

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

GRACE ANNE AZEVEDO DÓRIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Remirea*
maritima AUBL**

ARACAJU

2015

GRACE ANNE AZEVEDO DÓRIA. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA *Remirea maritima* AUBL 2015.

GRACE ANNE AZEVEDO DÓRIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA
Remirea maritima **AUBL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de S. Araújo

ARACAJU

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

D696 Dória, Grace Anne Azevedo
Avaliação da atividade antitumoral da *Remirea maritima*
AUBL/Grace Anne Azevedo Dória; orientador Adriano Antunes de
Souza Araújo. – Aracaju, 2015.
178 f.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal
de Sergipe, 2015.

1. Oncologia. 2 *Remirea maritima*. 3. Farmacologia. I. Araújo,
Adriano Antunes de Souza, orient. II. Título.

CDU 616-006

GRACE ANNE AZEVEDO DÓRIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA
***Remirea maritima* AUBL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Mairim Russo Serafini

2º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Gibara Guimarães

3º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Jullyana de Souza Siqueira Quintans

4º Examinador: Prof. Dr. Antônio José Alves

AGRADECIMENTOS

A senhor maior, Deus, pela vida, saúde e fé. Aos meus pais, Wagner e Evangelina, pela dádiva da vida, por acreditarem sempre em mim e me incentivarem a evoluir como pessoa e como profissional.

Aos meus irmãos Adriano e Nyanne, pela paciência, amizade, respeito e companheirismo.

À Jane e minha irmãzinha Emília pelo carinho e os momentos de alegria.

Ao meu noivo, Carlos Alberto, pelo apoio, paciência, incentivo e por acreditar em mim mesmo naqueles momentos em que nem eu acreditava.

Aos meus familiares, tios e primos, que sempre torceram por mim e me apoiando sempre. À Gina e Salete pela amizade e pelos esclarecimentos para nos melhorarmos como pessoa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica do Left, especialmente a Paula Passos e Bruno Vasconcelos, por ter me acompanhado desde o início e pela dedicação na realização do trabalho.

Aos professores colaboradores desse trabalho Daniel Bezerra Pereira, Ricardo Luiz Albuquerque Júnior, Maria José Vieira, Lucindo José Quintans, Silmara Pantaleão, Adriana Gibara e Mairim Russo Serafini pelo apoio, aprendizados, delineamento dos experimentos e oportunidade de realização dos mesmos.

Aos alunos de pós-graduação: Leonardo Bittencourt (UFRGS), Rebeca Oliveira (USP/RP) e Ricardo Amaral (UFS) pelas horas de trabalho, pelo companheirismo e dedicação mútua.

À todos aqueles que, de algum modo, me influenciaram positivamente durante este período, todo o meu reconhecimento.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Avaliação da Atividade Antitumoral da *Remirea maritima* AUBL. Grace Anne Azevedo Dória, Aracaju, 2015.

A *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) é uma espécie conhecida "pinheirinho-da-praia" e usada popularmente para curar diarreia, febre, doenças renais, dor e inflamação. Estudos têm mostrado a presença de muitos metabólitos secundários ativos, entretanto, relatos científicos sobre suas propriedades farmacológicas ainda são escassos na literatura. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente extratos da *R. maritima*, avaliar os efeitos antitumoral e imunomodulador, averiguar a atividade antioxidante, a citotoxicidade assim como realizar estudos pré-clínicos de toxicidade do extrato hidroalcoólico 40% da *R. maritima*. A composição química do extrato aquoso (EA) e os extratos hidroalcoólicos 40% (EH40) e 70% (EH70) foi avaliada por HPLC e LC-MS/MS e os compostos isovitexina, vitexina, luteolina e cafeoil foram identificados. Maiores quantidades de isovitexina e vitexina foram encontrados no EA, enquanto que a luteolina e o cafeoil foram encontradas em maiores porcentagens no EH40. A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada em três culturas de células tumorais humanas pelo ensaio do MTT e apenas o EH40 apresentou efeito antitumoral *in vitro* com IC₅₀ de 27,08; 46,62 e >50 µg/mL para as linhagens de células de OVCAR-8 (adenocarcinoma de ovário humano), NCI-H385M (carcinoma brônquio-alveolar humano) e PC-3M (carcinoma de próstata humano), respectivamente. O EA e o EH70 não apresentaram nenhuma atividade antitumoral *in vitro*. Diante desse resultado, apenas o EH40 foi conduzido aos ensaios subsequentes. A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada utilizando camundongos transplantados com Sarcoma 180. A evolução do peso, o leucograma, a análise bioquímica (AST, ALT, uréia e creatinina), o peso do tumor e o peso relativo dos órgãos (fígado, baço e rim) foram avaliados. A taxa de inibição do tumor foi de 57,16 – 62,57%, nas doses de 25 e 50 mg/kg de EH40 (v.o.), respectivamente, e secções histológicas do tumor apresentou elevado número de células apoptóticas através do teste de Tunel. Adicionalmente, o EH40 demonstrou atividade imunomoduladora com aumento da produção de anticorpos específicos para a ovoalbumina mensurada pelo teste de ELISA e pela histologia do baço. A determinação de Fenóis totais foi mensurada pelo reagente de Folin–Ciocalteu e o EH40 mostrou alto teor de fenóis. A atividade redox do EH40 foi avaliada com diferentes espécies reativas geradas *in vitro* e a citotoxicidade contra células de fibroblastos (L929) e de melanoma (B16F10) testada por meio de ensaio do Vermelho Neutro. O potencial total antioxidante reativo (TRAP) mostrou significativa capacidade antioxidante do EH40 nas concentrações testadas; também foi eficaz em reduzir radical hidroxila, ferro e a formação de óxido nítrico. A lipoperoxidação *in vitro* também foi diminuída pelo EH40 e os dados mostraram proteção aos danos oxidativos. Adicionalmente, o EH40 apresentou diminuição da viabilidade celular em 50% e 30% na concentração de 80 µg/mL para L929 e B10F16, respectivamente, e embora tenha apresentado efeito antiproliferativo, o EH40 não foi seletivo para melanoma. Estudos pré-clínicos de toxicidade foram realizados segundo a ANVISA e a OECD. Na toxicidade aguda, os animais receberam uma dose única de 2000 mg/kg, enquanto que na toxicidade subaguda, os animais testes receberam doses diárias de 100, 200 e 400 mg/kg de EH40. A urinálise também foi avaliada. O EH40 não apresentou alterações que indicassem toxicidade. Em suma, o EH40 apresentou em sua constituição química a presença de flavonoides e alto teor de fenóis totais e, em estudo farmacológico, o EH40 apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, com potencial indutor de apoptose, propriedade imunomoduladora e antioxidante sem apresentar toxicidade substancial.

Palavras-chaves: *Remirea maritima*, câncer, antitumoral, antioxidante, toxicidade.

ABSTRACT

Evaluation of the antitumor activity of *Remirea maritima* Aubl. Grace Anne Azevedo Dória, Aracaju, 2015.

Remirea maritima Aubl. (Cyperaceae) is a species known as "pinheirinho-da-praia" and popularly used to cure diarrhea, fever, kidney diseases, pain and inflammation. Many studies have shown the presence of many secondary metabolites of *R. maritima*, however, scientific reports about its pharmacological properties are still scarce. Therefore, this work aimed to perform the chemical composition of extracts of *R. maritima*, to evaluate the antitumor and immunomodulator effects, to investigate the antioxidant activity, cytotoxicity as well as to perform preclinical studies of toxicity of hydroalcoholic extract 40% of *R. maritima*. The chemical composition of the aqueous extract (AE) and hydroalcoholic extracts 40% (40HA) and 70% (70HA) were assessed by HPLC and LC-MS/MS and isovitexina, vitexin, luteolin and caffeoyl compounds were identified. Larger quantities of isovitexin and vitexin were found in AE, while luteolin and caffeoyl higher percentages were found in the 40HA. *In vitro* antitumor activity was determined using three human tumor cell lines by the MTT assay and only the 40HA presented potential antitumor property with IC₅₀ of 27.08, 46.62 and 50 µg/mL for OVCAR-8 (ovarian adenocarcinoma), NCI-H385M (bronchus-human alveolar carcinoma) and PC-3 (human prostate carcinoma) human cell lines, respectively. AE and 70HA did not show any significant *in vitro* antitumor activity. In this context, only 40HA was submitted to others assays. The antitumor activity *in vivo* was assessed in Sarcoma 180-bearing mice. Body weight loss, leukogram, biochemistry (AST, ALT, Urea and Creatinine), tumor weight and organ weights (liver, spleen, and kidney) were evaluated. Inhibition rate of tumor was 57.16-62.57%, at the doses 25 and 50 mg/kg of 40HA (v.o.), respectively, and the tumor histological sections presented large number of apoptotic cells by Tunel assay. Moreover, 40HA also demonstrated immunomodulatory activity with increase production of antibodies ovoalbumin specific by ELISA test and the spleen histology. The determination of TPC was measured by the Folin-Ciocalteu reagent, and the 40HA showed high amount of phenols. The redox activity of 40HA was evaluated with different reactive species generated *in vitro* and its cytotoxic effect against fibroblast cells (L929) and melanoma (B16F10) was tested by Neutral Red assay. The total reactive antioxidant potential (TRAP) of 40HA showed significant antioxidant capacity in the concentrations tested; 40HA was also effective at reducing hydroxyl radicals, iron and nitric oxide. The lipoperoxidation *in vitro* was also decreased by 40HA and data showed protection from oxidative damage. Additionally, the 40HA presented decreased of 50% and 30% of cell viability at concentrations of 80 µg/mL for L929 and B10F16, respectively, and although it presented antiproliferative effect, the 40HA was not selective for melanoma. Pre-clinical toxicity studies performed according to ANVISA and OECD. In acute toxicity, the animals received a single dose of 2000 mg/kg, while in subacute toxicity test, the animals received daily doses of 100, 200 and 400 mg/kg of 40HA. Urinalysis was also evaluated. The 40HA showed no indications of toxicity change. In conclusion, the 40HA presented in their chemical constitution the presence of flavonoids and high total phenols content. In pharmacological study, the 40HE presented *in vitro* and *in vivo* antitumor effect, potential of inducing apoptosis, immunomodulator and antioxidant properties without presenting substantial toxicity.

Keywords: *Remirea maritima*; cancer; antitumor; antioxidant; toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Câncer e plantas medicinais	5
2.1.1 Conceito e epidemiologia	5
2.1.2 Ciclo celular e apoptose	8
2.1.3 Tratamento contra o câncer	13
2.2 Atividade redox e doenças relacionadas	17
2.3 Agentes antioxidantes e plantas medicinais	23
2.4 Estudo de toxicidade	25
2.4.1 Toxicidade aguda	27
2.4.2 Toxicidade de doses repetidas	28
2.4.3 Avaliação hematológica	28
2.4.4 Avaliação bioquímica	30
2.4.5 Análises macroscópica e microscópica	31
2.5 <i>Remirea maritima</i>	32
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
5 RESULTADOS	59
6 DISCUSSÃO	99
7 CONCLUSÃO	109
PERSPECTIVAS	111
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE A- Artigo: Antitumor effect, induction of apoptosis and safety of <i>Remirea maritima</i> extracts Abul (Cyperaceae)	134
APÊNDICE B - Artigo: Redox-active profile characterization of <i>Remirea maritima</i> extracts and it cytotoxic effect in mouse fibroblats (L929) and melanoma (B16F10) cells	152
ANEXO A - Protocolo do depósito da Patente	175

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Fases da carcinogênese	6
Figura 2. Ciclo celular durante a mitose	9
Figura 3. Via intrínseca da apoptose	12
Figura 4. Via extrínseca da apoptose	12
Figura 5. Molécula do agente alquilante Gás Mostarda	14
Figura 6. Reação de Fenton	18
Figura 7. Metabolismo dos ácidos graxos e determinação de Lipoperoxidação lipídica pelo teste do malondialdeído (MDA)	21
Figura 8. Fatores externos como promotores de radicais livre e atuação dos agentes antioxidantes	22
Figura 9. <i>Remirea maritima</i>	33
Figura 10. Compostos isolados do extrato aquoso da <i>Remirea maritima</i>	35
Figura 11. Animal manutenção com células tumorais malignas de Sarcoma 180 ...	45
Figura 12. Urinálises	58
Figura 13. Perfil cromatográfico dos extratos da <i>Remirea maritima</i>	61
Figura 14. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i> na viabilidade das células L929 e B16F10	64
Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i> na inibição do crescimento do tumor Sarcoma 180	65
Figura 16. Fotomicrografias de secções histológicas de espécimes tumorais de Sarcoma 180	71
Figura 17. Secções histológicas de baço na atividade antitumoral <i>in vivo</i>	72
Figura 18. Fotomicrografias representativas da histologia do fígado de camundongos inoculados com o tumor Sarcoma 180	73
Figura 19. Fotomicrografias representativas da histologia do rim de camundongos inoculados com o tumor Sarcoma 180	74
Figura 20. Efeito do EH40 na indução da resposta imune humoral	75
Figura 21. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i> <i>in situ</i> de marcação celular apoptótica	76
Figura 22. Potencial Total de Antioxidante Reativo (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)	77

Figura 23. Atividade <i>scavenging</i> de radical hidroxila extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i>	78
Figura 24. Potencial Antioxidante de Redução de Ferro (FRAP)	79
Figura 25. Atividade quelante do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i> avaliada pelo ensaio da Ferrozina	80
Figura 26. Atividade <i>scavenging</i> de óxido nítrico (NO) do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i>	81
Figura 27. Peroxidação lipídica através de Espécies Reativas com Ácido Tiobarbitúrico <i>in vitro</i>	82
Figura 28. Evolução do peso dos animais na toxicidade aguda	83
Figura 29. Secções histológicas de baço na toxicidade aguda	87
Figura 30. Secções histológicas do encéfalo na toxicidade aguda	88
Figura 31. Evolução do peso dos animais na toxicidade subaguda	89
Figura 32. Secções histológicas do fígado na toxicidade subaguda	96
Figura 33. Secções histológicas do pulmão na toxicidade subaguda	97

LISTAS DE TABELA

Tabela 1. Formação de algumas espécies reativas de oxigênio via cadeia transportadora de elétrons	19
Tabela 2. Quantificação dos compostos isolados dos extratos aquoso e hidroalcoólicos 40% e 70% da <i>R. maritima</i>	62
Tabela 3. Percentual de inibição do crescimento celular frente à linhagens de células tumorais	63
Tabela 4. IC ₅₀ da atividade antitumoral <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da <i>Remirea maritima</i>	63
Tabela 5. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% da <i>Remirea maritima</i> no peso corpóreo e no peso relativo dos órgãos analisados de camundongos com tumor Sarcoma 180	67
Tabela 6. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% da <i>Remirea maritima</i> em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 na contagem dos leucócitos totais e diferencial	68
Tabela 7. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% da <i>Remirea maritima</i> em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 nos parâmetros bioquímicos	70
Tabela 8. Consumo de ração e de água dos animais na toxicidade aguda	83
Tabela 9. Parâmetros hematológicos dos animais na toxicidade aguda	84
Tabela 10. Parâmetros bioquímicos dos animais na toxicidade aguda	85
Tabela 11. Peso relativo dos órgãos na toxicidade aguda	86
Tabela 12. Consumo de ração e de água dos animais na toxicidade subaguda ...	90
Tabela 13. Parâmetros hematológicos dos machos na toxicidade subaguda	91
Tabela 14. Parâmetros hematológicos das fêmeas na toxicidade subaguda	92
Tabela 15. Parâmetros bioquímicos dos machos na toxicidade subaguda	93
Tabela 16. Parâmetros bioquímicos das fêmeas na toxicidade subaguda	94
Tabela 17. Peso relativo dos órgãos dos machos e das fêmeas na toxicidade subaguda	95

LISTAS DE ABREVIATURA E SIGLAS

5-FU – 5-fluorouracil

AAPH – radicais livres de dihidroclorato de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)

AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Apaf-1 – Fator de ativação de apoptose 1,

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

AUC - área sob a curva

AUC – área sob a curva

Bcl-2, Bcl-XL e Bcl-w – Proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases

Caspases – Proteases aspartato específicas contendo cisteína

CEPA – Comitê de Ética para experimentação com Animais

CF – Ciclofosfamida

CLAE – Cromatografia de alta eficiência

COX – Ciclooxigenase

DAB – Diaminobenzidina

dATP – Deoxiadenosina trifosfato

DOX – Doxorubicina

dUTP – Nucleotídeos

EA – Extrato aquoso

EH40 – Extrato hidroalcoólico 40%

EH70 – Extrato hidroalcoólico 70%

ELISA – Ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima

EM/EM – Espectrômetro de massas

EMEA – Agência Européia de Medicamentos

ERRO – Espécies reativas de oxigênio

FA – Fosfatase alcalina

FDA – Food and Drug Administration

Fe²⁺ – Íon ferroso

FRAP – Potencial Antioxidante de Redução de Ferro

G₀ – Célula em repouso

G₁ – Célula em intensa metabolização

G₂ – Célula em fase com síntese de RNA e de proteínas essenciais para a replicação

GGT – Gama glutamiltransferase

IC₅₀ – Concentração Inibitória Média

IgG/A/M – anticorpo secundário humano IgG, IgA e IgM

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IT – Inibição do crescimento tumoral

LPO – lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

M – Mitose

MDA – Malonaldeído

MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

NO – Óxido nítrico

OECD – Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVA – Ovoalbumina

OVACAR-8 – Linhagem de células tumorais do ovário humano

PR – Peso relativo

RL – Radicais livres

TAR – Reatividade Antioxidante Total

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TRAP – Potencial de Antioxidante Reativo

TUNEL – Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de causas multifatoriais que se caracteriza por um crescimento descontrolado e indiferenciado das células (BRANDÃO *et al.*, 2010). Possui origem latina e é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações (KUMMAR *et al.*, 2010).

Em 2008, a OMS estimou que haveria 12,7 milhões de pessoas diagnosticadas com câncer e, em 2012, de acordo com estimativas do projeto Globocan da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da OMS, houve 14,1 milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes, e uma prevalência de 32,6 milhões de indivíduos diagnosticada com a doença (OMS, 2008, 2012). Estima-se que em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% ocorrerão nos países em desenvolvimento (INCA, 2011).

No Brasil, as neoplasias ganharam importância no perfil de mortalidade do país, ocupando o segundo lugar de causa de óbito desde 2003 (HABR-GAMA, 2005; INCA, 2011) e perde somente para as doenças cardiovasculares (MANSUR; FAVARATO, 2012). A estimativa para 2014, válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer e mostra que a carga do câncer no país continua crescendo seguindo o crescimento mundial (INCA, 2014).

Atualmente, há três tipos principais de tratamento para o câncer: a quimioterapia, a mais requisitada, a cirurgia e a radioterapia. No entanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atuam de forma não-específica e promovem fortes efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo, leucopenia e, conseqüentemente, susceptibilidade maior às infecções (BRANDÃO *et al.*, 2010).

As plantas medicinais ao longo dos anos têm representado uma importante fonte de drogas anticâncer (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011). Muitos produtos de origem natural, como o taxol e os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina), têm apresentado grande atividade contra células tumorais, cujo isolamento introduziu uma nova era do uso de plantas medicinais como agentes citotóxicos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Outra substância como o camptecano, isolada da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (OBERLIES; KROLL, 2004; WALL *et al.*, 1966;) abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos, o topotecano e o irinotecano, os quais foram aprovados pela FDA, em 1996, para o tratamento de câncer de cólon e de ovário (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Desta forma, tendo em vista o crescente aumento da incidência do câncer, a necessidade de novas drogas antitumorais com menos efeitos tóxicos e considerando que 48,6% dos fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer são derivados de plantas medicinais, este trabalho se propôs a buscar uma nova alternativa para o tratamento do câncer através de fonte natural (NEWMAN; CRAGG, 2012; ALONSO-CASTRO *et al.*, 2012).

Espécies da família Cyperaceae são conhecidas por possuírem metabólitos secundários biologicamente ativos (LASEKAN, 2013; VITTA; PRATA, 2009), muitos dos quais têm sido relatados como agentes antitumorais (GAO *et al.*, 2014; QI *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2011).

A *Remirea maritima* Aubl. é uma espécie perene pertencente à família Cyperaceae que é comumente encontrada nas margens do mar em regiões tropicais. No Brasil, é popularmente conhecida como “pinheirinho-da-praia” e tem sido amplamente utilizada, na forma de chá, para o tratamento de diarreia, doença renal, febre alta como também para alívio da dor e inflamação (SIANI *et al.*, 2001; VITTA; PRATA, 2009). Entretanto, poucos estudos investigaram as propriedades químicas e farmacológicas desta espécie. Recentemente, o perfil cromatográfico e a avaliação da atividade antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso desta planta foram realizados por Rabelo *et al.* (2013). O perfil cromatográfico do extrato aquoso mostrou a presença de flavonoides biologicamente ativos como também apresentou atividades antioxidante, através dos testes de TBARS e NO, e atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, provavelmente, mediado por via de inibição de mediadores periféricos. Tendo estes fatos em vista, este trabalho visou caracterizar quimicamente extratos da *Remirea maritima* e avaliar os efeitos antitumoral, imunomodulador, antioxidante assim como realizar estudo de toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico 40% desta planta.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer e plantas medicinais

2.1.1 Conceito e epidemiologia

O câncer constitui de uma doença de células, caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle os quais dirigem a proliferação e a diferenciação celular (OLIVEIRA; ALVES, 2002). A palavra câncer possui origem latina, que significa caranguejo (capacidade de aderência da célula cancerígena e a obstinação de um caranguejo quando se agarra a algo), e é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações (KUMMAR *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, o rompimento do epigenoma é uma marca crítica no câncer humano, o qual contribui para a patogênese da doença. Alterações epigenéticas normais ocorrem durante o início do processo carcinogênico, no entanto, um aspecto fundamental é que essas alterações podem ser revertidas modificando fatores epigenéticos como a dieta e do estilo de vida (PISTOLLATO *et al.*, 2015).

As causas do câncer ainda não estão definidas claramente, mas evidências levam a crer que os fatores externos ambientais sejam os principais fatores relacionados ao desenvolvimento da doença. As causas externas abrangem como pilar o estilo de vida: uso de tabaco, ingestão de álcool, dieta, exposição à radiação, à poluição, as infecções, dentre outros (GUERRA *et al.*, 2005; IRIGARAY *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2013).

Outras causas incluem os fatores internos os quais consistem em pré-disposição genética do indivíduo ao organismo ou inter-relacionados com os externos (GROOT; MUNDEN, 2012). Segundo Anand *et al.* (2008), os fatores genéticos representam apenas 5% dos tumores, enquanto que 95% ocorrem devido a fatores ambientais, embora evidências sugiram que a maioria dos cânceres não são causados por um único fator ou evento (ANAND *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2014).

A carcinogênese é o processo de desenvolvimento do câncer que, em geral, dá-se lentamente e pode levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor

detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor: iniciação, promoção e progressão (**Figura 1**) (ALMEIDA *et al.*, 2005; REDDY *et al.*, 2003).

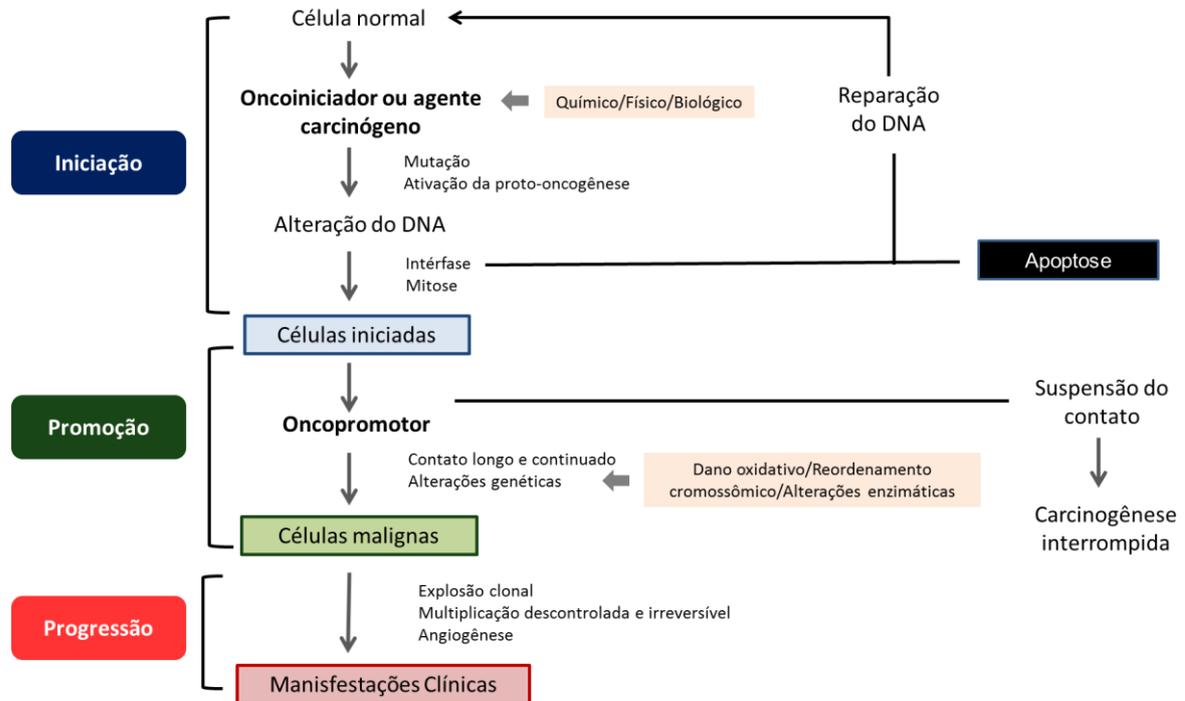


Figura 1. Fases da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão (neoplasia). **Fonte:** Adaptado de Amaral, 2014.

O estágio de iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese (**Figura 1**). As células saudáveis sofrem o efeito de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador) que provoca modificações em alguns de seus genes ou danos oxidativos ao DNA. Mais de 100 oncogêneses já são conhecidos e, na maioria dos casos, os genes mutantes são genes codificadores de fatores de crescimento, receptores de membrana, fatores de transcrição e enzimas quinases. Algumas substâncias podem agir como iniciador de danos genéticos como os metabólitos reativos celulares, a radiação ionizante, a luz UV, dentre outras. Adicionalmente, durante a proliferação celular, mutações podem ser adquiridas através de não reparação em códigos genéticos danificados, resultando em células iniciadas (mutantes) espontaneamente (TANAKA *et al.*, 2013).

O estágio seguinte é o da promoção (**Figura 1**). Nesta etapa, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. Os fatores de promoção podem ser agentes químicos, fatores biológicos como o Papilomavírus humano (HPV), o Epstein-Barr (EBV) e o da hepatite B (HBV), processo inflamatório, hormônios, fatores que atuam no crescimento celular normal, dentre outros. Estes agentes quando expostos durante um período longo e continuado promovem novas alterações as quais se acumulam, adquirem vantagens proliferativas e capacidade de não responder aos mecanismos de controle do organismo. Desta forma, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Por muitas vezes, a suspensão do contato com o agente oncopromotor interrompe o processo nesse estágio (ALMEIDA *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2013).

O terceiro e último estágio é a progressão que se caracteriza pela multiplicação descontrolada de modo irreversível, instabilidade genética, perda do controle mitótico, invasão, metástase assim como alterações da bioquímica, do metabolismo e da morfologia das células. A neoangiogênese é essencial para a progressão neoplásica (ALMEIDA *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2013).

Em pesquisa realizada pela OMS em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade são: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda (OMS, 2006).

Em 2008, a OMS estimou que haveria 12 milhões de pessoas diagnosticada com câncer e em 2012, de acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (OMS, 2012), foi estimado que iria ocorrer cerca de 14,1 milhões de novos casos com 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões diagnosticada com a doença (OMS, 2008, 2012). Estima-se que, em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões, dos quais cerca de 60% desses novos casos ocorrerão nos países em desenvolvimento (INCA, 2011).

No Brasil, o câncer em geral configura-se como problema de saúde pública de dimensões nacionais. Com o aumento da expectativa de vida do povo brasileiro e com a progressiva industrialização e globalização, as neoplasias ganharam importância crescente no perfil de mortalidade do país, ocupando o segundo lugar de causa de óbito desde 2003 (HABR-

GAMA, 2005; INCA, 2011). Esse dado representa quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2011) e perde somente para as doenças cardiovasculares (MANSUR; FAVARATO, 2012).

As estimativas apontaram para a ocorrência no país, de 489.270 casos novos de câncer no ano de 2011, sendo 236.240 para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Estimou-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil novos casos) seria o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), de mama feminina (49 mil), de cólon e reto (28 mil), de estômago (21 mil) e de cólon de útero (18 mil) (INCA, 2011). A estimativa para 2014 válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer e mostra que a carga do câncer no país continua crescendo seguindo o crescimento mundial. Nesses anos, o câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) continuará sendo o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), de mama feminina (57 mil), de cólon e reto (33 mil), de pulmão (27 mil), de estômago (20 mil) e do cólon do útero (15 mil) (INCA, 2014).

O impacto desta doença é grande para a população e para a economia uma vez que a assistência oncológica está entre as mais dispendiosas no âmbito social. A assistência oncológica envolve custos diretos como a realização de exames preventivos, testes diagnósticos e tratamentos, e custos indiretos consequentes da incapacidade produtiva do paciente e da morbi-mortalidade inerente à condição patológica e/ou tratamento (BITTENCOURT *et al.*, 2004; KLIGERMAN, 2000).

A tendência no desenvolvimento dos diversos tipos de câncer é crescente nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas e terapêuticas não forem amplamente investigadas e aplicadas (INCA, 2011).

2.1.2 Ciclo celular e apoptose

O ciclo de vida da célula compreende os processos de duplicação do DNA e, em seguida, a divisão nuclear (mitose) de uma célula somática, o que resulta na produção de duas novas células geneticamente semelhantes (MARTÍNEZ-CARPIO; MORENO, 2003). Esse ciclo consiste em duas etapas, a intérfase e a mitose. A intérfase é formada por três fases: G1, S e

G2; e a mitose também é conhecida como fase M; e embora todas as células apresentem as mesmas fases do ciclo durante o processo de divisão, a duração de cada fase é variável (RIVOIRE *et al.*, 2006; PERDIGÃO; TAVARES, 2001).

Na intérfase, a célula em repouso (G0) inicia o processo de intensa metabolização (fase G1) com a síntese de ATP, a síntese protéica e a duplicação dos componentes da célula-mãe. Esta fase se caracteriza por um período de crescimento do citoplasma, no qual são sintetizadas moléculas que estimulam ou inibem a duplicação do DNA e determina a progressão do ciclo. A duplicação do DNA ocorre em seguida na fase S, a qual permite que a célula duplique seus cromossomos precisamente. Depois de replicados os cromossomos, inicia-se a fase G2 na qual ocorre discreta síntese de RNA e de proteínas essenciais cuja formação promoverá a replicação do material genético (PERDIGÃO; TAVARES, 2001; REDDY *et al.*, 2003; RIVOIRE *et al.*, 2006). Por último, ocorre a fase M em que a célula se divide ao meio (citocinese) para produzir duas novas células com material genético idêntico (prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese). As novas células podem ficar no repouso ou entrar novamente em um novo ciclo celular em resposta a estímulos mitóticos extracelulares (**Figura 2**) (EKHOLM *et al.*, 2001).

