12</b> – Quantificação de IL-1 $\beta$ produzida por monócitos, através do teste imunoenzimático de ELISA de captura. ....	44
<b>Figura 13</b> – Viabilidade celular de HeLa , SiHa e Fibroblasto: após 24h de exposição a EHE de <i>P. marginatum</i> (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de redução do MTT. ....	47
<b>Figura 14</b> – Viabilidade celular HeLa, SiHa e Fibroblasto após 24h de exposição a EHE de <i>P. marginatum</i> (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de exclusão de Azul de tripano ....	48
<b>Figura 15</b> – Viabilidade celular HeLa , SiHa e Fibroblasto após 24h de exposição a EHF de <i>P. marginatum</i> (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de redução do MTT .....	48
<b>Figura 16</b> – Viabilidade celular de células HeLa, SiHa e Fibroblasto após 24h de exposição a EHF de <i>P. marginatum</i> (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método exclusão de Azul de tripano.....	49

<b>Figura 17</b> – Curva de crescimento HeLa (a), SiHa (b) e Fibroblasto (c) ao longo de 72 horas de exposição a EHE de <i>P. marginatum</i> (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de exclusão de Azul de tripano. Número inicial de células (linha tracejada). .....	50
<b>Figura 18</b> – Curva de crescimento HeLa (a), SiHa (b) e Fibroblasto (c) ao longo de 72 horas de exposição a EHF de <i>P. marginatum</i> (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de exclusão de Azul de tripano. Número inicial de células (linha tracejada). .....	51
<b>Figura 19</b> – Viabilidade de monócitos após 3h de exposição a EHE e EHF de <i>P. marginatum</i> (20 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de exclusão de Azul de tripano.....	53
<b>Figura 20</b> – Efeito de EHE de <i>P. marginatum</i> sobre a liberação de IL-1 $\beta$ . Grupos pré-estimulados com LPS (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e tratados RPMI-10% SFB (controle), EHE (20 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou soro humano saudável (SHN) .....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Coloração característica para cada classe de metabólitos secundários.....	35
<b>Tabela 02</b> – Coloração característica para cada classe de metabólitos secundários.....	35
<b>Tabela 03</b> – Prospecção qualitativa dos constituintes químicos de EHE e EHF de <i>P. marginatum</i> .....	46
<b>Tabela 04</b> – Porcentagem de lise de hemácias de coelho expostas a diferentes concentrações (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de EHE e EHF de <i>P. marginatum</i> . ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA** – Análise de Variância

**B16** – Melanócitos Murinos

**BBV** – BioBoa Vista

**CCD** – Cromatografia de Camada Delgada

**CI<sub>50</sub>** – Concentração Inibitória Média

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**COX** – Ciclo-oxigenase

**D.O** – Densidade Óptica

**D.P** – Desvio Padrão

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**DU145** – Células de Câncer de Próstata

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

**EHE** – Extrato Hidroalcoólico da Entrecasca

**EHF** – Extrato Hidroalcoólico da Folha

**ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FeCl<sub>3</sub>** - Cloreto férrico

**FLONA** – Floresta Nacional de Assú

**FT** – Fenóis Totais

**GVB-EGTA-Mg<sup>2+</sup>** - Tampão Veronal suplementado com gelatina e Magnésio

**H<sub>2</sub>O** – Água

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido Sulfúrico

**HaCaT** – Queratinócitos Humanos Saudáveis

**HCl** – Ácido Clorídrico

**HeLa** – Células de Câncer Cervical

**Hep-2** – Células de Carcinoma Laríngeo Humano

**HepG-2** – Células de Carcinoma Hepático

**HT-29** – Células de Cancro do Cólon

**IARC** – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

**ICB** – Instituto de Ciências Biomédicas

**ICMBio** – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

**IFN** – Interferon

**IFRN** – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

**IL** - Interleucina

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**K562** – Células de Leucemia Mielóide Humana

**LNCaP** – Células de Câncer de Próstata

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**M** – Molar

**M4Beu** – Células de Melanoma

**MCF-7** – Células de Carcinoma Mamário

**mg** – Miligrama

**mL** – Mililitro

**mM** – Milimolar

**MTT** – Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil

**µg** – Micrograma

**µL** - Microlitro

**µm** – Micrometro

**N** – Normal

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de sódio

**NaOH** – Hidróxido de Sódio

**NB4** – Células de Leucemia Promielocítica Humana

**NCI** – Nacional Cancer Institute

**NH<sub>4</sub>OH** – Hidróxido de Amônio

**nm** – Nanômetro

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**P.A** – Puro e Absoluto

**PBS** – Tampão fosfato-salino

**PC3** – Células de Câncer de Próstata

**pg** – Picograma

**PGE** – Prostaglandina E

**PNPIC** – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

**RPMI** – Roswell Park Memorial Institute

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SHN** – Soro Humano Normal

**SiHa** – Células de Câncer Cervical

**SISBIO** – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**UERN** – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

**UFERSA** – Universidade Federal Rural do Semi-Árido

**USP** – Universidade de São Paulo

**VBS** – Tampão Veronal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS .....	19
2.2 <i>Pseudobombax marginatum</i> .....	21
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	23
2.4 CÂNCER .....	25
2.5 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	27
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>31</b>
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
5.1 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE <i>Pseudobombax marginatum</i> .....	32
5.1.1 Coleta e identificação .....	32
5.1.2 Produção dos extratos hidroalcoólicos .....	33
5.1.3 Análise fitoquímica qualitativa .....	34
5.1.3.1 Teste para fenóis e taninos .....	34
5.1.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e outros flavonoides .....	34
5.1.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas .....	34
5.1.3.4 Teste para saponinas .....	35
5.1.3.5 Teste para esteroides e triterpenoides .....	35
5.1.3.6 Teste para quinonas e antraquinonas .....	36
5.1.3.7 Teste para alcaloides .....	36
5.1.4 Determinação do teor de fenóis totais .....	36
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EHE E EHF DE <i>P. marginatum</i> .....	37
5.2.1 Preparação de EHE e EHF de <i>P. marginatum</i> .....	37
5.2.2 Atividade citotóxica in vitro .....	37
5.2.2.1 Linhagens celulares .....	37
5.2.2.2 Citotoxicidade pelo método de redução do MTT .....	38
5.2.2.3 Citotoxicidade pelo método de exclusão do azul de tripano .....	39
5.2.2.4 Citotoxicidade pelo método de hemólise em tubos .....	40
5.2.2.5 Cálculo da $CI_{50}$ .....	41

5.2.2.6 Curva de crescimento celular .....	42
5.2.3 Atividade anti-inflamatória in vitro .....	42
5.2.3.1 Isolamento e tratamento de monócitos do sangue periférico humano .....	42
5.2.3.2 Viabilidade celular .....	43
5.2.3.3 Quantificação de IL-1 $\beta$ .....	43
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
6.1 PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO .....	46
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EHE E EHF DE <i>P. marginatum</i> .....	47
6.2.1 Atividade citotóxica.....	47
6.2.1.1 Atividade citotóxica em linhagens tumorais e normais .....	47
6.2.1.2 Curva de crescimento celular .....	49
6.2.1.3 Atividade hemolítica .....	52
6.2.2 Atividade anti-inflamatória.....	53
6.2.2.1 Viabilidade celular de monócitos .....	53
6.2.2.2 Efeito na liberação de IL-1 $\beta$ .....	53
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática comum entre as populações humanas e ocorre desde os primórdios. Ao longo dos anos, o homem observou que algumas plantas ingeridas em sua alimentação promoviam o alívio de suas dores e enfermidades, assim passou a investigar empiricamente suas propriedades medicinais. Aos poucos as plantas foram selecionadas, classificadas e suas propriedades medicinais repassadas através das gerações.

Apesar da relativa perda do conhecimento tradicional, devido ao avanço da medicina alopática, ainda é crescente o número de pessoas que buscam nas plantas uma forma alternativa de amenizar ou suprimir patologias. Guerra e colaboradores (2010) relatam que as práticas de uso popular de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde. Diversos fatores estão associados a essa prática, dentre eles a ineficiência de tratamentos alopáticos, a busca por tratamentos naturais com menores efeitos colaterais, menores custos, ou até mesmo a dificuldade de deslocamento até locais onde são oferecidos serviços de saúde (OLIVEIRA et al., 2010). Dessa forma, o enfoque de estudos nessa área tem sido cada vez maior.

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento, como etnobotânica, química e farmacologia, e tem crescido consideravelmente, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Entre 1981 e 2002, 30% das novas substâncias químicas descobertas foram obtidas diretamente ou derivadas de fontes naturais (NEWMAN et al., 2003).

Devido ao crescente interesse da população e dos pesquisadores, a Organização Mundial da Saúde (OMS) já considera as plantas medicinais como importantes instrumentos na assistência farmacêutica e trabalha no desenvolvimento de resoluções e protocolos no âmbito sanitário que visem validar seu uso seguro. O Brasil, que detém a maior parcela da biodiversidade de plantas superiores, com aproximadamente 24%, estabeleceu uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que determina diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais em nosso país (BRASIL, 2006a).

Esta Política tem como premissas o respeito aos princípios de segurança e eficácia na saúde pública e a conciliação de desenvolvimento socioeconômico e conservação ambiental,

tanto no âmbito local como em escala nacional. Além disso, o respeito às diversidades e particularidades regionais, que é frequentemente relatada em estudos etnobotânicos, também é princípio norteador desta Política. Essa legislação tem como objetivo principal reconhecer e promover práticas eficazes, focando em pesquisas das propriedades farmacológicas e uso seguro das plantas medicinais. Além disso, identificar as variadas formas do uso desse recurso, desde o uso caseiro e comunitário, passando pela área de manipulação farmacêutica de medicamentos até o uso e fabricação de medicamentos industrializados, e assim reforçar a importância dessas plantas em trazer benefícios para a saúde da população.

A partir dessa necessidade de reconhecer a importância da medicina tradicional na atenção básica à saúde, foi criada também a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS (BRASIL, 2006b). Esta política atende, sobretudo, à necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, entre as quais destacam-se a medicina tradicional, além da homeopatia, da fitoterapia e acupuntura chinesa.

Assim como em vários locais do país, no Rio Grande do Norte muitas comunidades, principalmente as rurais fazem uso de plantas medicinais (MOSCA; LOIOLA, 2009; ROQUE et al., 2010; PAULINO et al., 2011). Estudos etnobotânicos identificaram cerca de 85 espécies de plantas usadas como medicinais, dentre elas, *Anacardium occidentale*, *Myracrodruon urundeuva*, *Caesaria sylvestris* e *Ziziphus joazeiro*, que são usadas frequentemente pela população e como produtos manufaturados em farmácias (MELO et al., 2009). Contudo ainda são necessários mais estudos florísticos, fitossociológicos, etnobotânicos, dentre outros, que visem dar suporte à importância da biodiversidade no Estado (PAULINO et al., 2011; 2012).

A Embiratanha, *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob., é uma espécie arbórea amplamente utilizada na medicina tradicional da região Potiguar, com casca e entrecasca sendo usadas tradicionalmente no combate a dores e inflamações. Apesar de frequentemente relatada em estudos fitossociológicos, poucos são os estudos sobre as propriedades farmacológicas dessa espécie, de modo que a investigação de suas atividades biológicas apresente-se como uma excelente alternativa na busca por novos compostos com aplicações clínica. Além de *P. marginatum*, diversas espécies da família Malvaceae têm sido utilizadas na medicina tradicional. Essa família está entre as que apresentaram maior número de espécies citadas pelos moradores da comunidade rural Moacir Lucena, Apodi, RN. Dentre as espécies citadas pelos entrevistados estão a *Malva sylvestris* e *Malvavisco arboreus* usadas

contra gripe e inflamações (PAULINO et al., 2012). Da mesma subfamília da Embiratanha, temos a Barriguda (*Ceiba glaziovii*), citada com frequência em trabalhos etnobotânicos, sendo usada contra reumatismo e edema. *Sida cordifolia* e *Sida spinosa*, também têm destaque, com seu uso voltado para o tratamento de acnes, úlceras e doenças do aparelho respiratório (AGRA et al., 2007; GUERRA et al., 2010).

As vias metabólicas secundárias de *P. marginatum* dão origem a compostos como taninos, fenóis, alcaloides e flavonoides, que podem estar relacionadas às propriedades medicinais relatadas pela população. Sua ação anti-inflamatória *in vivo* já foi atestada em outros estudos (PAIVA et al., 2013). Sabe-se que o processo inflamatório está relacionado ao processo de formação e desenvolvimento de neoplasias, pois as células cancerígenas usam as mesmas substâncias do processo inflamatório, como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos, para induzir a sua própria proliferação e para criar barreiras que o rodeiam (BARRETO et al., 2011). Em virtude dessa relação causal entre o processo inflamatório e o câncer, princípios ativos com atividade anti-inflamatória podem exibir ação antitumoral. Em adição, estudos de outras espécies da família Malvaceae, como a *Sida acuta*, *Sida cordifolia*, *Sida rhombifolia* e *Urena lobata*, mostraram efeito citotóxico sobre as células cancerígenas (PIEME et al., 2010). Portanto, tem-se nesta planta um importante foco para pesquisas e testes da atividade antitumoral.

Além de ser uma ferramenta importante na descoberta de novos fármacos, estudos sobre o uso de plantas medicinais, bem como outros recursos naturais, podem contribuir para a conservação da biodiversidade local (AGRA et al., 2008; ROQUE et al., 2010; SILVA et al., 2014). Albuquerque e colaboradores (2007) afirmam que os recursos úteis, como plantas usadas na medicina tradicional, experimentam uma maior pressão antrópica e devem receber prioridade de conservação. Estudos de espécies vegetais com propriedades medicinais são importantes na valorização e no desenvolvimento de estratégias para a recuperação e conservação de áreas naturais (ROQUE et al., 2010). Assim, o intuito deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroalcoólicos da entrecasca e da folha de *Pseudobombax marginatum*, contribuindo para a pesquisa de plantas medicinais na região.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é uma prática desenvolvida pelo homem há milhares de anos, de modo que ao longo do tempo, tem-se registrado diversas formas da utilização de plantas para o tratamento, cura e/ou prevenção de diversas enfermidades. Segundo a OMS cerca de 80% da população mundial dependem da medicina tradicional para tratar doenças através do uso de plantas ou extratos (BRASIL, 2006a). Essa prática ocorre principalmente de maneira popular e seus conhecimentos são repassados através das gerações.

Um dos fatores que estimulam o uso de plantas medicinais é a falta de acesso aos medicamentos tradicionais, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam buscadas. O conhecimento e o uso de plantas medicinais são de grande importância econômica e tem um rápido crescimento, principalmente em países em desenvolvimento, onde o serviço de saúde moderno é limitado e representam o único tratamento acessível (AGRA et al., 2008; GUERRA et al., 2010). A OMS afirma que grande parte da população de países desenvolvidos também faz uso de plantas medicinais. Embora o acesso à medicina moderna esteja disponível nesses países, o uso de ervas medicinais se mantém por razões históricas e culturais (BRASIL, 2006a). Apesar dessa prática ocorrer em todas as esferas sociais, são nas regiões mais pobres do mundo que esse recurso é mais utilizado. Agra e colaboradores (2008) afirmam que em muitos países em desenvolvimento, a maior parte da população depende exclusivamente das plantas medicinais para cuidados básicos de saúde.

A utilização de plantas para o tratamento de doenças é comumente chamada de medicinal tradicional e já é o objeto de estudos etnobotânicos, área do conhecimento que se propõe a resgatar os conhecimentos populares das interações de grupos humanos com as plantas (VIU et al., 2010). As pesquisas etnobotânicas vêm crescendo em países como o Brasil, principalmente com enfoque no conhecimento de plantas medicinais nativas. A importância da medicina tradicional é reconhecida, principalmente no que diz respeito à conservação dos valores culturais dos grupos sociais humanos. Entretanto, o uso de plantas medicinais pode apresentar uma problemática no que diz respeito à saúde da população que faz uso deste recurso. O mau uso associado à falta de informações sobre a composição fitoquímica e as ações farmacológicas desses vegetais podem provocar reações colaterais graves. Veiga-Junior e colaboradores (2005) afirmam que a toxicidade de plantas medicinais,

comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, é um problema sério de saúde pública.

As investigações da composição e dos efeitos de plantas medicinais são importantes para o uso seguro desse recurso, além de propiciar o desenvolvimento da medicina tradicional. O conhecimento de plantas medicinais de forma organizada, com a finalidade de explorar, isolar e posteriormente sintetizar os princípios ativos das plantas para obter produtos fitoterápicos, tem crescido nas últimas décadas (CGEE, 2010). Mais de 50% dos novos agentes terapêuticos lançados entre 1981 e 2010 envolvem os produtos naturais, sendo mais representativo os compostos oriundos dos vegetais, com cerca de 25% desse total. Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal, além de um número significativo de drogas sintéticas obtidas a partir de precursores naturais (RATES, 2001; NEWMAN et al., 2003). Todos esses aspectos apoiam a importância da continuidade dessas pesquisas.

Exemplos bem sucedidos da utilização dos produtos naturais foram as descobertas da morfina e da codeína, alcaloides com ação anestésica isolados da *Papaver somniferum*. A quinina e a quinidina também são alcaloides isolados de plantas (*Cinchona ledgeriana*) e são utilizadas como antimalárico e como antipirético (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Um esteroide extraído das folhas da dedaleira (*Digitalis lanata*), a digoxina, apresenta propriedades medicinais no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. A atropina, alcalóide encontrado na planta *Atropa belladonna*, é muito utilizada na medicina para combater arritmias e para o Mal de Parkinson. A Reserpina é uma substância proveniente da raiz da planta medicinal *Rauwolfia serpentina* e usada para baixar a pressão arterial devido ao seu efeito hipotensor. Em contrapartida, a efedrina, composto presente em plantas pertencentes à família *Ephedraceae*, é utilizada em casos de queda abrupta da pressão arterial (RATES, 2001).

A descoberta de compostos anticancerígenos de origem vegetal também tem incentivado pesquisas nessa área, a ponto de alguns dos fármacos antitumorais já existentes no mercado serem de origem natural. A vincristina e a vimblastina, por exemplo, são compostos ativos extraídos de *Catharanthus roseus* e são utilizadas como medicamentos antineoplásicos no tratamento de diferentes tipos de câncer, entre eles, o linfoma de Hodgkin, o sarcoma de Kaposi, o câncer de ovário e o de testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil. Outra descoberta importante na área de câncer foi a das substâncias presentes em espécies do gênero *Podophyllum*, utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no

tratamento do câncer de pele e verrugas. A partir da podofilotoxina, uma lignana, foram obtidos o etoposídeo e o teniposídeo, cujos estudos experimentais permitiram a introdução desses compostos na terapia do câncer. Há ainda fármacos sintetizados a partir de substâncias encontradas na natureza, tendo como resultado mais importante a descoberta do paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*) em 1971. Estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (BRANDÃO et al., 2010).