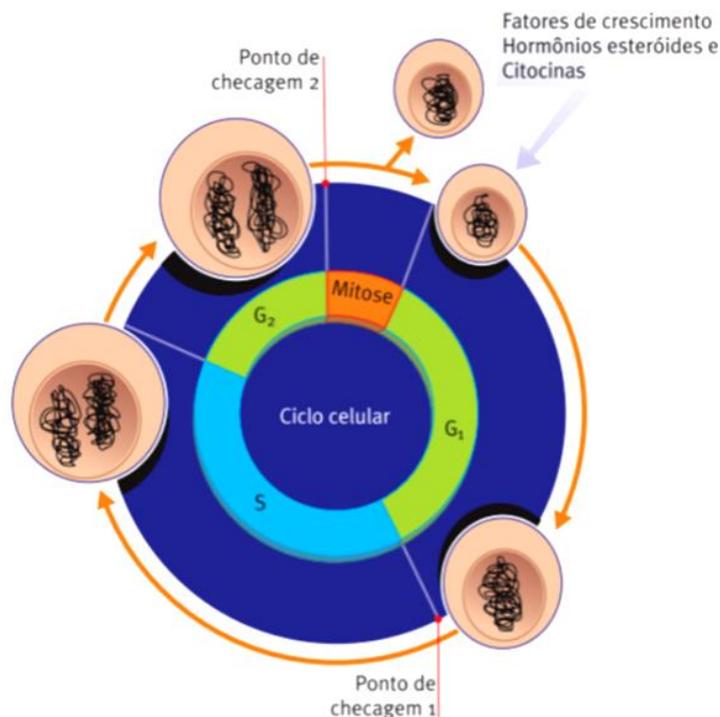


Figura 2. Ciclo celular durante a mitose. **Fonte:** BELIZÁRIO, 2002.

A divisão celular é um processo extremamente coordenado cuja progressão é controlada, de forma precisa, por eventos bioquímicos e moleculares muito complexos que sinalizam e orientam corretamente a passagem entre as fases (MALUMBRES; BARBACID, 2009). O sistema de controle é promovido por proteínas altamente específicas, denominadas de fatores de crescimento, as quais agem em receptores específicos expressos nas membranas de determinadas células. A formação do complexo receptor-ligante desencadeia uma cascata de proteínas transdutoras de sinais, que dirigem o ciclo celular, e o controle do ciclo é feito em pontos específicos (*check points*). Estes pontos regulam a divisão celular de acordo com a influência do meio (TANAKA *et al.*, 2013).

Os *checking points* são realizados em dois momentos durante o ciclo celular, na transição entre a fase G1/S e entre a fase G2/M, os quais as células decidem se avançam para a fase seguinte ou para o ciclo e inicia o processo de morte celular por apoptose (TANAKA *et al.*, 2013).

A apoptose é um mecanismo genético de controle da morte em que a morte da célula ocorre sem reação tecidual e inflamatória. É um fator importante em muitos processos biológicos normais, como a embriogênese, o desenvolvimento do sistema imune, a maturação e a diferenciação celular e sua importância está em eliminar células que não são mais necessárias ao organismo, ou em resposta à injúria genotóxica. Em situações patológicas, a apoptose parece estar implicada na imunodeficiência, na resistência a drogas e na carcinogênese (RANGANATH; NAGASHREE, 2001; SCHULTE-HERMANN *et al.*, 2000).

A morte celular programada desempenha um papel essencial como um mecanismo de proteção contra a carcinogênese por eliminar células geneticamente danificadas, células iniciadas ou em progressão para a malignidade. Desta forma, a indução da apoptose é altamente desejável como quimiopreventivo ou como estratégia quimiopreventiva para controle do câncer. Na verdade, muitos agentes quimiopreventivos ou agente antitumorais citotóxicos agem através da indução da apoptose como um mecanismo para suprimir o desenvolvimento da doença (SAFARZADEH *et al.*, 2014).

Evidências acumulativas sugerem que a resposta das células neoplásicas à quimioterapia não se limita à apoptose, mas também inclui outros modos de morte (BROWN; ATTARDI, 2005) tais como autofagia, necrose, catástrofe mitótica e senescência que se diferenciam com base em características bioquímicas e morfológicas distintas presentes em célula morta (DIMRI, 2005; OKADA; MAK, 2004; RICCI; ZONG, 2006).

No entanto, estudos com os outros modos de morte celular na formação do câncer, exceto a apoptose, têm ficado em latência devido à dificuldade de mensuração. Portanto, a apoptose é referido muitas vezes como o único modo de mecanismo de morte da célula induzido pelos quimioterápicos (BROWN; ATTARDI, 2005; RICCI; ZONG, 2006).

A apoptose é caracterizada morfológicamente pela redução no tamanho da célula, condensação da cromatina, geralmente com fragmentação do núcleo e do DNA, e perda da integridade da membrana plasmática (SAFARZADEH *et al.*, 2014). Em circunstâncias normais, a morte por apoptose de células é reconhecida pelos macrófagos ou células vizinhas que consomem as carcaças celulares fracionadas (RICCI; ZONG, 2006).

A ativação da apoptose, geralmente por danos ao DNA, parece ser um evento inicial comum que é propagado por resposta de “stress” celular. Esta resposta sinaliza enzimas proteolíticas como as caspases que consistem em importantes moléculas efetoras na morte programada por apoptose (RICH *et al.*, 2000; ROOS; KAINA, 2006).

A ativação dessas proteínas promove o aparecimento das alterações celulares que são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação dessas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (OLSSON; ZHIVOTOVSK, 2011).

Duas vias de sinalização molecular distintas levam à morte programada por apoptose: a via intrínseca, ou mediada por mitocôndria, e a via extrínseca, ou extracelular. Ambos os caminhos ativam as caspases que medeiam a destruição rápida de arquitetura e organelas celulares (ELMORE, 2007; TAYLOR *et al.*, 2008).

A via intrínseca é ativada em resposta a sinais de estresse intracelular os quais incluem danos ao DNA, infecção viral, ativação dos oncogenes como também a geração de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes, na verdade, constituem um dos maiores fatores de risco associados ao câncer. Essa família inibe a apoptose através da não formação de poros na membrana mitocondrial por ser capaz de neutralizar as ERO, inibir a acidificação intracelular e estabilização do potencial de membrana da mitocôndria e, conseqüentemente, inibem o extravasamento de citocromo c para o citosol. O citocromo c se associa com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando apoptossomo (**Figura 3**). Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (KAPUY *et al.*, 2014; SAFARZADEH *et al.*, 2014).

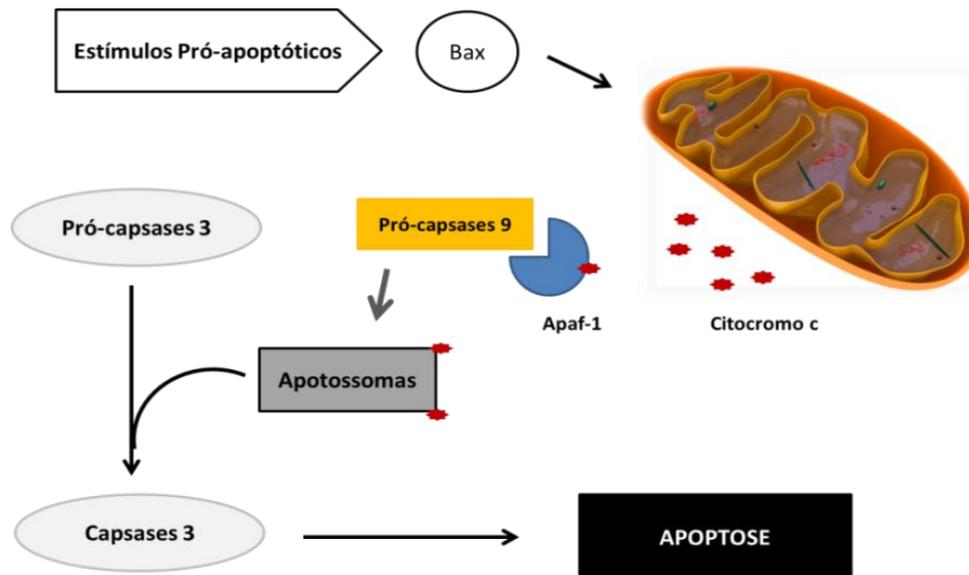


Figura 3. Via intrínseca da apoptose. **Fonte:** Própria.

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de um ligante extracelular a um receptor indutor de morte celular na membrana plasmática da célula. Este complexo ligante-receptor sinaliza a agregação e a formação de um complexo indutor de morte celular que recruta pró-capsases através de proteínas de domínio de morte associada ao receptor tal como a capsase-8. Esta proteína irá ativar a capsase-3 e, conseqüentemente, a apoptose (**Figura 4**) (ANAZETTI; MELO, 2007; SAFARZADEH *et al.*, 2014).

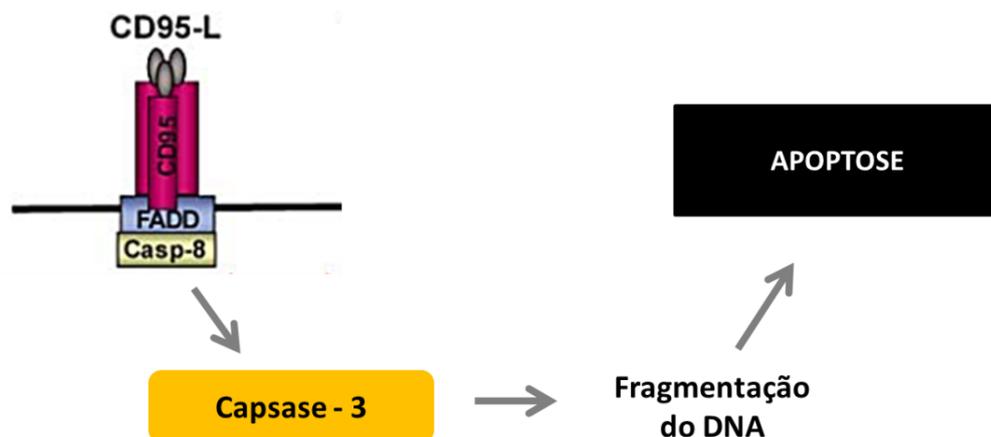


Figura 4. Via extrínseca da apoptose. **Fonte:** Própria.

A homeostasia do ciclo celular é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade dos cânceres, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004).

No entanto, a demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON, 2000).

Desta forma, a indução de apoptose em células tumorais é um alvo potencial do uso terapêutico antineoplásico ou pelo menos para compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia (THOMAS *et al.*, 2013). Alguns tratamentos atuais contra o câncer, incluindo alguns agentes quimioterápicos como também a terapia de radiação ionizante, visam ativar a apoptose e matar células cancerosas (ASHKENAZI, 2008; COTTER, 2009). O *Oblimersen* (G3139, Genasense, Genta, Berkeley Heights, NJ) é um oligonucleotídeo *antisense* anti Bcl-2 que está sendo testado em estudos clínicos de fase III e tem demonstrado alguns resultados positivos (KANG; REYNOLDS, 2009). Outro agente promissor é o ABT737, agente inibidor das proteínas Bcl-2, Bcl-XL e Bcl-w. Em estudo pré-clínico, esta substância melhorou a sobrevivência de animais com carcinoma de pulmão de pequenas células como também promoveu redução de tumores estabelecidos com alta taxa de cura (OLTERSDORF, 2005).

2.1.3 Tratamento contra o câncer

Os primeiros agentes antineoplásicos descobertos foram os agentes alquilantes, como o gás mostarda, utilizado na Segunda Guerra Mundial como arma química (**Figura 5**). Após ataque aéreo alemão com a mostarda nitrogenada, observou-se que soldados italianos apresentaram intensa hipoplasia linfóide e mielosupressão (RAJSKI; WILLIAMS, 1998; BARTZATT; DONIGAN, 2004).

A partir desta observação, pesquisas levaram a importantes descobertas e observaram que tecidos com alta taxa de proliferação eram mais suscetíveis aos agentes alquilantes. A meclorometamina, um agente alquilante tipo mostarda nitrogenada, em 1942, foi utilizado com sucesso para induzir remissão tumoral transitória em um paciente portador de linfoma. Este acontecimento marcou o início da era moderna de quimioterapia do câncer e cânceres como leucemias e linfomas que apresentavam alta taxa de proliferação, a partir de então, tiveram oportunidade de tratamento. Através de pesquisa se observou que os agentes antineoplásicos alquilantes interagem quimicamente com o DNA, embora não sejam ativos somente no processo de divisão celular (ALMEIDA *et al.*, 2005).

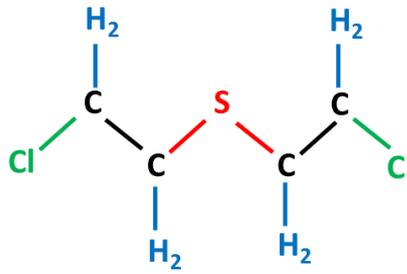


Figura 5. Molécula do agente alquilante Gás Mostarda. **Fonte:** Própria.

Posteriormente, outros agentes alquilantes citotóxicos foram descobertos, isolados, caracterizados e comercializados como a ciclofosfamida, temozolamida, cisplatina e a oxiplatina (PALUMBO *et al.*, 2013).

Atualmente, há três tipos principais de tratamento para o câncer: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Mais recentemente, outras técnicas vêm sendo utilizada como a terapia hormonal, terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP), os agentes biorredutíveis, bloqueadores de microtúbulos celulares e a imunoterapia. Entretanto, na grande maioria dos casos, o tratamento do câncer se dá por meio da terapia combinada entre eles (GIACOMINI; MENEZES, 2012; OLIVEIRA; ALVES, 2002; TOPHAM; TAYLOR, 2013; SIMPLICIO *et al.*, 2002).

A cirurgia é bastante eficiente na remoção de tumores quando não há metástase e é o tratamento inicial e de escolha para muitos tipos de cânceres. Entretanto, outros tipos de

câncer como a leucemia, a cirurgia não é possível e outros tratamentos são necessários (ALMEIDA *et al.*, 2005; GASPARINI; SARAIVA, 2004).

A radioterapia consiste na utilização de raios ionizantes ou de partículas de alta energia capazes de danificar o DNA das células tumorais e, conseqüentemente, a morte das mesmas. Esse tratamento pode ser utilizado isoladamente ou associado aos outros tratamentos tais como a cirurgia e a quimioterapia. O seu uso no tratamento da neoplasia depende de sua localização, estadiamento, tipo histológico e condições do paciente. Os raios atuam principalmente nas células com alta atividade mitótica, no entanto, o tratamento por radiação é sujeito a limitações (LOMAX *et al.*, 2013; MARTA *et al.*, 2011).

Os quimioterápicos são drogas com a capacidade de destruir as células neoplásicas através da interferência em pontos da progressão do ciclo celular. O objetivo primário do tratamento é erradicar o câncer com mínimo de efeito nas células saudáveis, entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atuam de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais. As mais atingidas são as células de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais do tratamento como náuseas, perda de cabelo, leucopenia e, conseqüentemente, susceptibilidade maior às infecções (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Com as pesquisas crescentes e avançadas, atualmente, várias classes de quimioterápicos existem comercialmente como os agentes alquilantes (ciclofosfamida, temozolamida, cisplatina e oxiplatina), os antibióticos antitumorais (doxorubicina, epirubicina e bleomicina), os antimetabólicos (metotrexato, citarabina, fluorouracil, mercaptopurina e capecitabina), os estabilizadores de microtúbulos (paclitaxel e docetacel) e os inibidores da topoisomerase (etoposida e irinotecan) (PALUMBO *et al.*, 2013). Essas classes agem em uma ou mais etapas da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) e são conhecidos como agentes ciclo-celular específicos (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Os produtos de origem vegetal pertencem a outra classe de agentes antineoplásicos importantes e eficientes que geraram muitos fármacos usados na terapia clínica do câncer e que originalmente não são compostos sintéticos (ALMEIDA *et al.*, 2005). A descoberta de medicamentos provenientes de fonte vegetal é particularmente evidente na área de câncer em que 48,6% das drogas são provenientes das plantas medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Um grande grupo destes produtos são os compostos fenólicos com ação antioxidante, o restante inclui grupos reativos que conferem propriedades protetoras. Estes produtos naturais são encontrados em vegetais, frutas, extratos de plantas e ervas (REDDY *et al.*, 2003).

Os agentes antineoplásicos naturais, no geral, podem ser classificados em dois grupos: o primeiro é constituído por agentes que inibem a iniciação do processo carcinogênico, como por exemplo, o consumo regular de chá verde, *Camellia sinensis*, em que sua eficácia é justificada devido à presença de flavonóides e de outros compostos fenólicos com alta atividade antioxidante; o segundo grupo é constituído por aqueles que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer (NOBILI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2007).

O primeiro grupo age como quimiopreventivo e sugere que a dieta poderia ser uma importante via na prevenção de alguns tipos de câncer, o que vem sendo sugerido em estudos epidemiológicos e experimentais (BOEHM *et al.*, 2009; NOBILI *et al.*, 2009).

Muitos produtos de origem natural, como os alcalóides da vinca e o taxol, têm apresentado grande atividade contra células tumorais, cujo isolamento introduziu uma nova era do uso de plantas medicinais como agentes antineoplásicos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Os alcalóides da vinca, a vimblastina e a vincristina, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, cujo nome popular é Vinca, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário, câncer de testículo e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO *et al.*, 2010). Estes medicamentos se ligam às proteínas microtubulares e interferem na progressão do ciclo celular (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

O taxol, um éster alcalóide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*), resultou em 1971 na descoberta do paclitaxel (Taxol®), a partir do programa de triagem de plantas do Departamento de Agricultura do Instituto Nacional de Câncer dos EUA. Estudos clínicos mostraram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional. Esta droga também age através da desestabilização dos túbulos o que promove a inibição da viabilidade celular (MANN, 2002; WALSH; GOODMAN, 1999).

Outra substância com efeito antitumoral foi o camptecano, um alcaloide extraído e isolado de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), (WALL *et al.*, 1966, OBERLIES; KROLL, 2004). Esta substância abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos, o topotecano e o irinotecano, os quais foram aprovados pela “Food and Drug Administration” (FDA), em 1996, para o tratamento de câncer de cólon e de ovário e suas ações ocorrem através da inibida enzima topoisomerase I (WALL *et al.*, 1966).

Outras drogas anticâncer semi-sintéticas provenientes de vegetais foram o etoposídeo e o teniposídeo, que são substâncias provenientes da epipodofilotoxina, isômero da

podofilotoxina. Esta substância foi isolada do gênero *Podophyllum* (*P. peltatum* e *P. emodii*), utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. Estudos experimentais permitiram a introdução desses compostos no tratamento de linfomas, câncer brônquico e testicular. A ação dessas drogas ocorre pelo bloqueio das células na fase S e no início da G2 e pela inibição da enzima topoisomerase II, o que promove danos ao material genético da célula (BRANDÃO *et al.*, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2007; HARVEY, 1999; SHOEB, 2006).

A homoharringtonina é outro componente natural derivado de produto natural de uso clínico no tratamento nas leucemias mielóides aguda e crônica como também no câncer de mama. É encontrado em cascas de várias espécies do gênero *Cephalotaxus* (Cephalotaxaceae), como a *C. harringtonia* K. Koch, a *C. haianensis* e a *C. qinensis*. Essas espécies são arbustos utilizados na medicina tradicional chinesa para tratamentos de neoplasias. Esse composto atua inibindo a síntese protéica ao se ligar à subunidade 60S nos ribossomos o que leva à morte celular por apoptose (GUREL *et al.*, 2009; KANTARJIAN *et al.*, 1996; ITOKAWA *et al.*, 2005).

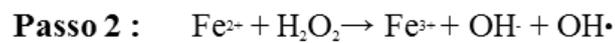
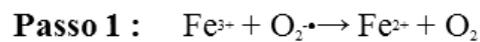
Assim, várias espécies em estudos pré-clínicos têm se mostrado ativas tais como a *Himatanthus drasticus* (MOUSINHO *et al.*, 2011), *Croton lechleri*, *Justicia spicigera* (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2012), a *Xylopiia frutescens* (FERRAZ *et al.*, 2013), *Limonium sinense* (TANG *et al.*, 2012), dentre outras.

As plantas têm representado uma importante fonte de pesquisa de drogas anticâncer e extensas pesquisas continuam sendo realizada com o objetivo de descobrir moléculas potentes, mais seletivas para as células alteradas e com menos toxicidade.

2.2 Atividade redox e doenças relacionadas

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas orgânicas e inorgânicas que contêm um ou mais elétrons não pareados. São continuamente produzidos durante os processos metabólicos no organismo e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas os quais desempenham funções fundamentais nos seres vivos (HALLIWELL, 2006).

A geração de radicais livres ocorre, normalmente, nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSEN, 2004). A produção de RL pode ser favorecida pela presença de íons de ferro e de cobre. Estes íons são muito ativos em reações de óxido-redução e são considerados como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Haber-Weiss e Fenton (**Figura 6**) (BARBOSA *et al.*, 2010).



Reação de Fenton (Passo 1 e 2):

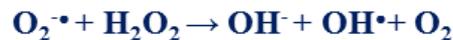


Figura 6. Reação de Fenton. O envolvimento do ferro com o peróxido de hidrogênio pode formar no sistema biológico, uma série de reações oxidativas o que promove aumento de ERO. **Fonte:** BARBOSA *et al.*, 2010.

Os RL são altamente reativos e sua formação resulta em reação em cadeia na qual cada etapa forma um novo RL e aciona uma nova etapa (HALLIWELL, 2006). Dentre estas espécies reativas, encontram-se as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO incluem todos os radicais derivados do oxigênio como o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}), radical alquila (L^{\cdot}), alcoxila (LO^{\cdot}) e peroxila (LOO^{\cdot}). Nas ERN estão incluídos além do peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}). Embora, outras moléculas tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), ácido hipocloroso (HOCl), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o ozônio (O_3) não sejam consideradas como RL, elas são relatadas como moléculas capazes de gerá-los através de várias reações químicas (BARBOSA *et al.*, 2014; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001). Algumas reações químicas formadoras de ERO encontram-se na **Tabela 1**.

As ERO representam a classe dos RL mais importantes produzidos no sistema vivo e estão envolvidas em muitas atividades bioquímicas fisiológicas das células como na produção de ATP, na participação da transdução de sinais, na transcrição de fatores, na proliferação e regulação do ciclo celular como também na indução da apoptose, na proteção contra infecções, dentre outras (KIM *et al.*, 2001; NAKASHIMA *et al.*, 2003; SAUER *et al.*, 2001; VALKO *et al.*, 2007). Diferentemente, o óxido nítrico (NO) é um gás altamente difusível e consiste numa molécula de sinalização essencialmente importante na regulação do relaxamento e da proliferação de células de músculo liso vascular. Também participa na adesão de leucócitos, na agregação de plaquetas, na angiogênese, no processo de trombose, no tônus vascular e na hemodinâmica (ZHENG; STORZ, 2000).

Tabela 1. Formação de algumas espécies reativas de oxigênio via cadeia transportadora de elétrons.

Reação química	Espécie reativa de oxigênio
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$O_2^{\bullet -} + H_2O \rightarrow HO_2^{\bullet -} + OH$	Radical hidroperoxil
$HO_2^{\bullet -} + e^- + H \rightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^{\bullet} + OH^-$	Radical hidroxila

Em condições fisiológicas, o oxigênio (O_2) ao entrar na célula se difunde para a mitocôndria onde sofre redução para a geração de energia e forma moléculas de água a fim de evitar que haja produção excessiva de RL durante a cadeia respiratória. No entanto, entre 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica e reduzidos de forma univalente, dando origem às espécies reativas. Portanto, o oxigênio é uma molécula de suma importância para o organismo e, por consequência, as ROS são constantemente produzidas pelo metabolismo no organismo (KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

No entanto, por essas espécies serem altamente reativas, diferentes mecanismos de defesas foram desenvolvidos para removê-las, num processo de chamado de detoxificação cujo processo ocorre pela presença de proteínas, substâncias e enzimas antioxidantes (KARDEH *et al.*, 2014; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

O processo de detoxificação endógena é mais eficiente através das enzimas: superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção os quais impendem e/ou controlam a geração de espécies reativas envolvidas com a iniciação da cascata bioquímica (HUBER *et al.*, 2008). Entretanto, sistemas não enzimáticos endógenos compostos por cofatores enzimáticos (Cu, Zn, Mn, Fe e Se) também são importantes (VINCENT *et al.*, 2007).

Desequilíbrio entre a produção e a capacidade de detoxificação de radicais nos sistemas fisiológicos tem sido atribuído com a formação de estresse oxidativo (WALSH *et al.*, 2014). O estresse oxidativo é o efeito tóxico resultante da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lípidos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mediados pelo excesso de RL. A reação destas espécies reativas com os AGPI presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (LIMA; ABDALLA, 2001).

Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática que envolve as enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI e uma não enzimática a qual envolve a participação de ROS, RNS, metais de transição e outros RL. Este processo causa perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (por exemplo, o malonaldeído, MDA), o que culmina com a morte celular. A LPO pode ser avaliada e utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular e entre as técnicas mais utilizadas destaca-se o teste de determinação de MDA. O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, o qual se condensa com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando produtos, que podem ser mensurados (**Figura 7**) (LIMA; ABDALLA, 2001).

O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é considerado o de maior potencial reativo e o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica. Estas características o configura como o radical mais propício de produzir danos oxidativos e, conseqüentemente, de promover possíveis mutações no material genético celular (WELCH *et al.*, 2002).

Desta forma, a produção excessiva de RL pode levar a diversas formas de dano celular e sua cronicidade pode estar envolvida com a etiogênese ou com a formação de inúmeras doenças (COSTA; MONTEIRO, 2009; HUYNH *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo tem mostrado, conclusivamente, estar associado ao envelhecimento e às doenças relacionadas com o envelhecimento como a formação do câncer (KARDEH *et al.*, 2014), a neurodegeneração (ANDERSEN, 2004; HALLIWELL, 2006), a doença cardiovascular (DHALLA *et al.*, 2000; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003) e diabetes (CERIELLO; MOTZ, 2004; HUYNH *et al.*, 2014). Outras doenças como a esquizofrenia tem sido estudada mais detalhadamente e evidências sugerem que esta patologia esteja relacionada com alterações de enzimas antioxidantes e, conseqüentemente, alteração de quantidade de RL (WU *et al.*, 2013).

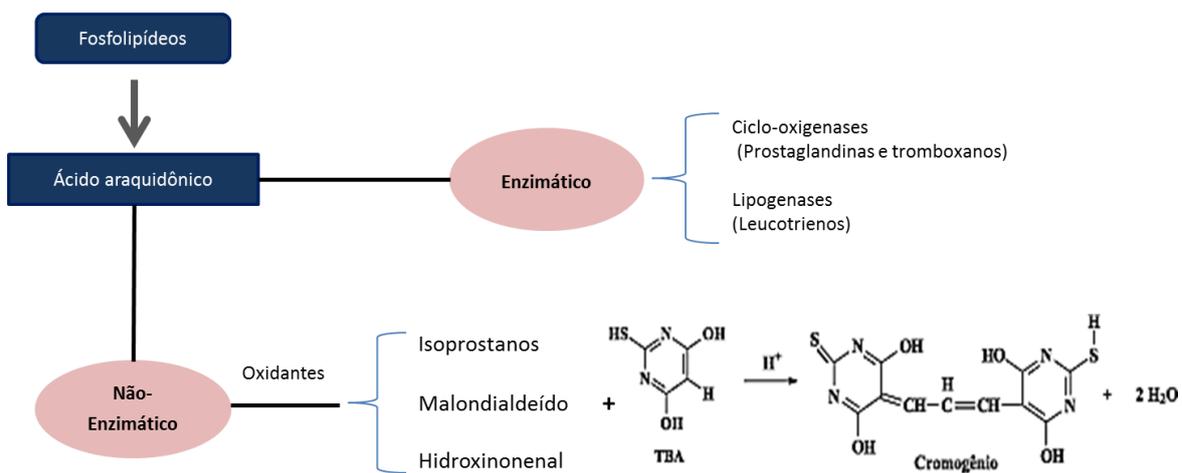


Figura 7. Metabolismo dos ácidos graxos e determinação da lipoperoxidação lipídica pelo teste do malondialdeído. **Fonte:** Própria.

As células controlam os níveis de ERO através de sistemas *scavenging* (varredura/depuração), mas em condições de estresse oxidativo o excesso de ERO pode ocasionar danos fatais para a célula os quais podem contribuir para a carcinogênese (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Policastro *et al.* (2004) observaram que o aumento da superóxido dismutase permite diminuição do ânion superóxido e aumento do nível de peróxido de hidrogênio. Esta relação tem sido correlacionada com a malignidade do câncer de mama; e a diminuição deste radical

está associada com a reversão da malignidade da linhagem MCF-7 (POLICASTRO *et al.*, 2004).

Doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e os distúrbios vasculares, constituem as principais causas de morte nos países desenvolvidos (DUVAL *et al.*, 2003). Injúrias vasculares, tais como aquelas associadas com o tabagismo, diabetes mellitus, hipertensão e hiperlipidemia podem desencadear uma resposta inflamatória nos vasos; e a aterogênese é geralmente acompanhada de inflamação crônica. O estabelecimento deste estado inflamatório, mediado em parte pela ERO, resulta em disfunção vascular em células endoteliais e musculares lisas, recrutamento de leucócitos, fatores de crescimento, citocinas e hipertrofia celular os quais contribuem para a formação de ateroma (SULLIVAN *et al.*, 2000).

Estudos citados acima, juntamente com vários outros, têm mostrado que anormalidade no metabolismo do ERO/ERN tem implicações funcionais e o desequilíbrio de geração de espécies reativas ajuda a conduzir muitos destes processos (WALSH *et al.*, 2014).

Fatores externos também são capazes de induzir a produção desses RL: irradiação ultravioleta, tabaco, álcool, xenobióticos, poluição, medicamentos, radiações ionizantes, metais pesados, dieta deficiente, entre outros (**Figura 8**) (DAS; VASUDEVAN, 2007; HU *et al.*, 2007; LYKKESLELDT, 2007).

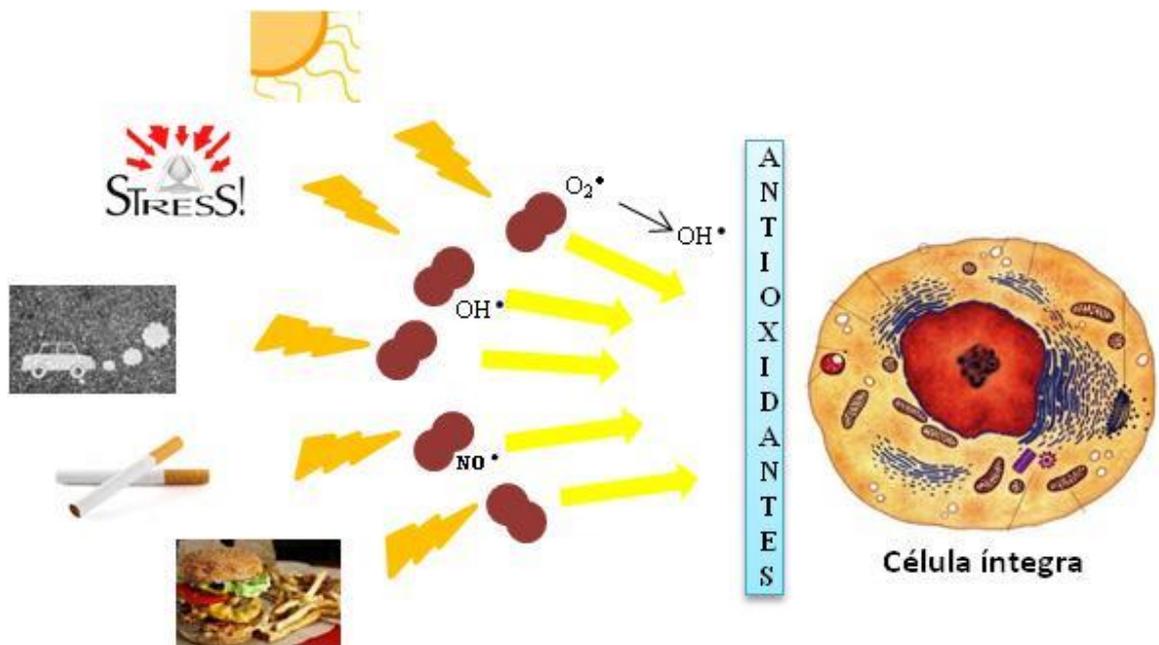


Figura 8. Fatores externos como promotores de RL e atuação dos agentes antioxidantes.
Fonte: Própria.

2.3 Agentes antioxidantes e plantas medicinais

Os agentes antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas de maneira eficaz. Tais agentes podem agir diretamente, neutralizando-os, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade e/ou prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (**Figura 8**) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; RATNAM *et al.*, 2006).

Esses componentes são considerados agentes antioxidantes não-enzimáticos e são compostos antioxidantes provenientes da dieta, entre os quais se destacam: vitaminas (A, C e E), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína) e compostos fenólicos (flavonóides) (BARBOSA *et al.*, 2010).

As vitaminas C e E são agentes com excelentes características antioxidantes com capacidade de sequestrar os RL com grande eficiência. A vitamina C (ácido ascórbico) está presente em diversos alimentos tais como as frutas cítricas e atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os RL (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010). A vitamina E é um componente dos óleos vegetais e a forma α -tocoferol é amplamente distribuída nos tecidos e no plasma. Essa vitamina se encontra em grande quantidade nos lipídeos e possui a capacidade de impedir a propragração das reações em cadeia induzidas pelos RL nas membranas biológicas (PACE *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2007).

Os carotenóides são corantes naturais presentes nas frutas e vegetais (cenouras, tomates, espinafre, laranjas, pêssegos, entre outros), e sua ação é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas presentes nas moléculas as quais exercem funções antioxidantes nas membranas lipoprotéicas (RAO; RAO, 2007). Alguns deles, como o β -carotenóide e o licopeno, estão relacionados com a redução dos danos provocados pelos RL associados a doenças específicas, tal como o câncer, artrite e o envelhecimento fisiológico (SOUZA *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes em plantas e compreendem um grande grupo de compostos biologicamente ativos contendo mais de 8000 estruturas já descritas (BRUSOTTI *et al.*, 2010). Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos como os mais comuns antioxidantes fenólicos de

fonte natural, sendo que os flavonoides são os compostos mais importantes (DO *et al.*, 2013; MIGUEL *et al.*, 2010).

Pesquisas com extratos fenólicos têm crescido devido ao aumento da demanda mundial por compostos fenólicos e à sua aplicação na indústria de alimentos como agentes antimicrobianos, antioxidantes e estabilizantes alimentares (MARINOVA *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2011).

Os flavonoides são um grupo de compostos largamente encontrados em plantas que possuem grande quantidade de compostos fenólicos, os quais incluem as classes de flavonas, flavonois, isoflavonas, flavononas e chalconas. Estes compostos contêm sua estrutura característica (C₆-C₃-C₆) com grupos hidroxilas livres ligados a anéis aromáticos que inibe a oxidação lipídica das lipooxigenases, ciclogenases, mieloperoxidaes e xantina oxidase como também atua como antioxidantes devido às suas propriedades quelante de ferro e sequestradoras de RL (ABELT *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Domínguez *et al.* (2005) afirmaram que baixas concentrações de compostos fenólicos podem inibir a cadeia de polimerização iniciada por RL e outras reações de oxidação subsequentes.

De fato, diversos estudos com plantas vêm mostrando o potencial antioxidante associado à quantidade de compostos fenólicos presentes nelas. Como exemplos temos a *Bridelia grandis* (BRUSOTTI *et al.*, 2010), *Ficus carica* (BEY *et al.*, 2014), *Limnophila aromatica* (DO *et al.*, 2013), *Morinda citrifolia* (SERAFINI *et al.*, 2011), *Piper auritum* e *Porophyllum ruderale* (CONDE-HERNÁNDEZ; GUERRERO-BELTRÁN, 2014), *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis* e *Origanum majorana* (ROBY *et al.*, 2013), dentre outras.

Estes compostos protegem plantas, frutos e vegetais de danos oxidativos e têm sido usados como antioxidantes para humanos. Acredita-se que um aumento da ingestão de alimentos ricos em antioxidantes naturais está associado com menores riscos de doenças degenerativas, particularmente de doenças cardiovasculares e câncer (DO *et al.* 2013), como também o consumo regular desses alimentos funcionais tem diminuído o risco de doenças crônicas tais como diabetes, osteoporoses e hipertensão (LOPEZ-VARELA *et al.*, 2002).

Muitos estudos têm demonstrado largamente suas propriedades antioxidantes e os seus efeitos anticarcinogênicos e antitumogênico através da inibição de proliferação celular *in vitro* (ANDROUTSOPOULOS *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2010; MALTA *et al.*, 2013). Além disso, diversos estudos reportam a capacidade anti-inflamatória e

inibidora da angiogênese por agentes antioxidantes naturais (LUO *et al.*, 2008; SEIFRIED *et al.*, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos com ação antioxidante tem sido um importante objeto de estudo, uma vez que a terapêutica farmacológica atual para o tratamento de doenças neurodegenerativa, doenças cardiovasculares, diabetes, esquizofrenia e alguns tipos de neoplasias pode ser realizada devido às propriedades antioxidantes de muitos compostos naturais e/ou sintéticos (HAMID *et al.*, 2010; REED, 2011) como também no retardo do envelhecimento (COSTA *et al.*, 2012).

2.4 Estudo de toxicidade

As plantas medicinais são utilizadas em todo o mundo como uma alternativa e/ou complemento no tratamento de algumas doenças. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS estima que cerca de 80% da população mundial são dependentes da medicina natural para cuidados com a saúde, sendo que 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (OMS, 2008).

Esse crescente uso das plantas pela população não é somente devido à pobreza e à falta de acesso a medicamentos industrializados, mas, principalmente, por acreditarem que as plantas são consideradas seguras, “naturais” para os seres humanos (JORDAN *et al.*, 2010). Outro fator importante ao grande uso de medicamentos à base de produtos naturais é a venda livre de prescrição ou muitos deles serem considerados como suplemento alimentar. Esse fato promove o uso sem a adequada orientação (HWANG *et al.*, 2013).

No entanto, as plantas medicinais também podem ser venenosas, as quais podem afetar todo o organismo humano, uma vez que algumas plantas são conhecidas por conter vários princípios tóxicos (TEKE; KUETE, 2014) ou causar vários efeitos colaterais. Estes efeitos podem ser causados por seus constituintes agressivos inerentes, contaminações de microorganismos patogênicos e/ou metais pesados assim como já se conhece interações importantes de uso de produtos naturais com outras drogas (CHAN, 2003). Este fato pode comprometer a eficácia de tratamentos convencionais, por reduzir ou potencializar seu efeito (CAPASSO *et al.*, 2000). Além disso, os princípios tóxicos podem ser encontrados em

diferentes partes de plantas medicinais: folhas, frutos, flores, raízes e casca do caule (TEKE; KUETE, 2014).

Tendo estes fatos em vista, a atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos, por diferentes razões e em diferentes setores (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Protocolos e documentos de orientação sobre segurança e testes de toxicidade de produtos naturais têm sido emitidos por algumas instituições tais como o Instituto de Medicina/Conselho Nacional de Pesquisa (2004), o Instituto Internacional de Ciências da Vida (*International Life Sciences Institute*), a União da Química Pura e Aplicada, Agência Européia de Medicamentos (EMA), a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (JORDAN *et al.*, 2010) e a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD).

A OECD é um dos mais importantes guias aceitos internacionalmente por governos, indústrias e laboratórios independentes para avaliar a segurança do uso de produtos químicos, medicamentos, fitoterápicos, dentre outros (OECD, 2008).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem buscando regulamentar a comercialização de produtos naturais através da RDC n. 48 de 16/03/2004 (DO da União de 17/03/04). Além desta resolução, outras foram publicadas a fim de normatizar a comercialização de fitoterápicos no país, tais como a RE n. 88/2004, que traz a “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos” e a RE n. 89/2004, que publica a “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. Em 2006, foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), com o objetivo ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006).

Em 2010, a ANVISA elaborou um Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos com base em agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMA) e de instituições de interesse na área (OECD, OMS). Esse guia tem a intenção de racionalizar estudos não clínicos, evitar duplicidade e utilizar menor quantidade de animais sem comprometer as informações referentes à segurança da substância em teste (ANVISA, 2010).

Neste sentido, a investigação sistemática de plantas medicinais, de forma a se validar tanto o uso quanto a ausência de toxicidade é de extrema importância. De fato, a ausência de

estudos que comprovem a eficácia e a ausência de toxicidade constitui um empecilho legal ao cultivo destas plantas em farmácias vivas e também para a comercialização.

O estudo toxicológico consiste no estudo dos efeitos de agentes xenobióticos sobre os organismos vivos. A toxicologia engloba a detecção, a ocorrência, as propriedades, os efeitos e a regulação de substâncias tóxicas. Além disso, ela desempenha um papel ativo na sociedade, aconselhando como mitigar, controlar ou prevenir os efeitos deletérios de substâncias tóxicas (COSTA; TEXEIRA, 2014).

Portanto, a avaliação sobre a segurança dos medicamentos à base de plantas por si só é necessária usando vários ensaios toxicológicos, sendo que os principais tipos de avaliações toxicológicas são toxicidade aguda e a toxicidade de doses repetidas as quais incluem: toxicidade subaguda, subcrônica e estudos de toxicidade crônica. Para avaliar a toxicidade aguda ou toxicidade subaguda de plantas medicinais, quaisquer espécies animais podem ser utilizada, embora os roedores são utilizados mais frequentemente (TEKE; KUETE, 2014).

2.4.1 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda é conduzida para determinar os efeitos adversos provocados por uma única dose elevada. Os objetivos são descobrir os potenciais efeitos adversos para a saúde que poderiam ser atribuídos ao agente sob investigação (CHAN *et al.*, 2014).

Nesse teste se investiga o potencial tóxico em órgãos específicos, a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico (VALADARES, 2006).

De acordo com a ANVISA e a OECD, o teste de toxicidade aguda deve ser realizado com espécies de mamíferos, a qual deve receber uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais durante 14 dias após a administração. Essa dose deve ser de no máximo 2000 mg/kg e pode ser administrada em uma única dose ou dividida em mais doses dentro de 24 h (ANVISA, 2010; OECD, 2008).

2.4.2 Toxicidade de doses repetidas

Os ensaios de toxicidade de doses repetidas auxiliam no conhecimento dos possíveis efeitos tóxicos de substâncias após a exposição diária por um período mais longo do que a toxicidade aguda. As subclasses desse ensaio diferenciam pelo tempo de exposição que podem variar de 15 a 90 dias (ANVISA, 2010).

A legislação brasileira preconiza o uso de mamíferos de ambos os gêneros e as doses utilizadas geralmente são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda. Sugere-se o uso de três doses, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia. Uma dose mais baixa que não produza efeitos adversos e uma outra dose intermediária entre as duas (ANVISA, 2010).

Os parâmetros que devem ser avaliados nesse ensaio são: mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e de água, patologia clínica (hematologia, bioquímica), duração e reversibilidade da toxicidade, investigações anátomo e histopatológicas (ANVISA, 2010; OECD 2008).

A partir de ensaios de doses repetidas, é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas (ANVISA, 2010; OECD, 2008).

2.4.3 Avaliação hematológica

A avaliação hematológica consiste na análise das células do sangue através do hemograma o qual permite a observação da influência da substância teste sobre os três componentes principais do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e seus precursores na medula óssea. Essa influência pode ser de forma quantitativa e qualitativa (DALANHOL *et al.*, 2010).

O hemograma é dividido em três partes: eritrograma, leucograma e o plaquetograma, e é indispensável no diagnóstico e no controle de diversas de doenças tais como doenças infecciosas, crônicas em geral, dentre outras (FAILACE, 2009).

O eritrograma constitui o estudo da série vermelha sanguínea e consiste na contagem do número de hemácias, concentração de hemoglobina, volume globular ou hematócrito, cujos valores obtidos dão origem aos índices hematimétricos (DIAS JUNIOR *et al.*, 2006). A contagem de hemácias é uma medida meramente quantitativa das hemácias circulantes no sangue periférico e varia, principalmente, em função do gênero (FAILACE, 2009).

A hemoglobina é o principal componente dos eritrócitos e têm a função de se associar ao oxigênio e transportá-lo dos capilares pulmonares aos tecidos, onde é trocado pelo dióxido de carbono devido ao grupo heme presente na hemoglobina (KLINKEN, 2002). Sua dosagem é indispensável, pois valores baixos caracteriza quadro de anemia a qual consiste em diminuição de oxigenação dos tecidos. Este quadro, geralmente, ocorre em quadro de hemorragia, produção ineficiente da eritropoiese e destruição aumentada de hemácias (MCLELLAN *et al.*, 2003).

O hematócrito é a proporção relativa ocupada pelos eritrócitos em uma amostra de sangue e em algumas situações, este parametro é importante no diagnóstico de anemia e policitemia, desidratação, monitoramento do tratamento de anemia e hemorragias (GOMES *et al.*, 2006).

Os índices hematimétricos são cálculos introduzidos na hematologia para a determinação do diâmetro, conteúdo e concentração de hemoglobina nos eritrócitos e vêm se mostrando úteis na caracterização morfológicas das anemias (HENRY, 2008). Esses índices são o volume corpuscular médio (VCM) que é a medida do volume médio das hemácias a partir da divisão do hematócrito pela contagem dos eritrócitos (NETO, 2004); hemoglobina corpuscular média (HCM) que corresponde à medida do conteúdo de hemoglobina na hemácia e é calculada pela divisão da taxa de hemoglobina pelo número de glóbulos vermelhos; e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) a qual reflete a concentração de hemoglobina dentro das hemácias (RIBEIRO-ALVES; GORDAN, 2007).

Os leucócitos são células de defesa presentes no sangue e o leucograma é parte do hemograma que avalia essas células. O leucograma consiste na contagem total e diferencial (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) e a morfologia dos glóbulos brancos (ASHTON, 2013). O aumento da contagem total dos glóbulos brancos é conhecido como de leucocitose, enquanto que a diminuição é chamada de leucopenia (BARGER, MS, 2003).

Os neutrófilos constituem, geralmente, a primeira linha de defesa do organismo e seu aumento está associada a infecções bacterianas e a diversas doenças inflamatórias. Os

linfócitos são células responsáveis pela resposta imune e humoral específica para organismos (GORDON-SMITH, 2009), enquanto os eosinófilos aumentam na circulação sanguínea, principalmente, em condição de parasitoses, como também em condições alérgicas ou hipersensibilidade do tipo imediata (CHAUFFAILLE, 2010). Os monócitos são as maiores células de defesa e seu aumento ocorre em vários processos inflamatórios e doenças crônicas (GORDON-SMITH, 2009).

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos da medula óssea e são avaliadas quanto ao seu número, tamanho e morfologia. São fragmentos importantes na homeostasia da coagulação sanguínea e sua avaliação é importante na avaliação de diversas desordens (WENDLAND *et al.*, 2009).

2.4.4 Avaliação bioquímica

A avaliação bioquímica auxilia a averiguar a integridade de alguns órgãos e a homeostase do organismo por meio de dosagens de substâncias e atividade enzimática presentes no soro sanguíneo (MELO *et al.*, 2012).

Através das enzimas alanina-aminotransferase ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT), aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO/AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT), é possível realizar a triagem de avaliação da função hepática (BORSA *et al.*, 2006).

TGP/ALT é uma enzima encontrada no citoplasma dos hepatócitos e é considerada específica para disfunção hepática (AMACHER, 2002), enquanto que TGO/AST é encontrada, principalmente, nas mitocôndrias e não é específica para função hepática uma vez que níveis elevados também são encontrados em uma variedade de tecidos tais como coração, músculos e eritrócitos. Elevação dessas enzimas é indicativo de lesão hepatocelular (RAMAIAH, 2007).

Outros parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para avaliar a capacidade de síntese do fígado que são: albumina, glicose e uréia (HENRY, 2008), embora esses parâmetros sejam inespecíficos já que outras causas podem ocasionar sua redução, tais como redução da concentração sérica de albumina associada à inflamação de fase aguda; excreção de glicose na urina em nefropatias; desnutrição; dentre outras (RAMAIAH, 2007).

As doenças cardiovasculares são atualmente a maior causa de mortalidade no mundo e a dislipidemia vem surgindo com uma importante causa. O colesterol é precursor de diversas substâncias no organismo (vitamina D, alguns hormônios, ácidos biliares e algumas lipoproteínas), sendo parte produzida de forma endógena e outra parte adquirida pela alimentação. Os triglicerídeos são substâncias gordurosas do sangue utilizadas como reserva energética para o organismo provenientes da alimentação. Níveis elevados de colesterol total e de triglicerídeos caracteriza quadro de dislipidemia que estão correlacionados com maior incidência de hipertensão e doença aterosclerótica, isquemia e doenças coronarianas (FRANCA; ALVES, 2006).

A dosagem de uréia e de creatinina são os principais parâmetros de avaliação da função renal uma vez que os rins são os principais órgãos de excreção desses produtos. Portanto, alterações patológicas nesses órgãos, níveis desses compostos são elevados na circulação sanguínea (HENRY, 2008). Entretanto, a ureia por ser um subproduto gerado pela catabolização das proteínas é um parâmetro fortemente influenciado pela dieta, catabolismo e perda de proteínas no trato gastrointestinal (SCHOSSLER *et al.*, 2001).

Os rins também participam na manutenção da homeostase de fluidos e eletrólitos. Alterações de distribuição da água e de íons podem levar a complicações de extrema gravidade, ou mesmo determinar a morte do indivíduo. Portanto, a avaliação de eletrólitos, principalmente o sódio e o potássio são relevantes na avaliação mais completa da função renal (THOMSON; MACNAB, 2009).

2.4.5 Análises macroscópica e microscópica

A avaliação anatomohistopatológica dos órgãos vitais consiste em observar a integridade da morfologia e estrutura dos tecidos (SALAS, 2004). Esta análise consiste em análise macroscópica e análise microscópica.

A análise macroscópica compreende em avaliar os órgãos dos animais a fim de observar alterações estruturais tais como possíveis processos de necrose, inflamação precoces, sinais de lesões, mudança de cor e hemorragias (OECD, 2008).

A análise microscópica dos órgãos vitais permite avaliar mais profundamente através do microscópio e, com isso, se observar precocemente processos inflamatórios em que os exames

laboratoriais não seriam capazes de detectar a fim de averiguar possíveis alterações que o composto administrado possa causar. Esta análise permite a avaliação de todos os órgãos, principalmente, aqueles em que os exames laboratoriais não conseguem avaliar (SALAS, 2004).

2.5 *Remirea maritima*

As plantas da família Cyperaceae compreendem 109 gêneros e 5.500 espécies, das quais 45 gêneros e cerca de 600 a 700 espécies ocorrem no Brasil. Destas, 14 gêneros e 61 espécies ocorrem no estado de Sergipe (GOVAERTS *et al.*, 2007; VITTA; PRATA, 2009).

Espécies da família Cyperaceae são conhecidas por apresentarem metabolismo secundário ativo. Esse metabolismo tem sido evidenciado pela extensiva pesquisa química o que resultou o isolamento de diversas classes de compostos, incluindo xantonas, cumarinas, flavonoides, chalconas, benzofuranos, triterpenos, entre outros (LASEKAN, 2013). Os pigmentos auronas são os componentes desta família mais distinta e encontrada em maior abundância. A luteolina, a tricina, as duas em forma de *O*-glicosídeos, e a vitexina também estão entre os compostos largamente encontrados em gêneros de Cyperaceae. A luteolina é o flavoinoide mais abundantemente encontrado dentre as espécies desta família e os outros dois compostos são encontrados em maior quantidade em espécies de regiões tropicais. Os flavonóis são menos comuns, entretanto, quatro flavonóis foram encontrados em extratos ácidos hidrolisados: a quercetina, a isoramnetina, o kaempferol e a miricetina (HARRORNE; WILLIAMS; WILSON, 1985).

Esses flavonóis são encontrados em diversas plantas e alimentos e, dentre eles, o mais predominante por suas propriedades terapêuticas é a quercetina seguido de miricetina e kaempferol, sendo que todos os três têm capacidade antioxidante (RAJENDRAN *et al.*, 2014).

A quercetina e seus derivados são considerados poderosos antioxidantes com efeitos anticarcinogênicos, anti-hipertensivo, antihiperglicemiante, dentre outros, já conhecidos na literatura (ALAM; MEERZA; NASEEM, 2014; HARWOOD *et al.*, 2007; PAN *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2014)

Kaempferol é um flavonóide encontrado em muitas plantas comestíveis, em plantas e em produtos botânicos comumente usados na medicina tradicional (por exemplo, *Ginkgo biloba*, e própolis). Estudos já demonstraram atividade antioxidante em diversas doenças: encefalomielite, diabetes, asma e na carcinogênese. O efeito anticâncer desse composto está relacionado com diferentes mecanismos, incluindo atividade anti-proliferativa, indução de apoptose, inibição do ciclo celular como também devido à capacidade de geração de espécies de oxigênio reativas (RAJENDRAN *et al.*, 2014).

A isoramnetina e a miricetina são flavonóis ainda pouco conhecidas cientificamente em relação as suas propriedades farmacológicas.

A *Remirea maritima* conhecida também como *Mariscus pedunculatus* (R. Br.) pertence à família Cyperaceae, a Ordem Gramineae e a Classe Monocotyledones (PRATA; LOPEZ, 2001). Esta espécie é perenifólia, heliófita e praticamente indiferente às condições físicas do solo. É característica de floresta pluvial atlântica que sofreu interferência do homem, sendo pouco comum nas florestas clímaxes e abundante nas capoeiras. Ela é uma planta herbácea, geralmente, perene e graminiforme. Planta dióica com folhas subcoriáceas, de 3 a 6 cm de comprimento, levemente pubescentes na face inferior, sustentadas por pecíolo de 2 a 4 cm de comprimento (**Figura 9**) (ALLAN; WELLS; MACLEOD, 1973; VITTA; PRATA, 2009).



Figura 9. Planta inteira da *Remirea maritima* encontrada na região de praia na cidade de Pirambu, Sergipe, Brasil. **Fonte:** Própria.

A *R. maritima* é uma espécie de regiões tropicais com um sistema de raiz reticulado, o qual o desenvolvimento de seus rizomas ocorre através da areia. No Brasil, essa espécie é encontrada ao longo do litoral sudeste e nordeste e é conhecida popularmente como “capim-da praia” (ALLAN; WELLS; MACLEOD, 1973; PRATA; LOPEZ, 2001; VITTA; PRATA, 2009).

As principais indicações populares de uso da *R. maritima* é, principalmente, no tratamento de diarreia, de doenças renais, febre alta, para alívio da dor e da inflamação (ALLAN; WELLS; MACLEOD, 1973; SIANI *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo a *R. maritima* são escassos na literatura atual. Pouco se sabe através da literatura científica sobre o perfil químico e os efeitos farmacológicos desta espécie.

Em 1969, Allan e colaboradores, através da extração etélica de rizomas da *R. maritima* por cromatografia de sílica em gel, isolou três quinonas, conhecidas como ciperquinonas: aciperquinona, a dibidroiperaguino e a tetrahidroiperaguino, e duas cetonas fenólicas: o iso-evodionol e remirol. Neste trabalho, foi sugerido que o remirol é o precursor biogenético das ciperquinonas (ALLAN; CORRELL; WELLS, 1969a, 1969b). Em 1970, esse mesmo grupo, isolou mais duas novas cetonas fenólicas da *R. maritima*, preremirol e o remiridiol, e em 1973, uma nova quinona flavonona, a remerina (ALLAN; WELLS; MACLEOD, 1970, 1973).

Siani *et al* (2001) avaliaram a atividade anti-inflamatória do hidrodestilado bruto da *R. maritima* como também das substâncias purificadas (diidrobenzofurano remirol e benzopirano iso-evodionol) através do modelo de pleurisia induzida em camundongos por polissacarídeo (LPS, 12,5 ng/cavidade) e observaram que tanto o extrato bruto quanto o remirol puro (100 e 200 mg/kg) demonstraram uma capacidade dose-dependente de inibir o acúmulo de neutrófilos e eosinófilos na cavidade pleural dos animais.

Estudo fitoquímico, a caracterização química e a avaliação das atividades antioxidante, antinoceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso da *R. maritima* foram realizadas por nosso grupo.

A triagem fitoquímica do extrato aquoso da *R. maritima* mostrou a presença de fenóis, taninos condensados, alcaloides, cumarinas voláteis, flavonoides, saponinas e triterpenos/esteroides (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Na caracterização química do extrato aquoso, foi identificada a presença majoritária de flavonóides tais como a luteolina, a vitexina e a isovitexina (**Figura 10**) (RABELO *et al.*, 2013).

A luteolina é encontrada em muitos vegetais e frutas tais como tal como pimentas, azeite, cenouras, hortelã-pimenta, alecrim, tomilho e orégãos. Estudos prévios têm demonstrado que

este composto exibe uma variedade de ações farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa (CHIU; LIN, 2008). Efeitos citotóxicos também foram observados da luteolina em algumas linhagens de células cancerígenas humana, tais como, câncer de pulmão, de cólon, fígado e mama como também foi eficaz na indução da apoptose através da modulação das vias intrínsecas e extrínsecas por meio das proteínas caspase-3 e caspase-7 (ATTOUB *et al.*, 2011).

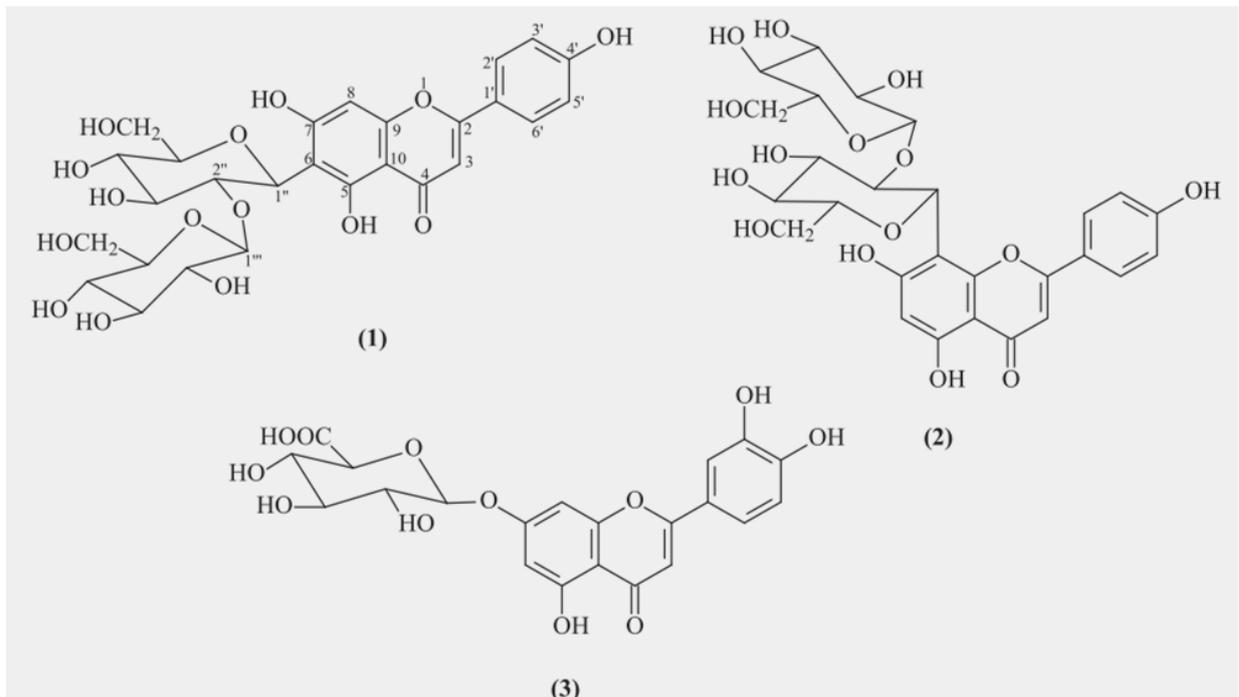


Figura 10. Compostos isolados do extrato aquoso da *Remirea maritima*: (1) Vitexina, (2) Isovitexina e (3) Luteolina. **Fonte:** RABELO *et al.*, 2013.

A Isovitexina e vitexina são flavonas glicosídicas presentes em algumas plantas medicinais e nutracêuticos (CAN; OZKAY; UCEL, 2013). A Isovitexina apresenta um alto potencial antioxidante por meio da inibição da peroxidação lipídica, da redução do peróxido de hidrogênio e da inibição da produção e liberação do fator de necrose tumoral e da prostaglandina E2 (PGE2) em processos inflamatórios induzidos por lipopolissacarídeos em macrófagos de camundongos. Esses achados sugerem que a supressão da COX-2 mediada por RL da isovitexina é benéfica na redução da inflamação e na carcinogênese (HUANG *et al.*, 2005).

A vitexina já demonstrou, em diferentes estudos propriedades antioxidantes (CAO *et al.*, 2011), analgesia de efeito central e periférica, e anti-inflamatória (GORZALCZANY *et al.*, 2011; ÖZKAY; CAN, 2013), antiviral (KNIPPING; GARSSSEN; LAND, 2012) e anticonvulsiva (ABBASI *et al.*, 2012). Além disso, a vitexina também mostrou atividade antitumoral e antimetastática, as quais foram associadas com o processo pró-apoptótica, que é mediada pela diminuição da proporção da proteína Bcl-2/Bax e ativação de caspases (TAN *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2009).

O extrato aquoso *R. maritima* apresentou atividade antioxidante através dos testes de TBARS e NO, como também atividade antinoceptiva e anti-inflamatória, provavelmente, mediado via inibição de mediadores periféricos, como a síntese das prostaglandinas. Estas atividades foram avaliadas através dos testes de contorções abdominais, de formalina, de placa quente, do *rota rod* e da carragenina nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, administradas agudamente por via intraperitoneal (RABELO *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente extratos da *Remirea maritima* e avaliar os efeitos antitumoral, imunomodulador, antioxidante assim como realizar estudo de toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico 40% desta planta.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar quimicamente extratos da *R. maritima*,
2. Realizar triagem da atividade antitumoral *in vitro* de extratos da *R. maritima*,
3. Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* do extrato hidroalcoólico da *R. maritima*,
4. Verificar a atividade imunomoduladora do extrato hidroalcoólico da *R. maritima*,
5. Avaliar a capacidade de indução de apoptose do extrato hidroalcoólico da *R. maritima*,
6. Verificar o efeito do extrato hidroalcoólico da *R. maritima*, sobre os parâmetros toxicológicos durante o tratamento quimioterápico,
7. Avaliar o efeito redox-ativo do extrato hidroalcoólico da *R. maritima* utilizando ensaios *in vitro*,
8. Determinar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da *R. maritima*,
9. Avaliar a toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico da *R. maritima* segundo a ANVISA e a OECD.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Plantas inteira da *R. maritima* foram coletadas em região de praia na cidade de Pirambu, Sergipe, Brasil (10°55'S,35°6'W), em fevereiro de 2011 e foi identificada pela Prof^a. Ana Paula Prata, taxonomista de plantas do departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do departamento de Biologia da UFS sob voucher n° ASE 20166, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. A autorização para a coleta foi obtida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério Brasileiro de Meio Ambiente (# 25637-1).

O material vegetal foi, inicialmente, selecionado, lavado e pesado. Em seguida, foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 dias ou até estabilização da umidade residual. Uma vez procedida à secagem, o material foi submetido à moagem em moinho de facas e o pó obtido foi utilizado no preparo do extrato hidroalcoólico.