O Brasil contém cerca de 23% das espécies vegetais existentes em todo o planeta (BATALHA et al., 2003). Essa diversidade vegetal, distribuída em distintos habitats e condições ambientais, contribuem acentuadamente para estudos etnobotânicos e fitoterápicos. Dentro desse panorama, o Nordeste brasileiro, constituído em grande parte pelo bioma caatinga e com elevada riqueza de espécies vegetais, é uma região com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à fitoterapia. Agra e colaboradores (2008) registraram um total de 650 espécies de plantas medicinais no Nordeste brasileiro. Isso se deve às características marcantes do bioma que influenciam na produção de metabólitos secundários pela vegetação.

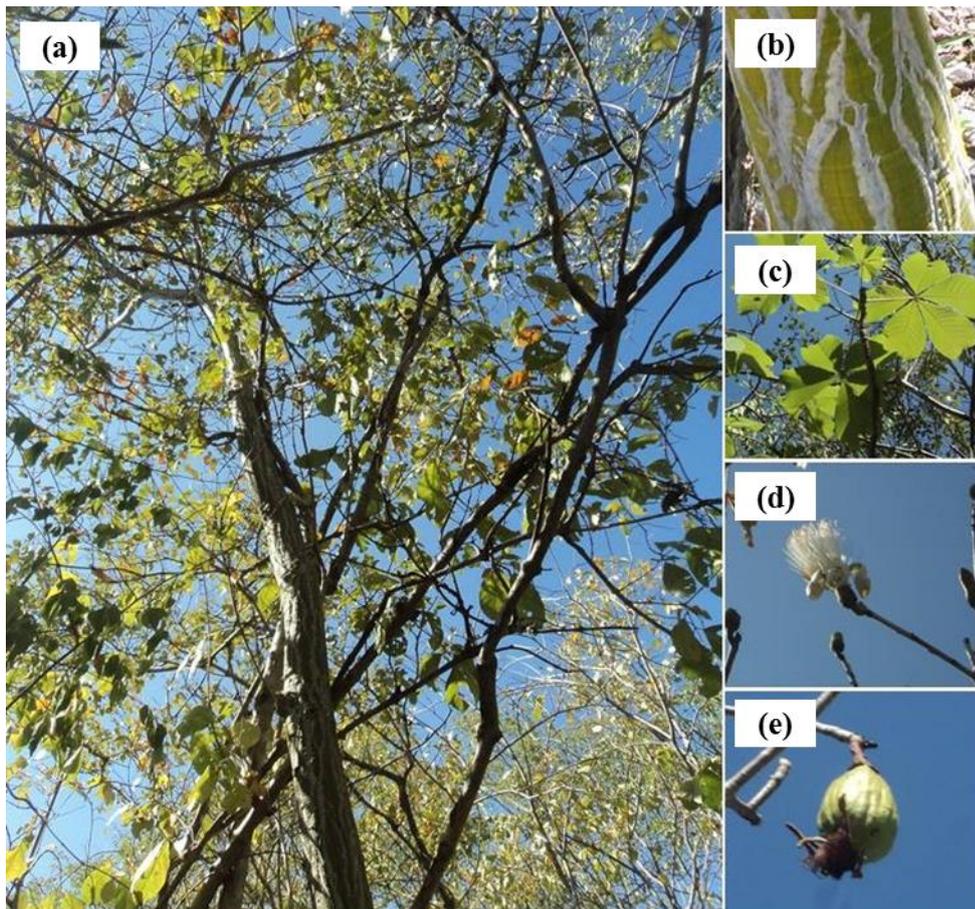
Extrapolando para o Rio Grande do Norte percebe-se que existem poucas investigações sobre plantas medicinais (GUERRA et al., 2010; PAIVA et al., 2013). Essa deficiência é notável em comparação a alguns estados vizinhos, como Paraíba, Pernambuco e Ceará, que já focam a importância de tais plantas no tratamento de doenças (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005; AGRA et al., 2007). Uma vez que, plantas da caatinga como Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), Pau-d'arco-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), Jatobá (*Hymenaea courbaril*), Cumaru (*Amburana cearensis*), Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*), entre muitas outras, são usadas frequentemente pela população (MELO et al., 2009; ROQUE et al., 2010; PAULINO et al., 2012), torna-se importante a realização de estudos mais aprofundados nessa região, tanto na perspectiva florística como medicinal, uma vez que cada área tem sua própria flora medicinal.

## 2.2 *Pseudobombax marginatum*

Conhecida popularmente como embiratanha, embira, imbiricu e sumaúma, *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil.) A. Robyns é uma planta pertencente à família *Malvaceae*, subfamília *Bombacoidea*, encontrada na América do Sul, distribuindo-se

principalmente no Peru, Bolívia, Paraguai e no Brasil, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (DUARTE, 2006). No Nordeste brasileiro, essa planta é vastamente encontrada nos estados do Maranhão, Ceará, Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte (BOCAGE; SALES, 2002).

*P. marginatum* (Figura 01) é uma espécie de porte arbóreo (6 a 14 m), apresentando um tronco relativamente vertical com 30-40 cm de diâmetro, com casca lisa e estrias longitudinais verdes. É composta por uma copa ampla e rala, com folhas compostas por 5 folíolos sésseis ou subsésseis. As flores são brancas e solitárias, estando geralmente nas extremidades dos ramos, e o fruto desenvolve-se em cápsula obovoide com sementes arredondadas, marrom-escuras, envolvidas por uma paina esbranquiçada (SOBRINHO, 2006).



**Figura 01** – *Pseudobombax marginatum*: árvore (a), tronco (b), folha (c), flor (d) e fruto (e).  
Fonte: Arquivo pessoal (2014).

Em sistemas de classificação mais antigos, *P. marginatum* pertencia à família *Bombacaceae*. No entanto, estudos recentes de filogenia baseados em dados morfológicos, polínicos, químicos e anatômicos associados com dados moleculares evidenciam que esse grupo compartilha características filogenéticas relacionadas com gêneros tradicionalmente

incluídos na família *Malvaceae*. Assim, a família *Bombacaceae* vem sendo mencionada como subfamília, *Bombacoideae*, da família *Malvaceae* (BOCAGE; SALES, 2002).

Como outras espécies do gênero *Pseudobombax*, a Embiratanha é muito utilizada comercialmente. Sua madeira leve é bastante utilizada para confecção de caixas de madeira, calçados e aeromodelos, enquanto a casca, denominada “embira”, é utilizada como matéria-prima na produção de cordas (LORENZI, 2002). A raiz da planta jovem pode ser utilizada para alimentação humana ou animal em tempos de escassez e, seus frutos podem ser utilizados como isca na pesca e como forrageira (DAMASCENO et al., 2010; MORAIS; SILVA, 2010). Devido às suas flores vistosas e às suas copas frondosas, essa espécie apresenta grande potencial ornamental, sendo utilizadas na arborização de praças públicas, parques e avenidas. Pode ser empregada também para restauração florestal, para enriquecer capoeiras e matas ciliares (LORENZI, 2002).

A Embiratanha tem destaque quanto ao uso medicinal na região potiguar, devido às suas propriedades farmacológicas, frequentemente relatadas em estudos fitossociológicos. A casca em decocção pode ser utilizada por populares como calmante e para aliviar insônia e inflamações da coluna vertebral (ALBUQUERQUE, 2007; AGRA et al., 2008; KFFURY, 2008). A água de sua casca pode ser usada como anti-inflamatório, contraceptivo e ainda, contra úlceras, gastrites e dores lombares (ROQUE et al., 2010; PAULINO et al., 2012). Entretanto, no que diz respeito a estudos experimentais das propriedades farmacológicas de *P. marginatum*, tem-se uma literatura bastante escassa, observando-se poucos registros com estudos da atividade antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória de extratos de sua casca (VERAS FILHO, 2012; CHAVES et al., 2013; PAIVA et al., 2013; SANTOS, 2013).

### 2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos orgânicos que são classificados como metabolitos primários e secundários. Compostos que têm papéis essenciais para os vegetais, como os lipídios, ácidos nucleicos, aminoácidos e ácidos orgânicos, são chamados metabolitos primários e estão associados à fotossíntese, respiração e crescimento vegetal. Os metabolitos secundários são compostos estruturalmente diferentes e se acumulam em concentrações elevadas em algumas espécies (CROZIER et al., 2006).

Existem cerca de 40.000 substâncias diferentes identificadas a partir da análise do metabolismo secundário vegetal (SIMÕES; 2007). A produção desses compostos pelas plantas tem a função de proteção contra agentes do ambiente, como a ação de predadores,

microrganismos e do clima. Ainda podem agir como atrativos para polinizadores e na dispersão de sementes por animais, controle da germinação de sementes e inibição das espécies de plantas concorrentes (alelopatia), sendo, portanto, parte integrante das interações de espécies em comunidades vegetais e animais (MAKKAR et al., 2009). Os metabólitos secundários ainda possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à radiação e deficiência de nutrientes minerais (CHAVES, 2012).

Para o homem, esses compostos são de grande interesse comercial, sendo importantes principalmente para o setor farmacêutico. O metabolismo secundário produz substâncias farmacologicamente ativas e com propriedades medicinais que são de grande interesse para a fitoterapia. Dentre essas substâncias estão os compostos fenólicos, como fenóis e flavonoides, presentes em plantas medicinais como *P. marginatum*, *Malva sylvestris*, *Hibiscus acetosella* e *Sidastrum micranthum* (CAVALCANTE et al., 2010; GIOMBELLI et al., 2012; FELISBINO, 2014). Os compostos fenólicos, caracterizados pela presença de um grupamento hidroxila (-OH) ligada a um anel aromático, é a classe de metabólitos que apresenta uma maior variedade estrutural e distribuição entre as espécies vegetais (EMERY et al., 2010). Estes compostos incluem fenóis simples e glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, cumarinas e isocumarinas, ligninas, flavonoides e quinonas.

Os flavonoides destacam-se entre os compostos fenólicos, pois podem ser encontrados em todas as partes das plantas (SIMÕES, 2007). No reino vegetal, estes compostos são responsáveis pela pigmentação, que tem finalidade de atrair polinizadores e ação protetora às radiações solares, bem como, propriedades antioxidantes de proteção ao metabolismo vegetal. Por outro lado, compostos possuem diversos efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, diurética e vasodilatadora (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Outros metabólitos secundários como alcaloides, esteroides, taninos e saponinas espumílicas são comumente relatados em análises fitoquímicas de espécies vegetais usadas na medicina tradicional. Os alcaloides constituem uma ampla e diversificada classe em termos estruturais e nos vegetais, esses compostos possuem funções voltadas para proteção contra insetos e herbívoros. Por apresentar uma elevada toxicidade, os alcaloides são importantes fontes de fitofármacos, tendo grande utilidade no tratamento de alguns tipos de câncer (MANN, 2002). Os esteroides, formados a partir dos triterpenos por meio de descarboxilações, também apresentam propriedades farmacológicas importantes, agindo como

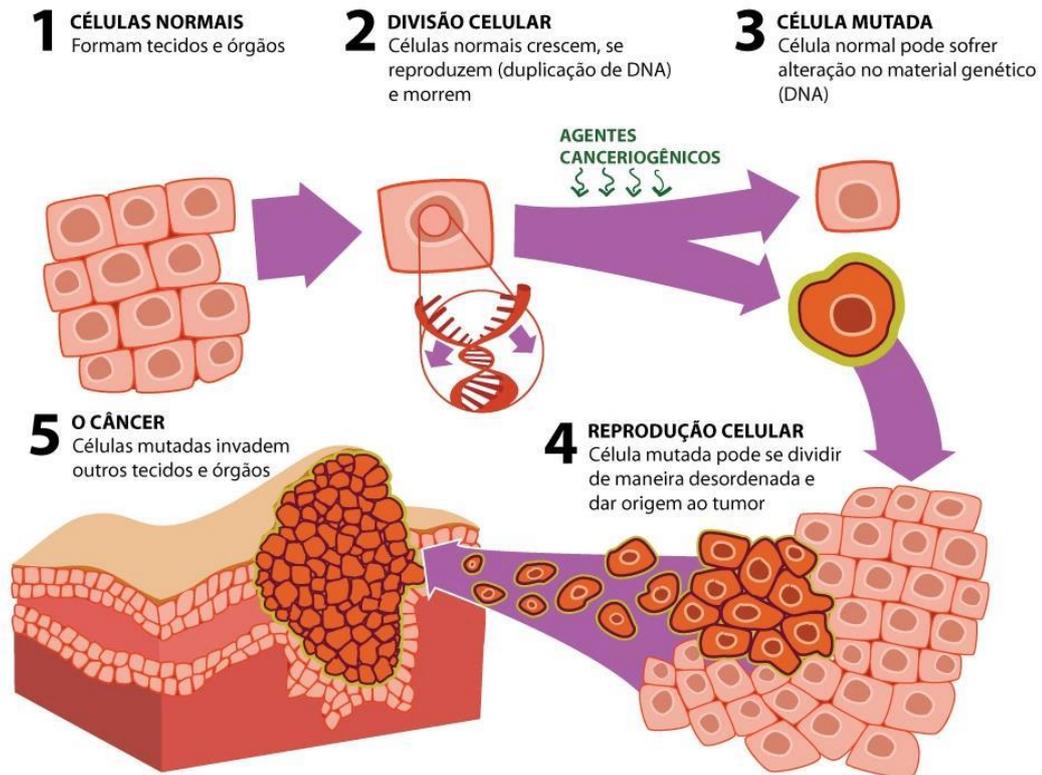
anti-inflamatório, analgésico e a antitumoral (RODRIGUES et al., 2010). Os taninos, por sua vez, estão presentes em inúmeros vegetais, sendo geralmente encontrados nas folhas, frutos e sementes. Diversos estudos sobre atividade dos taninos evidenciaram importante ação anti-inflamatória, tumoral, antioxidante e anti-infectiva (SIMÕES, 2007; CASTEJON, 2011). Os taninos também apresentam potente ação antimicrobiana e antifúngica, efeito este verificado por Chaves e colaboradores (2013) para o extrato alcoólico da casca de *P. marginatum*, que demonstrou a presença desse composto.

As saponinas espumídicas também são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, estando relacionadas, principalmente, com o sistema de defesa. Possuem estrutura esteroidal ou triterpênica e em algumas plantas possuem propriedade hemolítica. Outras atividades biológicas estão relacionadas às saponinas, podendo-se destacar a ictiotóxica, molusquicida e anti-helmíntica, além de propriedades diuréticas, digestivas e anti-inflamatórias (SIMÕES, 2007; CASTEJON, 2011).

## 2.4 CÂNCER

A palavra Câncer se refere ao termo neoplasia, especificamente as malignas, uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. A oncogênese, origem do câncer, ocorre a partir de células que sofrem uma sequência de mutações ou alterações genéticas, e se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (Figura 02).

Estas alterações resultam tanto de fatores intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, quanto de fatores ditos extrínsecos, por exemplo, os danos e instabilidade genética induzida por radiação, por substâncias químicas ou por infecção viral. Uma única mutação, no entanto, dificilmente leva à formação de um tumor. Para que esse processo ocorra, são necessárias duas ou mais modificações genéticas, que irão progressivamente interferir nos mecanismos responsáveis por proliferação, diferenciação e morte celular (ALMEIDA et al., 2005; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).



**Figura 02** – Processo de transformação de células normais em neoplasias malignas.

Fonte: Revista Nova Escola

A transformação de uma célula normal em cancerígena ocorre por meio de seis alterações fundamentais na fisiologia celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000). São elas: auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, e invasão tecidual e metástase. Além disso, o câncer funciona como um microambiente, onde interagem células geneticamente alteradas, células normais (fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos, e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea.

O Câncer é um problema de saúde pública mundial, atingindo tanto países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento. Segundo a OMS, o câncer é, estatisticamente, a terceira causa de óbitos no mundo, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano. De acordo com estimativas do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), houve um total de 8,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo no ano de 2012. No Brasil, esta neoplasia é atualmente a segunda causa de mortes por doença, com estimativas de 190 mil óbitos para o ano de 2014. Neste mesmo ano, também foram determinados a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos

casos de câncer no Brasil (INCA, 2014). Para os próximos dois anos, estudos recentes sugerem um aumento de cerca de 4%, totalizando 600 mil novos casos. Excetuando-se o câncer de pele do tipo não melanoma (aproximadamente 30% dos casos), os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%) e intestino (7,8%), enquanto nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%) e colo do útero (INCA, 2015).

O aumento da incidência de câncer está relacionado principalmente ao aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido pelo envelhecimento do organismo. Ao longo de sua existência, as células humanas são expostas a agentes mutagênicos e sofrem erros de duplicação, resultando em alterações sutis e progressivas no DNA. Quanto maior o número de divisões da célula, maiores as chances de ocorrência de alterações no seu DNA. Eventualmente, uma dessas mutações pode alterar o comportamento de crescimento no ciclo celular, levando a uma multiplicação exagerada dessa célula (HAHN; WEINBERG, 2002).

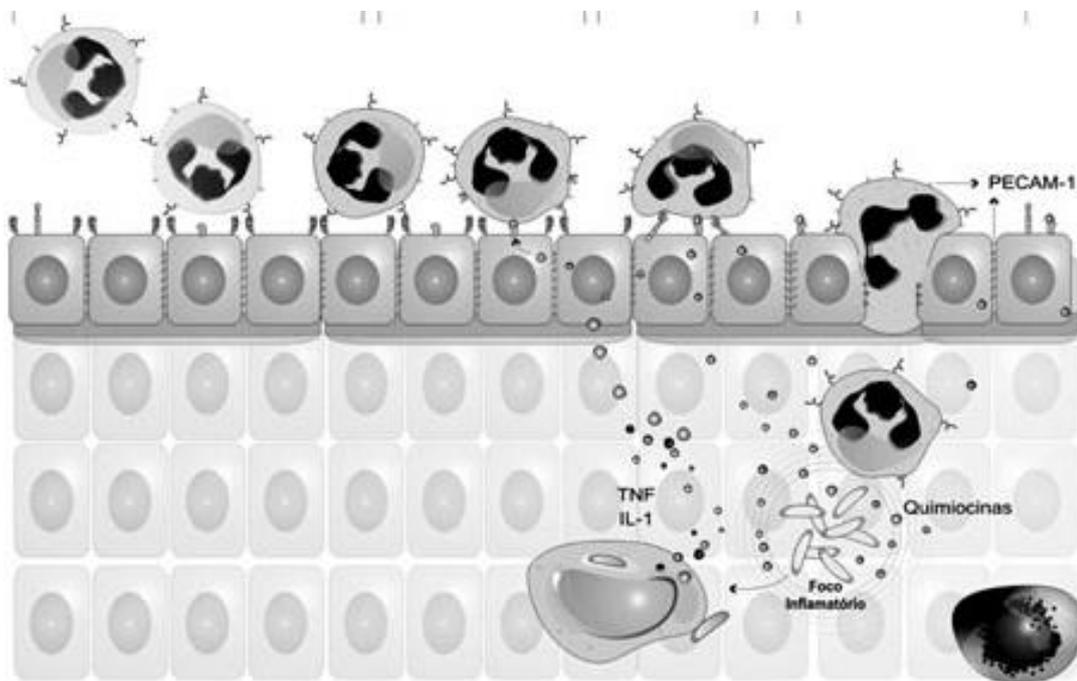
O tratamento do câncer é realizado de diversas maneiras dependendo do tipo e evolução da doença. Terapias baseadas em radiação e em compostos químicos e hormonais são os principais métodos utilizados no tratamento. Em virtude disso, tratamentos alternativos estão sendo constantemente propostos na área de oncologia, dentre os quais se inclui a terapia com o uso de células-tronco, imunoterapia e fitoterapia. Diversos estudos voltados para o uso de plantas medicinais com propriedade anticancerígenas são desenvolvidos a cada ano, tornando-se uma fonte promissora no combate a esta doença (LIN et al., 2012; FROZZA et al., 2013; YE et al., 2014; FORMAGIO et al., 2015). Entretanto, os esforços despendidos na busca de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer são discretos devido, principalmente, ao grau de agressividade da doença, aos mecanismos de escape das células neoplásicas e também à toxicidade exercida pelos agentes antineoplásicos clássicos (RAFFERTY et al., 1996; NEWMANN; CRAGG, 2003).