4.2 Preparo dos extratos aquoso e hidroalcoólicos da *R.maritima*

Os extratos utilizados da *R. maritima* foram os extratos aquoso (EA), hidroalcoólico 40% (EH40) e o hidroalcoólico a 70% (EH70). Esses extratos foram preparados por decocção em aparelho Soxhlet sob aquecimento (100°C) por 30 minutos, adicionando-se 300 mL de solvente (água, etanol/água 40% ou etanol/água 70%, respectivamente) a 15 g do pó das folhas desidratadas. Em seguida, as suspensões foram filtradas a vácuo. Para o extrato aquoso, o solvente foi liofilizado (vácuo 9999 μHg , condensador: $+95^\circ\text{C}$, Terroni LS 3000) e para os extratos hidroalcoólicos, os solventes foram inicialmente rotaevaporado ($30-50^\circ\text{C}$, 30 minutos, Marconi MA 120) e, depois, liofilizados (vácuo 9999 μHg , condensador: $+95^\circ\text{C}$, Terroni LS 3000).

Desta forma, obteve-se um rendimento de 5,8% do extrato aquoso, de 6,2% do extrato hidroalcoólico a 40% e de 8,6% do extrato hidroalcoólico a 70% da *R. maritima*. Os extratos foram armazenados em dessecador até o momento da utilização.

4.3 Análise química dos extratos da *Remirea maritima*

4.3.1 Preparação das amostras para a análise CL-EM/EM

Os extratos EA, EH40 e EH70 foram diluídos utilizando acetonitrila/água mili-Q 50:50 até concentração final de 1 mg/mL. Em seguida, as diluições foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore-HVHP, MA, EUA) para análise por CL-EM/EM.

4.3.2 Análise química e quantificação dos compostos dos extratos da *R. maritima*

A análise por CLAE foi realizada num sistema Shimadzu[®] que consiste de um desgaseificador DGU-20A3, um amostrador automático SIL-20A, duas bombas LC-20AD e um detector de arranjo de fotodiodos SPD20Avp (DAD), juntamente com uma interface de CBM20A. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica de Phenomenex Luna C18 de 250 x 4,6 mm (tamanho das partículas 5 µm).

A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. O método analítico empregado foi um sistema de gradiente que consistiu em (A) ácido acético: água 1% (v/v) e (B) acetonitrila. A fase móvel consistiu de um gradiente de água e acetonitrila, começando com 10% e terminando com acetonitrila a 60%, e foi corrido, durante 65 min. O gradiente de eluição começou com 20% de B durante 10 minutos, 25-50% de B a 25 minutos, 50 - 55% de B a 30 minutos e 55 - 60% de B a 40 minutos. Um detector de arranjo de fotodiodos foi fixado em 340 nm para a aquisição de cromatogramas.

A quantificação dos compostos, vitexina/isovitexina, luteolina e cafeoyol presentes nos extratos EA, EH40 e EH70 foi feita a partir das curvas de calibração de isovitexina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A análise por espectrometria de massa (EM/EM) foi realizada em espectrômetro de massa Bruker (Walnut Creek, CA, EUA) equipado com fonte "ion trap". O modo de ionização negativa foi utilizado para analisar todos os compostos (m/z [M-H]⁻).

A ionização do "ion trap" foi operada em MRM e as condições foram: pressão de nebulização: 40 psi; fluxo de gás seco: 9 L/min; temperatura de secagem do gás: 300 °C; fluxo volumétrico: 200 mL/min. As análises preliminares foram realizadas com verificação

completa, dependente dos dados digitalizados EM/EM de m/z 150-800. As identidades dos compostos foram obtidas fazendo corresponder os seus íons moleculares (m/z) obtidos por meio de CLAE-EM/EM com os dados da literatura e pelo seu tempo de retenção.

4.3.3 Determinação de Fenóis Totais

A dosagem de fenóis totais foi determinada pelo reagente de Folin–Ciocalteu, seguido de uma versão ligeiramente modificada por Singleton e colaboradores (1999). O EH40 foi diluído para 1 mL de água. Uma alíquota (100 µL) de EH40 foi adicionada a 6 mL de água deionizada e a 500 µL de reagent de Folin–Ciocalteu. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 2 mL de solução Na₂CO₃ 15%, e a mistura foi novamente homogeneizada por 30 segundos. Depois, a solução foi diluída em água deionizada para um volume final de 10 mL e incubada por 2 h em temperatura ambiente (22°C). A dosagem de fenóis totais foi determinada por espectrofotômetro a 750 nm. Ácido gálico foi usado como padrão e o resultado foi expresso como equivalente do padrão (µg/mg de EH40) através da curva de calibração com ácido gálico. A faixa da curva de calibração foi de 20–350 mg/mL ($R^2 = 0,999$).

4.4 Animais

Os camundongos e ratos utilizados para a realização deste trabalho foram obtidos do Biotério Central da UFS, São Cristovão, Brasil. Para avaliação do efeito antitumoral e da atividade imunomoduladora foram utilizados 70 camundongos *Swiss* (machos, 25-30 g). Para avaliação da toxicidade aguda e subaguda foram utilizados 60 ratos *Wistar* de ambos os gêneros (100-150 g).

Todos os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos para experimentação com animais (CEPA – Comitê de Ética para experimentação com Animais) da UFS. Antes dos experimentos, os animais foram previamente aclimatados por período de 3 - 5 dias, mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e com ciclo claro/escuro de doze horas. Os

animais foram mantidos em caixas plásticas com água potável e ração Purina balanceada *ad libitum*, com exceção do período necessário de jejum (pré-administração do extrato e pré-sacrifício dos animais).

Os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Animais sob o protocolo de número 100/2011 para a avaliação do efeito antitumoral e imunoestimulante e, sob o protocolo 17/2011 para os ensaios de toxicidade.

4.5 Determinação da citotoxicidade

4.5.1 Linhagem celular e condições de cultura

As linhagens celulares utilizadas foram a NCI-H385N (Carcinoma brônquio-alveolar humano), OVCAR-8 (Adenocarcinoma de ovário humano), PC-3M (carcinoma de próstata humano), B16F10 (Carcinoma de pele, melanona) e L929 (células normais de fibroblastos). As primeiras linhagens (NCI-H385N, OVCAR-8 e PC-3M) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As outras linhagens (L929 e B16F10) foram cedidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10% (DMEM completo), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

4.5.2 Determinação *in vitro* do efeito dos extratos da *R. maritima* em cultura de células

A inibição do crescimento das células tumorais (NCI-H385N, OVCAR-8 e PC-3M) foi determinada pela habilidade de células viáveis em reduzir o corante amarelo brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) a um produto azul, o formazan, como descrito por Mosmann (1983).

Em todos os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL em 100 μL de meio). Após 24 h, os extratos (0,78 a 50 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados em cada placa e incubado por 72 h. Tanto as células quanto os extratos foram adicionados as placas através do aparelho HTS (*High Throughput Screening*). O EA, EH40 e EH70 foram diluídos em DMSO e as amostras foram testadas em concentrações crescentes em diluição seriada.

Após a incubação, as placas foram centrifugadas e o meio trocado por um novo (150 μL) contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após 3 h, o produto formazan foi dissolvido em 150 μL de DMSO puro e a absorbância foi mensurada por um leitor de placas (DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EUA). O efeito dos extratos foi quantificado como porcentagem da redução da absorbância do controle em 595 nm. A doxorubicina (DOX), um quimioterápico comercialmente disponível, foi utilizada como controle positivo. Este experimento foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Convém ressaltar que apenas o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) mostrou potencial citotóxico *in vitro*, segundo o critério do Instituto Nacional de Câncer Americano adotado em nossos experimentos (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Este critério considera promissores os extratos que apresentem $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ e, portanto, o EH40 foi selecionado para a realização da citotoxicidade com as linhagens L929 e B16F10, assim como também foi conduzido aos ensaios de atividade antitumoral *in vivo*, aos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* e aos testes pré-clínicos de toxicidade.

A atividade citotóxica frente às linhagens L929 e B16F19 foi realizada pelo ensaio do vermelho neutro. Este método baseia-se na captação de corante pelos lisossomos das células viáveis (BORENFREUND *et al.*, 1988; CHIBA *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 2005).

Primeiramente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de 10^5 células/poço e incubadas por 24 h a 37°C e CO_2 a 5%. Em seguida, 20 μL de EH40, em diferentes concentrações (10–360 $\mu\text{g/mL}$) diluído em água foram adicionados nas placas com as culturas de células por 24 h. Soluções controles foram realizadas com suspensão de células adicionadas com água destilada e estéril.

Após o tratamento, as células foram lavadas uma vez com solução salina e, em seguida, foram incubadas durante 3 h com solução de vermelho neutro (50 $\mu\text{g/mL}$ por poço). Posteriormente o meio foi removido e as células foram lavadas rapidamente com 200 μL de uma solução aquosa de formaldeído a 1% e de CaCl_2 1%; e depois lavadas com 200 μL de solução composta de ácido acético 1% e de etanol 50% para extrair o corante. Após agitação, a placa foi transferida para um leitor de microplacas, equipado com um filtro de 540 nm (Cary 50 Bio UV-Visible, Spectrophotometer, Varian, Inc, Melbourne, Austrália) para mensurar a absorbância. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem das células viáveis em

comparação com o grupo controle e o índice seletivo (SI) foi calculado por meio da razão entre o IC₅₀ de células normais e células tipo melanoma (BADISA *et al.*, 2014).

4.6 Atividade antitumoral *in vivo*

4.6.1 Manutenção do tumor Sarcoma 180

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foi realizada com o tumor experimental Sarcoma 180. Estas células tumorais foram obtidas através do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC, Fortaleza, Brasil) e sua manutenção foi realizada na forma ascítica em camundongos (**Figura 11**) na UFS. Esta manutenção foi realizada com a transferência das células de um animal para outro a cada 8-10 dias.



Figura 11. Animal manutenção com células tumorais malignas de Sarcoma 180 mantidas de forma ascíticas. **Fonte:** Própria.

No dia do experimento, o animal de manutenção ou doador foi anestesiado com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela) e eutanasiado por deslocamento cervical. Após assepsia da região abdominal com álcool iodado, coletou-se 0,5 mL do líquido ascítico da cavidade abdominal do animal e transferida para 5,0 mL de Ringer lactato e 0,2 mL de gentamicina (5

mg/mL). Em seguida, a suspensão celular era conduzida para posterior contagem das células através da câmara de Neubauer com o auxílio do corante azul de Tripán (1:1) por meio de microscópio óptico e ajuste da concentração com solução ringer para 2×10^6 células/0,5 mL. Os animais receptores saudáveis foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal.

4.6.2 Determinação do efeito do extrato hidroalcolico da *R. maritima* no crescimento *in vivo* do tumor sólido.

As células tumorais malignas de Sarcoma 180 foram retiradas do abdômen do animal doador ou de manutenção, com 8 a 10 dias de crescimento do tumor ascítico. Inicialmente, o animal doador foi previamente anestesiado e eutanasiado por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita a assepsia com álcool iodado na região abdominal e o líquido ascítico foi retirado, com auxílio de seringa de 5 mL, da cavidade abdominal do camundongo. O líquido ascítico foi transferido para um bécker contendo 5 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do tumor ascítico. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 50 μ L e adicionados 50 μ L de azul de Tripán para contagem em câmara de Neubauer de células tumorais viáveis. As células inviáveis estavam coradas de azul devido à incapacidade de bombear o Tripán para fora da célula e as viáveis sem coloração.

A partir da contagem de células viáveis foi feito o ajuste com solução ringer para uma concentração 2×10^6 células/500 μ L. Após o ajuste, 500 μ L da suspensão de células foram inoculados em camundongos receptores, por via subcutânea, na região axilar esquerda do animal (BEZERRA *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2010). Após 24 horas da inoculação, os tratamentos foram iniciados para avaliar o efeito das drogas sobre o crescimento tumoral. Os animais foram tratados uma vez ao dia por via intraperitoneal ou por via oral durante sete dias consecutivos.

No experimento por tratamento via intraperitoneal, foram utilizados um total de 40 animais, distribuídos em quatro grupos de animais em caixas de polipropileno: grupo controle negativo, controle positivo e dois grupos testes que receberam o EH40 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente. O controle negativo recebeu o mesmo volume de salina e o controle positivo recebeu a droga 5-fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia).

No experimento por tratamento via oral, foram utilizados o mesmo número de animais distribuídos nos mesmos grupos, no entanto, os dois grupos tratados com o EH40 receberam as doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente. O grupo controle negativo recebeu o mesmo volume de água e o controle positivo foi tratado com o quimioterápico ciclofosfamida (10 mg/kg/dia).

No oitavo dia, os animais foram submetidos à anestesia transitória com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela), e amostra de sangue periférico foi coletada pelo plexo orbital para análise hematológica e bioquímica. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o tumor, baço, fígado e rins foram retirados, pesados e examinados macroscopicamente. Por último, o tumor e os órgãos foram armazenados em solução de formaldeído 10% tamponado para análise histológica.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

A = média da massa do tumor no grupo controle negativo

B = média da massa do tumor nos animais tratados

4.6.3 Parâmetros toxicológicos avaliados da atividade antitumoral *in vivo*

Os parâmetros toxicológicos avaliados foram a evolução do peso, o peso relativo dos órgãos, leucograma, análise bioquímica e histologia dos órgãos analisados (baço, rins e fígado).

4.6.3.1 Evolução do peso ponderal e peso médio dos órgãos

A evolução do peso dos animais foi obtida pesando os animais em dois momentos: antes da inoculação do tumor Sarcoma 180 e 24 h após o último dia do tratamento.

Os órgãos tais como fígado, rins e baço foram coletados após a eutanásia dos camundongos e observados macroscopicamente e, em seguida, foram lavados em solução salina 0,9% e pesados em balança analítica.

O peso relativo dos órgãos foi calculado pela seguinte maneira:

$$PR = (\text{peso do órgão} \times 100) / \text{peso do animal}$$

4.6.3.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Amostra de sangue foi coletada pelo plexo orbital através de capilares heparinizados sob anestesia transitória com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela). Os parâmetros hematológicos avaliados foram a contagem de leucócitos totais e a diferencial (eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e monócitos).

Para a contagem dos leucócitos totais, colocou-se 20 μL de sangue em 380 μL de solução Turkey. Em seguida, 20 μL dessa suspensão foram colocados em câmara de Neubauer e os leucócitos totais foram contados. Para a contagem diferencial dos leucócitos, uma gota do sangue total foi acrescentada em lâmina limpa e identificada pra a preparação do esfregaço. Após esfregaço pronto, as lâminas estendidas foram coradas com corantes panóticos e realizadas a contagem diferencial em 100 células contadas por microscópio de luz.

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de soro por meio de automação (Abbott; Architect C 8000) com Kits da Clinical Chemistry[®]. Os parâmetros bioquímicos mensurados foram aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), glicose, proteínas totais, globulina e albumina para investigar alterações da função hepática; e uréia, creatinina, ácido úrico para investigar a função renal.

4.6.3.3 Observação macroscópica e anatomohistopatológica

Após pesados, os órgãos (baço, fígado e rins) foram avaliados macroscopicamente quanto a presença de sinais de lesões, mudança de cor e hemorragias. Em seguida, o tumor e os órgãos tais como o baço, fígado e rins foram armazenados em solução de formaldeído 10% tamponado. Após 72 h, porções do tumor, baço, dos rins e do fígado foram cortados em pequenos pedaços e desidratados em uma série etanólica crescente (70, 80, 95 e 100%), diafanizado em dois banhos de xilol (xilol I e xilol II) e imersos em parafina fundida entre 57-60° C.

Depois, iniciou-se a etapa de inclusão, utilizando-se cápsulas de alumínio, que são preenchidas juntamente com o corte do órgão com parafina liquefeita por aquecimento. Aguardou-se o resfriamento e a conseqüente solidificação do material retido no interior da parafina solidificada. Após esta etapa, os segmentos foram orientados para a obtenção de cortes histológicos (5 µm) paralelos ao longo do eixo do tendão horizontal em micrótomo rotativo.

O material parafinado foi seccionado por uma lâmina de aço no micrótomo. Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar sobre a superfície de água aquecida, em banho-maria, coletados com lâminas de vidro e armazenados na estufa a 37° C por 5 minutos. Após 3 h, iniciou-se a etapa de desparafinação, hidratação e coloração com hematoxilina-eosina.

Inicialmente, os cortes passaram sequencialmente por três soluções de xilol (xilol I, II e III), seguido de soluções etanólicas de concentrações decrescentes (100, 95, 80 e 70%). Em seqüência, as lâminas passaram pela etapa de hidratação com água, seguido pela etapa de hematoxilina, água destilada, eosina, água acética 1% e álcool etílico de concentração crescente (etapa de desidratação). Concluiu-se com dois banhos de xilol (xilol I e II) e, por fim, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá recobrimo a lamínula sobre o corte.

Por último, as lâminas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio (Olympus®), empregando-se luz policromática convencional e polarizada. Para registro dos cortes, os melhores campos foram fotografados e documentados para posterior análise dos resultados.

Os procedimentos anatomohistopatológicos foram realizados com a colaboração do Prof^o. Dr. Ricardo Luiz Cavalcante de Albuquerque Júnior do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) do Instituto Tecnológico de Pesquisa da Universidade Tiradentes (ITP, UNIT), Aracaju, Sergipe, Brasil.

4.7 Análise imunomodulatória

4.7.1 Imunização Subcutânea

Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de cinco animais e imunizados subcutaneamente com dose única. O primeiro grupo foi imunizado com a ovoalbumina (OVA) (2 mg/kg), o segundo grupo com a OVA mais EH40 (2 mg/kg, 25 mg/kg, s.c.) e o terceiro grupo com a OVA mais EH40 (2 mg/kg, 50 mg/kg, s.c.). Para a mensuração da imunização de anticorpos OVA-específico, sangue foi coletado dos animais através de capilares heparinizados sob anestesia transitória com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela). As amostras do soro foram obtidas no 7^o, 14^o e 21^o dias após a imunização. Após a coleta, os sangues foram centrifugados e o soro utilizado para a mensuração do anticorpo específico para OVA.

4.7.2 Mensuração do anticorpo específico para OVA

O anticorpo OVA-específico em soro foi detectado pelo ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA). Para avaliar a habilidade do EH40 em aumentar a resposta elucidada pela ovoalbumina, anticorpo Ig total OVA-específico foi determinado usando OVA (10 µg/poço) em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37° C por 1h e lavadas três vezes com solução salina/tween 0,05%. Em seguida, as placas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em solução salina por 1-2 h a 37° C, lavadas uma vez, depois 100 µl do soro apropriado diluído em solução salina foi adicionado e as placas reincubadas por mais 1-2 h a 37° C. Após a reicunbação, as placas foram lavadas novamente três vezes com solução salina/tween 0,05% e tratadas com anticorpo secundário humano IgG/A/M (100 µl/poço, diluição final de 1:2000) por 1-2 h à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição da solução de TMB (3,3'-tetrametilbenzidina), seguido de incubação por 10 min. A

intensidade da cor resultante foi lida a 650 nm, utilizando um leitor de multiplacas (Synergy Mx, Biotek, USA).

4.8 Detecção de células apoptóticas através da técnica de Tunel (*Terminal deoxynucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*)

Secções histológicas de 5 µm de espessura do tumor de Sarcoma 180 foram incubadas em *in situ cell death detection kit, POD* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o seguinte protocolo.

Inicialmente, os cortes passaram sequencialmente por três soluções de xilol (xilol I, II e III) durante 3 minutos cada, seguido de soluções etanólicas de concentrações decrescentes (100, 95, 80 e 70%) por 2 minutos cada. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada (3 min) e em solução em tampão fosfato salino (PBS) (2 banhos de 3 min). Seguido de recuperação antigênica com citrato de Sódio (10 min em microondas) e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% + álcool metílico (10 min em câmara escura). As lâminas foram lavadas novamente em solução PBS (2 banhos de 3 min) e esperou-se secar para isolamento dos cortes com caneta hidrofóbica. Depois, os tecidos foram incubados com solução contendo nucleotídeos (dUTP) marcados com fluoresceína em câmara úmida escura a 37° C por 1 hora. As lâminas foram novamente lavadas em solução PBS (3 banhos de 3 min), secas em papel toalha e incubadas com anticorpo anti-fluoresceína-POD (câmara úmida escura 37°C (30 min). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas em solução PBS (3 banhos de 5 min cada) e, em seguida, incubadas com solução cromógena reveladora DAB (diaminobenzidina) adicionado de 1,2 µL de peróxido de hidrogênio para ativação do cromógeno (câmara úmida escura). Por último, os cortes foram lavados em água destilada, contra corados com Hematoxilina de Harris (1 min), desidratados em solução etanólica crescente 70, 80 e 90% e absoluto (1 banho de 3 min cada), diafinizados em xilol I e II (1 banho de 3 min cada) e as lâminas montadas em permount.

Após a montagem, foram contadas 1000 células tumorais de Sarcoma 180 para cada animal (n=5) em objetivas de maior aumento (40x) e os dados foram analisados através da frequência de células marcadas dentro das 1000 células tumorais observados. Áreas periféricas, respeitando os limites tumorais, foram priorizadas na análise.

4.9 Atividade Antioxidante *in vitro*

4.9.1 Potencial Total de Antioxidante Reativo (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)

O Potencial de Antioxidante Reativo (TRAP) é baseado na proteção proporcionada por agentes antioxidantes sobre o decaimento da quimioluminescência induzida pelo luminol. O aumento da quimioluminescência pelo luminol é gerado pela reação de luminol com radicais peroxilas produzidos por decomposição térmica de radicais livres de dihidrocloro de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH). Este teste é utilizado para estimar a capacidade antioxidante não enzimática das amostras *in vitro* (DRESCH *et al.*, 2009).

Inicialmente, a solução de AAPH foi preparada adicionando o reagente AAPH em tampão de glicina a 100 mM (pH 8,6) para obter uma solução de concentração final de 120 mM e volume final de 20 mL. Em seguida, adicionou-se ao reagente AAPH 4 µL de luminol (concentração final de 0,001 mM) em câmara escura por 2 h antes da leitura. Diferentes concentrações de EH40 foram adicionadas e a luminescência produzida pela reação dos radicais livres foi quantificada em contador de cintilador líquido (Wallac 1409, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) por 2h. O controle positivo foi considerado a quimioluminescência emitida pela termólise do AAPH sem a presença do extrato. Os resultados foram transformados em área sob a curva (AUC) calculado pelo software (GraphPad[®], San Diego, CA; version 5.0) como descrito anteriormente (DRESCH *et al.*, 2009).

A leitura da Reatividade Antioxidante Total (TAR) foi realizada no mesmo experimento do TRAP e os resultados foram calculados como a razão entre a intensidade da luz na ausência de amostras (I_0)/intensidade de luz após adição de EH40.

4.9.2 Atividade *scavenging* de radical hidroxila

A atividade *scavenging* de radical hidroxila foi determinada pela reação de Fenton. Esta reação mede a habilidade de depuração de radicais hidroxilas geradas pela reação com Fe^{2+} e

H₂O₂ através da quantificação da degradação oxidativa usando 2-deoxi-D-ribose (LOPES *et al.*, 1999). A capacidade antioxidante é indiretamente determinada pela mensuração da quantidade de MDA (malondialdeído) gerado pela reação entre 2-desoxi-D-ribose e radical hidroxila, na presença e na ausência de EH40. A quantidade de MDA gerada foi determinada por absorvância em 532 nm do cromóforo obtido pela reação entre MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) (LOPES *et al.*, 1999).

O sistema de geração de radicais foi iniciado pela adição de 100 µL Fe²⁺ (FeSO₄, concentração final de 6 µM) em solução contendo 100 µL de 2-deoxi-D-ribose 50 mM (concentração final de 5 mM), 100 µL de H₂O₂ 1 mM (concentração final de 100 µM) e 700 µL de tampão fosfato 20 mM (pH 7,2). A mensuração da capacidade antioxidante de *scavenging* de radical hidroxila do EH40 foi realizada adicionando o extrato em diferentes concentrações no sistema antes da adição de Fe²⁺. As reações foram realizadas durante 15 minutos em temperatura ambiente (22° C) e finalizada com a adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) e de 500 µL de TBA 1% (p/v, em 50 mM NaOH). As soluções foram aquecidas durante 15 min a 95° C e, em seguida, esfriadas em temperatura ambiente.

4.9.3 Potencial Antioxidante de Redução de Ferro (FRAP)

Esse ensaio é usado para determinar a capacidade de redução de ferro por agentes antioxidantes. Inicialmente, em câmara escura, adicionou-se 90 µL de EH40 em diferentes concentrações (0,1 a 100 µg/mL) em tubos de ensaio contendo 270 µL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP [2,5 mL de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM, 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM e 25 mL de tampão de acetato 0,3 M, pH 3,6]. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 37°C. A leitura da reação foi determinada por espectrofotômetro a 595 nm e o padrão da curva foi preparado com sulfato ferroso a 5 mM. A determinação da quantidade de Fe²⁺ produzido durante a reação pelo extrato foi calculada através da curva de calibração com o sulfato ferroso (RUFINO *et al.*, 2006).

4.9.4 Teste de quelação do Fe²⁺

A atividade quelante de íons férrico do extrato EH40 foi estimada como descrito previamente por Cheng *et al.* (2013). O EH40 nas concentrações utilizadas (0,1 a 100 µg/mL) foi incubado com 50 µL de FeCl₂ a 2 mM por 10 min. A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de ferrozina 5 mM seguida pela incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. A ferrozina reage com o ferro livre originando um cromóforo vermelho, o qual foi mensurado em absorbância a 562 nm em comparação com o controle negativo (100% de ferro livre). O controle negativo foi realizado da mesma maneira utilizando FeCl₂ e água sem a presença do extrato. A solução de EDTA (100 µg/mL), um agente quelante padrão, serviu como o controle positivo. A atividade quelante de Fe²⁺ foi calculado usando a equação abaixo:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = (1 - \text{Absorbância da amostra/Absorbância do controle}) \times 100$$

4.9.5 Atividade *scavenging* de Óxido Nítrico (NO)

A atividade *scavenging* de NO foi determinada pela decomposição de nitroprusseto sódico em tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4). Esta mistura gera radical de NO que interage com oxigênio para produzir íons nitrito, os quais podem ser determinados pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006). A reação experimental foi realizada com nitroprusseto sódico 10 mM em tampão fosfato (pH 7,4) e concentrações diferentes de EH40 (0,1 a 100 µg/mL), totalizando 1 mL de volume final. Esta mistura foi incubada por 1 h a 37°C e, em seguida, uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL de reagente de Griess. A absorbância da reação foi determinada através da formação de cromóforo e mensurada em 540 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de nitrito formado na presença de extrato em comparação com a formação de nitrito na ausência do mesmo. Esta reação representou 100% da produção de nitrito.

4.9.6 Peroxidação lipídica através de Espécies Reativas com Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio com substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico é empregado para a quantificação da peroxidação lipídica (DRAPER; HADLEY, 1990). O método de TBARS foi utilizado para mensurar a capacidade antioxidante do EH40 utilizando homogenato de gema de ovo como substrato rico em lipídeos.

Inicialmente, a gema do ovo foi homogeneizada (1% p/v) em tampão fosfato a 20 nM (pH 7,4), sonificado em potência 3 e 1 mL da mistura foi misturada com 0,1 mL de EH40 em diferentes concentrações. Em seguida, 0,1 mL de solução de AAPH (0,12 M) foi adicionada como geradora de radicais livres com o objetivo de induzir a peroxidação lipídica.

O controle do experimento foi realizado incubando o homogenato da gema de ovo sem a solução de AAPH. As reações foram incubadas por 30 minutos em 37°C. Em seguida, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (concentração final 10%) em 10000 g durante 10 min. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram homogeneizadas e misturadas com 0,5 mL TBA (0,67%) e aquecidas a 95° C durante 30 min. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotômetro a 532 nm. Esses resultados foram expressos como porcentagem de MDA formados comparados com o controle.

5.0 Toxicidade aguda e subaguda

A avaliação pré-clínica de toxicidade aguda e subaguda foi realizada de acordo com o Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA (ANVISA, MS, 2010) e com a Organização de Desenvolvimento e Cooperação da Economia (OECD, 2008).

5.0.1 Avaliação comportamental, consumo de água e de ração

Na avaliação da toxicidade aguda, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 5 ratos (5 machos e 5 fêmeas tratados com o EH40; 5 machos e 5 fêmeas controle). Os animais tratados receberam uma dose única de 2000 mg/kg, por gavagem oral, após 12 horas

de jejum e foram observados quanto a alterações comportamentais indicativos de toxicidade durante 4 horas após a administração de EH40 e uma vez ao dia durante 14 dias.

Na toxicidade subaguda, os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos de 5 ratos (5 machos e 5 fêmeas tratados com o EH40; 5 machos e 5 fêmeas controles, para cada grupo). A administração do EH40 foi realizada através de doses diárias de 100, 200 e 400 mg/kg, uma vez ao dia por gavagem oral, suspenso em salina (20 mL/kg) durante vinte oito dias consecutivos. O EH40 foi dissolvido em água destilada (20 mL/kg) e os animais controle receberam o volume equivalente de diluente. Todas as fêmeas eram nulíparas e não-gravídicas.

As doses administradas diariamente foram delineadas tendo como base as doses que apresentaram efeito farmacológico ao longo da pesquisa.

Durante o experimento, os animais foram observados quanto às alterações comportamentais indicativos de toxicidade uma vez ao dia, normalmente entre 1 a 3 h após a administração do extrato. Os seguintes efeitos foram observados: a presença de mortes, alterações da atividade motora, alterações de pele, alterações de reflexos, alterações oculares, alterações gastrointestinais, presença de convulsões, de contorções abdominais, de salivação e de piloereção (ALMEIDA, 2006).

A evolução do peso como também o consumo de ração e de água também foram monitorados durante os experimentos.

5.0.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

No 15º dia para a toxicidade aguda e no 29º dia para a toxicidade subaguda, os animais foram colocados de jejum por 12 horas para a coleta do sangue. Os animais foram anestesiados por meio da administração de quetamina (1 g/mL; 0,1 mL/kg de peso, i.p.) e xilazina (2 g/mL; 0,1 mL/kg de peso, i.p.) e as amostras de sangue (4 mL) foram coletadas através da artéria mesentérica superior. Parte do sangue (1 mL) foi rapidamente colocado num tubo contendo o anticoagulante EDTA para realização do hemograma completo em analisador automatizado (BC5380, Mindray) e outra parte da amostra (3 mL) foi, logo em seguida, colocada em tubo seco, centrifugado e o soro utilizado para as dosagens dos parâmetros bioquímicos em analisador automatizado (Abbott; Architect C 8000). Os parâmetros

bioquímicos avaliados foram fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, globulina, albumina, sódio, potássio, triglicérides e colesterol.

5.0.3 Avaliação anátomo e histopatológica

Após a coleta do sangue, todos os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical e autopsiados. Alguns órgãos tais como rins, coração, baço, fígado, encéfalo e pulmão para a toxicidade aguda, e acrescentado a estes estômago, testículos e ovários, para a toxicidade subaguda, foram retirados, lavados com solução salina 0,9%, pesados e avaliados macroscopicamente quanto aos parâmetros morfológicos (dimensão, coloração, consistência, superfície e formato) e patológicos (necrose e alteração tecidual). Logo em seguida, os encéfalos e os baços, na toxicidade aguda, e os fígados, pulmões, rins, baços e encéfalos, na toxicidade subaguda, foram fixados em solução paraformaldeído 10% tamponada e os fragmentos foram submetidos à preparação das lâminas histológicas com coloração por Hematoxilina-eosina (item 4.6.3, subitem 4.6.3.3).