## 2.5 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório corresponde a uma resposta a uma lesão, que pode ser provocada por infecções, ação de anticorpos ou traumas. A finalidade primordial da inflamação é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual do local agredido (MURI et al., 2009; CRUVINEL et al., 2010). Essa resposta é geralmente benéfica para o organismo e promove a sobrevivência do tecido, bem como repara e recupera o tecido acometido. Entretanto, em algumas situações, a resposta inflamatória torna-se exagerada,

extensiva ou não regulada, que é altamente prejudicial ao organismo. Muitas doenças envolvem inflamação, que pode ser a causa de dano tecidual como ocorre na esclerose múltipla, doença de Alzheimer, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, lesão do cérebro e medula espinal e acidente vascular encefálico (LIMA et al., 2007; CARVALHO, 2009).

A resposta inflamatória se inicia através de uma fase aguda provocada por uma lesão tissular periférica leva à liberação de mediadores químicos, como citocinas, que promovem e facilitam a transmissão dolorosa levando à hiperalgesia. Ocorrem, também, alterações inflamatórias com os sintomas de calor, rubor, dor e edema, além da liberação de neurotransmissores excitatórios, como por exemplo, o aspartato, glutamato e substância P (MURI et al., 2009). De acordo com Cruvinel e colaboradores (2010), monócitos e macrófagos ativados desempenham papel importante no início e na evolução do processo inflamatório, pois induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios como fatores de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 e IL-6 e quimiocinas (Figura 03).



**Figura 03** – Resposta inflamatória induzida por citocinas, como TNF e IL-1, e quimiocinas produzidas por macrófagos ativados.

Fonte: MESQUITA Jr *et al.*, 2008.

As citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, a interleucina (IL) 1, tem papel fundamental no início da resposta inflamatória aguda, pois são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. No entanto, sua produção

exagerada pode causar danos aos tecidos ou distúrbios metabólicos já que são, muitas vezes, citotóxicas (ZHANG; AN, 2007; MENICHINI et al., 2011; SOARES et al., 2015). Segundo Dinarello (1996), há duas formas principais de IL-1, designados IL-1 $\alpha$ , que age através do contato celular, e IL-1 $\beta$ , que produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2), com a formação de Prostaglandinas E2 (PGE2) no hipotálamo anterior, causando febre. Segundo Varela e Forte (2001), a principal função de IL-1 é mediar a inflamação local, estimulando monócitos, macrófagos e células endoteliais a sintetizarem quimiocinas que ativam os leucócitos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias no local da inflamação (Figura 03).

Atualmente, a maioria dos anti-inflamatórios estudados são bloqueadores das principais vias de mediadores pró-inflamatórios, assim o estudo de produção ou inibição de interleucinas com essa característica tem sido utilizado como modelo para determinar as propriedades anti-inflamatórias de produtos de origem vegetal. Walker e colaboradores (2013) estudaram a liberação da IL-8 por fibroblastos gengivais humanos após a exposição de extratos de vegetais preparados com *Polygonum aviculare*, *Sambucus nigra* e *Isodon japonicus*. Ehrnhöfer-Ressler e colaboradores (2013) avaliaram a produção de IL-6 por células bucais humanas após a exposição de compostos voláteis do chá de *Salvia officinalis*. Assim, os compostos analisados possuem atividade inflamatória, pois foram capazes de inibir a produção das interleucinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-6. Uma vez que, constituem compostos com diversas ações biológicas, os vegetais podem atuar nos estágios iniciais do processo inflamatório através da inibição de componentes que são essenciais para a ocorrência do mesmo, como a produção de citocinas pró-inflamatórias.

### 3. OBJETIVOS

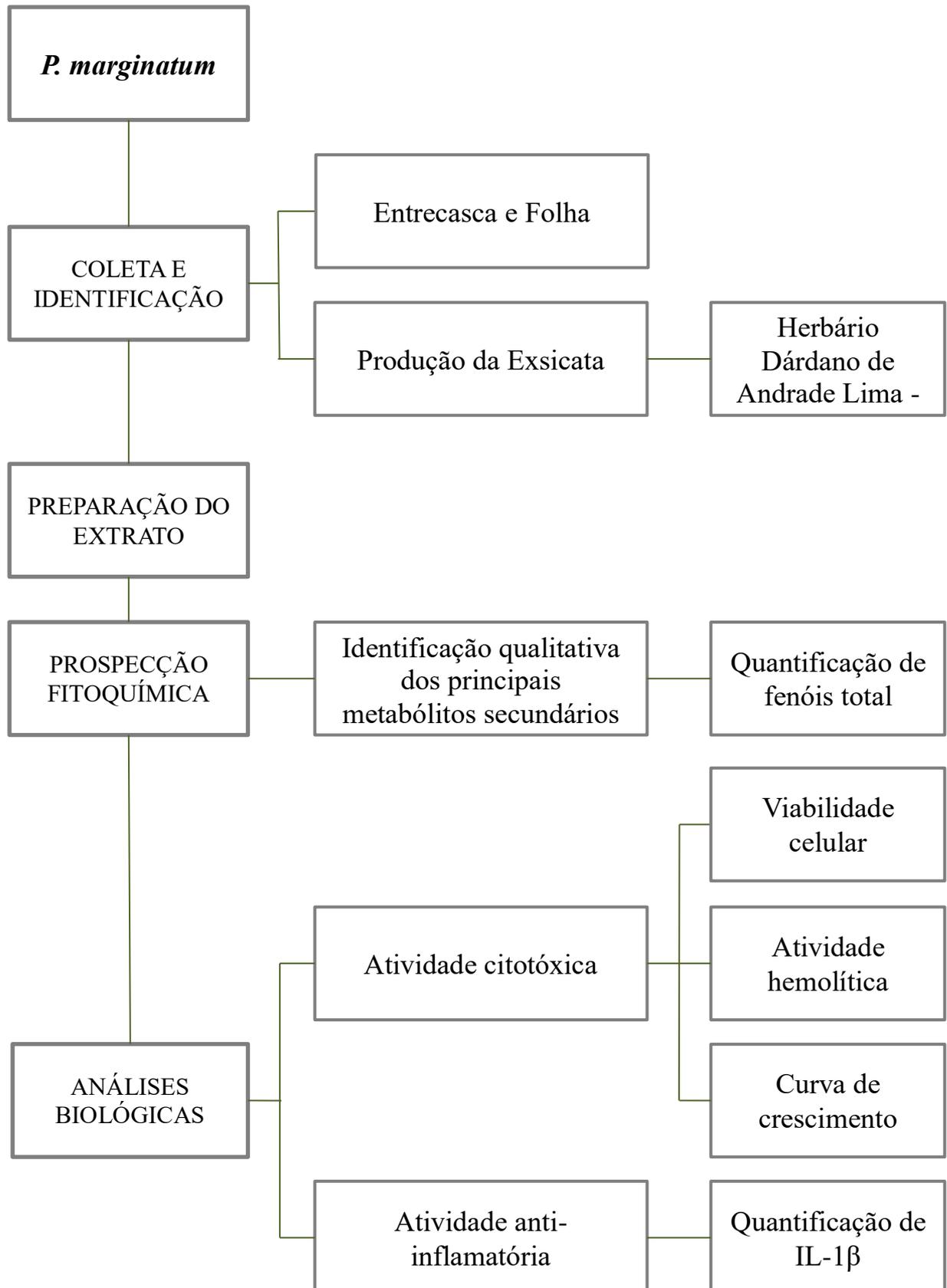
#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos extratos hidroalcoólicos da entrecasca e da folha de *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil.) A. Rob. sobre o crescimento de células de câncer cervical.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar estudo fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos da entrecasca e da folha de *P. marginatum*, buscando identificar qualitativamente seus metabólitos secundários;
- Determinar o teor de fenóis totais nos extratos de *P. marginatum*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos de *P. marginatum* sobre células de câncer cervical (HeLa e SiHa) e sobre fibroblastos humanos saudáveis;
- Investigar a curva de crescimento celular de células tumorais e normais submetidos aos extratos de *P. marginatum*;
- Avaliar o potencial hemolítico dos extratos de *P. marginatum*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólicos da entrecasca de *P. marginatum*.

#### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

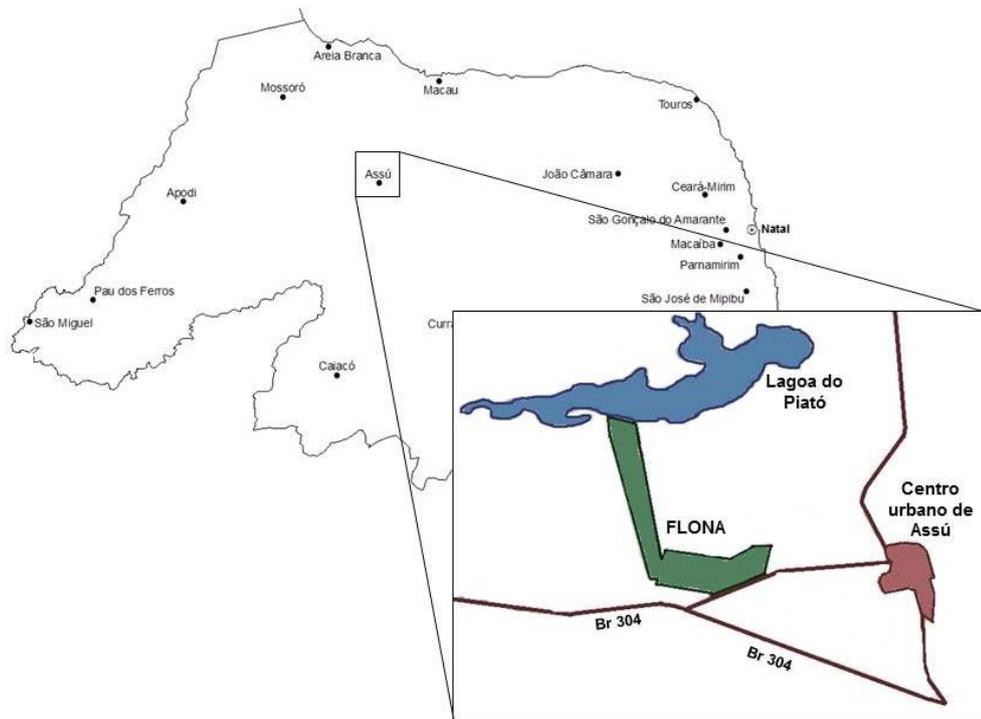


## 5. METODOLOGIA

### 5.1 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE *Pseudobombax marginatum*

#### 5.1.1 Coleta e identificação

A coleta da entrecasca e da folha de *P. marginatum* foi realizada, respectivamente, nos meses de fevereiro e maio de 2015, na Floresta Nacional de Assú (Flona-Açu), Rio Grande do Norte (Figura 04).



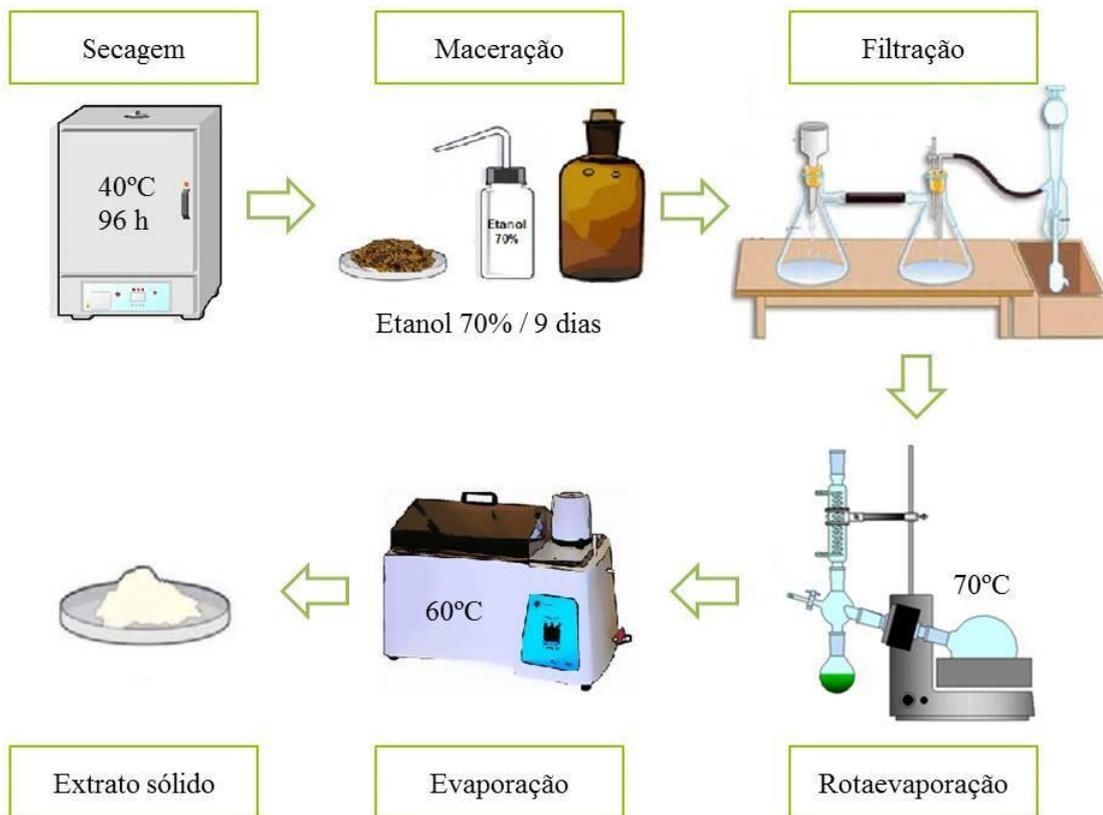
**Figura 04** – Floresta Nacional de Assú. Mapa do Estado do Rio Grande do Norte, com destaque para área da FLONA no município de Assú.

Fonte: modificado de Martins (2007).

Por meio da autorização SISBIO/ICMBio de número 46690-1, 3,7 kg de peso fresco de entrecasca foram coletados através de uma incisão vertical do tronco e, 5,2 kg de folha foram colhidas com auxílio de uma tesoura de poda. A identificação botânica da espécie vegetal foi realizada pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática Vegetal (LESV), Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN. A exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, Universidade Federal do Semi-Árido – UFERSA, sob o número MOSS 14885.

### 5.1.2 Produção dos extratos hidroalcoólicos

Para a obtenção do Extrato Hidroalcoólico da Entrecasca (EHE) e da Folha (EHF) de *P. marginatum* (Figura 05), o material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar à uma temperatura de 40°C por 96 horas. Posteriormente, o material foi triturado e macerado com etanol a 70% sob agitação ocasional por um período de 9 dias, com renovação do líquido extrator a cada 3 dias. O líquido extraído passou por duas filtrações em kitasato sob pressão reduzida. Para a separação do etanol, o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo à 70°C, sob pressão reduzida. A solução resultante foi seca em banho-maria à temperatura constante de 60°C para evaporação da água e obtenção dos extratos sólidos brutos.



**Figura 05** – Produção do Extrato Hidroalcoólico de *P. marginatum*.

Depois de seco, os extratos tiveram sua massa medida para cálculo do rendimento de extrativos com relação ao peso da planta seca pela fórmula descrita abaixo. Posteriormente foram armazenados sob proteção da luz e em ambiente refrigerado até o uso.

$$\text{Rendimento do extrato (\%)} = \left( \frac{\text{Massa do extrato}}{\text{Massa seca da amostra}} \right) \times 100$$

### 5.1.3 Análise fitoquímica qualitativa

Seguindo a metodologia de Matos (1997), os extratos foram submetidos à análise fitoquímica qualitativa para detecção das principais classes de metabólitos. Esta análise inclui várias reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias.

Para a identificação de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavanonas, flavonóis, xantonas, saponinas, esteroides, triterpenoides, quinonas, antraquinonas e alcaloides, os extratos foram solubilizados em água destilada ou em outros compostos de acordo com a especificidade de cada teste conforme descrito a seguir.

#### 5.1.3.1 Teste para fenóis e taninos

Em um tubo de ensaio foram dissolvidos aproximadamente 0,1 g de extrato em 3 mL de água destilada e foram adicionadas 3 gotas de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Após agitação observou-se se houve a variação da cor e a formação de precipitado, que foram comparados a um teste branco. A presença de fenóis é geralmente indicada por uma coloração azul ou vermelha. Já a formação de precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

#### 5.1.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e outros flavonoides

Em três tubos de ensaio foram adicionados 3 mL do extrato solubilizado em água destilada. O tubo 01 foi acidificado a pH 3, enquanto os tubos 02 e 03 foram alcalinizados a pH 8.5 e 11, respectivamente. Foi observado se houve mudança de coloração de acordo com a Tabela 01. É importante destacar que a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro.

#### 5.1.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Para este teste, dois tubos de ensaio contendo 3 mL dos extratos solubilizados em água destilada tiveram seus pH modificados. O tubo 01 foi acidulado com solução de ácido clorídrico (HCl) até pH 3, enquanto o tubo 02 foi alcalinizado a pH 11 com solução de hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, os tubos foram aquecidos por aproximadamente 3 minutos, observando-se, de acordo com a Tabela 02, se houve o aparecimento da cor

indicativa do constituinte. Neste teste a presença de um constituinte também pode mascarar a cor indicativa de outro.