5.1 Urinálise

No final do tratamento subaguda (26^o dia), os animais (n=3) de ambos os gêneros dos grupos controle e tratados com EH40 receberam 5 mL de água por gavagem oral e foram transferidos para gaiolas metabólicas. Urina fresca foi coletada por cerca de 3 h e transferidos para tubos falcons. Neste período, os animais ficaram com água livre e sem ração. Em seguida, a urina foi analisada fisicamente quanto ao volume, aspecto e cor e quimicamente quanto à presença de sangue, corpos cetônicos, glicose, proteína, nitrito, pH, urobilinogênio, densidade, bilirrubina e leucócitos através de fitas reagentes Biocon 10 (Biocon) (**Figura 12**).

A urina foi coletada também continuamente por cerca de 20 h (urina cumulativa) para análise do sedimento através do microscópio óptico (**Figura 12**). Neste período, os animais tiveram acesso livre a ração e a água.

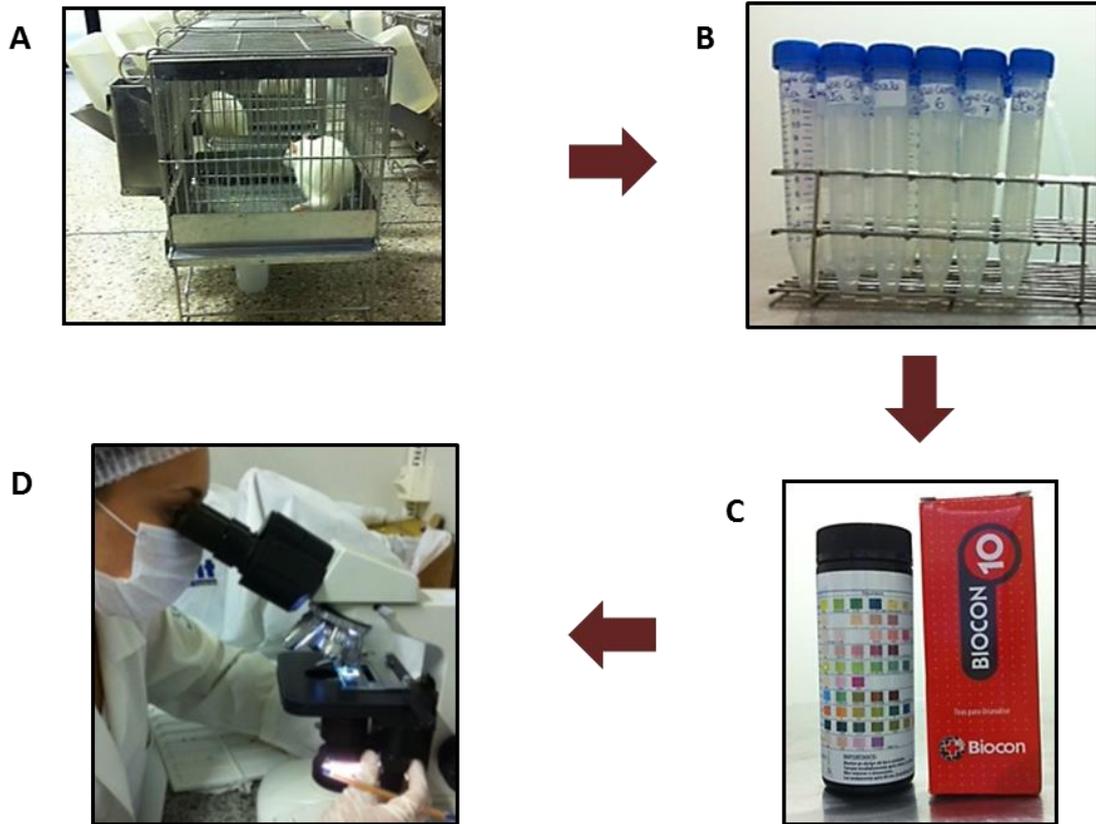


Figura 12. Urinálises. (A) Animais transferidos para a gaiola metabólica para a coleta de urina, (B) Urina transferida para tubos falcons para avaliação física e o volume, (C) Fitas reagentes para análise química, (D) microscopia optica para análise do sedimento.

5.2 Análise estatística

A viabilidade celular será expressa Média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da porcentagem de inibição do crescimento celular. A Concentração Inibitória (IC_{50}) foi calculada por regressão não-linear com Intervalo de confiança de 95%. Os grupos experimentais das atividades foram analisados pelo Teste t ou por ANOVA seguido de pós-teste de Student Newman-Keuls ou Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$, sendo que todos os dados foram analisados pelo Programa GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Identificação e quantificação dos constituintes dos extratos da *Remirea maritima*

A análise de CLAE dos extratos da *Remirea maritima* (EA, EH40 e EH70) revelou a presença de três picos principais analisadas em 340 nm. Foi obtida boa separação dos picos os quais apresentaram grande resolução no mesmo tempo de retenção de cada uma.

Os picos foram identificados de acordo com o tempo de retenção e análise por EM/EM: o pico 1 (P1) foi identificado como uma mistura de isovitexina-2"-*O*- β -D-glucopiranosida e vitexina-2"-*O*- β -D-glucopiranosida (TR = 4 min) com íons $[M-H]^-$ em m/z de 593 $[M-H]^-$; o pico 2 (P2) foi reconhecido como luteolina-7-*O*-glucuronídeo (Rt = 22 min) com íons $[M-H]^-$ em m/z de 461 $[M-H]^-$ (RABELO et al, 2013) e o pico 3 (P3) foi caracterizado como cafeoil-D-glicose (Rt = 28 min) com íon $[M-H]^-$ em m/z de 339 (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012; SHAKYA et al, 2006).

O perfil cromatográfico dos três extratos, os espectros de diodos de cada composto isolado e a estrutura química de cada um estão apresentados na **Figura 13**.

Os outros picos presentes nos cromatogramas exibiram padrões de espectros de UV de derivados de ácido cafeoilquínicos, com bandas de absorção máxima de UV em 340 nm, o que sugere que esta classe de polifenóis pode ser o constituinte principal na fração polifenólica.

Em relação ao conteúdo de compostos identificados nos extratos liofilizados, o EA apresentou a maior quantidade da mistura de isovitexina e vitexina (13%), enquanto o extrato EH40 apresentou o maior conteúdo de luteolina e cafeoil, 11% e 25%, respectivamente. A quantificação dos compostos isolados em cada extrato está presente na **Tabela 2**.

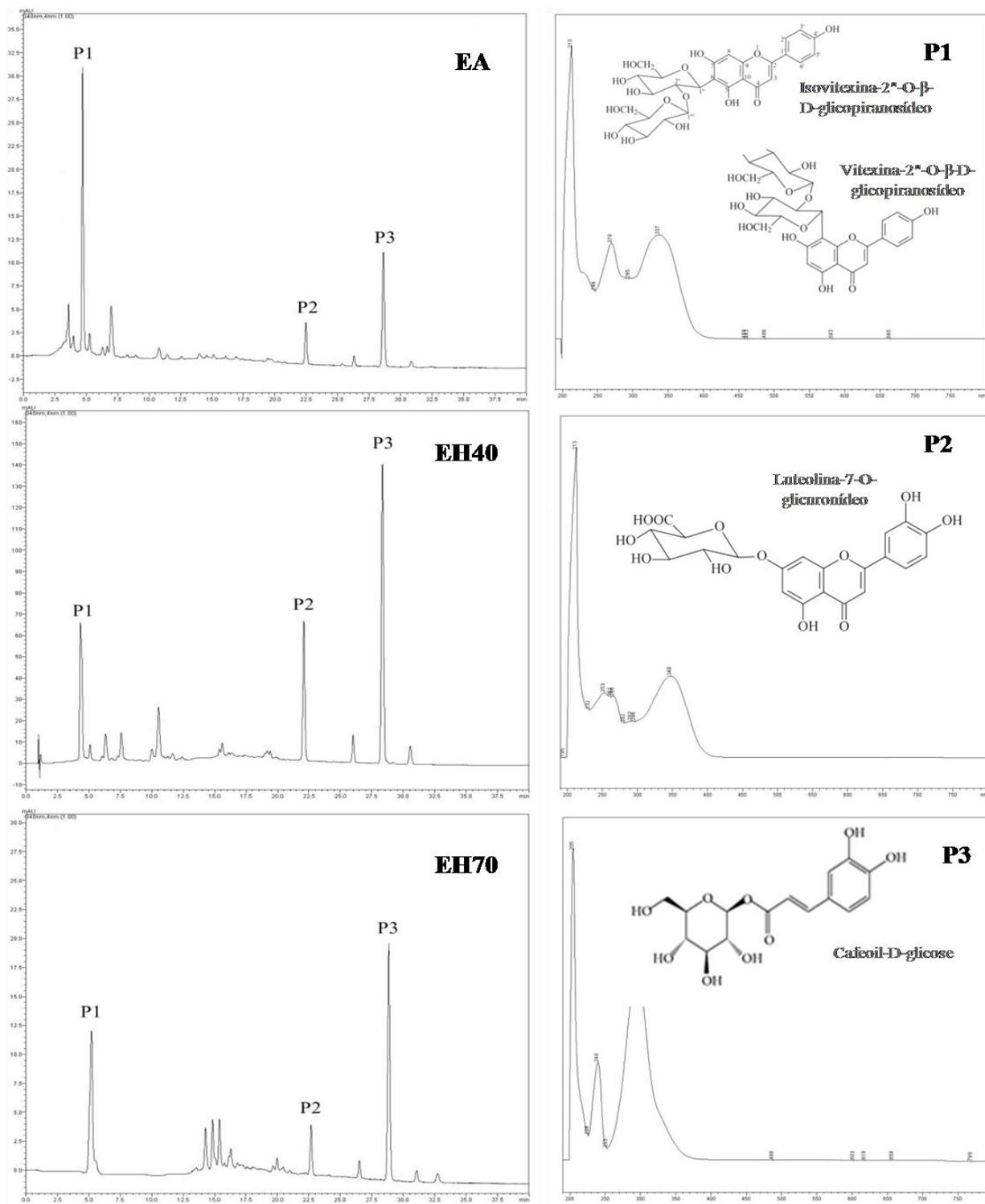


Figura 13. Perfil cromatográfico dos extratos da *Remirea maritima*, espectra diodo dos compostos isolados e as estruturas químicas de cada um (RABELO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2012).

Tabela 2. Quantificação dos compostos isolados dos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólicos 40% (EH40) e 70% (EH70) da *R. maritima*.

Pico	TR (min)*	Compostos	[M – H] ⁻	Quantidade (%)		
				EA	EH40	EH70
P1	4	Isovitexina e vitexina- <i>O</i> -β-D-glucopiranosídeo	m/z 593	13,0	8,6	9,0
P2	22	Luteolina-7- <i>O</i> -glicuronídeo	m/z 461	3,0	11,0	4,3
P3	28	Cafeoil-D-glicose	m/z 339	4,9	25,0	11,4

*TR - tempo de retenção.

5.2 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação de fenóis totais do EH40 foi analisada pelo Folin-Ciocalteu e estimado pelo conteúdo equivalente químico através da comparação com o composto fenólico padrão (ácido gálico). O teor de fenóis totais desse extrato foi de 582,5 mg de equivalentes fenólicos (ácido gálico) por grama de EH40 extrato. Este conteúdo representa 58,25% de teor de fenóis, dos quais 44,6% consistem dos flavonoides isolados: vitexina e isovitexina (8,6%), luteolina (11%) e cafeoil (25%); e 13,65% representam compostos polifenólicos.

5.3 Atividade antitumoral *in vitro*

Os resultados da taxa de inibição do crescimento das três linhagens de células tumorais humanas frente aos extratos (EA, EH40 e EH70) da *R. maritima* estão apresentados na **Tabela 3**.

Segundo o critério do Instituto Nacional de Câncer Americano adotado em nossos experimentos, extratos que apresentam $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ são considerados promissores (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Portanto, somente o EH40 apresentou atividade citotóxica, com valores de IC_{50} de 27,08, 46,62 e $>50 \mu\text{g/mL}$ para OVCAR-8, NCI-H385M e PC-3M, respectivamente. A doxorubicina foi usada como controle positivo e apresentou valores de

IC₅₀ de 0,85, 1,19 e 1,58 µg/mL para as linhagens de NCI-H385M, OVCAR-8 e PC-3M, respectivamente. O EA e o EH70 não apresentaram nenhuma atividade citotóxica significativa *in vitro* em níveis de exposição utilizadas nesse experimento. O resultado da citotoxicidade do EH40 está expresso como valor de IC₅₀ e intervalo de confiança de 95% presente na **Tabela 4**. Desta forma, o EH40 foi considerado ativo e foi conduzido ao teste antitumoral *in vivo*.

Tabela 3. Percentual de inibição do crescimento celular (%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL. Valores: média ± DPM.

Células tumorais	EA	EH40	EH70
NCI-H385M	16,13 ± 5,38%	47,34 ± 1,65%	26,47 ± 1,65%
OVCAR-8	-15,29 ± 0,71%	81,83 ± 6,21%	-2,24 ± 13,04%
PC-3M	33,28 ± 5,26%	22,46 ± 9,01%	35,54 ± 3,19%

NCI-H385M - Carcinoma broncoalveolar; OVCAR-8 - adenocarcinoma ovariano; PC-3M - Carcinoma prostático metastásico.

Tabela 4. IC₅₀ da atividade antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*.

Células tumorais	Histotipo	EH40 (µg/mL)	Doxorrubicina
NCI-H385M	Carcinoma	46,62	0,85
	Broncoalveolar	40,59 – 53,53	0,56 – 1,30
OVCAR-8	Adenocarcinoma	27,08	1,19
	Ovariano	24,97 – 29,36	0,90 – 1,56
PC-3M	Carcinoma prostático	>50	1,58
	mestastásico		1,07 – 2,36

Dados estão apresentados com valores de IC₅₀ values e o intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não-linear de quatro experimentos independentes (n=4). Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Diante do resultado acima, a avaliação da citotoxicidade do EH40 também foi realizada em linhagens de células normais de fibroblastos L929 e em célula tumoral tipo melanoma B16F10. O percentual de células viáveis do EH40 em células de fibroblastos L929 e em

células tipo melanoma B16F10, estão apresentados na **Figura 14**. Observa-se que o EH40 na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ reduziu, aproximadamente, 50% de células viáveis de fibroblastos, enquanto que nesta mesma concentração houve redução de apenas 30% de células tumorais B16F10. O valor da IC_{50} em células normais L929 foi de 70,96 $\mu\text{g/mL}$ (65,59 - 77,96) e em células tumorais B16F10 foi de 108,30 $\mu\text{g/mL}$ (101,90 - 115,00), apresentando valor de SI de 0,65. Portanto, os resultados mostraram que, embora o EH40 tenha apresentado uma significativa redução de células viáveis de B1610 nas concentrações de 80 a 320 $\mu\text{g/mL}$, este extrato não foi seletivo para o câncer de pele tipo melanoma quando comparado para as células de fibroblastos normais.

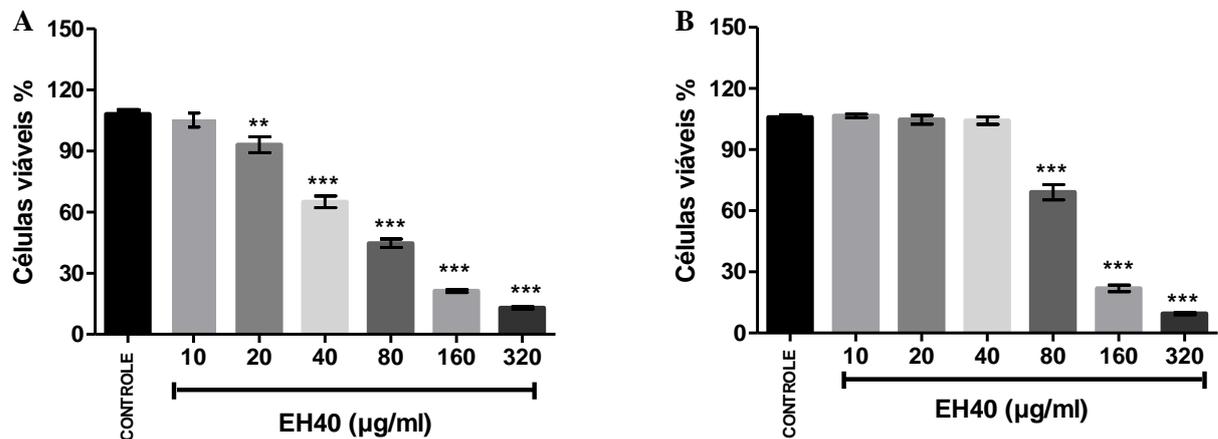


Figura 14. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* na viabilidade das células em diferentes concentrações em meio de reação avaliada pelo ensaio do Vermelho Neutro. (A) L929 - células de fibroblastos e (B) células de melanoma B16F10. O grupo controle foi utilizado água destilada (1:1). Dados apresentados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados com o controle negativo por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.3 Atividade antitumoral *in vivo*

O efeito antitumoral do EH40 foi determinado através da utilização do tumor experimental Sarcoma 180 e está apresentado na **Figura 15**. Observou-se redução significativa no peso do tumor dos animais tratados intraperitonealmente com EH40, em ambas as doses (25 and 50

mg/kg) ($p < 0,05$) em comparação ao controle negativo. No oitavo dia, a média do peso do tumor dos animais do grupo controle inoculados com Sarcoma 180 foi de $1,59 \pm 0,14$ g, enquanto os animais tratados com o EH40 apresentaram peso médio do tumor de $0,68 \pm 0,09$ e $0,59 \pm 0,06$ g e uma taxa de inibição de 57,16% e 62,57% nas doses de 25 e 50 mg/kg (i.p.), respectivamente. A administração de 5-FU reduziu significativamente o peso do tumor em 77,50% no mesmo período.

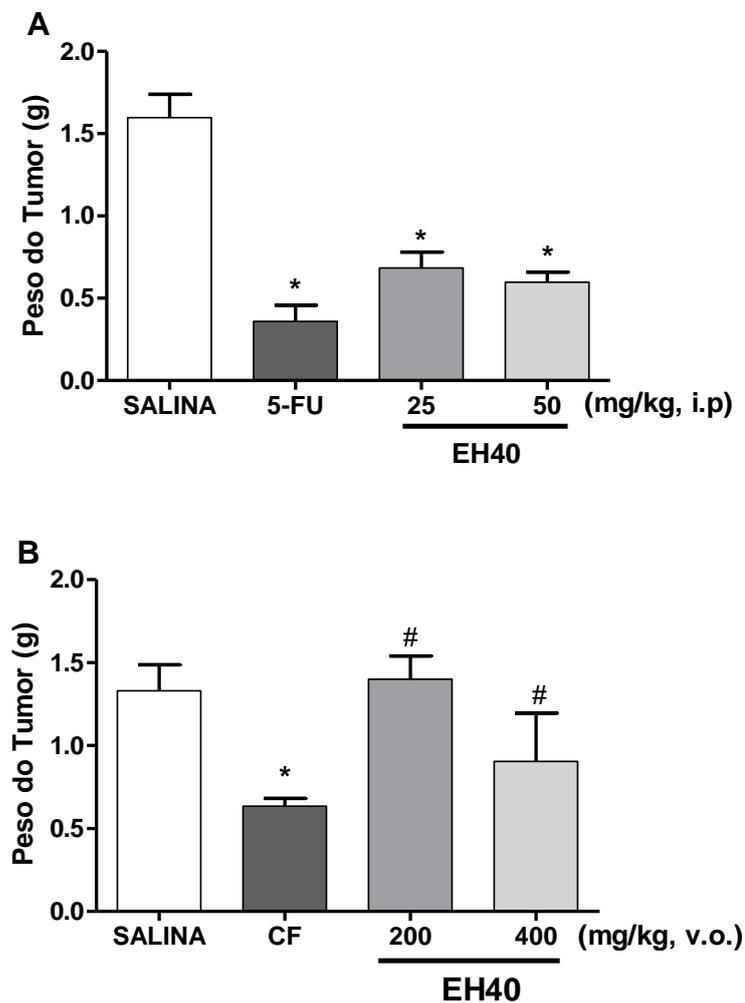


Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* na inibição do crescimento do tumor Sarcoma 180 em camundongos transplantados. (A) Tratamento por via intraperitoneal, (B) Tratamento por via oral. 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg, i.p.) e ciclofosfamida (CF, 10 mg/kg, v.o.) foram utilizados como controle positivo e o controle negativo recebeu salina. Dados estão apresentados como Média \pm E.P.M. de 10-17 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina, # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle positivo, por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student–Newman–Keuls.

Convém ressaltar que não houve diferença significativa entre o peso do tumor dos grupos tratados com EH40 em ambas as doses (25 e 50 mg/kg, i.p.) e o peso do tumor dos animais tratados com o quimioterápico 5-FU.

A atividade antitumoral do EH40 frente ao tumor Sarcoma 180 foi avaliada também por via oral. Por esta via não houve redução significativa do peso relativo do tumor dos animais tratado com o EH40 nas doses de 200 e 400 mg/kg em relação ao grupo controle negativo (**Figura 15**).

5.4 Parâmetros toxicológicos avaliados durante a atividade antitumoral *in vivo*

Os parâmetros toxicológicos avaliados foram a evolução do peso, o peso relativo dos órgãos, leucograma, análise bioquímica e histologia dos órgãos analisados (baço, rins e fígado).

A evolução do peso corpóreo e o peso relativo dos órgãos analisados dos animais com tumor Sarcoma 180, tratados por via intraperitoneal, estão expressos na **Tabela 5**. Não houve alterações significativas na evolução do peso dos animais tratados com o EH40 em ambas as doses (25 e 50 mg/kg/dia).

Após o tratamento intraperitoneal com EH40 durante sete dias consecutivos, também não houve mudanças significativas no peso relativo do fígado e dos rins dos animais inoculados com o Sarcoma 180. Entretanto, o peso relativo do baço apresentou aumento significativo quando comparado com o grupo controle negativo na dose de 25 mg/kg ($p < 0,05$). Em contrapartida, o grupo que recebeu 5-FU mostrou uma redução significativa do peso relativo do baço (**Tabela 5**).

Na análise de leucócitos total e diferencial de animais transplantados com o tumor Sarcoma 180, ambos os tratamentos com EH40 não induziu mudanças significativas. No entanto, o grupo tratado com 5-FU apresentou redução significativa na contagem dos leucócitos totais ($p < 0,05$) e dos neutrófilos ($p < 0,01$) em relação ao grupo tratado com salina assim como houve aumento significativo dos linfócitos ($p < 0,05$) (**Tabela 6**).

O tratamento por via oral com o EH40 com as doses de 200 e 400 mg/kg/dia durante sete dias consecutivos não apresentou alteração significativa em relação a evolução do peso e peso

relativo dos órgãos avaliados (**Tabela 5**). O tratamento do EH40 por via oral também não alterou os parâmetros leucocitários (**Tabela 6**).

Tabela 5. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* no peso corpóreo e no peso relativo dos órgãos analisados de camundongos com tumor Sarcoma 180.

Tratamento (i.p.)	Salina	EH40		5-FU
		25 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg
Parâmetros				
Evolução do peso corpóreo (g)	1,55 ± 1,40	2,00 ± 1,51	1,20 ± 1,65	0,60 ± 1,04
Fígado (g/100 g)	5,70 ± 1,43	6,22 ± 1,63	6,40 ± 1,64	5,65 ± 1,06
Rim (g/100 g)	1,60 ± 0,37	1,91 ± 0,45	1,73 ± 0,39	1,67 ± 0,24
Baço (g/100 g)	0,62 ± 0,17	0,84 ± 0,26*	0,74 ± 0,25	0,44 ± 0,19*

Tratamento (v.o.)	Salina	EH40		CF
		200 mg/kg	400 mg/kg	10 mg/kg
Parâmetros				
Evolução do peso corpóreo (g)	3,43 ± 0,92	5,40 ± 3,37	4,33 ± 1,60	3,24 ± 1,35
Fígado (g/100 g)	8,62 ± 1,22	6,28 ± 0,73	7,12 ± 0,64	7,10 ± 1,00
Rim (g/100 g)	1,73 ± 0,09	1,96 ± 0,25	1,87 ± 0,14	1,92 ± 0,25
Baço (g/100 g)	1,23 ± 0,84	0,82 ± 0,12	1,26 ± 0,20	0,86 ± 0,09

5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg, i.p) e ciclofosfamida (CF, 10 mg/kg, v.o.) foram usados como controle positivo no tratamento via intraperitoneal e via oral, respectivamente, e o controle negativo foi tratado com salina. Os animais foram tratados por via intraperitoneal por sete dias consecutivos. Dados apresentados como Média ± E.P.M. de 5-17 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student–Newman–Keuls.

Tabela 6. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 na contagem dos leucócitos total e diferencial em sangue periférico.

Tratamento (i.p.)	Salina	EH40		5-FU
		25 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg
Parâmetros				
Leucócitos Totais (10 ³ cél/μL)	15,30 ± 2,99	21,00 ± 2,66	16,40 ± 5,53	5,20 ± 3,83*
Neutrófilos (%)	41,00 ± 4,60	47,60 ± 5,60	44,80 ± 4,99	25,80 ± 6,10**
Linfócitos (%)	42,80 ± 3,49	45,40 ± 5,94	52,20 ± 6,07	68,20 ± 4,31*
Monócitos (%)	2,80 ± 0,58	4,40 ± 0,74	2,20 ± 0,73	3,60 ± 1,91
Eosinófilos (%)	0,20 ± 0,20	1,20 ± 0,37	1,20 ± 0,20	1,80 ± 0,48

Tratamento (v.o.)	Salina	EH40		CF
		200 mg/kg	400 mg/kg	10 mg/kg
Parâmetros				
Leucócitos Totais (10 ³ cél/mL)	6,38 ± 0,49	8,81 ± 1,57	9,36 ± 0,48	5,18 ± 1,16
Neutrófilos (%)	29,10 ± 3,56	33,26 ± 3,80	28,45 ± 2,46	34,69 ± 1,70
Linfócitos (%)	66,85 ± 4,98	66,24 ± 4,34	66,76 ± 2,35	61,37 ± 2,88
Monócitos (%)	2,14 ± 0,18	1,60 ± 0,51	2,98 ± 0,62	2,76 ± 1,46
Eosinófilos (%)	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,54 ± 0,07

5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg, i.p.) e ciclofosfamida (CF, 10 mg/kg, v.o.); foram usados como controle positivo no tratamento via intraperitoneal e via oral, respectivamente, e o controle negativo foi tratado com salina. Os animais foram tratados por via intraperitoneal por sete dias consecutivos. Dados apresentados como Média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student–Newman–Keuls.

Os parâmetros bioquímicos mensurados foram o aspartate aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcaline, proteína totais, globulina e albumina para investigar alterações funcionais hepáticas. Uréia, ácido úrico e creatinina foram utilizados como parâmetros para avaliação renal.

Nenhuma mudança significativa foi observada em parâmetros renais e hepáticos em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados com EH40 em ambos os tratamentos, 25 e 50 mg/kg (i.p.), em comparação com o grupo salina (**Tabela 7**). Os animais

tratados com 5-FU apresentaram redução significativa de ALT e AST quando comparado com o grupo do controle negativo (**Tabela 7**).

A análise histológica foi realizada com o tumor e os órgãos analisados: baço, fígado e rim. A histologia do tumor apresentou intenso pleomorfismo celular e nuclear (**Figura 16**). Invasão muscular, mitoses, coagulação, necrose e presença de células tumorais dentro de vasos sanguíneos também foram observadas no grupo tratado com a salina. Os tumores removidos do grupo tratado com o 5-FU (25 mg/kg, i.p.), adicionalmente, observou-se invasão da bainha perineural de fibras nervosas periféricas pelas células tumorais (**Figura 16**).

Nas seções histológicas do baço, observou-se moderado aumento qualitativo da polpa branca nos grupos tratados com EH40 nas doses de 25 e 50 mg/kg (i.p.) e marcante atrofia no grupo tratado com 5-FU. Adicionalmente, também se observou discreto aumento qualitativo do número de megacariócitos nos grupos tratados com EH40 nas doses de 25 e 50 mg/kg (i.p.) em comparação com os grupos tratados com Salina e 5-FU (**Figura 17**).

A **Figura 18** apresenta a histologia do fígado dos grupos e não foi observada nenhuma diferença morfológica entre os mesmos. Nestas figuras, observam-se os cordões de hepatócitos intactos enfileirados convergindo à veia centro-lobular (asterisco), com núcleo e citoplasmas sem alteração morfológica.

Na histologia renal também não se observou alterações histopatológicas relativos ao tratamento com o EH40. Nestas figuras, observam-se glomérulos constituídos de enovelados capilares envoltos pela cápsula de bowman (seta) e os tubos proximais e distais sem alteração histopatológicas (**Figura 19**).

Tabela 7. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 nos parâmetros bioquímicos.

Tratamento (i.p.)	Salina	EH40		5-FU
		25 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg
Parâmetros				
ALT/TGP (U/L)	77,15 ± 7,42	64,40 ± 7,20	69,20 ± 4,28	39,67 ± 2,64*
AST/TGO (U/L)	286,40 ± 21,31	250,20 ± 23,98	207,80 ± 9,73	195,20 ± 10,64*
FA (mg/dL)	65,50 ± 7,13	71,40 ± 7,86	71,20 ± 10,43	91,11 ± 10,19
PT (mg/dL)	4,80 ± 0,15	4,70 ± 0,17	4,66 ± 0,12	5,44 ± 0,39
Albumina (mg/dL)	2,22 ± 0,06	2,22 ± 0,03	2,12 ± 0,05	2,40 ± 0,08
Globulina (mg/dL)	2,58 ± 0,09	2,56 ± 0,13	2,54 ± 0,11	3,04 ± 0,37
Creatinina (mg/dL)	0,31 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,32 ± 0,01
Uréia (mg/dL)	36,62 ± 2,27	36,00 ± 3,78	29,00 ± 3,22	35,10 ± 2,72
Ác. Úrico (mg/dL)	2,46 ± 0,17	3,50 ± 0,23	3,32 ± 0,43	2,78 ± 0,33

Tratamento (v.o.)	Salina	EH40		CF
		200 mg/kg	400 mg/kg	10 mg/kg
Parâmetros				
ALT/TGP (U/L)	67,40 ± 7,34	60,60 ± 8,42	53,28 ± 2,98	51,40 ± 3,76
AST/TGO (U/L)	240,20 ± 23,95	221,80 ± 13,51	233,57 ± 15,00	180,40 ± 13,51
Albumina (mg/dL)	2,20 ± 0,10	2,14 ± 0,10	2,30 ± 0,08	2,02 ± 0,10
Creatinina (mg/dL)	0,35 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,34 ± 0,00
Uréia (mg/dL)	50,00 ± 6,8	41,00 ± 5,11	48,50 ± 2,94	34,40 ± 2,29

AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase; FA – Fosfatase Alcalina; PT – proteínas Totais; 5-Fluorouracil (5FU, 25 mg/kg/dia, i.p.) foi usado como controle positivo. Controle negativo foi tratado com Salina. Tratamento iniciado um dia após a implantação do tumor. Os animais foram tratados por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos. Os dados estão apresentados como Média ± E.P.M. de 10-13 animais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Salina por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student–Newman–Keuls.