**Tabela 01** – Coloração característica para cada classe de metabólitos secundários.

Constituintes	Cor do meio		
	<i>pH 3</i>	<i>pH 8,5</i>	<i>pH 11</i>
<b>Antocianinas e antocianidinas</b>	Vermelho	Lilás	Azul púrpura
<b>Flavonas, flavonóis e xantonas</b>	---	---	Amarela
<b>Chalconas e auronas</b>	Vermelho	---	Vermelho
<b>Flavanonóis</b>	---	---	Vermelho-Laranja

Fonte: Matos (1997).

**Tabela 02** – Coloração característica para cada classe de metabólitos secundários.

Constituintes	Cor do meio		
	<i>pH 3</i>	<i>pH 8,5</i>	<i>pH 11</i>
<b>Leucoantocianidinas</b>	Vermelho	---	---
<b>Catequinas</b>	Pardo-Amarela	---	---
<b>Flavanonas</b>	---	---	Vermelho-Laranja

Fonte: Matos (1997).

#### 5.1.3.4 Teste para saponinas

Aproximadamente 0,5 g dos extratos da entrecasca ou da folha foram diluídos em 10 mL de água destilada. O tubo fechado foi agitado vigorosamente durante 2 minutos. A formação de uma espuma persistente e abundante indica a positividade do teste.

#### 5.1.3.5 Teste para esteroides e triterpenoides

Os testes para esteroides e triterpenoides foram realizados pela reação de Liebermann-Burchard. Para isso, cerca de 0,5 mg dos extratos secos foram dissolvidos em 10 mL de Clorofórmio, sendo filtrada em funil de algodão posteriormente. Ao filtrado foi adicionado 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionaram-se cuidadosamente três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) concentrado. Agitou-se novamente e foi observado se houve o desenvolvimento de cores que vão do azul evanescente ao verde persistente que

indicam esteroides livres e, do pardo ao vermelho que indica triterpenoides pentacíclicos livres.

#### 5.1.3.6 Teste para quinonas e antraquinonas

Neste teste foi utilizada a reação direta de Bornträger, onde cerca de 0,1 g do extrato foi diluída em 5 mL de éter etílico, agitada suavemente por 2 minutos e filtrada. À solução etérea do extrato adicionou-se 2 mL de solução de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 10%, agitou-se suavemente e foi verificado se houve o aparecimento de coloração rósea ou vermelha na fase aquosa, que indica reação positiva para quinonas e antraquinonas.

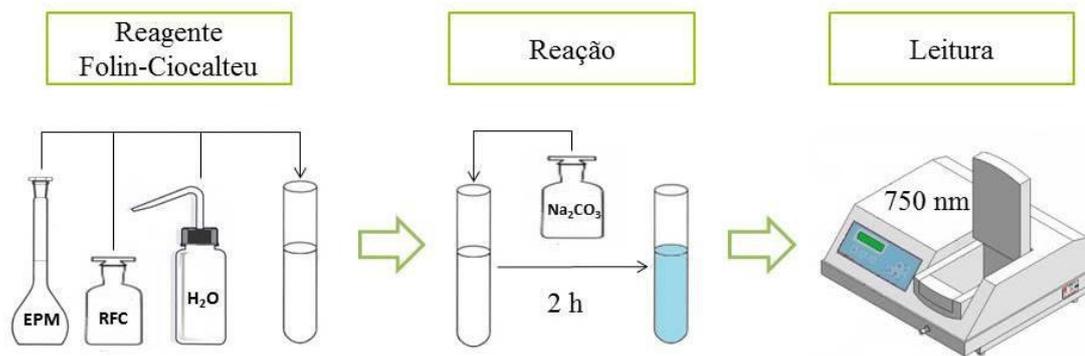
#### 5.1.3.7 Teste para alcaloides

Os alcaloides são geralmente detectados por meio dos reativos gerais de alcaloides (RGA), com os quais formam turvação e precipitação em meio ácido. Para o teste, 0,1 g do extrato seco foi dissolvido em 5 mL da solução de HCl a 5%, filtrada e separada em três porções. A elas foram adicionadas respectivamente 3 gotas dos RGAs Wagner, Mayer e Dragendorff. O aparecimento de turvação branca com os reativos de Wagner e Mayer, e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcaloides.

### 5.1.4 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos de *P. marginatum* foi realizada através do método de Folin–Ciocalteu (BONOLI *et al.*, 2004), cujo reagente apresenta uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, que na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam o molibdênio azul e o tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA *et al.*, 2007).

Cada extrato vegetal foi dissolvido em metanol a uma concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi misturada com 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada. Depois do intervalo de 1 min, foram adicionados 2 mL da solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 15% e a mistura foi deixada em repouso durante 2 horas. A absorbância da mistura foi medida a 750 nm, utilizando como um reagente branco a solução final, exceto o extrato (Figura 06).



**Figura 06** – Determinação do teor de fenóis totais. EPM = extrato de *P. marginatum*; RFC = Reagente Folin-Ciocalteu.

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico ( $10$  a  $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressos como mg de EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) por g de extrato. A equação da curva foi  $C = 0,0011A + 0,0138$ , onde  $C$  é a concentração do ácido gálico,  $A$  é a absorbância da amostra a  $750 \text{ nm}$  e o coeficiente de correlação foi  $R = 0,9925$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EHE E EHF DE *P. marginatum*

### 5.2.1 Preparação de EHE e EHF de *P. marginatum*

Para os ensaios biológicos, os extratos sólidos brutos da entrecasca e da folha foram solubilizados em uma solução fosfato-salino (PBS) numa concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para acelerar a dissolução dos extratos, as soluções foram sonicadas em 6 ciclos de 5 minutos cada. Em seguida, os extratos solubilizados foram centrifugados a  $1000 \text{ g}$  por 10 minutos e esterilizados em filtro com membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ .

Os extratos foram ajustados para as concentrações de  $20$ ,  $50$ ,  $100$  e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em meio de cultura RPMI-1640 e DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina ( $0,2 \text{ M}$ ) e 1% de gentamicina ou em tampões salinos de acordo com a especificidade dos ensaios biológicos descritos a seguir.

### 5.2.2 Atividade citotóxica *in vitro*

#### 5.2.2.1 Linhagens celulares

A atividade citotóxica dos extratos de *P. marginatum* foi avaliada através das linhagens celulares de neoplasias cervicais HeLa (ATCC - CCL-2) e SiHa (ATCC - HTB-35),

e por uma linhagem de fibroblasto normal isolados de tecido humano, cedidas pelos Laboratório de Imunomodulação e pelo Laboratório de Complemento, do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB, USP. As células foram mantidas em meio RPMI (células neoplásicas) e DMEM (fibroblastos), suplementados com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 1% de gentamicina em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para avaliar a toxicidade de EHE e EHF também foram utilizadas hemácias de coelho conservadas em Alsever estéril adquiridas comercialmente (BBV – BioBoaVista).

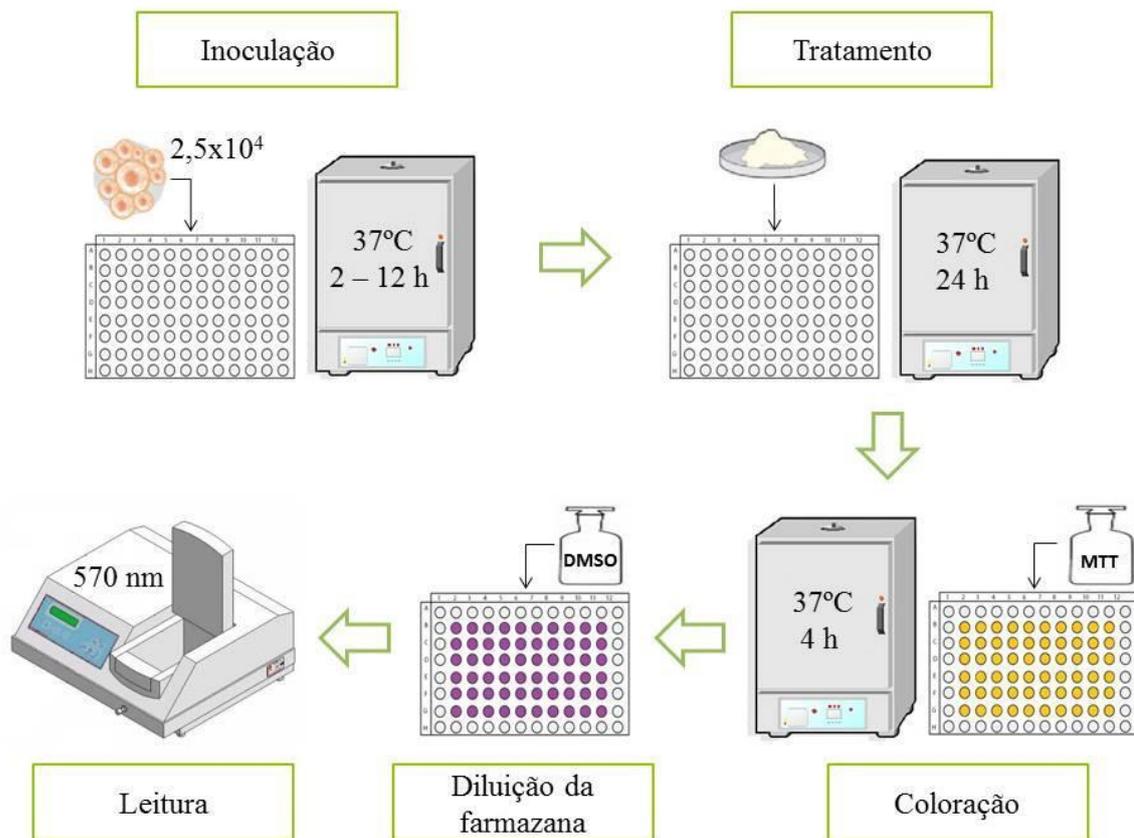
#### 5.2.2.2 Citotoxicidade pelo método de redução do MTT

A citotoxicidade de EHE e EHF de *P. marginatum* foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico do MTT (Figura 08) proposto por Mosmann (1983). Neste método, o MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil), um sal de coloração amarela, é reduzido pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial a um produto chamado farmazana, um composto de coloração púrpura. A quantidade deste produto pode ser determinada espectroscopicamente e indicar metabolismo e viabilidade celular.

Neste ensaio,  $2,5 \times 10^4$  células/poço foram semeadas em placa de 96 poços (100 µL / poço), em meio de cultura RPMI ou DMEM, contendo 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 1% de gentamicina em estufa a 37°C e 5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Após completa adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações (20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>) de EHE ou EHF de *P. marginatum* por 24 horas. Posteriormente, 10 µl da solução de MTT a 5 mg mL<sup>-1</sup> foram adicionados a cada poço e incubados por mais 4 horas sob proteção da luz. Os cristais de farmazana, resultante da redução do MTT por células viáveis foram dissolvidos pela adição de 100 µL de DMSO P.A. Células incubadas apenas em meio de cultura suplementado foram utilizadas com controle, correspondendo a 100% de viabilidade celular. A densidade óptica foi obtida por leitor de ELISA utilizando comprimento de onda 570 nm.

Foram consideradas não tóxicas, as concentrações em que a viabilidade celular foi maior ou igual a 90% em relação aos controles celulares. A viabilidade celular foi estimada pela porcentagem da densidade óptica (D.O) de acordo com a fórmula abaixo:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \left( \frac{D.O_{amostra}}{D.O_{controle}} \right) \times 100$$

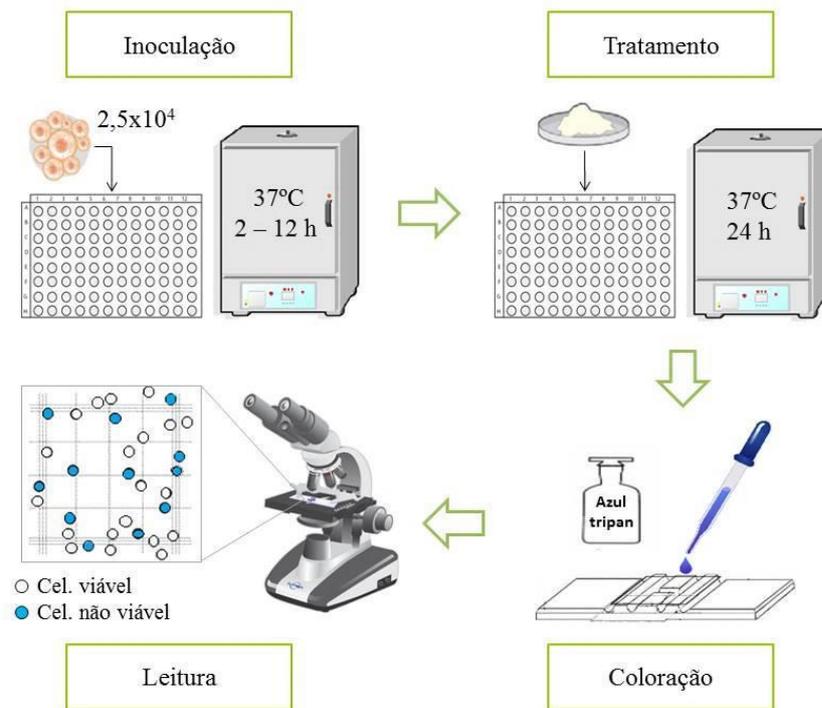


**Figura 06** – Ensaio colorimétrico do MTT (Mosmann, 1983).

### 5.2.2.3 Citotoxicidade pelo método de exclusão do azul de tripano

O número de células viáveis na presença ou ausência dos extratos de *P. marginatum* também foi avaliado segundo o método de exclusão de azul de tripano. Este método avalia a integridade da membrana celular, através da capacidade de permeabilização do corante azul de tripano. As células viáveis são impermeáveis a este corante, enquanto as células não viáveis permitem a penetração do corante devido à presença de poros na membrana. Dessa forma, células viáveis, que excluem o azul de tripano, apresenta aspecto translúcido, enquanto as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento.

Para a realização deste método (Figura 09), uma alíquota de 20µl da suspensão de células tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de EHE e EHF foi diluída em 10µl de azul de tripano a 0,2%. As células foram contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi calculada em relação aos grupos controle não tratados.

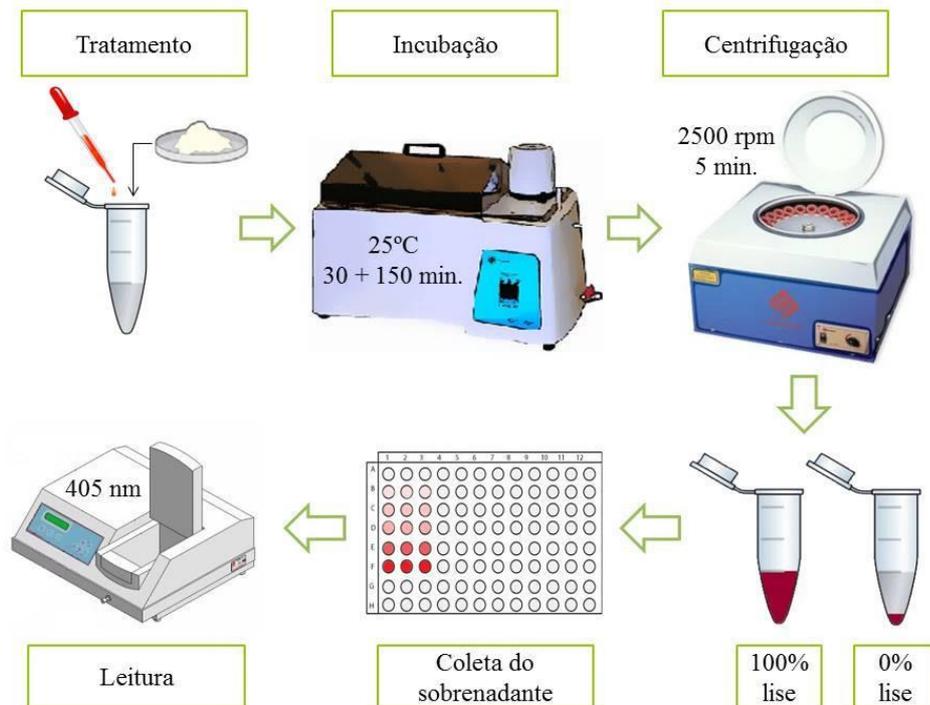


**Figura 07** – Método de exclusão do azul de tripano.

#### 5.2.2.4 Citotoxicidade pelo método de hemólise em tubos

O ensaio de hemólise é outro método *in vitro* que vem sendo empregado em estudos de toxicidade de plantas com interesse farmacológico. A hemólise é caracterizada pela ruptura do eritrócito com consequente liberação de hemoglobina. Livre no plasma, a hemoglobina é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração (SANTOS *et al.*, 2012). Nesse sentido a determinação da atividade hemolítica, como indicador de citotoxicidade, é importante em estudos de triagem de atividades biológicas de extratos vegetais.

O ensaio da atividade hemolítica de EHE e EHF de *P. marginatum* foi feito através da adaptação do método descrito por Wall *et al* (1952), como demonstrado na Figura 10. Neste método, uma alíquota de 2 mL de hemácias de coelho conservadas em Alsever estéril foi diluída em 10 mL de tampão GVB-EGTA- $\text{Mg}^{2+}$  e lavadas três vezes por centrifugação a 400 g a uma temperatura de  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante foi preparada uma suspensão de hemácias a 1% em tampão GVB-EGTA- $\text{Mg}^{2+}$ . As hemácias diluídas (100  $\mu\text{L}$ ) foram distribuídas em tubos contendo os extratos diluídos em tampão GVB-EGTA- $\text{Mg}^{2+}$  (100  $\mu\text{L}$ ) nas concentrações de 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 8** – Ensaio de hemólise em tubos (WALL *et al.*, 1952).

Os tubos foram incubados em banho-maria a 25°C por 30 minutos, sendo agitados suavemente e incubados novamente por 150 minutos, nas mesmas condições. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 400 g por 5 minutos. Como controles, as hemácias foram incubadas apenas com tampão GVB-EGTA-Mg<sup>2+</sup> (0% de lise) e com H<sub>2</sub>O (100% de lise). Para cada amostra, 100 µL do sobrenadante em duplicata foram transferidos para uma microplaca para leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 405nm. A porcentagem de lise foi obtida em relação aos controles pela fórmula a seguir, onde D.O indica a densidade óptica:

$$\text{Hemólise (\%)} = \left( \frac{D.O \text{ amostra} - D.O \text{ 0\%}}{D.O \text{ 100\%} - D.O \text{ 0\%}} \right) \times 100$$

#### 5.2.2.5 Cálculo da CI<sub>50</sub>

As concentrações que inibem 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>) foram determinadas graficamente a partir das porcentagens de células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão, admitindo-se um intervalo de confiança de 95% (p<0,05).

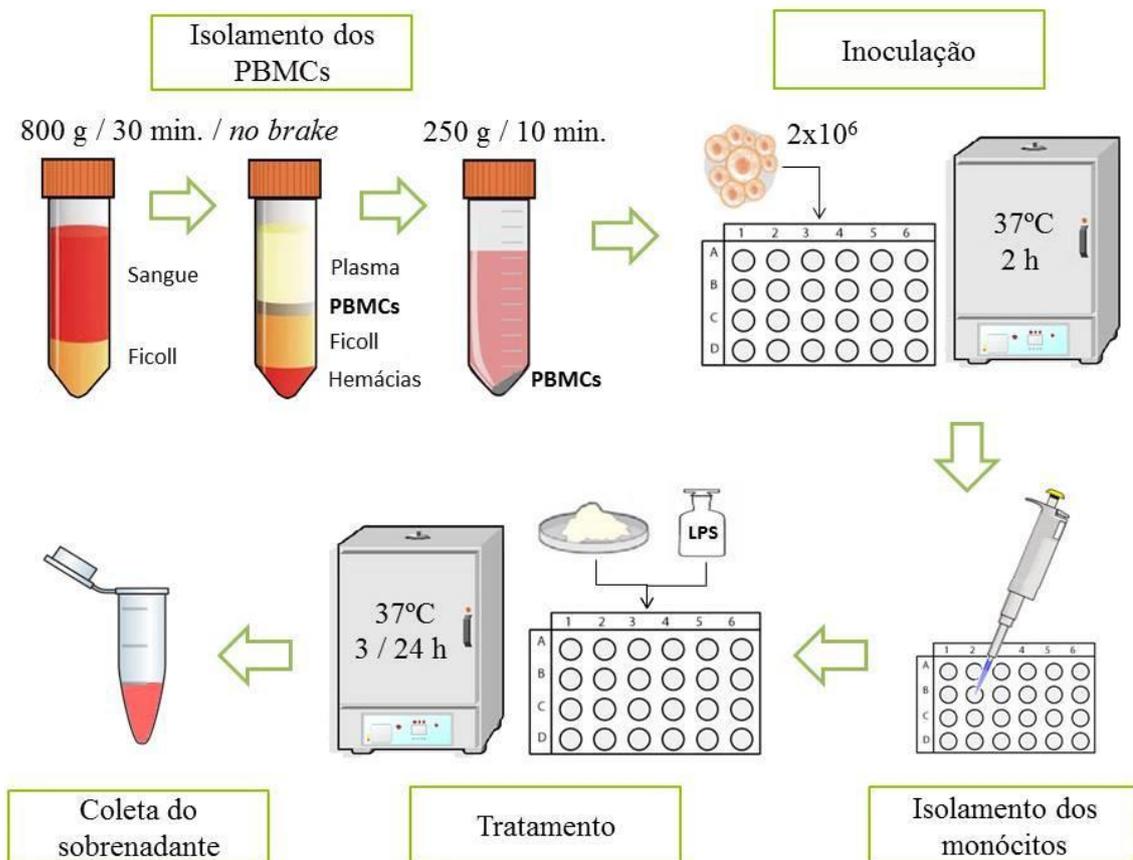
### 5.2.2.6 Curva de crescimento celular

O comportamento da multiplicação celular sob influência dos extratos de *P. marginatum* foi realizada pelo método de exclusão de azul de tripano descrito no item 5.2.2.3. O crescimento celular na presença ou ausência de EHE e EHF ( $20$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi avaliado nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A curva de crescimento foi calculada em relação à curva de grupos controle não tratados.

### 5.2.3 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

#### 5.2.3.1 Isolamento e tratamento de monócitos do sangue periférico humano

Para a obtenção dos monócitos (Figura 11), aproximadamente 30 mL de sangue foi coletado em tubo contendo heparina e homogeneizado levemente para evitar a formação de coágulos.



**Figura 9** – Isolamento e tratamento de monócitos do sangue periférico humano. PBMC = Células mononucleares do sangue periférico; LPS = Lipopolissacarídeo.

O sangue foi diluído em PBS na proporção 1:1 e separado através de um gradiente de Ficoll, seguido de centrifugação a 800 g sem *brake* por 30 minutos. Em seguida foi coletada a “nuvem” de células entre o Ficoll e o sobrenadante, que foram transferidas para um tubo

contendo meio RPMI e lavadas duas vezes por centrifugação a 250 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuscitado em 1 mL de RPMI para contagem de células viáveis pelo método de exclusão do azul de tripano. Posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de  $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram incubadas em placa de 24 poços a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 2 horas para a adesão das células mononucleares. Após a incubação foram realizadas 3 lavagens com meio RPMI em cada poço para a remoção de células não aderentes.

Para avaliar a produção de IL-1 $\beta$ , os monócitos isolados foram estimulados com 50  $\mu\text{L}$  de LPS (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 500  $\mu\text{L}$ ) e tratadas com as concentrações de 20 ou 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de EHE e EHF de *P. marginatum*. As células foram incubadas novamente a  $37^\circ\text{C}$  por 3 horas em estufa de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, seus sobrenadantes foram coletados e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização do ensaio.

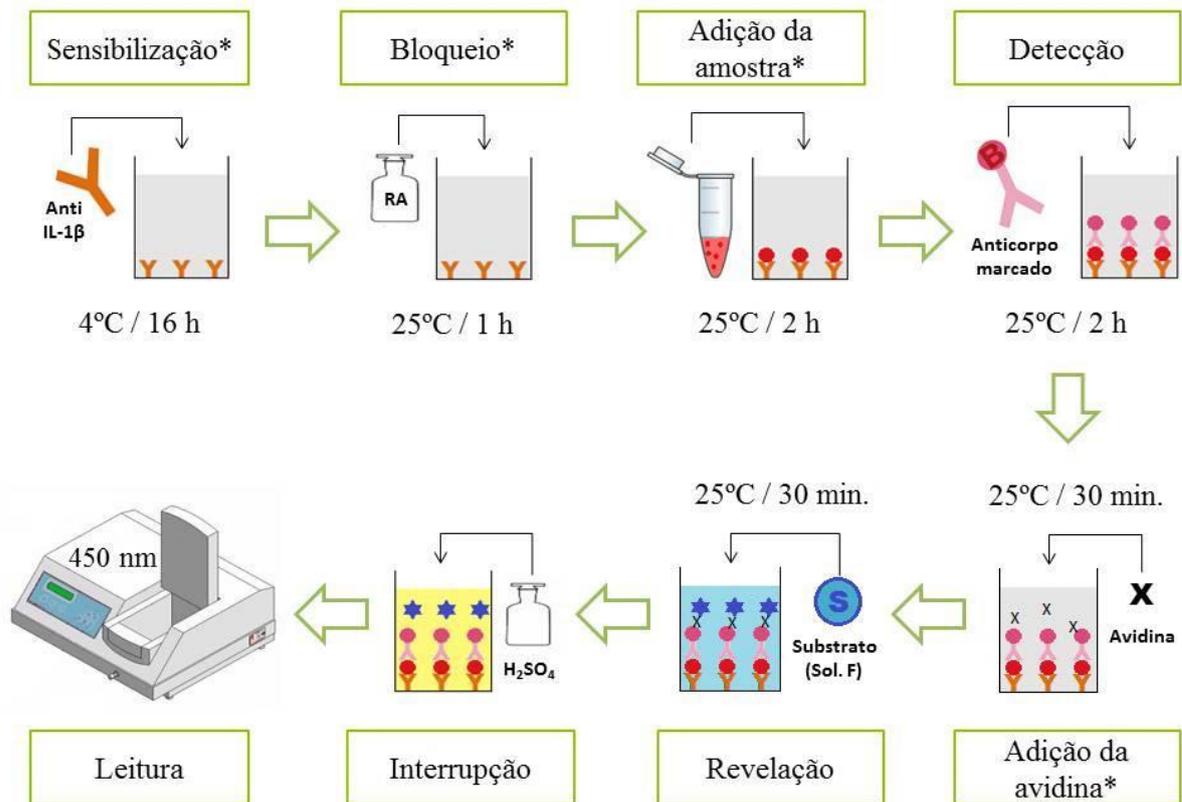
Como controles, monócitos estimulados com 50  $\mu\text{L}$  de LPS (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 500  $\mu\text{L}$ ) foram incubados apenas com meio RPMI suplementado, correspondendo ao máximo de inflamação, enquanto o soro de dois indivíduos saudáveis correspondeu ao mínimo de inflamação. Células sem estímulo de LPS também foram incubadas na presença ou ausência (produção basal) das mesmas concentrações de EHE para verificar a habilidade do extrato de influenciar a liberação de IL-1 $\beta$ .

#### 5.2.3.2 Viabilidade celular

A viabilidade de monócitos frente a *P. marginatum* foi realizada para garantir que as variações nas concentrações de IL-1 $\beta$  seriam devido à modulação de mecanismos celulares e não à citotoxicidade dos extratos. O método utilizado foi o de exclusão por azul de tripano descrito no item 5.2.2.3, onde os monócitos foram submetidos à ação de EHE e EHF (20 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante um período de 3 e 24 horas.

#### 5.2.3.3 Quantificação de IL-1 $\beta$

A citocina IL-1 $\beta$  foi quantificada no sobrenadante celular através do teste imunoenzimático de ELISA de captura. O kit de ELISA para detecção de IL-1 $\beta$  (BioLegend) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Figura 12).



**Figura 10** – Quantificação de IL-1 $\beta$  produzida por monócitos, através do teste imunoenzimático de ELISA de captura.

O anticorpo humano de captura monoclonal anti IL-1 $\beta$ , em concentração adequada, foi adsorvido em microplaca de 96 poços a 4°C por 16 horas (100  $\mu$ L / poço). Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (tampão de lavagem) e posteriormente bloqueada com 200  $\mu$ L / poço da solução diluente (Reagente A – PBS pH 7,4; diluição 1:5). A placa foi incubada à temperatura ambiente, por 1 hora, seguida de quatro lavagens. A cada poço foram adicionados 50  $\mu$ L do padrão da citocina ou dos sobrenadantes das culturas de monócitos. A placa foi novamente incubada à temperatura ambiente por 2 horas e lavada quatro vezes. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L / poço do anticorpo de detecção (marcado com biotina) na proporção 1:200 em solução diluente. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas, seguida de quatro lavagens e adição de 100  $\mu$ L / poço da solução avidina-peroxidase na diluição 1:1000 em solução diluente. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, a placa foi lavada quatro vezes e 100  $\mu$ L do substrato (Solução F) foram adicionados a cada poço. Esta, foi incubada protegida da luz por aproximadamente 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de

100  $\mu\text{L}$  da solução de paragem (2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) em cada poço. A absorbância foi lida a 450 nm em leitor de ELISA e a concentração de IL-1 $\beta$  foi determinada utilizando-se a curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas de cada padrão. Os resultados foram expressos em  $\text{pg mL}^{-1}$ .

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos de *P. marginatum* foram realizados experimentos fatoriais 3x2, onde a susceptibilidade de 3 linhagens celulares foram testadas frente a ação de 2 extratos diferentes (EHE ou EHF). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (D.P). Para comparações múltiplas foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, sendo considerados estatisticamente significativos, os valores com  $p < 0,05$ .

Todos os dados foram analisados e apresentados graficamente através dos softwares GraphPad Prism versão 6.0 e Microsoft Excel 2010.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

Com a extração hidroalcoólica com etanol 70% obteve-se um rendimento de 10,9% e 12,1% de extrativos solúveis para EHE e EHF, respectivamente.

Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica para os extratos hidroalcoólico bruto da entrecasca e da folha de *P. marginatum* estão descritos na Tabela 03. Dentre as classes químicas identificadas, observa-se a presença de fenóis, taninos, saponinas, esteroides livres, alcaloides, bem como flavonoides e seus derivados para ambos os extratos. A presença de antocianinas, antocianidinas, leucoantocianidinas e quinonas não foi observada.

**Tabela 03** – Prospecção qualitativa dos constituintes químicos de EHE e EHF de *P. marginatum*.

Constituintes	EHE	EHF
Fenóis	+	+
Taninos e catequinas	+	+
Antocianinas, antocianidinas e leucoantocianidinas	-	-
Flavonóis, flavononóis, flavanonas e xantonas	+	+
Chalconas e auronas	+	+
Saponinas	+	+
Esteroides livres	+	+
Alcaloides	+	+
Quinonas e antraquinonas	-	-

EHE = Extrato hidroalcoólico da entrecasca; EHF = Extrato hidroalcoólico da folha; (+) Presença; (-) Ausência.

Os teores de fenóis totais (FT) dos extratos de *P. marginatum*, determinados pelo método Folin– Ciocalteu e expressos como mg EAG / g de extrato bruto foram  $72,21 \pm 4,39$  e  $214,76 \pm 3,66$  para EHE e EHF, respectivamente.

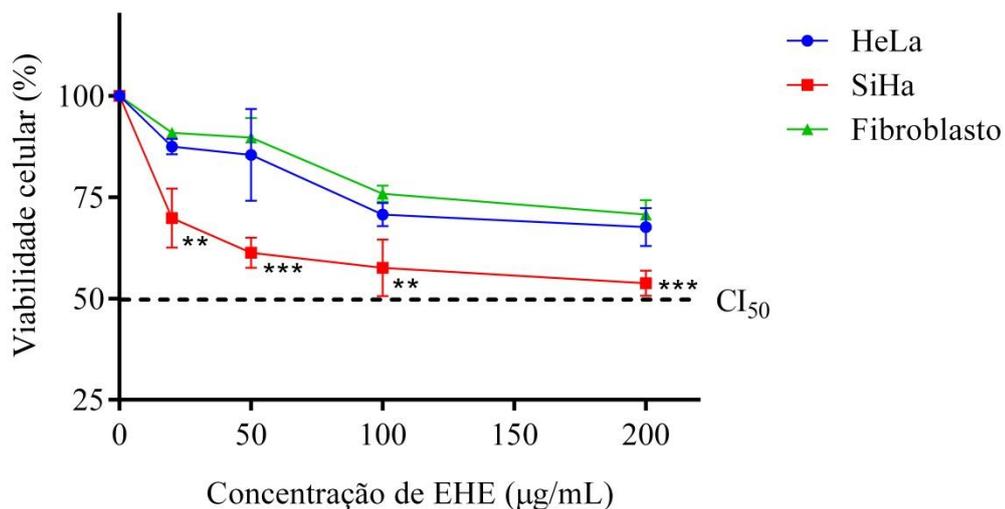
## 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EHE E EHF DE *P. marginatum*

### 6.2.1 Atividade citotóxica

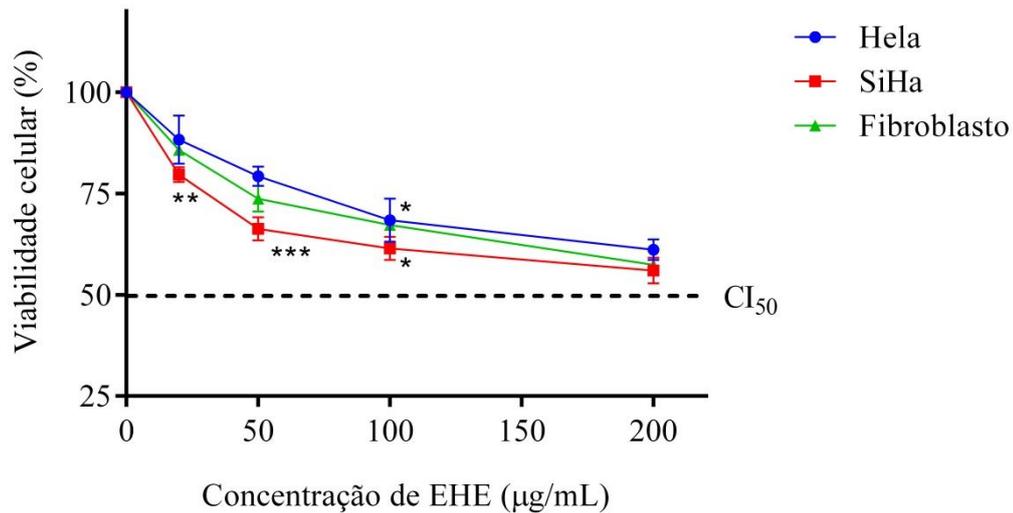
#### 6.2.1.1 Atividade citotóxica em linhagens tumorais e normais

A viabilidade das células HeLa, SiHa e Fibroblasto, avaliadas após 24 h de exposição a diferentes concentrações dos extratos de *P. marginatum*, pelos métodos de redução do MTT e exclusão do azul de tripano e seus valores de  $CI_{50}$ , estão apresentadas nas Figuras 13 a 16, respectivamente. Esta avaliação demonstrou que ambos os extratos, entrecasca e folha, produziram um efeito citotóxico dose-dependente.

O Extrato Hidroalcoólico da Entrecasca (EHE) foi mais ativo sobre as células SiHa tanto pelo método do MTT (Figura 13) quanto pelo ensaio do azul de tripano (Figura 14), enquanto HeLa e fibroblasto foram menos sensíveis, não apresentando diferenças significativas entre si. No entanto, no ensaio do azul de tripano todas as linhagens apresentaram sensibilidade semelhante na concentração de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 14).



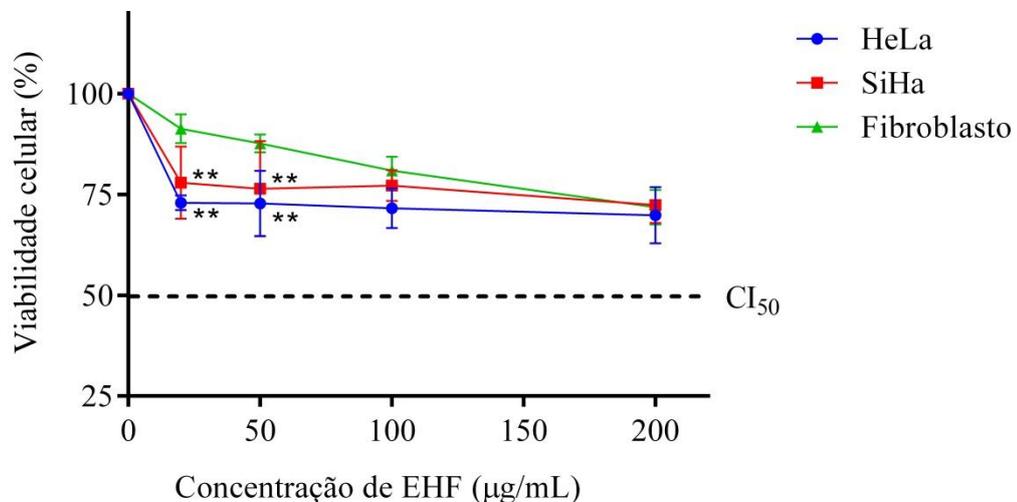
**Figura 11** – Viabilidade celular de HeLa, SiHa e Fibroblasto: após 24h de exposição a EHE de *P. marginatum* ( $20$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de redução do MTT. Resultados expressos como média e D.P. Com \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  no teste de Tukey.