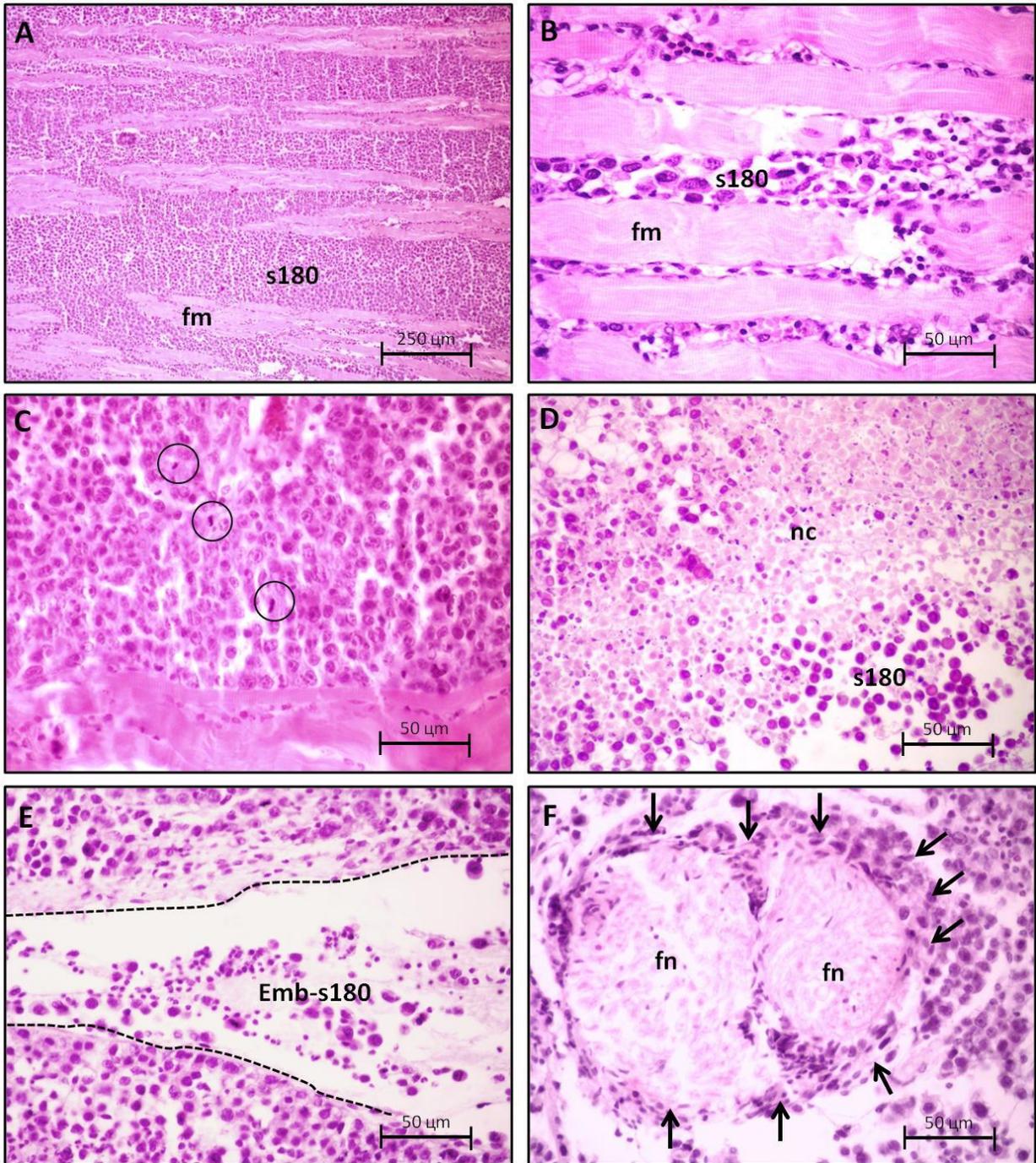


Figura 16. Fotomicrografias de secções histológicas de espécimes tumorais de Sarcoma 180 (5,0 μm) coradas em HE. (A) e (B) Células tumorais (S180) arranjadas em lençóis, permeando e dissociando fibras musculares estriadas esqueléticas (fm). (C) Figuras de mitose, (D) focos de necrose coagulativa (nc) de animais tratados com o EH40. (E) formação de êmbolos tumorais (Emb-s180) no interior de vasos sanguíneos (linha tracejada) em tumor de grupo tratado com Salina. (F) Invasão da bainha perineural de fibras nervosas periféricas (fn) pelas células tumorais (setas) em espécime tratado com 5-FU (25 mg/kg, i.p.) (HE, A – 100 x; B/C/D/E/F – 400 x).

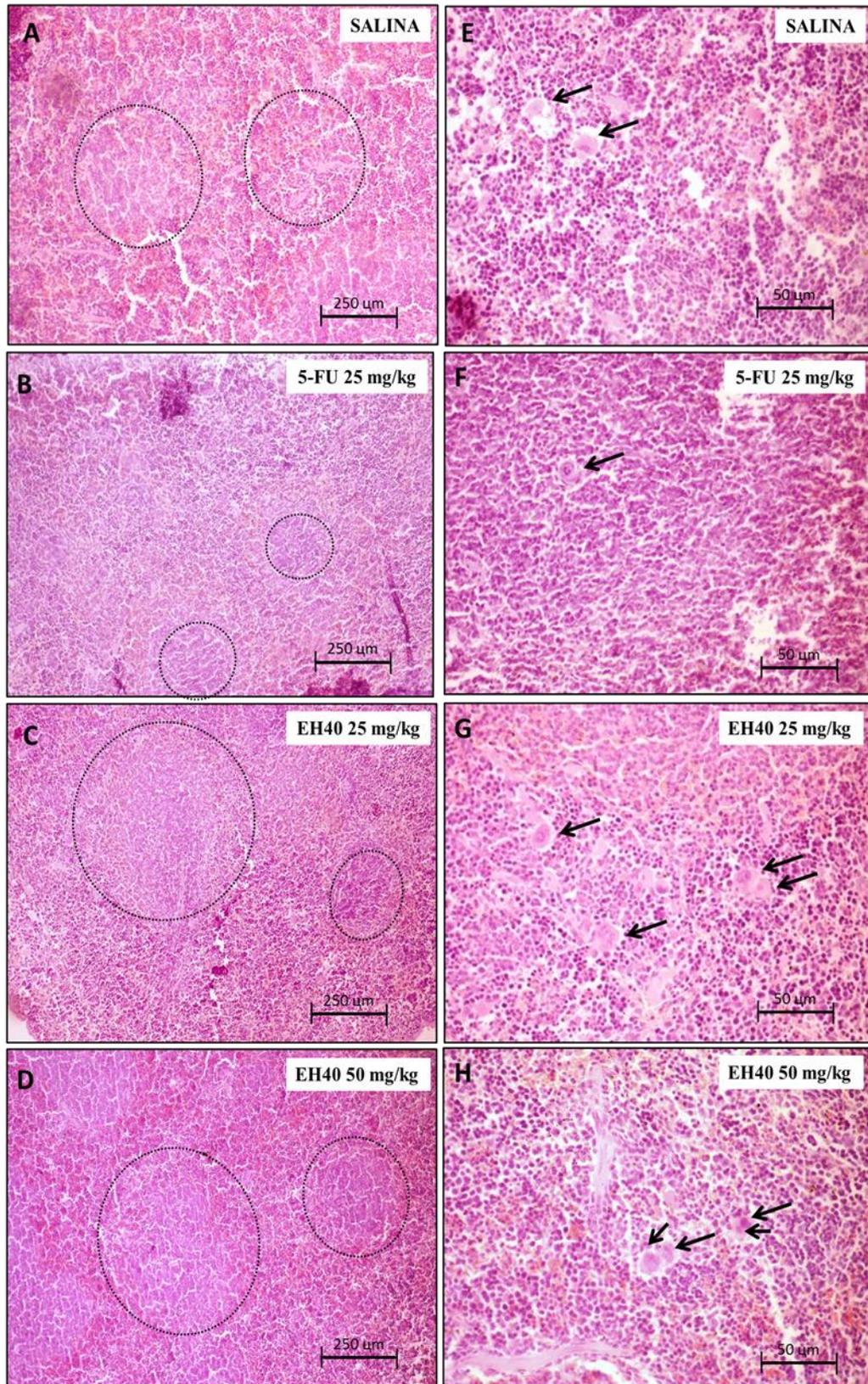


FIGURA 17. Secções histológicas de baço (5,0 μm), destacando os limites da polpa branca (círculos pontilhados) e a presença de megacariócitos (setas). 5-Fluorouracil (25 mg/kg, i.p.) foi usado como controle positivo e o controle negativo recebeu salina (HE, A/B/C/D – 100 x; E/F/G/H – 400 x).

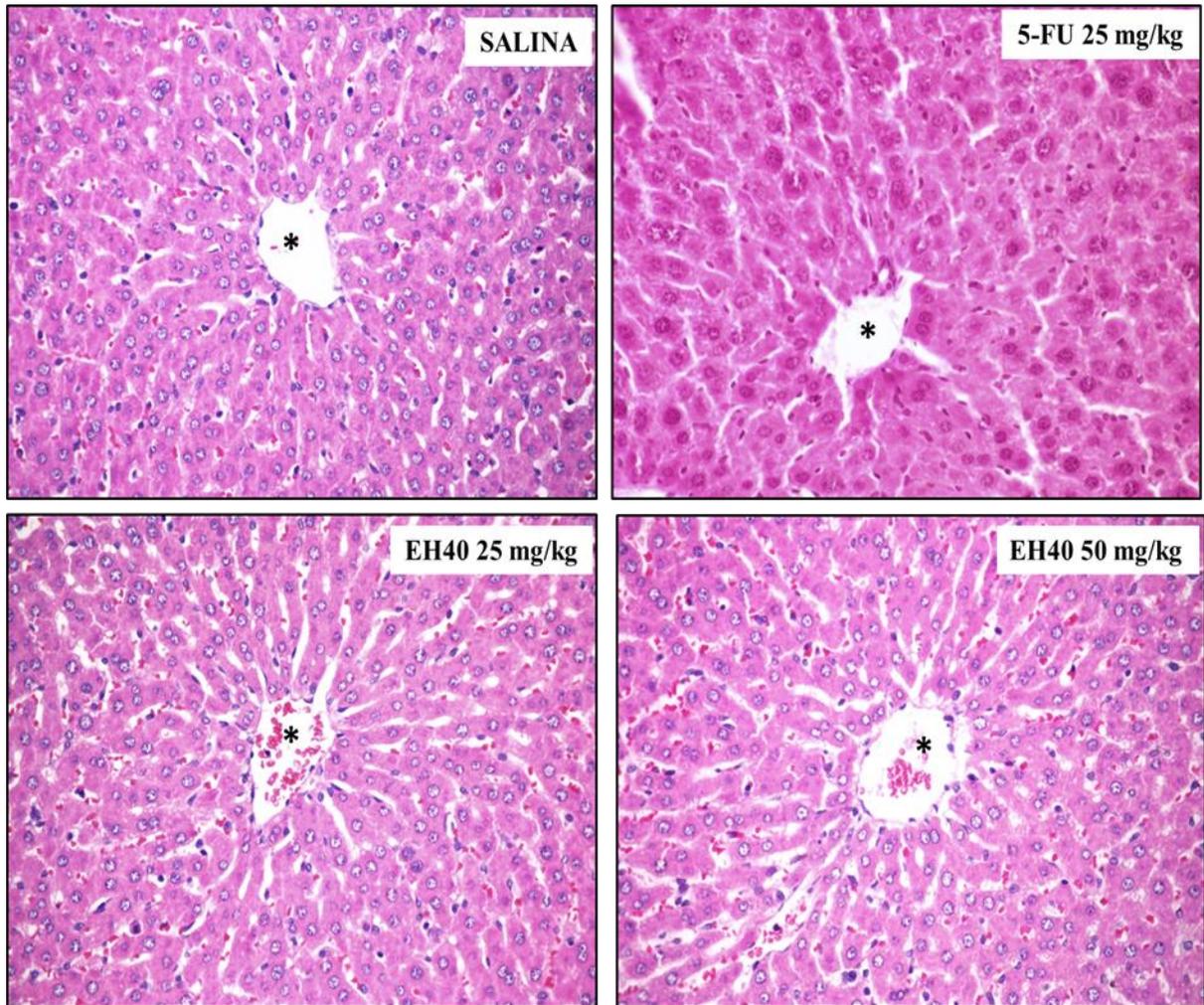


Figura 18. Fotomicrografias representativas da histologia do fígado de camundongos inoculados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*. Hepatócitos intactos convergindo à veia centro-lobular (*). 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg, i.p.) foi usado como controle positivo e o controle negativo recebeu salina (HE, 400 x).

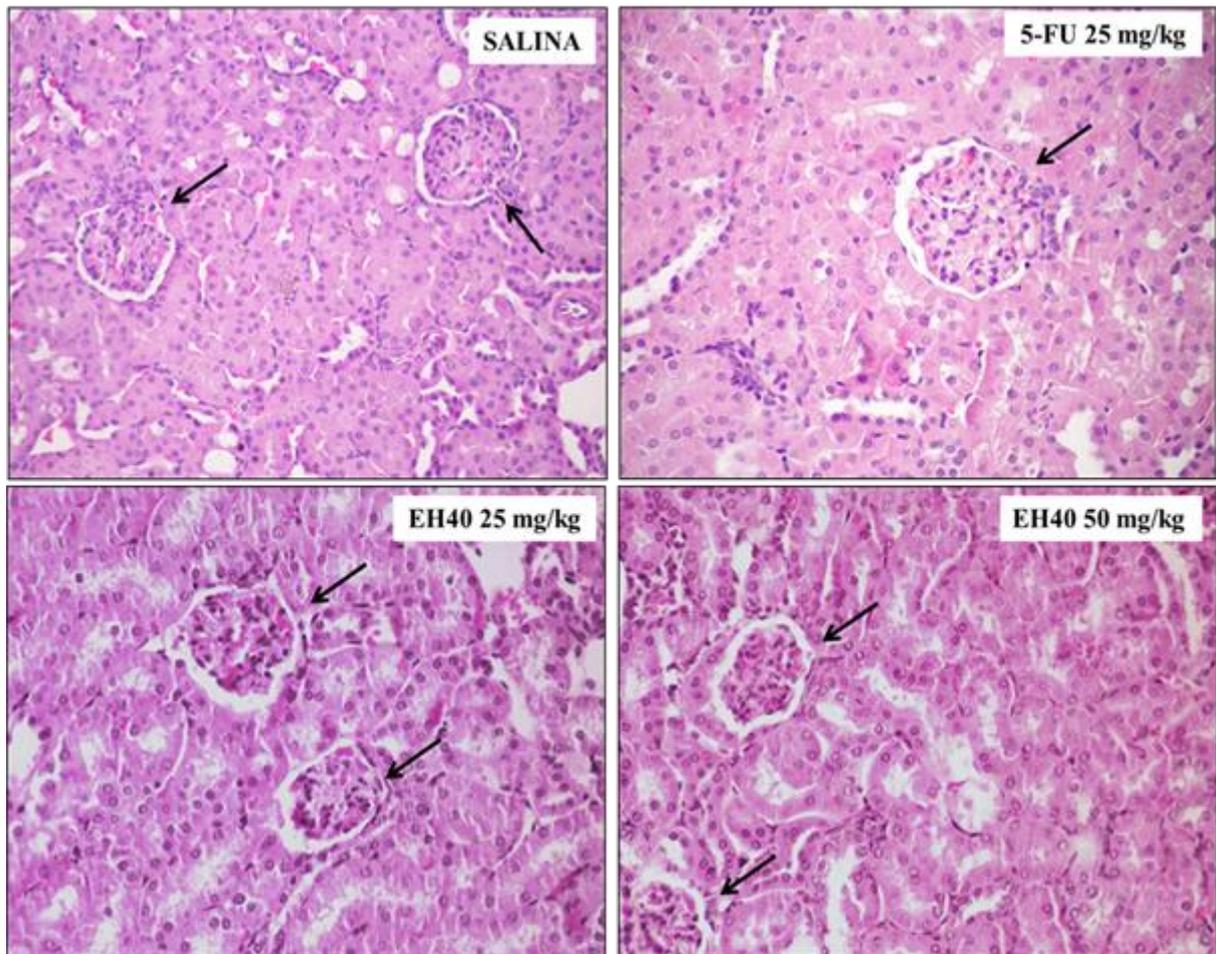


Figura 19. Fotomicrografias representativas da histologia do rim de camundongos inoculados com o tumor Sarcoma 180 e tratados com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*. Glomérulos constituídos de enovelados capilares envoltos pela cápsula de bowman (seta). 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg, i.p.) foi usado como controle positivo e o controle negativo recebeu salina (HE, 400 x).

5.5 Atividade Imunoestimulante

Para investigar o efeito do EH40 na indução da resposta imunohumoral, camundongos foram imunizados com uma dose única de OVA (2 mg/kg), OVA (2 mg/kg) mais EH40 (25 mg/kg), e OVA (2 mg/kg) mais EH40 (50 mg/kg). A quantificação dos anticorpos específicos no soro foi mensurada nos dias 7, 14 e 21 após a imunização, na diluição de 1:20 por ELISA. Os resultados estão apresentados na **Figura 20**. O EH40 aumentou significativamente a quantidade de Ig total específico para OVA nos animais tratados na dose de 50 mg/kg (i.p.) comparado com o grupo imunizado somente com a OVA ($p < 0,05$).

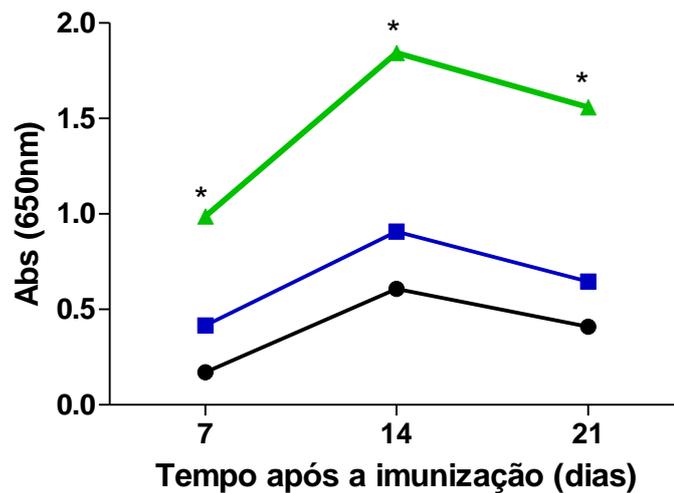


Figura 20. Efeito do EH40 na indução da resposta imune humoral. Camundongos foram imunizados subcutâneamente com dose aguda de Ovoalbumina (OVA 2 mg/kg, ●), (OVA 2 mg/kg) mais EH40 (25 mg/kg, ■) e OVA (2 mg/kg) mais EH40 (50 mg/kg, ▲). O soro foi coletado no 7, 14 e 21º dia após a imunização. A produção de anticorpos para ovoalbumina específica foi determinado por ELISA na diluição de 1:20, em 650 nm. Dados estão apresentados como Média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ comparado com o grupo pré-imunizado com OVA, por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student–Newman–Keuls.

5.6 Detecção de células apoptóticas através da técnica de Tunel

A morte celular apoptótica foi detectada nos tumores removidos de todos os grupos experimentais, utilizando o ensaio TUNEL (**Figura 21**). Células TUNEL-positivas mostraram núcleos marrom-manchado e foram encontrados em todos os grupos. No entanto, o número médio de núcleos castanhos coradas foi significativamente aumentado no grupo 5-FU e em ambos os grupos tratados com EH40 quando comparado com o grupo de controle ($p < 0,05$).

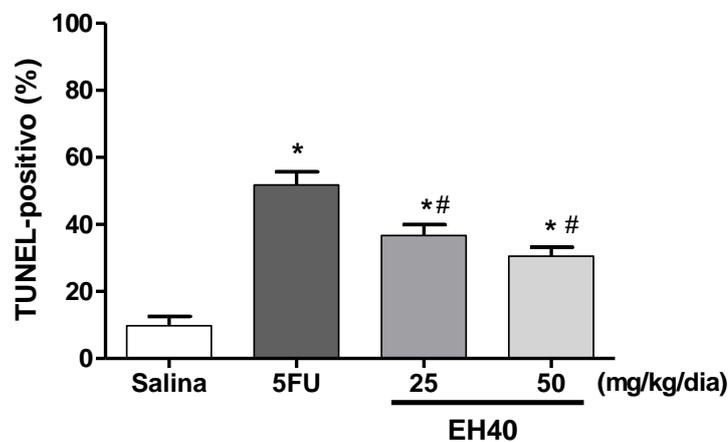


Figura 21. Efeito do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima in situ* de marcação celular apoptótica realizado pelo ensaio do TUNEL. Taxa de aumento de células marcadas pelo TUNEL em camundongos tratados com EH40. Mil células foram contadas. 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo recebeu salina. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina, # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle positivo, por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student–Newman–Keuls.

5.8 Atividade antioxidante *in vitro*

5.8.1 Potencial Total de Antioxidante Reativo (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)

A capacidade antioxidante geral do EH40 foi avaliada pela primeira vez por TRAP e TAR. O EH40 foi capaz de manter a produção de RL induzida por AAPH inibida durante 120 min (ensaio TRAP) em todas as concentrações testadas (0,001 a 100 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 22A**). Em relação à mensuração do TAR, EH40 mostrou alta eficiência em inibir a formação de RL induzida por AAPH quando imediatamente adicionado ao sistema, nas concentrações que variam de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo que na maior concentração, essa capacidade foi mais eficaz do que o controle positivo (**Figura 22B**).

Na **figura 22A**, podemos observar que nas concentrações de 0,001 a 0,01 $\mu\text{g/mL}$ o EH40 apresentou comportamento cinético antioxidante adequado, mas baixa qualidade antioxidante, quando as medições de TAR foram analisadas (**Figura 22B**), assim justificando a razão que tais concentrações foram escolhidas para as outras análises descritas neste estudo.

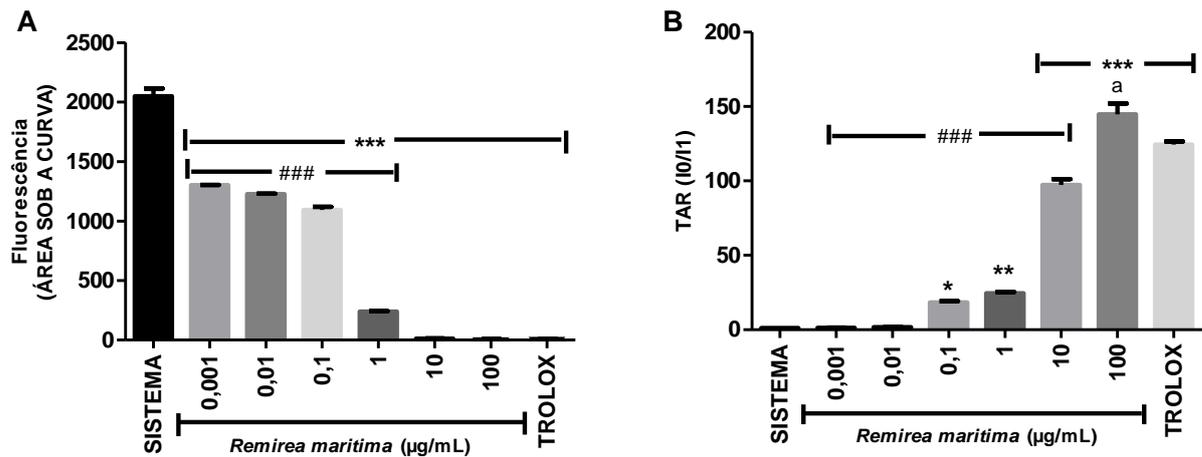


Figura 22. Potencial Total de Antioxidante Reativo (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR) do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* em diferentes concentrações. (A) Análises do TRAP; (B) Valor calculado do TAR. Trolox[®] (75 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como antioxidante padrão. Dados apresentados como Média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com o sistema, ### $p < 0,001$ comparado com o controle positivo, ^a $p < 0,001$ mais eficaz que o Trolox[®], por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.8.2 Atividade *scavenging* de radical hidroxila

A degradação da 2-deoxi-ribose por radicais hidroxilas gerados *in vitro* pela reação de Fenton foi utilizada para avaliar a capacidade do EH40 de eliminar esses radicais. Em concentrações de 0,1-100 µg/mL, o EH40 foi significativamente eficaz na eliminação dos radicais hidroxilas (**Figura 23A**), sendo que na maior concentração, o perfil *scavenging* de hidroxila foi significativamente melhor do que o Trolox® (75 µg/mL). A **Figura 23B**, mostra o valor de IC₅₀ do EH40 que foi de 13,1 µg/mL.

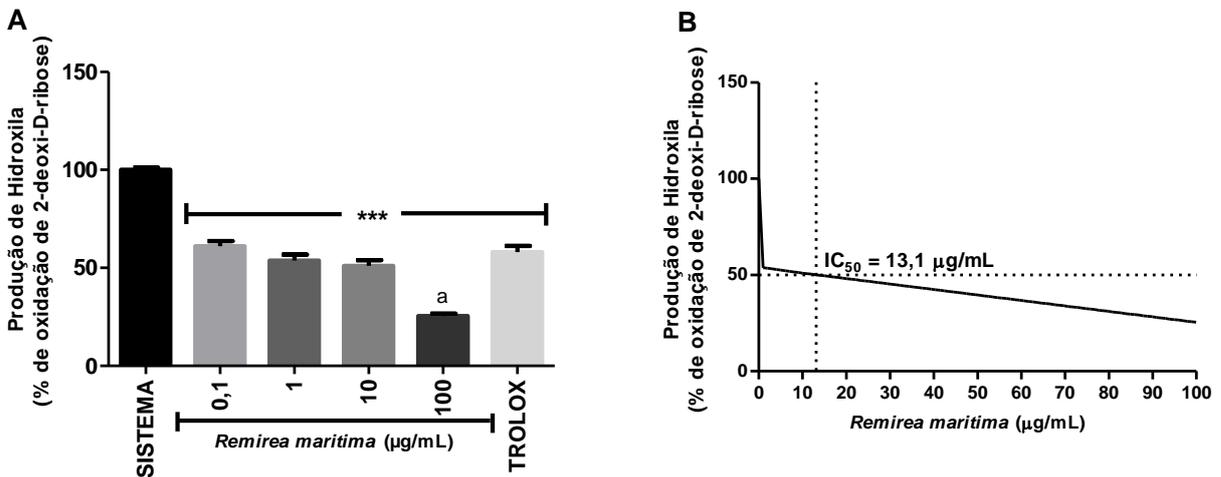


Figura 23. Atividade *scavenging* de radical hidroxila do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*. (A) A atividade *scavenging* de radical hidroxila foi quantificada usando a degradação oxidativa *in vitro* de 2-deoxiribose; (B) IC₅₀ do EH40 sobre a atividade *scavenging* de hidroxila. Trolox® (75 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. Dados apresentados como Média ± E.P.M. *** $p < 0,001$, ^a $p < 0,001$ mais eficaz que o Trolox®, por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.8.3 Potencial Antioxidante de Redução de Ferro (FRAP) e Teste de quelção do Fe²⁺

A avaliação da capacidade do EH40 em reduzir o Fe⁺³ a Fe⁺² foi realizada pelo ensaio de FRAP. Todas as concentrações testadas (0,1 a 100 µg/mL) foram capazes de reduzir o ferro, no entanto, a concentração de 10 µg/mL do EH40 foi semelhante ao Trolox®. Na

concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o EH40 foi mais eficiente do que o antioxidante padrão para a redução de ferro (**Figura 24**).

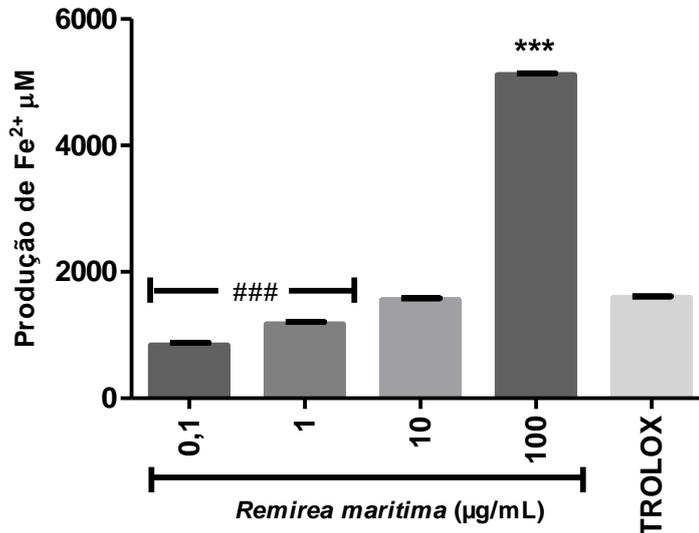


Figura 24. Potencial Antioxidante de Redução de Ferro (FRAP) do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*. Trolox[®] (75 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como antioxidante padrão. Dados apresentados como Média \pm E.P.M. ### $p < 0,001$ indica menor eficiência do que o Trolox[®], NS não-significante comparado com o Trolox[®], *** $p < 0,0001$ indica maior eficiência que o Trolox[®], por ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

A atividade ion-quelante do ferro é considerada um indicador importante em qualquer estresse oxidativo envolvendo íon ferroso. Ferrozina pode formar complexos com Fe^{+2} originando um cromóforo vermelho quantificável por espectrofotometria. No entanto, na presença de agentes quelantes, tais como o EH40, a formação do complexo é interrompida ou evitada, o que resulta numa diminuição da cor vermelha do complexo. A mensuração da cor, por conseguinte, permite uma estimativa da atividade quelante de metal do extrato analisado. Todas as concentrações testadas (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) do EH40 foram eficazes como agente quelante do íon ferroso (**Figura 25A**), o que impede a reação de Fenton. A **Figura 25B** mostra o valor de IC_{50} da atividade quelante do extrato (2,4 $\mu\text{g/mL}$).

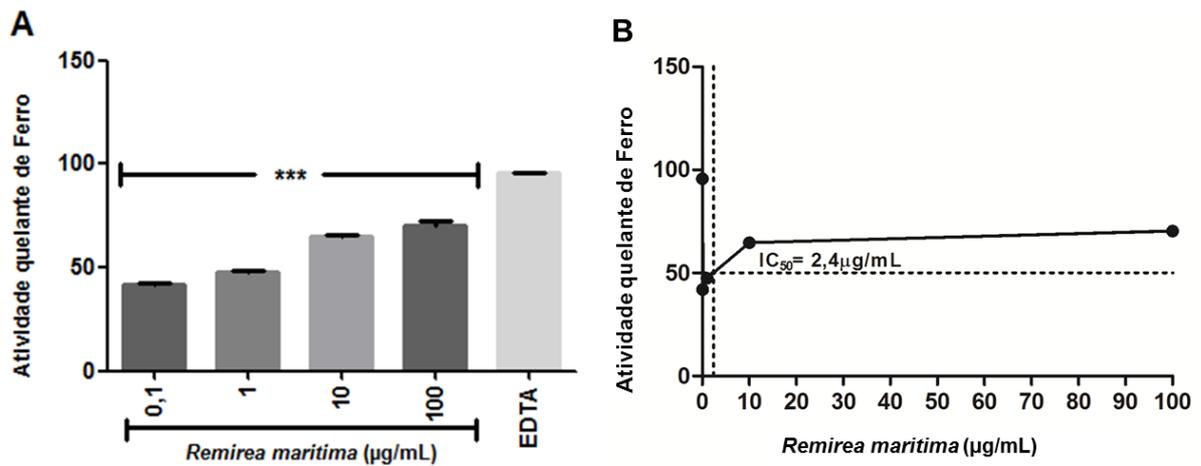


Figura 25. Atividade quelante do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* avaliada pelo ensaio da Ferrozina. (A). A capacidade do EH40 em impedir a formação do complexo ferrozina-Fe⁺², diminuindo, assim, a cor vermelha em comparação com o controle. (B) IC₅₀ de EH40 da atividade quelante. EDTA foi utilizado como composto sequestrante padrão. Dados apresentados como Média ± E.P.M. de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ comparado com o EDTA, por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.8.4 Atividade *scavenging* de Óxido Nítrico (NO)

A atividade *scavenging* de óxido nítrico do EH40 foi determinada pela decomposição de nitroprussiato sódico por meio da reação de Griess. O EH40 em todas as concentrações testadas, 0,1-100 µg/mL, mostrou capacidade para sequestrar radicais NO gerados *in vitro* (**Figura 26A**), sendo que em todas estas concentrações, os resultados de EH40 foram melhores do que Trolox[®]. O valor de IC₅₀ do efeito do EH40 sobre a produção de NO induzido pela decomposição de nitroprussiato sódico também foi calculada e apresentou valor de IC₅₀ de 4,04 µg/mL (**Figura 26B**).