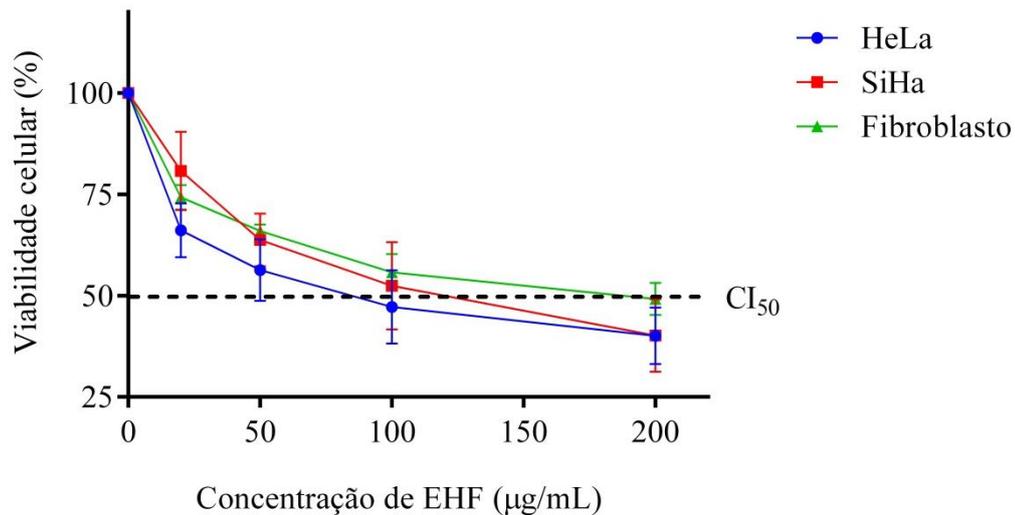
**Figura 12** – Viabilidade celular HeLa, SiHa e Fibroblasto após 24h de exposição a EHE de *P. marginatum* (20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>) pelo método de exclusão de Azul de tripano. Resultados expressos como média e D.P. Com \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 no teste de Tukey.

As células tumorais (HeLa e SiHa) foram mais sensíveis ao Extrato Hidroalcoólico da Folha (EHF) nas concentrações de 20 e 50 µg mL<sup>-1</sup>, quando comparadas aos fibroblastos no ensaio do MTT (Figura 15). Neste teste, as viabilidades das linhagens avaliadas não apresentaram diferença significativa entre si para as concentrações de 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>.

Através do método de exclusão do azul de tripano, EHF apresentou ação citotóxica sobre todas as linhagens celulares (Figura 16).



**Figura 13** – Viabilidade celular HeLa, SiHa e Fibroblasto após 24h de exposição a EHF de *P. marginatum* (20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>) pelo método de redução do MTT. Resultados expressos como média e D.P. Com \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 no teste de Tukey.

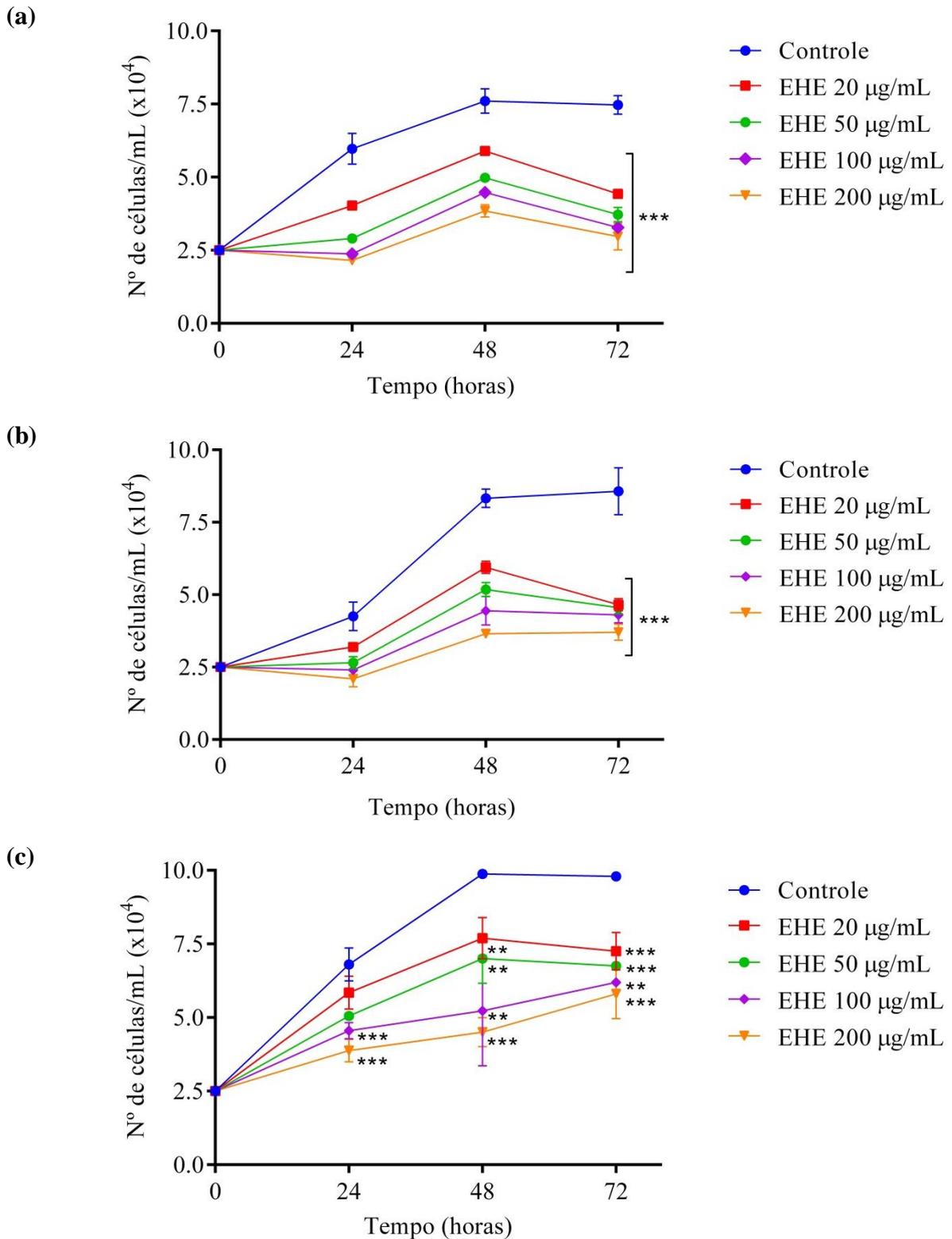


**Figura 14** – Viabilidade celular de células HeLa, SiHa e Fibroblasto após 24h de exposição a EHF de *P. marginatum* (20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>) pelo método exclusão de Azul de tripano. Resultados expressos como média e D.P. Com \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 no teste de Tukey.

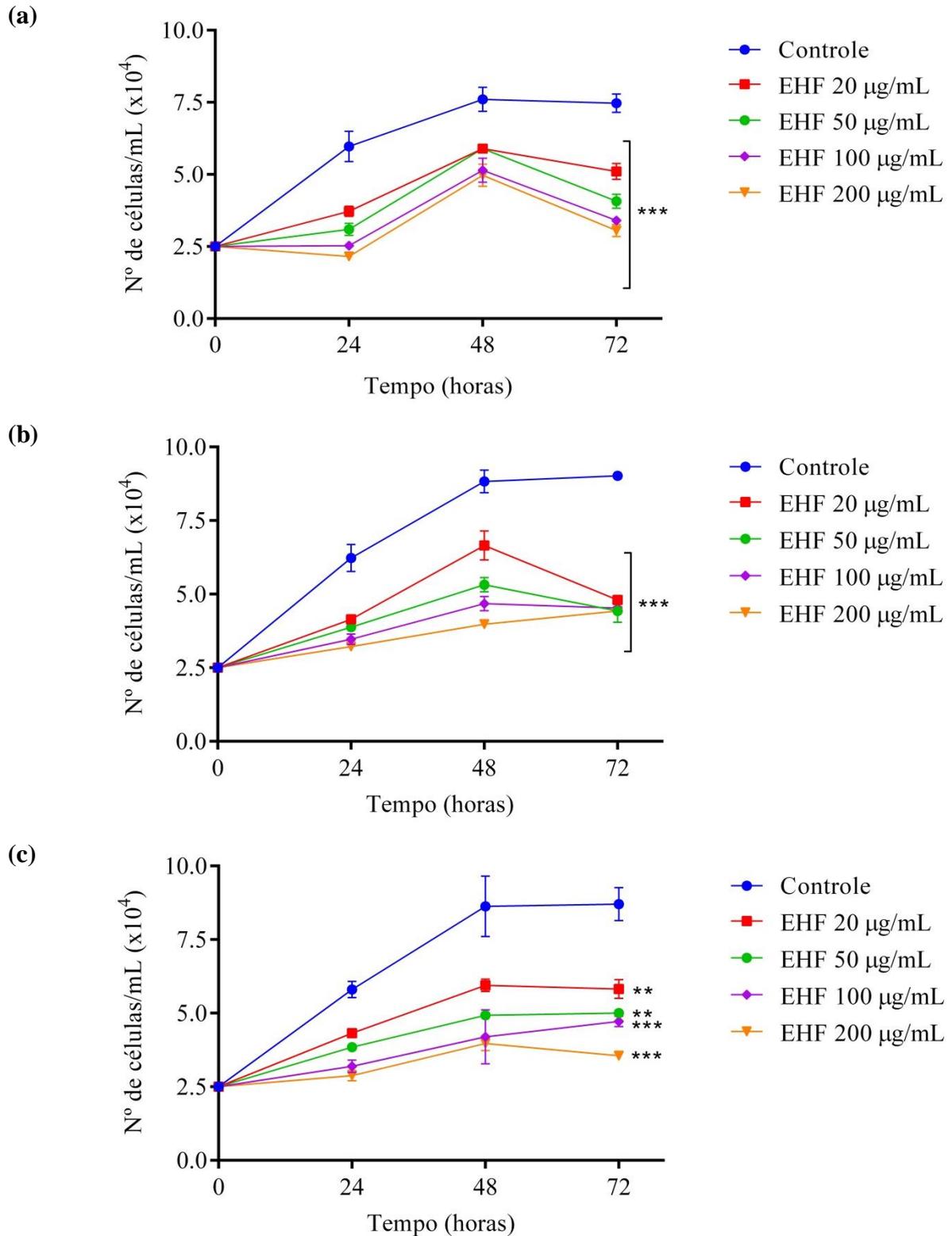
Os valores de CI<sub>50</sub>, concentração capaz de inibir a viabilidade celular em 50%, estão demonstrados nas Figuras 13 a 16. As linhagens HeLa, SiHa e Fibroblasto tratadas com EHF e avaliadas através do método de exclusão de azul de tripano apresentaram valores de CI<sub>50</sub> de 91, 122 e 174 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A CI<sub>50</sub> para as demais análises não foram determinados, pois os valores obtidos demonstraram que até mesmo a concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> dos extratos avaliados não inibiu a proliferação celular a 50%.

#### 6.2.1.2 Curva de crescimento celular

Nas figuras 17 e 18 estão representadas as curvas de crescimento, com o número de células viáveis descrito em logaritmo na base 10, das linhagens HeLa, SiHa e Fibroblasto avaliadas sob a ação de diferentes concentrações dos extratos EHE e EHF, ao longo de 72 horas de incubação. A partir destes dados, observou-se uma variação dose dependente no crescimento das linhagens estudadas quando tratadas com os extratos da entrecasca e da folha de *P. marginatum*.



**Figura 15** – Curva de crescimento HeLa (a), SiHa (b) e Fibroblasto (c) ao longo de 72 horas de exposição a EHE de *P. marginatum* (20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>) pelo método de exclusão de Azul de tripano. Número inicial de células (linha tracejada). Resultados expressos como média e D.P. Com \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 nos testes de Tukey.



**Figura 16** – Curva de crescimento HeLa (a), SiHa (b) e Fibroblasto (c) ao longo de 72 horas de exposição a EHF de *P. marginatum* (20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>) pelo método de exclusão de Azul de tripano. Número inicial de células (linha tracejada). Resultados expressos como média e D.P. Com \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 nos testes de Tukey.

Em relação ao controle, a multiplicação celular das linhagens tumorais tratadas com EHE foi significativamente menor. No entanto, a linhagem de células normais expostas às concentrações de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  desse mesmo extrato, apresentou comportamento semelhante ao grupo controle nas primeiras 24 horas (Figura 17). Nesse tratamento, a duplicação do número de células ocorreu apenas nas concentrações de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde as linhagens HeLa e SiHa duplicaram após um período de 48 horas de exposição a EHE, enquanto os fibroblastos dobraram o número de células viáveis após 24 horas.

Todas as linhagens celulares submetidas à ação de EHF apresentaram uma proliferação inferior à do grupo controle (Figura 18). No entanto, as linhagens aqui estudadas dobraram seu número de células após 48 horas de avaliação.

As figuras 17 e 18 demonstram ainda que para ambos os extratos o declínio da duplicação celular das células HeLa e SiHa ocorreu após 48 horas de incubação, comportamento não observado nos fibroblastos, que se manteve em fase estacionária até o tempo máximo de avaliação.

#### 6.2.1.3 Atividade hemolítica

O teste de hemólise de hemácias de coelho *in vitro* foi empregado para a avaliação da toxicidade dos extratos hidroalcoólicos da entrecasca e da folha de *P. marginatum*. A Tabela 04 apresenta as porcentagens de lise obtidas neste teste. Os dados demonstram que os extratos desta planta não apresentaram ação hemolítica, sendo observada uma baixa porcentagem de lise das hemácias para cada uma das concentrações testadas.

**Tabela 04** – Porcentagem de lise de hemácias de coelho expostas a diferentes concentrações ( $20$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de EHE e EHF de *P. marginatum*.

Concentração	Lise (%)	
	EHE	EHF
$20 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,18 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,12$
$50 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,46 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,05$
$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,85 \pm 0,34$	$0,30 \pm 0,04$
$200 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,59 \pm 0,27$	$1,35 \pm 0,26$
GVB-EDTA-Mg <sup>2+</sup>	0% de lise	
H <sub>2</sub> O	100% de lise	

EHE = Extrato hidroalcoólico da entrecasca; EHF = Extrato hidroalcoólico da folha.

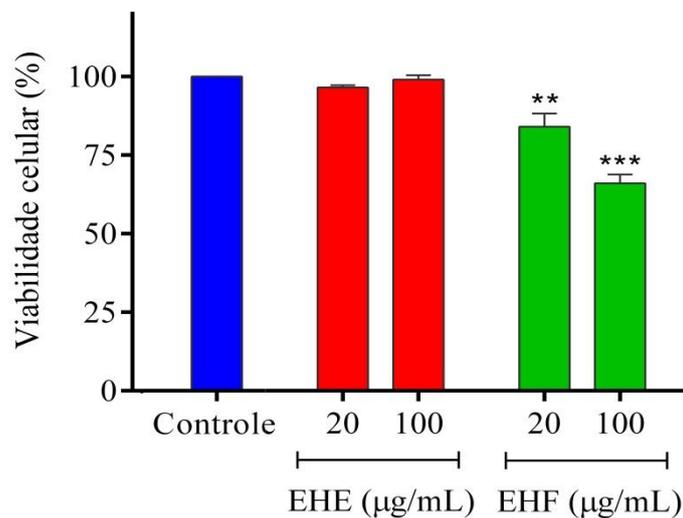
## 6.2.2 Atividade anti-inflamatória

### 6.2.2.1 Viabilidade celular de monócitos

A viabilidade de monócitos frente à EHE e EHF de *P. marginatum* foi avaliada através do ensaio de exclusão por azul de tripano. O número de células viáveis foi avaliado após 3h e 24h de estimulação às concentrações de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada extrato (Figura 19).

Após um período de 3h de exposição, a citotoxicidade de EHE foi insignificante sobre os monócitos, uma vez que os valores não diferiram significativamente do controle. Por outro lado, EHF mostrou-se extremamente tóxico, reduzindo a viabilidade dos monócitos em 13,6% e 37,3% após 3h de estímulo para as concentrações de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

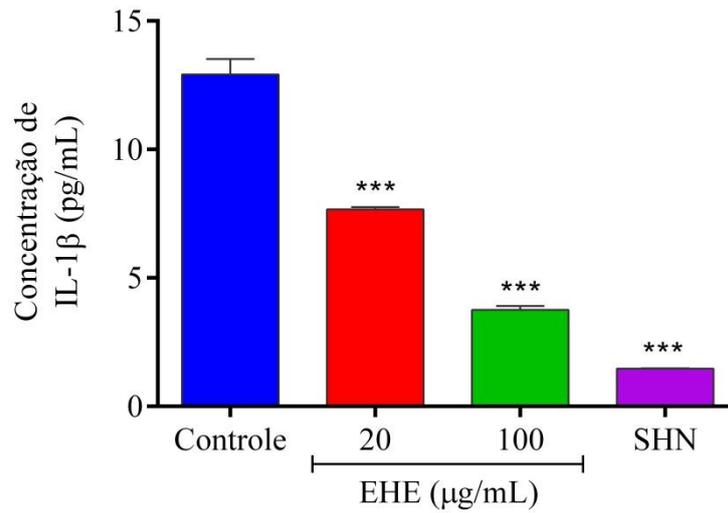
Ambos os extratos reduziram significativamente a viabilidade dos monócitos após exposição de 24h, sendo a utilização deste período invariável para a quantificação de IL-1 $\beta$ .



**Figura 17** – Viabilidade de monócitos após 3h de exposição a EHE e EHF de *P. marginatum* (20 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelo método de exclusão de Azul de tripano. Resultados expressos como média e D.P. Com \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  no teste de Tukey

### 6.2.2.2 Efeito na liberação de IL-1 $\beta$

A inibição da produção de IL-1 $\beta$  pelo extrato da entrecasca de *P. marginatum* (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) após um período de 3h de estímulo está representada na Figura 20.



**Figura 18** – Efeito de EHE de *P. marginatum* sobre a liberação de IL-1β. Grupos pré-estimulados com LPS ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e tratados RPMI-10% SFB (controle), EHE (20 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou soro humano saudável (SHN). Resultados expressos como média e D.P. Com \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  no teste de Tukey.

Os monócitos estimulados apenas por LPS (controle) produziram grandes quantidades de IL-1β ( $12,91 \pm 0,60 \text{ pg mL}^{-1}$ ), enquanto que a concentração desta citocina no soro humano saudável foi pouco mais que  $1 \text{ pg mL}^{-1}$ . Os monócitos estimulados com LPS e tratados com EHE reduziram a produção de IL-1β, indicando que em condições inflamatórias esse extrato inibe a produção desta citocina.