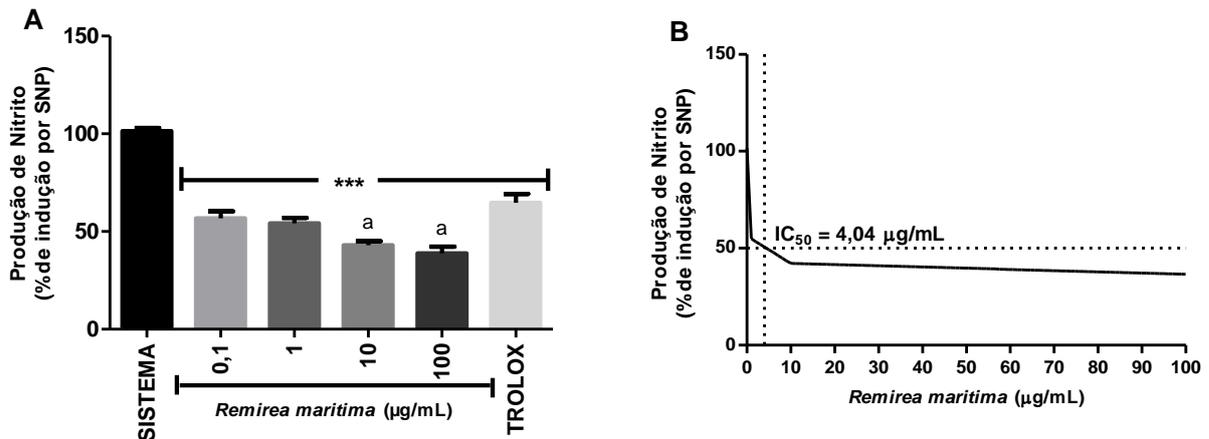


Figura 26. Atividade *scavenging* de óxido nítrico do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*. (A) Atividade *scavenging* de óxido nítrico do EH40. O óxido nítrico foi gerado a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (SNP) na presença de oxigênio, produzindo íons nitrito, as quais foram medidas por meio da reação de Griess. (B) IC₅₀ do EH40 sobre a atividade *scavenging* de óxido nítrico. Trolox[®] (75 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. Dados apresentados como média ± E.P.M. *** $p < 0,001$, ^a $p < 0,001$ mais eficaz que o Trolox[®], por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.8.5 Peroxidação lipídica através de Espécies Reativas com Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A capacidade do EH40 para proteger o dano oxidativo de peroxidação lipídica foi medida por meio da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) gerado por AAPH em um meio de incubação rica em lipídios. O efeito de diferentes concentrações de EH40 (0,1 a 100 µg/mL) sobre a peroxidação lipídica é mostrado na **Figura 27A**. Nas concentrações de 1-100 µg/mL, os resultados de EH40 mostram a redução da lipoperoxidação induzida por AAPH quando comparado com o sistema. Além disso, nas concentrações de 10-100 µg/mL, a capacidade do EH40 em proteger a peroxidação lipídica foi melhor do que Trolox[®].

A **Figura 27B** mostra os valores de IC₅₀ da capacidade do EH40 em impedir a peroxidação lipídica e apresentou o valor de 4,04 µg/mL.

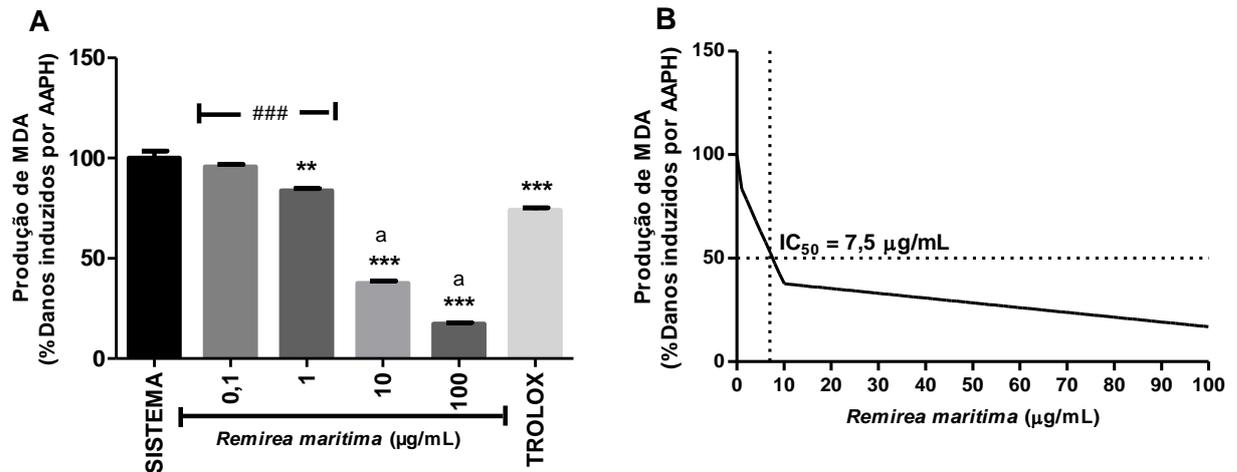


Figura 27. Peroxidação lipídica através de Espécies Reativas com Ácido Tiobarbitúrico *in vitro* do extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*. (A) Efeito de diferentes concentrações de EH40 na lipoperoxidação; (B) IC₅₀ do EH40 sobre a capacidade em reduzir a peroxidação lipídica. Trolox[®] (75 µg/mL) foi utilizado como antioxidante padrão. Dados apresentados como Média ± E.P.M. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$ comparado com o controle positivo, ^a $p < 0,001$ mais eficaz que o Trolox[®], por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.9 Toxicidade Aguda

5.9.1 Avaliação comportamental, evolução do peso, consumo de água e de ração da toxicidade aguda

A avaliação comportamental, a evolução do peso, o consumo de água e de ração dos animais durante os 14 dias de observação do experimento são parâmetros preconizados pela legislação da ANVISA para avaliação de toxicidade aguda.

Após a administração única de 2000 mg/kg do EH40, não houve alteração comportamental dos animais tratados com o extrato em relação aos animais controle, durante os 14 dias de observação.

Em relação à evolução do peso, embora todos os animais, machos e fêmeas, tenham ganhado peso ao longo das duas semanas de observação, as fêmeas apresentaram redução

significativa da evolução do peso corpóreo quando comparados ao grupo tratado com água (Figura 28).

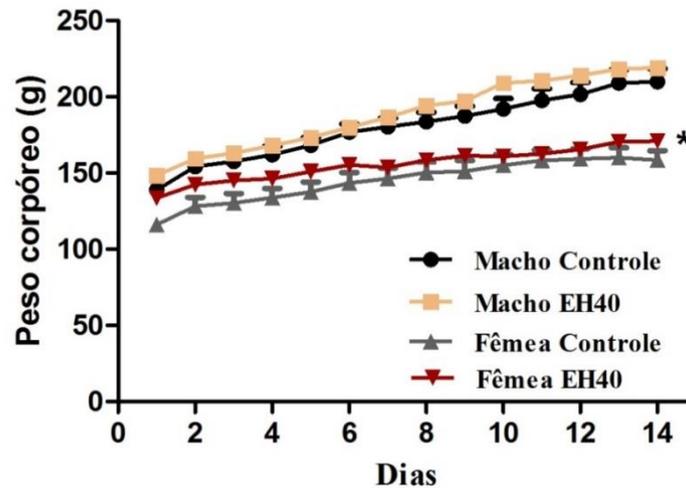


Figura 28. Evolução do peso (g) dos animais controle e tratado com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima*, durante 14 dias de observação após a administração única de 2000 mg/kg (v.o.) do EH40 (n=5). * $p < 0,1$, comparado com o controle negativo, por Teste *t*-Student.

A **Tabela 8** mostra o consumo de ração e de água dos animais tratados com EH40 em relação ao grupo controle durante 14 dias. Não foram observadas diferenças significativas para o consumo médio de ração e de água, após a administração do EH40, para ambos os gêneros.

Tabela 8. Consumo de ração e de água dos animais de ambos os gêneros para os grupos controle e tratados com o extrato hidroalcoólico da *R. maritima* durante 14 dias após a administração única da dose de 2000 mg/kg (v.o.) de EH40.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Macho		Fêmea	
		Ração	Água	Ração	Água
Controle	-	91,31 ± 2,96	173,70 ± 14,37	76,28 ± 3,52	178,70 ± 20,24
EH40	2000	97,50 ± 11,17	162,70 ± 14,88	75,31 ± 6,09	169,70 ± 11,79

Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. Teste *t*-Student.

6.0.2 Avaliação hematológico e bioquímica da toxicidade aguda

Na avaliação do hemograma completo, não houve alteração significativa dos parâmetros avaliados, como ilustrado na **Tabela 9**. As fêmeas e os machos tratados com o EH40 apresentaram valores hematológicos semelhantes aos respectivos controles.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, também não foi detectada mudança significativa nos parâmetros analisados para ambos os gêneros, como mostra a **Tabela 10**.

Tabela 9. Parâmetros hematológicos dos animais de ambos os gêneros para os grupos controle e tratados com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *R. maritima* após 14 dias da administração única da dose de 2000 mg/kg (v.o.).

Tratamento	Macho		Fêmea	
	Controle	EH40	Controle	EH40
Hemácias ($10^6/\text{mL}$)	7,19 ± 0,16	7,15 ± 0,09	7,43 ± 0,12	7,45 ± 0,21
Hemoglobina (g/dL)	14,12 ± 0,23	14,00 ± 0,14	14,08 ± 0,35	14,14 ± 0,34
Hematócrito (%)	41,26 ± 0,65	40,90 ± 0,32	41,24 ± 0,59	40,98 ± 0,91
VCM (fL)	57,20 ± 0,91	57,40 ± 0,50	55,40 ± 0,40	55,00 ± 0,70
HCM (pg)	19,62 ± 0,39	19,62 ± 0,07	19,12 ± 0,09	19,00 ± 0,41
CHCM (g/dL)	34,18 ± 0,12	34,32 ± 0,17	34,52 ± 0,13	34,52 ± 0,25
RDW-CV (%)	11,46 ± 0,40	10,94 ± 0,23	11,42 ± 0,35	11,78 ± 0,69
Plaquetas ($10^3/\text{mL}$)	1064 ± 55,24	1021 ± 58,59	1016 ± 34,67	990,00 ± 51,80
Leucócitos ($10^3/\text{mL}$)	11,06 ± 0,92	13,64 ± 1,47	8,90 ± 0,74	9,38 ± 0,67
Neutrófilos (%)	4,76 ± 0,88	5,30 ± 0,52	7,08 ± 0,68	9,56 ± 0,97
Linfócitos (%)	90,66 ± 1,31	73,58 ± 16,26	86,62 ± 0,91	79,60 ± 5,66
Monócitos (%)	3,88 ± 0,55	4,28 ± 0,82	4,72 ± 0,33	3,90 ± 0,81
Eosinófilos (%)	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,04	1,08 ± 0,62	0,28 ± 0,12

VCM – Volume corpuscular médio; HCM – Hemoglobina corpuscular média; CHCM – Concentração da hemoglobina corpuscular média; RDW-CV – Coeficiente de variação da média do volume das hemácias. Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. Teste *t*-Student.

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos dos animais de ambos os gêneros para os grupos controle e tratados com o extrato hidroalcoólico da *R. maritima* (EH40) após 14 dias da administração única da dose de 2000 mg/kg (v.o.).

Tratamento	Macho		Fêmea	
	Controle	EH40	Controle	EH40
FA (U/L)	157,20 ± 15,60	190,80 ± 22,99	92,60 ± 7,81	109,40 ± 5,84
AST/TGO(U/L)	102,00 ± 5,52	107,40 ± 10,49	99,40 ± 9,46	91,00 ± 5,21
ALT/TGP(U/L)	54,20 ± 2,39	56,20 ± 3,73	49,00 ± 3,63	45,40 ± 4,29
Glicose (mg/dL)	112,00 ± 5,33	115,20 ± 12,28	108,00 ± 6,40	124,60 ± 6,08
Sódio (mmol/L)	141,60 ± 0,40	143,20 ± 1,56	140,20 ± 0,37	140,20 ± 0,37
Potássio (mmol/L)	4,80 ± 0,12	5,30 ± 0,28	4,62 ± 0,13	5,16 ± 0,70
PT (mg/dL)	5,82 ± 0,05	5,90 ± 0,08	5,84 ± 0,11	6,08 ± 0,12
Albumina (mg/dL)	2,72 ± 0,05	2,72 ± 0,04	2,72 ± 0,06	2,84 ± 0,09
Globulina (mg/dL)	3,10 ± 0,04	3,16 ± 0,06	3,12 ± 0,14	3,24 ± 0,10
Ácido Úrico (mg/dL)	0,84 ± 0,11	1,12 ± 0,19	1,36 ± 0,14	1,48 ± 0,23
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,42 ± 0,01
Uréia (mg/dL)	48,80 ± 5,21	45,80 ± 3,68	38,60 ± 2,44	36,20 ± 3,33
Colesterol (mg/dL)	75,00 ± 6,96	76,00 ± 2,60	70,80 ± 7,65	89,80 ± 2,55
Triglicerídeo (mg/dL)	82,20 ± 14,40	66,00 ± 6,34	64,40 ± 4,91	75,80 ± 13,80

FA – Fosfatase alcalina; AST – Aspartato aminotransferase; ALT - Alanina aminotransferase; PT – Proteínas totais. Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. Teste *t*-Student.

6.0.3 Avaliação anatomohistopatológica na toxicidade aguda

Em relação ao peso dos órgãos houve redução significativa da média do peso dos encéfalos ($p < 0,05$), como também houve aumento significativo do peso médio do baço ($p < 0,05$) entre os machos, como ilustrado na **Tabela 11**. O peso médio dos outros órgãos avaliados se encontrou semelhantes ao peso dos órgãos dos animais controle.

As fêmeas não apresentaram alteração significativa do peso médio dos órgãos em relação ao seu respectivo grupo controle (**Tabela 11**).

Tabela 11. Peso relativo dos órgãos (g/100 g) dos animais de ambos os gêneros para os grupos controle e tratados com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *R. maritima* após 14 dias da administração única da dose de 2000 mg/kg (v.o.).

Tratamento	Macho		Fêmea	
	Controle	EH40	Controle	EH40
Encéfalo (g)	0,77 ± 0,03	0,63 ± 0,03 *	1,03 ± 0,07	1,02 ± 0,06
Coração (g)	0,41 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,42 ± 0,02
Rim[#] (g)	0,77 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,78 ± 0,02
Fígado (g)	3,45 ± 0,12	3,15 ± 0,18	3,70 ± 0,09	3,79 ± 0,08
Pulmão (g)	0,77 ± 0,04	0,71 ± 0,07	0,80 ± 0,03	0,83 ± 0,05
Baço	0,26 ± 0,01	0,32 ± 0,01 *	0,26 ± 0,02	0,31 ± 0,02

[#] Média de peso do rim direito e do rim esquerdo. Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. * $p < 0,1$, comparado com o controle negativo, por Teste *t*-Student.

A histologia do baço dos machos tratados com a dose única de 2000 mg/kg do EH40 está ilustrada na **Figura 29**. Na **Figura 29B** e **29D**, observa-se que o baço dos animais tratados com o EH40 agudamente se encontra sem alteração da morfologia indicativo de toxicidade e se apresentam semelhantes aos animais tratados com o veículo (**Figura 29A** e **29C**).

A histologia do encéfalo está ilustrada na **Figura 30**. Observa-se que o tecido dos animais machos tratado com dose única de 2000 mg/kg do EH40 (**Figura 30B** e **30D**) apresenta o tecido com os neurônios e as glías sem alterações morfológicas.

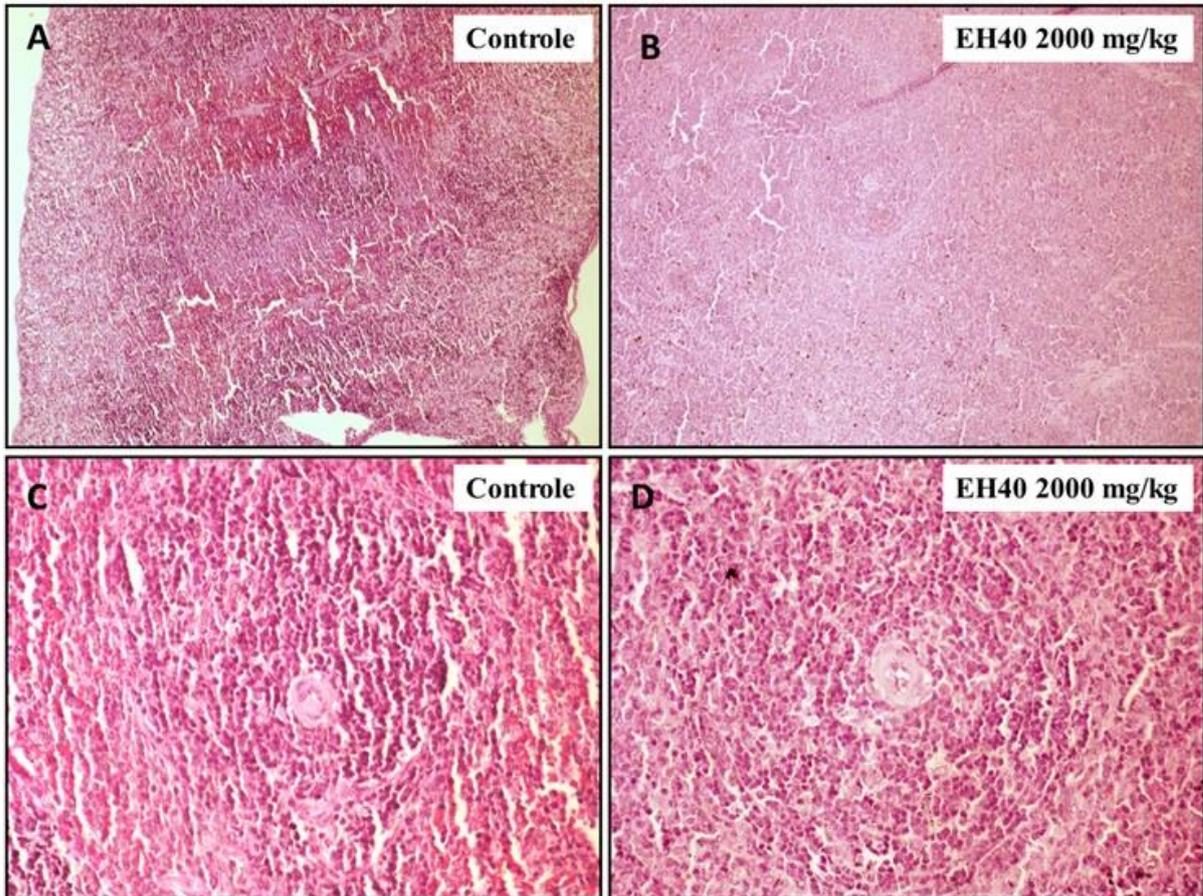


Figura 29. Secções histológicas de baço (5,0 μm), dos animais machos controle e tratado com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* após 14 dias da administração única da dose 2000 mg/kg (v.o.) de EH40 (HE, A/B – 100 x; C/D – 400 x).

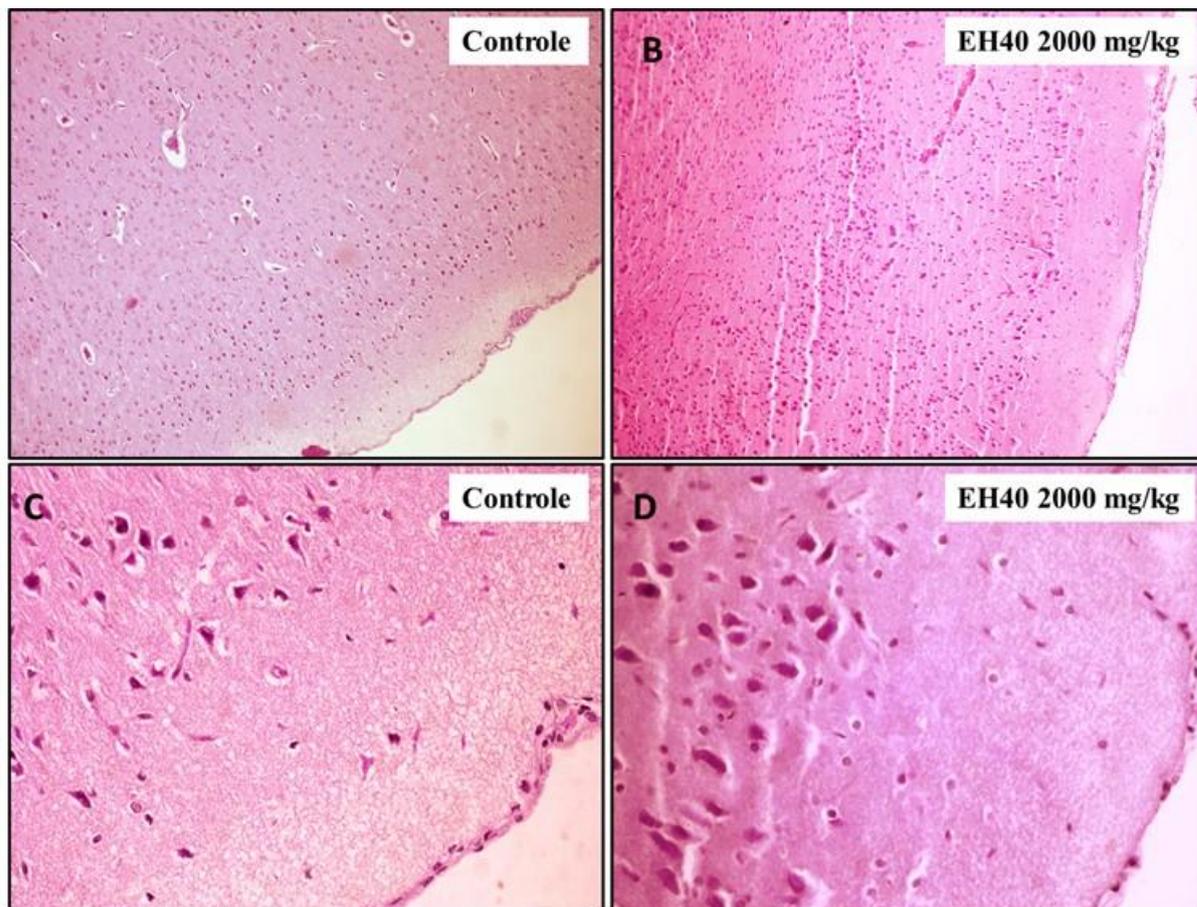


Figura 30. Secções histológicas do encéfalo (5,0 μ m), dos animais machos controle e tratado com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* após 14 dias da administração única da dose 2000 mg/kg (v.o.) de EH40 (HE, A/B – 100 x; C/D – 400 x).

6.1 Toxicidade Subaguda

6.1.1 Avaliação comportamental, evolução do peso, consumo de água e de ração da toxicidade subaguda.

Após a administração de doses diárias de 100, 200 e 400 mg/kg do EH40, durante os 28 dias de experimento, não houve mortes e nem alterações comportamentais indicativas de toxicidade nos animais tratados com EH40, para ambos os gêneros, em relação aos animais controle.

Em relação à evolução do peso corpóreo, os machos não apresentaram alteração significativa da evolução do peso corpóreo após o tratamento diário de 100, 200 e 400 mg/kg de EH40 em relação ao grupo tratado com o veículo (**Figura 32A**). No entanto, embora todos os animais, machos e fêmeas, tenham ganhado peso durante o experimento, as fêmeas apresentaram redução significativa na evolução do peso corpóreo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle após o tratamento diário durante 28 dias de 200 mg/kg do EH40 (**Figura 31B**).

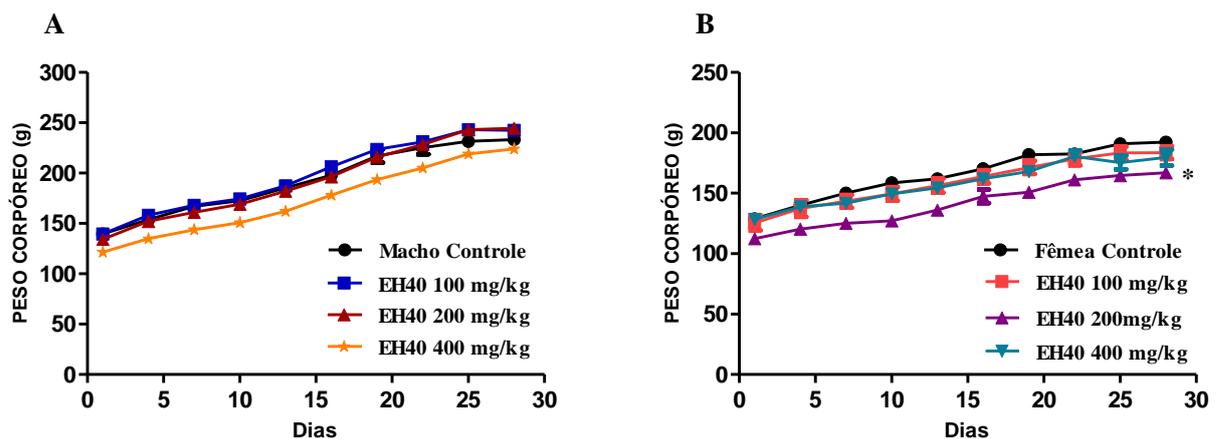


Figura 31. Evolução do peso (g) dos animais controles e tratados diariamente com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *Remirea maritima* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (v.o.) durante 28 dias consecutivos (n=5). (A) Machos, (B) Fêmeas. * $p < 0,1$, comparado com o controle negativo, por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Quanto ao consumo de ração e de água, tanto os machos quanto as fêmeas não apresentaram alteração significativa desses parâmetros durante o tratamento subagudo com o EH40 (**Tabela 12**). O consumo de água e de ração dos animais tratados com EH40 foi semelhante ao dos respectivos grupos controle.

Tabela 12. Consumo de ração e de água dos animais controle e tratado diariamente com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *Remirea maritima* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos (v.o.).

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Macho		Fêmea	
		Ração	Água	Ração	Água
Controle	-	212,60 ± 20,18	284,20 ± 21,34	175,20 ± 13,97	253,10 ± 21,30
EH40	100	222,90 ± 25,04	288,50 ± 37,95	168,40 ± 17,77	229,80 ± 11,00
	200	220,40 ± 24,68	299,30 ± 17,08	150,20 ± 25,56	202,80 ± 14,56
	400	194,00 ± 14,44	293,60 ± 18,47	175,90 ± 25,82	228,80 ± 14,82

Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

6.1.2 Avaliação hematológica e bioquímica da toxicidade subaguda

Os dados hematológicos dos machos e fêmeas, para o grupo controle e tratado com o EH40, após a administração diária de 100, 200 e 400 mg/kg, estão apresentados nas **Tabelas 13 e 14**, respectivamente.

Os machos apresentaram redução significativa dos neutrófilos e aumento significativo dos linfócitos após a administração diária de 200 mg/kg ($p < 0,05$) e de 400 mg/kg ($p < 0,01$) do EH40 em relação aos machos do grupo controle (**Tabela 13**).

As fêmeas tratadas diariamente com 100, 200 e 400 mg/kg de EH40, não apresentaram nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos avaliados em relação ao grupo tratado com veículo (**Tabela 14**).

Tabela 13. Parâmetros hematológicos dos animais machos controles e tratados diariamente com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *Remirea maritima* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos (v.o.).

Tratamento	Macho			
	Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mL}$)	7,66 ± 0,42	7,38 ± 0,09	7,58 ± 0,104	7,32 ± 0,12
Hemoglobina (g/dL)	14,48 ± 0,76	14,00 ± 0,21	14,38 ± 0,15	13,38 ± 0,18
Hematócrito (%)	45,62 ± 3,12	43,16 ± 0,59	44,14 ± 0,45	41,76 ± 0,70
VCM (fL)	59,36 ± 0,99	58,48 ± 0,33	58,22 ± 0,34	57,10 ± 0,99
HCM (pg)	18,88 ± 0,13	18,96 ± 0,21	18,96 ± 0,09	18,30 ± 0,31
CHCM (g/dL)	31,88 ± 0,48	32,44 ± 0,36	32,60 ± 0,07	32,06 ± 0,12
Plaquetas ($10^3/\text{mL}$)	1118 ± 63,85	1019 ± 19,95	1020 ± 40,18	1011 ± 21,14
Leucócitos ($10^3/\text{mL}$)	8,84 ± 1,30	7,58 ± 0,68	6,89 ± 0,33	9,48 ± 0,89
Neutrófilos (%)	38,54 ± 1,02	33,30 ± 1,78	31,18 ± 1,87*	26,82 ± 1,34**
Linfócitos (%)	58,64 ± 0,73	64,72 ± 1,95	66,34 ± 2,23*	71,34 ± 1,63**
Monócitos (%)	1,60 ± 0,57	1,04 ± 0,27	1,76 ± 0,64	1,14 ± 0,29
Eosinófilos (%)	0,74 ± 0,14	0,62 ± 0,12	0,50 ± 0,11	0,46 ± 0,05

Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, comparado com o controle negativo, por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Tabela 14. Parâmetros hematológicos dos animais fêmeas controle e tratadas diariamente com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *Remirea maritima* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos (v.o.).

Tratamento	Fêmea			
	Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mL}$)	7,36 ± 0,33	7,16 ± 0,15	7,36 ± 0,16	7,14 ± 0,21
Hemoglobina (g/dL)	14,20 ± 0,61	13,74 ± 0,36	13,68 ± 0,25	13,74 ± 0,33
Hematócrito (%)	42,82 ± 2,33	42,00 ± 0,88	42,28 ± 1,17	41,40 ± 1,2
VCM (fL)	58,02 ± 0,63	58,66 ± 0,41	57,42 ± 1,25	58,00 ± 0,56
HCM (pg)	19,28 ± 0,10	19,16 ± 0,10	18,60 ± 0,21	19,26 ± 0,25
CHCM (g/dL)	33,26 ± 0,36	32,70 ± 0,22	32,40 ± 0,40	33,20 ± 0,24
Plaquetas ($10^3/\text{mL}$)	1163 ± 87,43	1094 ± 22,76	1119 ± 12,26	1019 ± 45,82
Leucócitos ($10^3/\text{mL}$)	4,31 ± 0,52	6,92 ± 1,49	7,35 ± 0,47	6,48 ± 1,07
Neutrófilos (%)	27,20 ± 3,76	30,38 ± 4,44	27,44 ± 2,23	35,80 ± 2,32
Linfócitos (%)	69,80 ± 3,98	67,18 ± 4,39	68,76 ± 2,37	60,32 ± 2,76
Monócitos (%)	2,10 ± 0,29	1,50 ± 0,54	3,04 ± 0,66	2,86 ± 1,19
Eosinófilos (%)	0,50 ± 0,04	0,52 ± 0,04	0,36 ± 0,05	0,64 ± 0,09

Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

As dosagens bioquímicas analisadas, no estudo pré-clínico de toxicidade subaguda, estão apresentadas nas **Tabelas 15 e 16**, para os machos e fêmeas, respectivamente.