## 7. DISCUSSÃO

O rendimento obtido com a extração hidroalcoólica com etanol a 70% esteve dentro do previsto, resultando em um maior aproveitamento de extrativos para as partes menos rígidas, como as folhas (SIMÕES, 2007). A água é um dos solventes mais comumente utilizados pela população para a extração dos princípios ativos vegetais, no entanto, é o álcool que possibilita a extração de um maior número de compostos. Preparações hidroalcoólicas, como a utilizada para a produção dos extratos brutos de *P. marginatum*, apresentam grande eficácia quanto à solubilidade de constituintes fitoquímicos, além de possibilitar uma abordagem voltada para o uso popular.

A prospecção de EHE e EHF de *P. marginatum* revelou a presença de fenóis, taninos, saponinas, esteroides livres, alcaloides e flavonoides. Outros estudos também relataram a presença desses compostos na casca da Embiratanha. Com exceção das saponinas, Chaves (2012) e Paiva (2013) detectaram em extratos hidroalcoólicos da casca e entrecasca de *P. marginatum* os mesmos metabolitos secundários identificados neste estudo. Além destes compostos, outras substâncias como cumarinas, derivados antracênicos, lignanas e terpenoides (mono, sesqui, diterpenos e triterpenos) já foram identificados na casca desta planta (VERAS FILHO, 2012).

Poucos estudos demonstram a presença e identificação de metabolitos secundários na folha da Embiratanha. Através de análise fitoquímica pelo método cromatografia em camada delgada (CCD), Veras Filho (2012) verificou a presença de antocianinas, antraquinonas agliconas e glicosídicas, compostos fenólicos, cumarinas, terpenoides e esteroides na folha de *P. marginatum*. Para ele, os grupos que mais se destacaram em diversidade foram os terpenoides e compostos fenólicos. A carência de estudos voltados para a folha e outras partes da planta pode estar relacionada ao maior interesse fármaco e etnobotânico na casca desta espécie, uma vez que esta é frequentemente relatada quanto ao seu uso popular (ALBUQUERQUE, 2007; AGRA et al., 2008; KFFURY, 2008; ROQUE et al. 2010; PAULINO et al., 2011; SILVA et al., 2014).

Apesar de informações escassas no que diz respeito a estudos de prospecção fitoquímica da espécie *P. marginatum*, tem-se na literatura relatos de diversos metabolitos secundários de importância fitoterápica em outras espécies da subfamília *Bombacoideae*. Paula e colaboradores (1997) realizaram uma revisão de todos os estudos químicos realizados em espécies da família *Bombacaceae*, atualmente incorporada na família *Malvaceae*, e verificaram que as substâncias mais significativas isoladas foram alcaloides, naftalenos

oxidados, cumarinas, lignanas e ácidos graxos com anel ciclopropeno. A análise fitoquímica da Barriguda (*Ceiba glaziovii*) indicou a presença de taninos catéquicos, flavonóis, fenóis, flavonas, xantonas, alcaloides, albumina e quantidades menores de antocianina e antocianidina na casca, enquanto nas folhas constatou-se a presença de taninos catéquicos, flavonóis, alcaloides, albumina, antocianina, antocianidina e traços de saponinas (LEAL et al., 2011).

A prospecção fitoquímica preliminar não permitiu verificar a presença de antocianinas, antocianidinas, leucoantocianidinas e quinonas. No entanto, Menezes e colaboradores (2015) relataram a presença desses compostos em diferentes partes (galhos, cascas, raízes e flores) de *P. marginatum*. Os resultados obtidos por esses autores constataram que as concentrações de antocianinas nesta planta não são significativas, portanto podem não ser detectados em testes qualitativos. Dentre os membros estudados, a casca apresentou o resultado mais relevante para o estudo em questão, com concentração de 0,49 mg/100 g de extrato.

Dentre os compostos químicos identificados qualitativamente em EHE e EHF estão os fenóis. A avaliação de seus teores nos extratos de *P. marginatum*, realizada através do reagente de Folin-Ciocalteu, apresentou valores intermediários em relação aos dados de outras espécies descritas na literatura (SOUSA et al., 2007; CHAVES et al., 2010; DE SÁ et al., 2012). No entanto, quando comparados com estudos dessa mesma espécie, esses valores são elevados para ambos os extratos (CHAVES et al., 2013; VERAS FILHO, 2013).

O extrato da folha de Embiratanha exibiu o maior teor de fenóis totais (FT) com  $214,76 \pm 3,66$  mg EAG/g. Estes resultados são corroborados por Veras Filho (2012), que encontrou resultados semelhantes ao avaliar extratos hidroalcoólicos da casca e da folha de *P. marginatum*, com teores de 9,06 e 26,01 mg EAG/g, respectivamente. Ruiz-Terán e colaboradores (2008) determinaram o conteúdo total de fenóis de extratos metanólicos de plantas utilizadas na medicina popular mexicana, dentre elas *Pseudobombax ellipticum*, e encontraram valores próximos a 230 mg EAG/g para o extrato da folha, valor semelhante ao obtido para *P. marginatum*. Valores semelhantes também foram obtidos para os extratos de *Hibiscus sabdariffa*, que apresentaram maiores teores de FT para os extratos metanólico dos cálices (471,35 mg EAG/g) em relação ao extrato da folha com 389,98 mg EAG/g (FORMAGIO et al., 2015).

Neste estudo, as concentrações de fenóis de EHE e EHF sofreram alteração de acordo com a parte da planta estudada. Outros fatores, como a idade e o tamanho da planta, da parte

coletada, características edáficas e climáticas influenciam na quantidade desses e de outros metabólitos (BLANK et al., 2007). Ao avaliar a concentração de fenóis do extrato da casca da Embiratanha, Chaves e colaboradores (2013) observaram uma influência sazonal, onde os fenóis foram mais abundantes no período chuvoso (37,21  $\mu\text{g EAG/g}$ ).

A atividade citotóxica dos extratos da entrecasca e da folha de *P. marginatum* ocorreu principalmente sobre as células de câncer cervical. Ao avaliar a ação dos extratos metanólico de quatro espécies da família Malvaceae (*Sida acuta*, *Sida Cordifolium*, *Sida rhombilifolia* e *Urena lobata*) sobre células de carcinoma hepático (HepG-2), Pieme e colaboradores (2010) também registraram efeito citotóxico com redução dose-dependente da viabilidade celular. De modo geral, fibroblastos isolados de tecido humano saudável demonstraram nesse estudo uma menor sensibilidade aos extratos, principalmente nas menores concentrações testadas. O extrato aquoso da flor de *Hibiscus sabdariffa* também apresentou toxicidade sobre células de câncer de estômago, que foram mais susceptíveis à ação do extrato do que as células saudáveis do fígado (LIN et al., 2007). O extrato aquoso da folha dessa mesma espécie foi avaliado sobre linhagens de adenocarcinoma da próstata. Os resultados mostraram um efeito inibidor dose-dependente sobre o crescimento de células de câncer de próstata, LNCaP, DU145 e PC3. O mesmo tratamento foi realizado numa linhagem celular normal, no entanto, essas foram menos sensíveis ao efeito citotóxico desse extrato (LIN et al., 2012).

Nesse estudo, as células SiHa foram significativamente mais sensíveis a EHE, sugerindo que esse extrato pode apresentar citotoxicidade seletiva para esse tipo celular. Nas doses mais altas, o extrato da folha apresentou moderada citotoxicidade para todas as linhagens estudadas, reduzindo a viabilidade celular em até 40% para as células tumorais e 49% para a linhagem normal no teste do azul de tripano. A viabilidade celular abaixo de 50% indica que um extrato é ativo e, portanto, citotóxico (RIBEIRO, 2012). Das linhagens tumorais avaliadas por Costa e colaboradores (2004), as células HEp-2 (carcinoma laríngeo humano) foram mais sensíveis ao extrato etanólico das folhas de *Lipia alba*, quando comparado ao extrato da raiz e do caule. O extrato etanólico da folha de *Anisomeles indica* também foi mais ativo e inibiu a viabilidade de células colo 205 (câncer de colo uterino) e MCF-7 (câncer de mama) em 94% e 82%, respectivamente, na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (HSIEH et al., 2008). Por outro lado, doses menores do extrato da folha de Embiratanha nesse estudo mostraram maior seletividade para as linhagens HeLa e SiHa.

A concentração de um determinado composto ou substância capaz de inibir um processo biológico em 50% é chamada  $\text{CI}_{50}$ . Como já afirmado acima um composto capaz de

reduzir a viabilidade celular a 50% é considerado citotóxico. Menores valores de  $CI_{50}$  indicam maior citotoxicidade. Os dados aqui apresentados demonstraram que as células HeLa e SiHa tratadas com EHF apresentaram os menores valores de  $CI_{50}$  comparados aos fibroblastos, indicando maior citotoxicidade desse extrato sobre células tumorais. Frozza e colaboradores (2013) observaram uma inibição seletiva do crescimento de células tumorais tratadas com o extrato bruto de *Dalbergia ecastophyllum*, com valores de  $CI_{50}$  de  $128 \mu\text{g mL}^{-1}$  para Hep-2 e  $85 \mu\text{g mL}^{-1}$  para HeLa. Semelhante a EHF, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Casearia sylvetris* também demonstrou uma redução da viabilidade de células tumorais MCF-7, que apresentou  $CI_{50}$  de  $141 \mu\text{g mL}^{-1}$  (FELIPE et al., 2014). Felisbino (2014) afirma que valores de  $CI_{50}$  entre 25 e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  podem ser considerados moderadamente citotóxicos. O mesmo autor, ao averiguar, o potencial farmacológico de extratos hidroalcoólicos de *Hibiscus acetosella* registrou essa citotoxicidade para as frações de acetato de etila e de diclorometano quando adicionados a linhagens HaCaT (queratinócitos humanos saudáveis) e B16 (melanócitos de murinos).

EHE demonstrou um efeito antiproliferativo, reduzindo de forma dose-dependente a viabilidade das linhagens celulares estudadas, com maior ação sobre as linhagens de câncer cervical. No entanto, este extrato não possui citotoxicidade acentuada, uma vez que as maiores concentrações não inibiram a proliferação celular em 50%. O extrato hidroalcoólico de *Marsdeniae tenacissimae* reduziu a viabilidade das PBMCs, no entanto foi mais ativo sobre as células tumorais de Raji (linfoma de Burkitt) e células leucêmicas humanas NB4 e K562 (YE et al., 2014). O extrato etanólico de *Mikania laevigata* apresentou valores de  $CI_{50}$  acima de  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  para as linhagens Hep-2 e HeLa. Esses valores indicam menor atividade quando comparados com os obtidos nesse estudo. No entanto, esse extrato manteve a atividade citotóxica sobre essas linhagens (RUFATTO et al., 2013). Esses resultados são significantes, principalmente estando relacionados a linhagens de câncer cervical, que é o terceiro mais frequente em mulheres, além de apresentar maior potencial de prevenção e cura (INCA, 2014). Além disso, não há na literatura relatos da atividade antitumoral dessa espécie, assim, este estudo é pioneiro na avaliação da capacidade antiproliferativa de extratos brutos da entrecasca e da folha de Embiratanha.

A citotoxicidade de EHF pode estar associada a sua elevada concentração de fenóis, comparado com EHE. Estes e outros metabólitos secundários são sintetizados com a função de defender a espécie de predadores, por isso apresentam elevada toxicidade. Ao avaliar a atividade antitumoral de extratos metanólicos da folha e do cálice de *Hibiscus sabdariffa*,

Formagio e colaboradores (2015) observaram que o extrato do cálice, com maior teor de FT (474,09 mg EAG/g) apresentou significativa atividade citotóxica contra uma linhagem de leucemia (K-562), com valores de  $IC_{50}$  de  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O tratamento de células SiHa com componentes fenólicos purificados de *Baccharis trimera* suprimiu a formação de colônias celulares, e inibiu a proliferação e a motilidade celular (OLIVEIRA et al. 2013). A avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos isolados do extrato etanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* indicaram o ácido gálico como o composto de maior atividade citotóxica contra células HeLa e HL-60 (SANTANA et al., 2012). Devido a esse crescente estudo sobre sua capacidade antitumoral é que os compostos fenólicos têm atraído considerável interesse na prevenção e tratamento do câncer.

Para determinar o padrão de crescimento celular frente ao estímulo dos extratos de *P. marginatum*, foram construídas curvas de crescimento para cada linhagem aqui estudada. Os resultados apresentados demonstram que, com exceção dos fibroblastos tratados com as concentrações 20 e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de EHE, todas as linhagens estudadas reduziram a proliferação celular de forma dose-dependente. As linhagens celulares não estimuladas com os extratos de Embiratanha apresentaram uma curva de crescimento padrão, atingindo o *plateau* nas 72 horas de avaliação. Linhagens estimuladas com EHE e EHF exibiram alterações no número de células ao longo do período avaliado, sendo mais evidentes para as linhagens cancerígenas.

As concentrações de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de EHE e EHF permitiram a duplicação das linhagens HeLa e SiHa dentro do período avaliado. No entanto, esse comportamento ocorreu após um período de 48 horas de exposição, indicando que o tratamento com os extratos retarda a multiplicação dessas linhagens. Apesar da duplicação celular, essas células ainda mantiveram a viabilidade inferior a do grupo controle. Após esse período, foi observado um declínio na viabilidade dessas linhagens, que não apresentou o período estacionário.

A multiplicação dos fibroblastos foi semelhante ao grupo controle nas menores concentrações de EHE, possibilitando sua duplicação nas primeiras 24 horas. No entanto, quando estimulado com EHF, essas células dobraram a partir das 48 horas de avaliação apenas nas concentrações de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ao contrário das células cancerígenas, os fibroblastos apresentaram fase estacionária observada após duplicação até o tempo máximo de avaliação para ambos os extratos. No entanto, todas as linhagens submetidas à ação de EHF, principalmente nas maiores doses, apresentaram uma proliferação inferior à do grupo controle, corroborando com uma elevada citotoxicidade deste extrato quando comparado com

o extrato da entrecasca. No entanto, os critérios estabelecidos pelo programa de triagem vegetal do National Cancer Institute (NCI) defendem que para a atividade citotóxica ser considerada significativa o  $CI_{50}$  para extratos brutos de origem vegetal deve ser  $\leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto para substâncias puras o  $CI_{50} \leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$  (GERAN et al., 1972). Dessa forma, os extratos de *P. marginatum* não mostraram atividade citotóxica significativa, embora tenha demonstrado efeito antiproliferativo, principalmente sobre as células de câncer cervical.

Aliado a essa prerrogativa, tem-se os resultados do ensaio de citotoxicidade dos extratos de *P. marginatum* através do teste de hemólise. Sabe-se que através do metabolismo secundário nos vegetais são produzidas substâncias capazes de provocar hemólise, dentre elas estão os compostos saponínicos. Essa propriedade é resultado da formação de complexos insolúveis com colesteróis presentes nas membranas de eritrócitos celulares, alterando sua permeabilidade e causando o rompimento celular (SCHENKEL et al., 2001). Embora estudos fitoquímicos tenham demonstrado a presença de saponinas na Embiratanha, nossos resultados demonstraram que os extratos hidroalcoólico da entrecasca e da folha dessa espécie não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações avaliadas. Esses dados corroboram a seletividade dos extratos para células cancerígenas, uma vez que apresentou menor atividade biológica sobre células saudáveis, como eritrócitos e fibroblastos.

Ao investigar os efeitos citotóxicos do extrato etanólico da casca de *Sterculia striata*, pertencente à mesma família da Embiratanha, Sousa (2009) observou que as concentrações estudadas (1 a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) não induziram lise em eritrócitos de ratos. A atividade hemolítica também não foi observada na avaliação do extrato etanólico e metanólico das folhas de *Pereskia aculeata* e *Myracrodruon urundeuva*, apesar da verificação de compostos saponínicos através da prospecção qualitativa nesses extratos (CARVALHO; OLIVEIRA, 2012; SANTOS et al., 2012). Ao verificar parâmetros sanguíneos de cães tratados com *Yucca schidigera*, que também apresentou saponinas em seu extrato, Álvares (2006) constatou uma diminuição no número de hemácias, porém, ainda permaneceram dentro dos valores de referência. Resultados negativos são de grande interesse para estudos farmacológicos, pois possibilitam o uso seguro desses extratos.

*P. marginatum* tem sido usada popularmente para o tratamento de inflamações e dores, principalmente na coluna. Apesar de diversos estudos etnobotânicos relatarem o uso dessa espécie como anti-inflamatória, existem poucos estudos experimentais que confirmem essa atividade (PAIVA et al., 2013). Dentre os vários mecanismos naturais de defesa, os monócitos e macrófagos apresentam participação crucial na reação inflamatória, portanto,

muitas pesquisas têm focado as ações inflamatórias dessas células (AN et al., 2009). Monócitos e macrófagos podem ser ativados pela secreção de citocinas, que também regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011). O estudo de produção ou inibição de interleucinas tem sido utilizado como modelo para determinar as propriedades anti-inflamatórias de produtos de origem vegetal (SOARES et al., 2015). Assim, o extrato hidroalcoólico de *P. marginatum* foi avaliado quanto a sua capacidade de modular a secreção da citocina IL-1 $\beta$ , produzida por monócitos humanos.

A citotoxicidade de EHE e EHF sobre monócitos isolados do sangue periférico humano foi realizada para garantir que as variações nos níveis da citocina IL-1 $\beta$  ocorreram devido à modulação de mecanismos celulares e não à toxicidade das amostras vegetais. Após um período de 3 horas de exposição, a citotoxicidade de EHE, foi insignificante sobre os monócitos, uma vez que os valores não diferiram significativamente do controle. Por outro lado, EHF mostrou-se tóxico, onde a viabilidade dos monócitos ficou abaixo de 90% no mesmo período de avaliação. Ambos os extratos reduziram significativamente a viabilidade dos monócitos após exposição de 24h, sendo a utilização deste período inadequado para a quantificação de IL-1 $\beta$ . Desse modo, nas concentrações avaliadas, apenas EHE testado no período de 3 horas apresentou citotoxicidade adequada para a avaliação de IL-1 $\beta$ .

Os resultados expressos nesse estudo revelaram que monócitos estimulados com LPS e EHE por um período de 3h tiveram sua produção de IL-1 $\beta$  alterada. As concentrações de 20 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  diminuíram, respectivamente, a produção de IL-1 $\beta$  para 7,66 e 3,75  $\text{pg mL}^{-1}$ . Sendo uma citocina pró-inflamatória, IL-1 $\beta$  produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de prostaglandina E2 (PGE2) no hipotálamo anterior, causando febre (VARELLA; FORTE, 2015). Dessa forma, a inibição na produção de IL-1 $\beta$  pela ação de EHE indica atividade anti-inflamatória. A ação anti-inflamatória de *P. marginatum* foi similarmente verificada através de ensaios *in vivo* por Paiva e colaboradores (2013) em estudos anteriores do grupo de pesquisa. Nas doses de 100 e 300  $\text{mg kg}^{-1}$ , o extrato da entrecasca dessa espécie demonstrou uma resposta anti-inflamatória, impedindo o aumento do edema de pata de rato induzido por carragenina e a migração de neutrófilos para o sítio da inflamação. As mesmas doses do extrato também inibiram a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, numa porcentagem de 48 e 56%, respectivamente.

Do mesmo modo, outras espécies da família Malvaceae apresentam atividade anti-inflamatória. A produção de IL-1 $\beta$  por fibroblastos estimulados com LPS foi inibida pela

adição do extrato hidroalcoólico de *Malva sylvestris*, onde a concentração de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi capaz de inibir 86% dessa citocina (BENSO, 2012). A atividade anti-inflamatória local de *M. sylvestris* em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina, demonstrou que o gel contendo o extrato de malva a 5% reduziu significativamente o edema, mostrando o maior poder anti-inflamatório, com redução significativa do edema após 3 horas (CHICLANA et al., 2009). As espécies *Sidastrum micranthum*, *Luehea divaricata* e *Sida santaremnensis* também promoveram um efeito anti-inflamatório *in vivo* em modelo experimental de edema de pata e de orelha induzido por carragenina e óleo de cróton, respectivamente (GONÇALVES et al., 2013; ROSA et al., 2014).

É relevante mencionar que alguns dos metabólitos detectados pela prospecção fitoquímica de EHE e EHF de *P. marginatum* apresentam ação anti-inflamatória comprovada em testes experimentais. Muitos esteroides estão relacionados aos efeitos anti-inflamatórios. Esteroides isolados do extrato etanólico de *Sidastrum paniculatum* reduziram significativamente a migração células polimorfonucleares induzida por carragenina em ratos em até 82% na dose de  $90 \text{ mg kg}^{-1}$  (CAVALCANTE et al., 2013). Os flavonoides também apresentam importância nos processos inflamatórios. Eles podem inibir enzimas importantes na resposta inflamatória, como ciclo-oxigenase, 5-lipoxigenase e prostaglandina sintetase (LEE et al., 2007). O flavonóide cianidina, por exemplo, suprimiu a produção da interleucinas pró-inflamatórias IL-6 no processo de inflamação aguda em macrófagos humanos (DESJARDINS et al., 2012).

Extratos brutos apresentam uma gama de compostos oriundos do metabolismo secundário nos vegetais que podem agir sinergicamente, tornando-se responsáveis pelas atividades observadas nessa pesquisa. Os extratos de *P. marginatum* reduziram a viabilidade de linhagens celulares cancerígenas e normais, sendo mais seletivo para as primeiras, e inibiu a produção de IL- $1\beta$ , indicando uma ação anti-inflamatória. Assim, tem-se nessa planta um potencial fitoterápico a ser explorado em testes mais específicos, que nos possibilitem averiguar os mecanismos envolvidos tanto na citotoxicidade quanto na ação anti-inflamatória exercida por EHE e EHF. Portanto, a continuação da investigação das propriedades biológicas de *Pseudobombax marginatum* é relevante tanto para o esclarecimento de seu potencial terapêutico, quanto para o uso medicinal seguro desta planta.

## 8. CONCLUSÕES

A prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de *Pseudobombax marginatum* revelou a presença de fenóis, taninos, saponinas, esteroides livres, alcaloides e algumas classes de flavonoides. O extrato bruto da folha (EHF), no entanto, apresentaram teores de fenóis totais maiores do que o extrato da entrecasca (EHE).

Ambos os extratos de *P. marginatum* produziram um efeito citotóxico dose-dependente, sendo EHE mais ativo sobre a linhagem de câncer cervical SiHa e EHF tóxico para todas as linhagens, com maior atividade sobre as linhagens HeLa e SiHa nas concentrações de 20 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Somente o extrato da folha de *P. marginatum* apresentou valores de  $\text{CI}_{50}$  mensuráveis para todas as linhagens avaliadas. No entanto, os extratos não apresentaram ação hemolítica sobre hemácias de coelho nas concentrações avaliadas.

O padrão de crescimento das linhagens tratadas com EHE e EHF foi significativamente menor ao do grupo controle. Entretanto, fibroblastos tratados com EHE (20 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram crescimento semelhante aos fibroblastos não tratados, duplicando após 24 horas e apresentando fase estacionária. Todas as linhagens submetidas à ação de EHF obtiveram crescimento inferior à do grupo controle, com duplicação do número de células apenas após um período de 48 horas, seguida de morte.

O extrato da entrecasca (EHE) de *P. marginatum* apresentou efeitos imunomodulatórios, inibindo a produção de IL-1 $\beta$  por monócitos estimulados ou não estimulados por LPS. Nas concentrações avaliadas, o extrato da folha (EHF) foi tóxico sobre os monócitos após 24h, não sendo possível a avaliação de sua atividade anti-inflamatória.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.3, p. 472-508, 2008.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal parts of the caatinga (semi-arid) vegetation of the NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p.325-354, 2007.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AN, H. J. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase by *Corydalis turtschaninovii* on interferon- $\gamma$  stimulated macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 573-578, 2009.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARRETO, R. C. et al. O duplo papel da inflamação no surgimento das lesões cancerígenas. **Rev. Bras. Ciên. Saúde**, v. 14, n. 4, p. 107-114, 2011.

BATALHA, M. O. et al. Plantas medicinais no Estado de São Paulo: situação atual, perspectivas e entraves ao desenvolvimento. **Sisflor: florestar estatístico**. v. 6, n. 15, agosto de 2003. Disponível em: < [http://www.sisflor.org.br/download/fe15\\_4.pdf](http://www.sisflor.org.br/download/fe15_4.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2014.

BENSO, B. **Estudo do efeito da Malva sylvestris em fibroblastos estimulados por LPS**. 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado), Curso de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

BLANK, A.F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.4, p.557-564, 2007.

BOCAGE, A. L. D; SALES, M. F. A família Bombacaceae Kunth no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** v.16, n. 2, p. 123-139, 2002.

BONOLI, M. et al. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare*) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5195, 2004.

BRANDÃO, H. N., et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC – SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92 p.

CARVALHO, P. R. C. **Estudo da atividade farmacológica dos glicosídeos isolados da *Herissantia crisper* L. (Brizicky) e *Sidastrum paniculatum* (Fryxell) Malvaceae**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

CAVALCANTE, J. M. S. et al. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.) fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Quím. Nova**, v. 33, n. 4, p. 846-849, 2010.

CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas**. 2011. 29 p. Relatório (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, 2011.

CARVALHO, M. da S.; OLIVEIRA, D. A. de. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2012.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Ed. rev. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. 438 p.

CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.106-112, 2010.

CHAVES, T. P. **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

CHAVES, T. P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 8, p. 847-853, 2013.

CHICLANA, C. F.; ENRIQUE, A.; CONSOLINI, A. E. Actividad Antiinflamatoria Local de *Malva sylvestris* L.(Malvaceae) en el Edema Inducido por Carragenina en Ratas. **Lat Am J Pharm**. 2009 abr-jun; 28 (2): 275-8.

COSTA, M. do C. C. D.; AGUIAR, J. dos S.; NASCIMENTO, S. C. do. Atividade Citotóxica de Extratos Brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 349-52, 2004.

CROZIER, A. et al. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Ames, Iowa –EUA. Blackwell Publishing, 2006.

CRUVINEL, W. de M. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**. v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

DAMASCENO, M. M. et al. Etnoconhecimento de espécies forrageiras no semiárido da Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 219 - 228, 2010.

DE SÁ, P. G. S. et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos antioxidants properties of phenolic compounds. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DESJARDINS, J. et al. Anthocyanin-Rich Black Currant Extract and Cyanidin-3- O - Glucoside Have Cytoprotective and Anti-Inflammatory Properties. **Journal Of Medicinal Food**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.1045-1050, dez. 2012.

DINARELLO, C. A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **Blood**. v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DUARTE, M. C. **Diversidade de Bombacaceae Kunth no Estado de São Paulo**. 2006. 99 p. Dissertação (mestrado). Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

EHRNHÖFER-RESSLER, M. M., et al. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 14, p. 3451-9, 2013.

EMERY, F. S. et al. **A química na natureza**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010. 70p.

FELIPE, K. B. et al. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p.1492-1499, 2014.

FELISBINO, A. S. **Análise fitoquímica e avaliação do potencial farmacológico de extratos hidroalcoólicos de *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern**. 2014. 69 p. Dissertação

(Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2014.

FORMAGIO, A. S. N. et al. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Braz. J. Biol.**, vol. 75, no. 1, p. 69-76, 2015.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**. v. 52, p. 137- 142, 2013.

GERAN, R. I. et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumour and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 3, n. 1, p. 17-19, 1972.

GIOMBELLI, L. et al. Perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana das folhas de *Malva sylvestris* (Malvaceae). **Revista de Biologia e Saúde da Unisep**, São Paulo, v. 5, n. 2, p.17-22, 2012.

GONÇALVES, G. M. et al. Anti-nociceptive and anti-oedematogenic properties of the hydroethanolic extract of *Sidastrum micranthum* leaves in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p.836-843, set. 2013.

GUERRA, A. M. N. M. et al. Utilização de plantas medicinais pela comunidade rural Moacir Lucena, Apodi-RN. **Biosci J**. n. 26, p. 442-450, 2010.

HAHN, W.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature Review**, v. 2, n. 5, p. 331-41, 2002.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.

HSIEH, S. et al. Inhibition of pro-inflammatory mediators and tumor cell proliferation by *Anisomeles indica* extracts. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 118, n. 1, p.65-70, jun. 2008.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil / Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil / Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122p.

LEAL, A. J. et al. Estudo Fitoquímico Antimicrobiano de *Ceiba glaziovii* Kuntze K. Schum. **Biofar**. v. 5, n. 1, p. 73-77, 2011.

LEE, S. et al. *In vitro* treatment of chicken peripheral blood lymphocytes, macrophages, and tumor cells with extracts of Korean medicinal plants. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.362-366, 2007.

LIMA, R. R., et al. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, 2007.

LIN, H. et al. Chemopreventive properties of Hibiscus sabdariffa L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 165, n. 1, p.59-75, jan. 2007.

LIN, H. et al. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 132, n. 2, p.880-891, maio 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. vol. 2. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum 2º ed. 384p. 2002.

MAKKAR, H.P.S. et al. Plant Secondary Metabolites in some Medicinal Plants of Mongolia Used for Enhancing Animal Health and Production. *Tropicultura*, v. 29, n. 3, p. 159-167, 2009.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews (Cancer)** v. 2, p. 143-148, 2002.

MARTINS, I.G. **Padrão de atividade do sagui Callithrix jacchus numa área de caatinga**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

MATOS, F. J. de A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições Ufc, 1997.

MELO, J. G.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U.P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. **Environmental Monitority Assessment**, v.156, n. 1-4, p. 567–580. 2009.

MENEZES, M. A. G. de et al. Quantificação de antocianinas dos extratos de Embiratanha (*Pseudobombax marginatum*). **Holos**, v. 1, p.30-35, 2015.

MENICHINI, F., et al. Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from Citrus medica L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 7, p. 1549-55, 2011.

MORAIS, F.F.; SILVA, C. J. Conhecimento ecologico tradicional sobre fruteiras para pesca na Comunidade de Estirão Comprido, Barão de Melgaço – Pantanal Matogrossense. **Biota Neotrop**. v.10, n. 3, 2010.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. *Revista Caatinga*, v.22, n.4, p. 225-234, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURI, E. M. F. et al. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local Nonsteroidal antiinflammatory drugs and their local pharmacology. **Acta Fisiatr**. v. 16, n. 4, p. 186 – 190, 2009.

NEWMAN, D. J. et al. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p.1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, F.C.S. et al. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Rev Bras Plant Med**. v. 12, p. 282-301, 2010.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Cytokines and pain. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

OLIVEIRA, C. et al. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha Cells: differences in their activity and mechanism of action. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.11022-11032, 9 set. 2013.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

PAIVA, D. C. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 416-421, 2013.

PAULA, V. F. A Química da família Bombacaceae. **Quím. Nova**, v. 20, n. 6, 1997.

PAULINO, R da C. et al. Medicinal plants at the sítio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte state, Brazil. **Rev. bras. farmacogn**. n. 22, p. 29-30, 2012.

PAULINO, R da C. et al. Riqueza e importância das plantas medicinais do Rio Grande do Norte. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 11, n. 1, p. 157-168, 2011.

PIEME, C.a. et al. In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 29, n. 3, p.223-228, 2010.

RAFFERTY, J. A. et al. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer Metast Ver**. v. 15, p. 365-383, 1996.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-13, 2001.

RIBEIRO, A. F. de C. **Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot**. 2012. 92 p.

Tese (doutorado). Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

RODRIGUES, K. A. F. et al. Estudo farmacognóstico das folhas de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae). In: Reunião Anual da SBPC, 62., 2010, Natal. **62ª Reunião Anual da SBPC**. Natal: Ufrn, 2010.

ROQUE, A. A. et al. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

ROSA, R. L. da et al. Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) bark. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.599-610, 2014.

RUFATTO, L.C. et al. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p.883-889, 2013.

RUIZ-TERÁN, F. et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1886-1893, 2008.

SANTANA, J. S. et al. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p 2245-2248, 2012.

SANTOS, A, G. dos. et al. Avaliação das atividades antimicrobiana sobre patógenos bucais e hemolítica das folhas de *Pereskia aculeata*. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, 7., 2011, Maringá. **7º Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**. Maringá: Editora CESUMAR, 2012.

SANTOS, E. C. G. dos. **Atividade antibacteriana das plantas *Copaifera duckei* dwyer e *Pseudobombax marginatum* e sua interação com a superfície celular bacteriana**. 2013. 65 p. Tese (Doutorado), Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

SILVA, N. et al. Conhecimento e Uso da Vegetação Nativa da Caatinga em uma Comunidade Rural da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão**, n. 34, p.5-37, 2014.

SIMÕES, C. M. O. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

SOARES, D. J. et al. Atividade antiinflamatória de produtos de origem vegetal. **Saúde Rev.** v. 15, n. 39, p. 33-45, 2015.

SOBRINHO, J. G. de C. **O gênero *Pseudobombax* Dugand (Malvaceae s.l., Bombacoideae) no Estado da Bahia, Brasil**. 2006. 155 p. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2006.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, J. A. de. **Avaliação da atividade farmacológica de *Sterculia striata* A. St. Hil. & Naudin (Malvaceae) sobre o trato gastrointestinal de ratos e camundongos.** 92 p. Dissertação (mestrado), Farmacologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Piauí, 2009.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001. Disponível em <<http://www.asbai.org.br/revistas/vol244/citocinas.htm>> Acesso em 30 out 2015.

VEIGA-JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.

VERAS FILHO, J. **Desenvolvimento farmacotécnico de formulações plásticas do extrato bruto do caule de *Pseudobombax marginatum* (A. ST. – Hil, Juss. & Cambess) A. Robyns.:** Avaliação de atividades fitoquímica toxicológica, antimicrobiana e antioxidante. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

VIU, A. F. M. et al. Etnobotânica: uma questão de gênero? **Rev. Bras. Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 138-147, 2010.

WALKER, J. M. et al. Identification of *Magnolia officinalis* L. bark extract as the most potent anti-inflammatory of four plant extracts. **American J Chinese Medicine**, v. 41, n. 3, p.531-44, 2013.

WALL, M.E. et al. Detection and estimation of sterioidal sapogenins in plant tissue. **Analytical Chemistry**, v.24, p.1337-1341, 1952.

YE, B. et al. Anti-tumor activity and relative mechanism of ethanolic extract of *Marsdenia tenacissima* (Asclepiadaceae) against human hematologic neoplasm *in vitro* and *in vivo*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 153, n. 1, p.258-267, 2014.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, Inflammation, and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p.27-37, 2007.

## ANEXOS

## Anexo A - Autorização do SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 46690-1	<b>Data da Emissão:</b> 23/10/2014 12:42	<b>Data para Revalidação*:</b> 22/11/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Francisco Fábio Mesquita Oliveira	CPF: 050.934.104-70
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Pseudobombax marginatum</i> (St. Hill) Rob. SOBRE A PROLIFERAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS TUMORAIS	
Nome da Instituição: Universidade do Estado do Rio Grande do Norte	CNPJ: 08.258.295/0001-02

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta do material vegetal (casca), além de uma amostra de folhas e flor.	12/2014	06/2015

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

## Outras ressalvas

1	Como está previsto um volume total de 8 kg de casca e entrecasca de árvores de <i>P. marginatum</i> , recomendamos que a coleta desse material nas árvores seja efetuada de forma cautelosa, para evitar danos e doenças que possam comprometer os indivíduos. Deverá ser evitada a coleta em árvores muito jovens ou danificadas.
---	--

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Helaine Mirali de Almeida	Membro/Discendente de Mestrado	013.985.354-51	002.432.1881TEP-RN	Brasileira
2	DAYSEANNE ARAUJO FALCÃO	Coordenadora/Orientadora	653.766.845-04	944856 SSP/SE-SE	Brasileira

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 97516994



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 46690-1	<b>Data da Emissão:</b> 23/10/2014 12:42	<b>Data para Revalidação*:</b> 22/11/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Francisco Fábio Mesquita Oliveira	CPF: 050.934.104-70
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Pseudobombax marginatum</i> (St. Hill) Rob. SOBRE A PROLIFERAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS TUMORAIS	
Nome da Instituição: Universidade do Estado do Rio Grande do Norte	CNPJ: 08.258.295/0001-02

1	RN	FLORESTA NACIONAL DE AÇU	UC Federal
---	----	--------------------------	------------

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Pseudobombax marginatum</i>

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Casca, Flor, Folhas
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 97516994



Página 2/4

Anexo B - Confirmação de submissão do artigo - Submetido ao Journal of Ethnopharmacology (ISSN 0378-8741).

> From: [jethnoph@chem.leidenuniv.nl](mailto:jethnoph@chem.leidenuniv.nl)  
> To: [REDACTED]@hotmail.com; [REDACTED]@gmail.com  
> Date: Thu, 3 Mar 2016 19:38:25 +0000  
> Subject: Submission Confirmation for your paper  
>  
> Research Paper  
>  
> Dear Dr.Falcão,  
>  
> Your submission entitled "Influence of Inner Bark and Leaf Hydroalcoholic Extracts of Pseudobombax marginatum (St. Hill) Rob. on Cervical Cancer Cells Growth" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology  
>  
> You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.  
>  
> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.  
>  
> Thank you for submitting your work to this journal.  
>  
> Kind regards,  
>  
> Journal of Ethnopharmacology  
>  
> For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.  
>