A **Tabela 15** apresenta os resultados dos parâmetros bioquímicos dos machos após a administração diária de 100, 200 e 400 mg/kg do EH40. Nessa tabela, observa-se que houve redução significativa das proteínas totais e das globulinas após a administração diária de 100 mg/kg ($p < 0,05$) e de 200 mg/kg ($p < 0,05$) do EH40 quando comparados aos animais tratados com veículo. Não houve alteração significativa dos parâmetros bioquímicos para as fêmeas após o tratamento subagudo em relação aos animais controle (**Tabela 16**).

Tabela 15. Parâmetros bioquímicos dos animais machos controle e tratado diariamente com o extrato hidroalcoólico (EH40) da *Remirea maritima* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos (v.o.).

Tratamento	Macho			
	Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
FA (U/L)	231,80 ± 7,23	219,40 ± 7,15	217,20 ± 16,53	227,40 ± 12,96
AST (U/L)	86,80 ± 5,84	82,20 ± 5,45	87,20 ± 3,25	72,60 ± 1,07
ALT (U/L)	62,00 ± 2,49	58,00 ± 3,39	45,44 ± 11,73	55,40 ± 2,11
Glicose (mg/dL)	184,80 ± 15,96	230,40 ± 24,51	232,40 ± 15,63	211,60 ± 14,90
Sódio (mmol/L)	135,80 ± 0,58	135,60 ± 1,03	35,20 ± 0,86	134,40 ± 1,50
Potássio (mmol/L)	5,18 ± 0,48	5,86 ± 0,56	5,56 ± 0,63	6,12 ± 0,58
PT (mg/dL)	5,38 ± 0,16	4,96 ± 0,12*	4,90 ± 0,06*	5,36 ± 0,07
Albumina (mg/dL)	2,48 ± 0,02	2,50 ± 0,04	2,52 ± 0,04	2,60 ± 0,04
Globulina (mg/dL)	2,90 ± 0,15	2,50 ± 0,09*	2,48 ± 0,04*	2,76 ± 0,06
Ácido Úrico (mg/dL)	1,80 ± 0,46	1,36 ± 0,19	1,26 ± 0,05	1,46 ± 0,16
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,39 ± 0,01
Uréia (mg/dL)	62,80 ± 3,29	59,80 ± 6,359	61,00 ± 6,58	50,80 ± 5,76
Colesterol (mg/dL)	71,00 ± 4,32	66,80 ± 3,455	71,40 ± 1,28	70,20 ± 2,17
Triglicerídeo (mg/dL)	37,00 ± 2,387	40,60 ± 6,853	43,60 ± 6,86	46,20 ± 6,55

FA – Fosfatase alcalina; AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase; PT – Proteínas totais. Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. * $p < 0,1$ comparado com o controle negativo, por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Tabela 16. Parâmetros bioquímico dos animais fêmeas controle e tratado diariamente o extrato hidroalcoólico (EH40) da *Remirea maritima* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos (v.o.).

Tratamento	Fêmea			
	Salina	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
FA (U/L)	117,80 ± 11,45	126,40 ± 10,65	142,60 ± 17,07	119,80 ± 6,44
AST (U/L)	82,00 ± 11,80	74,80 ± 3,39	82,60 ± 14,00	88,60 ± 10,35
ALT (U/L)	43,20 ± 3,86	41,20 ± 1,32	43,20 ± 3,84	41,20 ± 3,49
Glicose (mg/dL)	125,80 ± 9,95	167,80 ± 16,26	201,80 ± 43,91	114,40 ± 10,42
Sódio (mmol/L)	134,60 ± 0,51	134,80 ± 0,80	133,40 ± 0,51	135,20 ± 0,66
Potássio (mmol/L)	5,36 ± 0,95	5,18 ± 0,38	6,36 ± 1,10	4,80 ± 0,85
PT (mg/dL)	5,58 ± 0,14	5,36 ± 0,11	5,66 ± 0,13	5,34 ± 0,08
Albumina (mg/dL)	2,72 ± 0,05	2,62 ± 0,08	2,68 ± 0,04	2,60 ± 0,07
Globulina (mg/dL)	2,86 ± 0,11	2,74 ± 0,05	2,98 ± 0,11	2,74 ± 0,02
Ácido Úrico (mg/dL)	2,66 ± 1,06	1,52 ± 0,09	3,94 ± 1,12	2,58 ± 1,38
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,39 ± 0,02
Uréia (mg/dL)	51,00 ± 3,33	59,60 ± 4,07	52,40 ± 3,06	50,60 ± 3,04
Colesterol (mg/dL)	80,40 ± 4,11	78,00 ± 1,34	71,60 ± 2,77	78,00 ± 3,14
Triglicerídeo (mg/dL)	43,20 ± 3,66	48,20 ± 7,69	42,20 ± 2,33	46,20 ± 8,84

FA – Fosfatase alcalina; AST – Aspartato aminotransferase; ALT - Alanina aminotransferase; PT – Proteínas totais. Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

6.1.3 Avaliação anátomo e histopatológica da toxicidade subaguda

A avaliação macroscópica foi realizada no fígado, rins, intestinos, estômago, encéfalo, coração, pulmão, testículos e ovários. Não foi encontrada nenhuma alteração indicativo de toxicidade do EH40 nos órgãos analisados. Todos os órgãos, tanto para os machos quanto para as fêmeas, após o tratamento diário de 100, 200 e 400 mg/kg do EH40, apresentaram-se íntegros e semelhantes aos órgãos dos respectivos animais controle.

Em relação ao peso médio dos órgãos avaliados, os machos não apresentaram nenhuma alteração significativa do peso relativo dos órgãos analisados (**Tabela 17**). Apenas as fêmeas apresentaram redução significativa do peso relativo do fígado ($p < 0,05$) e do pulmão ($p < 0,05$) após o tratamento diário de 200 mg /kg do EH40 em relação ao grupo tratado com o veículo (**Tabela 17**).

Tabela 17. Peso relativo dos órgãos (g/100 g) dos machos e das fêmeas dos animais controle e tratado diariamente com o EH40 nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos (v.o.).

Tratamento	Macho			
	Salina	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Encéfalo (g)	0,89 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,85 ± 0,02	0,89 ± 0,03
Coração (g)	0,43 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,43 ± 0,01
Rins [#] (g)	2,18 ± 0,17	2,26 ± 0,05	2,28 ± 0,18	2,07 ± 0,03
Fígado (g)	8,57 ± 0,44	8,72 ± 0,17	8,74 ± 0,71	8,44 ± 0,25
Pulmão (g)	0,86 ± 0,17	0,59 ± 0,03	0,64 ± 0,07	0,60 ± 0,03
Baço	0,54 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,51 ± 0,03
Testículos ^{##}	1,17 ± 0,03	1,24 ± 0,03	1,18 ± 0,12	1,13 ± 0,05
Tratamento	Fêmea			
	Salina	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Encéfalo (g)	1,68 ± 0,03	1,49 ± 0,19	1,41 ± 0,22	1,70 ± 0,04
Coração (g)	0,70 ± 0,05	0,64 ± 0,02	0,56 ± 0,05	0,68 ± 0,03
Rins [#] (g)	1,55 ± 0,06	1,58 ± 0,09	1,38 ± 0,09	1,39 ± 0,06
Fígado (g)	6,97 ± 0,38	6,19 ± 0,15	6,54 ± 0,27	5,86 ± 0,26*
Pulmão (g)	1,17 ± 0,04	1,12 ± 0,04	1,02 ± 0,06	0,94 ± 0,04*
Baço	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,42 ± 0,03
Estômago	1,56 ± 0,05	1,50 ± 0,07	1,51 ± 0,09	1,46 ± 0,06
Ovários ^{##}	0,65 ± 0,07	0,52 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,55 ± 0,05

[#] Média de peso do rim direito e do rim esquerdo. ^{##} Média de peso do ovário direito e do ovário esquerdo e do testículo direito e do testículo esquerdo. Dados expressos como Média ± E.P.M., n = 05/grupo. * $p < 0,1$ comparado com o controle negativo, por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

A análise histológica foi realizada com os órgãos dos animais tratados com o EH40 após o tratamento diário de 400 mg/kg. A **Figura 32** mostra a histologia do fígado e podemos observar que os hepatócitos dos animais tratados com o EH40 encontram-se enfileirados em cordões, com núcleo e citoplasma intactos, sem nenhuma alteração morfológica indicativo de toxicidade proveniente do tratamento com o extrato.

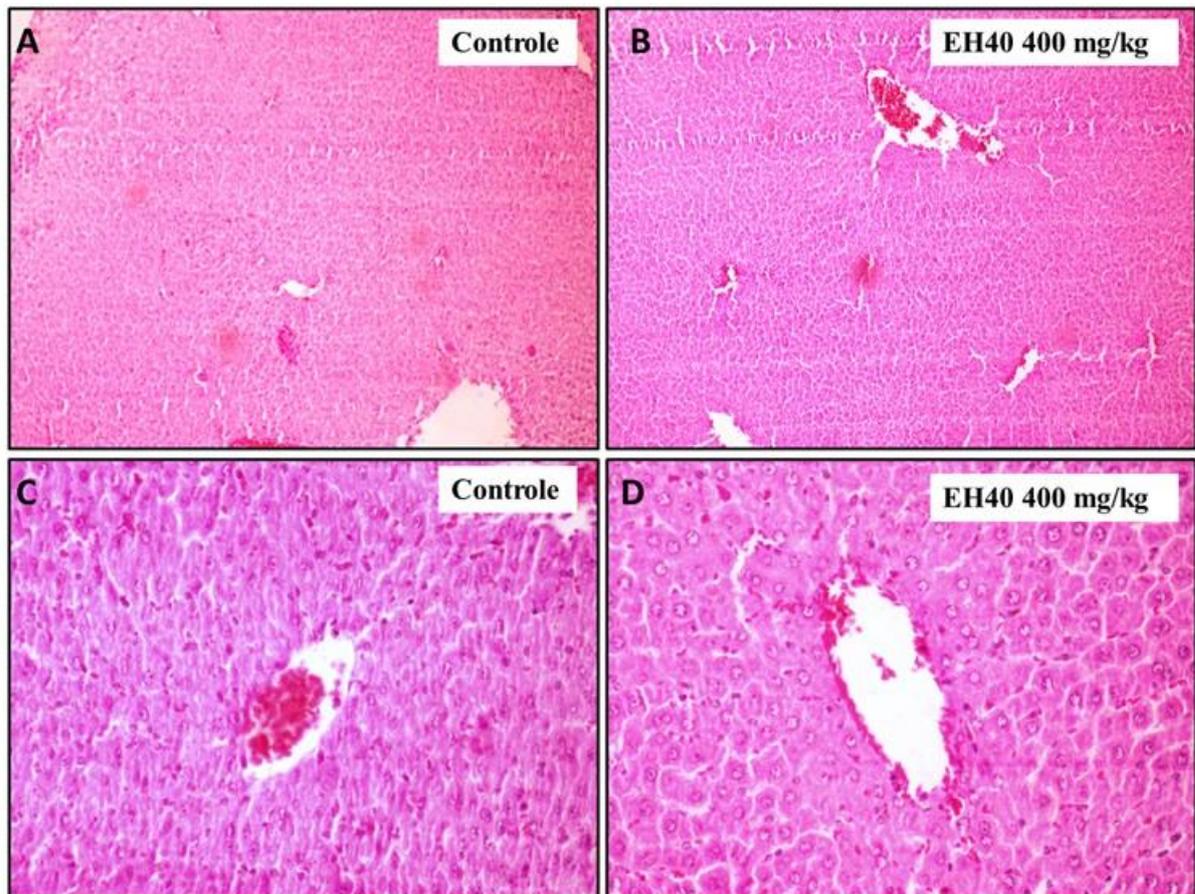


Figura 32. Secções histológicas do fígado (5,0 μ m), dos animais fêmeas controle e tratado com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* após 28 dias da administração diária da dose 400 mg/kg (v.o.) de EH40 (HE, A/B – 100 x; C/D – 400 x).

A histologia do pulmão está ilustrada na **Figura 33**. A **Figura 33A** e **33B** mostram bronquíolos terminais de rato *Wistar* fêmea controle e fêmea tratada com a dose de 400 mg/kg do EH40 durante 28 dias, respectivamente. Os bronquíolos se apresentam com o lúmen límpido revestido por epitélio simples cúbico sem nenhuma mudança na sua morfologia.

As **Figuras 33C e 33D** mostram a disposição mais geral do tecido pulmonar: alvéolos, ductos e sacos alveolares dos animais tratados com o veículo e com o EH40, respectivamente, durante 28 dias consecutivos. Não foi encontrada nenhum aspecto diferente do tecido pulmonar indicativo de toxicidade quando comparada com o grupo tratado com o veículo.

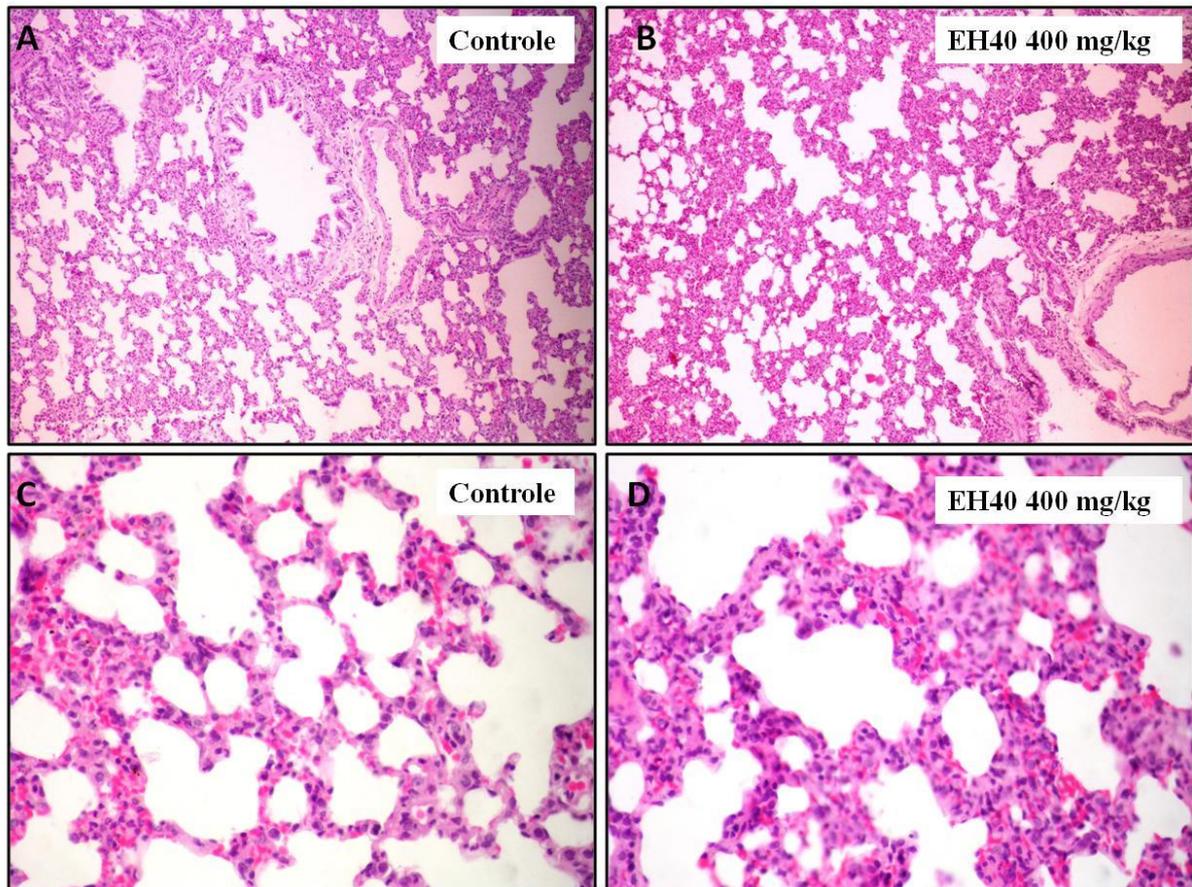


Figura 33. Secções histológicas do pulmão (5,0 μ m), dos animais fêmeas controle e tratado com o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) da *Remirea maritima* após 28 dias da administração diária da dose 400 mg/kg (v.o.) de EH40 (HE, A/B – 100 x; C/D – 400 x).

A histologia dos outros órgãos avaliados histologicamente na toxicidade subguda (rim, cérebro e baço) também não apresentou degeneração ou processo patológico que fosse associado à ação do extrato hidroalcoólico em nenhum dos animais tratados (machos e fêmeas) com EH40 na maior dose (400 mg/kg) durante 28 dias consecutivos. Todos os órgãos para ambos os gêneros se encontravam semelhantes aos dos seus respectivos animais controle.

6.1.4 Urinálise

Urina fresca coletada durante 3h não apresentou alteração física quanto ao volume, aspecto e cor comparados ao grupo controle em ambos os gêneros. Na análise química qualitativa através de fitas reagentes, os animais em todos os grupos de ambos os gêneros apresentaram ausência de sangue, glicose, proteína, cetona, bilirrubina, urobilinogênio, nitrito e leucócitos. A densidade variou entre 1010 a 1015 e o pH entre 6,5 a 8,0.

Na análise do sedimento através do microscópio óptico também não foi achado nenhum componente diferente do respectivo grupo controle que caracterizasse alteração de função renal provocada pelo tratamento diário de 100, 200 e 400 mg/kg do EH40.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas biologicamente ativas e, apesar de algumas destas substâncias poderem ser sintetizadas industrialmente, a grande diversidade estrutural de compostos provenientes do metabolismo das plantas justifica o crescente interesse químico e farmacológico por estes compostos (VARANDA, 2006).

Extensas pesquisas continuam sendo realizada com o objetivo de descobrir moléculas mais potentes, mais seletivas e com menos toxicidade. Assim, várias espécies em estudos pré-clínicos têm se mostrado ativas contra o câncer (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2013; MOUSINHO *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2012).

A *Remirea maritima* é uma planta com grande potencial farmacológico uma vez que espécies da família Cyperaceae são conhecidas por possuírem metabolismos secundários ativos, entretanto, é uma planta pouco explorada cientificamente.

Nesta pesquisa, inicialmente, o extrato aquoso (EA) e os extratos hidroalcoólicos 40% (EH40) e 70% (EH70) foram caracterizados quimicamente e os compostos: isovitexina, vitexina, luteolina e cafeoil foram identificados nos extratos. Para apoiar os nossos achados, Rabelo *et al.* (2013) também identificaram a isovitexina, a vitexina e a luteolina em extrato aquoso da *R. maritima*.

Flavonas C-glicosídicas, como isovitexina e vitexina, estão presentes em muitos produtos alimentares e nutracêuticos e têm recebido muita atenção recentemente por causa de suas propriedades antioxidantes e anticancerígenos (CAN *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2012).

Huang *et al.* (2005) demonstraram que a isovitexina é benéfica na redução da inflamação e da carcinogênese quando presente na supressão da expressão da COX-2 mediada pelas espécies reativas de oxigênio.

A vitexina além das propriedades antioxidantes já observada (CAO *et al.*, 2011), também apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória (GORZALCZANY *et al.*, 2011; ÖZKAY *et al.*, 2013), antiviral (KNIPPING *et al.*, 2012) e anticonvulsivante (ABBASI *et al.*, 2012) como também mostrou atividade antitumoral e antimetastática associadas com o processo pró-apoptótica, mediada por uma diminuição da proporção de Bcl-2/Bax e ativação de caspases (TAN *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2009).

A luteolina (3', 4',5,7-tetrahidroxiflavona) é um membro dos flavonoides e é encontrado em vários legumes e frutas, como aipo, pimentas, azeite, cenouras hortelã-pimenta, orégano e tomilho, e tem demonstrado exibir variadas ações farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobianos e anti-proliferativas (CHIU; LIN, 2008).

Neste contexto, Attoub *et al.* (2011) demonstraram que a luteolina foi capaz de reduzir a viabilidade celular de linhagens cancerígenas humanas originadas no pulmão (LNM35), cólon (HT29), fígado (HepG2) e mama (MCF7/6 e MDA-MB231-1833) assim como aumentou efetivamente a fração apoptótica sub-G1 das células através das vias dependentes de caspase-3 e caspase-7. Nesta pesquisa, os autores sugeriram que a luteolina é uma molécula segura com potencial clínico para ser utilizado na terapia contra o câncer (ATTOUB *et al.*, 2011).

Seelinger *et al.* (2008) mostraram também que a luteolina apresenta forte propriedade antioxidante e baixo potencial de atividade pró-oxidante quando comparado com alguns flavonoides comuns, como a quercetina e miricetina, conhecidos por apresentarem benefícios à saúde dos seres humanos. A luteolina também demonstrou efeito protetor contra danos ao DNA induzidos por H₂O₂ assim como apresentou efeito protetor sobre as aberrações cromossômicas induzidas por droga citostática (melfalano), na metástase de células de melanoma maligno (HORVÁTHOVÁ *et al.*, 2005).

Em relação ao composto cafeoil, esta é a primeira vez que este composto é isolado em espécies da família Cyperaceae e não há, até o momento, nenhum relato sobre o efeito antitumoral ou atividades farmacológicas do Cafeoil-D-glicose.

No presente estudo, investigou-se pela primeira vez a atividade anticâncer da *R. maritima*. Inicialmente, os três extratos, o extrato aquoso (EA) e os extratos hidroalcoólicos 40% (EH40) e 70% (EH70), foram testados frente a três linhagens de células cancerígenas humanas. De acordo com Suffness e Pezzuto (1990), extratos que apresentam valor de IC₅₀ menor que 30 µg/mL frente a linhagens de células tumorais em ensaios *in vitro* são considerados promissores para o desenvolvimento de drogas contra o câncer. Desta forma, apenas o EH40 apresentou potencial antitumoral frente ao OVCAR-8 com IC₅₀ de 27,08 µg/mL e foi conduzido aos ensaios antitumoral *in vivo* como também para averiguação das propriedades imunomoduladora, antioxidante *in vitro* e toxicológicas desse extrato.

Convém ressaltar que a incidência global de câncer de pele é alta no mundo, 132.000 câncer de pele tipo melanoma ocorre globalmente a cada ano (OMS, 2012), e que a luteolina apresentou efeito protetor sobre as aberrações cromossômicas induzidas por droga citostática

(melfalano), na metástase de células de melanoma maligno. O EH40 apresentou maior quantidade dessa substância em comparação aos outros extratos, portanto, surgiu o interesse de averiguar seu potencial citotóxico frente à proliferação de linhas de células de melanoma (B16F10).

O índice seletivo (SI) é usado frequentemente para avaliar a toxicidade diferencial de um composto, que é determinado como uma relação entre valores de IC_{50} de células normais e cancerosas. Um valor de SI menor ou igual de 2 sugere a toxicidade geral do composto puro nas células (BADISA *et al.*, 2014). O SI entre fibroblastos e células de melanoma foi de 0,65, portanto, os resultados mostraram que, embora o EH40 tenha apresentado uma significativa redução de células viáveis de B1610 nas concentrações de 80 a 320 $\mu\text{g/mL}$, este extrato não foi seletivo para o câncer de pele tipo melanoma quando comparadas com células de fibroblastos normais (**Figura 27**).

Tal como no estudo corrente, EH40 foi capaz de inibir o crescimento de células tumorais de Sarcoma180, e estes efeitos podem ser relacionados com os seus constituintes químicos, particularmente luteolina, uma vez que o seu efeito anticâncer já é conhecido na literatura e este extrato apresentou teor mais elevado deste composto (11%) em comparação com EA e EH70. No entanto, EH40 também apresentou o maior teor de cafeoil (25%) que também pode ser benéfico à sua ação antitumoral ou mais provavelmente a associação entre esses dois compostos.

Embora a isovitexina e a vitexina possam ter auxiliado, por efeito sinérgico, na redução da viabilidade celular dos extratos frente as linhagens testadas, esses compostos por si só nas concentrações apresentadas não foram relacionados com o potencial citotóxico do EH40, uma vez que o EA foi o extrato que apresentou maior quantidade desses compostos e não foi considerado ativo como possível agente antitumoral.

Muitas terapias contra o câncer funcionam por indução de apoptose em células cancerígenas como resultado de uma cascata de eventos bioquímicos. Esta cascata promove alterações típicas na morfologia celular, tais como a formação de bolhas de membrana, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos, resultando em morte celular (ELMORE, 2007).

O ensaio do TUNEL é uma técnica largamente aceita para detectar a fragmentação do DNA em células apoptóticas (DUTTA; PARK; MILLS, 2012). Em nosso modelo experimental, observamos que EH40 aumentou significativamente o número de células TUNEL-positivos em tumores de Sarcoma 180. Portanto, estes resultados sugerem que o

efeito antitumoral de EH40 pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao seu efeito pró-apoptótico.

Um dos maiores desafios em relação ao desenvolvimento de novos quimioterápicos contra o câncer é a minimização dos efeitos secundários adversos destas drogas. Portanto, os parâmetros toxicológicos sistêmicos também foram avaliados nos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 tratados com EH40 durante sete dias consecutivos. Nenhum dos parâmetros toxicológicos sistêmicos analisados foram afetados pelo tratamento com o EH40 nas doses de 25 e 50 mg/kg via intraperitoneal.

Por outro lado, o 5-FU, um agente quimioterápico clinicamente útil, induziu uma diminuição significativa na evolução do peso corporal, no peso relativo do baço, na contagem de leucócitos totais assim como dos neutrófilos em relação ao grupo controle. Adicionalmente, os animais tratados com o 5-FU apresentaram atrofia qualitativa da polpa branca do baço. Estes resultados são indicativos da imunotoxicidade desta droga, como demonstrado em estudos anteriores (FERRAZ *et al.*, 2013; GONZAGA *et al.*, 2009; MOUSINHO *et al.*, 2011).

No entanto, os níveis séricos de transaminases (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) dos animais tratados com o agente citotóxicos foram diminuídos neste estudo em comparação com os animais tratados com o veículo. Estas enzimas estão presentes em tecidos tais como o fígado, coração, eritrócitos e músculo e danos nessas células podem promover liberação dessas enzimas no soro (RAMAIAH, 2007). Desta forma, os resultados encontrados nessa pesquisa podem ser explicados pelo menor crescimento dos tumores dos animais que receberam o 5-FU, o qual resulta em menor dano tecidual derivado da invasão e, conseqüentemente, menor liberação dessas transaminases no soro.

Em contraste, o EH40 pareceu agir como um agente imunoestimulador, tal como sugerido pelo aumento do número de células megacariocíticas, do aumento qualitativo da polpa branca e da elevação do peso relativo do baço assim como elevação da produção de anticorpos OVA específico em camundongos tratados com EH40 quando comparados aos animais tratados com o veículo.

Esses primeiros experimentos mostraram que o EH40 apresentou potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*, associado aos seus constituintes químicos com potencial indutor de apoptose e imunoestimulante, sem apresentar toxicidade sistêmica durante os sete dias de tratamento por via intraperitoneal.

A determinação de fenóis totais do EH40 foi avaliada usando o reagente Folin-Ciocalteu e mostrou uma elevada presença de compostos fenólicos (582,5 mg de ácido gálico/g EH40). Este fato nos levou a investigar a atividade antioxidante do EH40 uma vez que extratos com alta concentração de compostos fenólicos são descritos como tendo propriedades antioxidantes (BRUSOTTI *et al.*, 2010; NOUR *et al.*, 2013) e possuem a capacidade de reduzir o estresse oxidativo (MANDAVE *et al.*, 2014; PACE *et al.*, 2013).

A propriedade redox do EH40 foi avaliada utilizando diferentes abordagens para compreender os possíveis efeitos em diferentes fontes de geração espécies reativas tais como os radicais superóxido (O_2), hidroxila (OH), peroxila, óxido nítrico (NO) e metais redox ativos.

Os radicais peroxilas formados na reação de TRAP participam das etapas de iniciação e propagação da lipoperoxidação e pode produzir citotoxicidade e produtos genotóxico. Esses radicais promovem danos celulares envolvidos na patogênese de variadas doenças (LIMA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2006).

Adicionalmente, EH40 foi capaz de reduzir os radicais hidroxila e, nas concentrações de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, o EH40 mostrou uma atividade antioxidante significativa, que foi semelhante ao Trolox[®] (**Figura 22**). A reação de Fenton é uma importante fonte de radicais hidroxilas e ocorre devido à combinação de peróxido de hidrogênio e ferro livre dentro da célula. Ao pensar na química de Fenton, uma última pergunta precisava ser respondida: o EH40 foi capaz de reduzir e quelar o íon ferro e, por isso, minimiza a reação química de Fenton?

Em todas as concentrações testadas, EH40 mostrou ser eficiente na redução de ferro livre, no entanto, nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, o EH40 apresentou desempenho semelhante, ou melhor, respectivamente, ao Trolox[®] (**Figura 23**).

O íon ferroso (Fe^{2+}) é necessário para o transporte de oxigênio, transporte de elétrons e para a atividade de diversas enzimas e, no organismo, em concentrações fisiológicas é capaz de participar da reação de Fenton, gerando radicais hidroxila (HALLIWELL, 2006). O EH40 foi capaz de quelar Fe^{2+} em todas as concentrações testadas, evitando assim a geração de radicais hidroxila (**Figura 24**).

É importante mencionar que metal redox ativo acima mencionados estão envolvidos em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, as quais concentrações elevadas de ferro foram encontradas em placas neurais, aumentando o dano oxidativo. Além disso, a deposição de β -amilóide aumenta a geração de H_2O_2 e, conseqüentemente, a geração de

radicais hidroxila por reação química de Fenton (WARD; DEXTER; CRICHTON, 2015). Com base nestes resultados, EH40 poderia representar uma alternativa promissora para evitar ou diminuir o dano oxidativo causado pelo radical mais reativo e prejudicial, o radical hidroxila.

O NO é um mediador importante da inflamação aguda e crônica por estimulação da atividade da ciclooxigenase (COX) o que resulta em produção desequilibrada de prostaglandinas pró-inflamatórias. A capacidade do EH40 em eliminar NO foi medida através da quantificação da produção de nitrito derivado de nitroprussiato de sódio (PNS) pela reação de Griess. Os dados mostraram que nas concentrações de 0,1 a 100 µg/mL, o EH40 reduziu significativamente a formação de nitrito derivado do PNS (**Figura 25**) e, portanto, esse extrato pode regular a produção dessas espécies reativas em sistemas biológicos.

Rabelo *et al.* (2013) avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso de *Remirea maritima* e os resultados sugeriram que este extrato tem uma ação antiinflamatória provavelmente mediada através da inibição de mediadores periféricos (tais como a síntese de prostaglandinas, NO, ROS). Entretanto, o extrato aquoso somente reduziu a formação de NO nas concentrações de 100 µg/mL a 1 mg/mL (RABELO *et al.*, 2013), enquanto que o EH40 apresentou redução significativa na produção de NO nas concentrações de 0,1 a 100 µg/mL e todas elas foram melhores do que o Trolox[®] (**Figura 25**). Em doenças neurodegenerativas, o quadro inflamatório é considerado como uma característica crucial, o qual contribui significativamente para o aumento do estresse oxidativo e, portanto, a progressão da doença. Uma condição pró-inflamatória, pode levar a uma sobrecarga de óxido nítrico, aumentando o dano oxidativo devido à formação de peroxinitritos (LI *et al.*, 2015; ZHANG; DAWSON; DAWSON, 2006).

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares. Essa cascata pode promover alteração da permeabilidade, perda da seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas para a célula, alterações do DNA, oxidação de LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (DAVIES; GUO, 2014).

O EH40 foi capaz de impedir a peroxidação lipídica *in vitro* como evidenciado pelo ensaio de TBARS nas concentrações de 1 a 100 µg/mL (**Figura 26A**). Rabelo *et al.* (2013) também testaram a capacidade de peroxidação lipídica do extrato aquoso de *Remirea*

maritima e este extrato inibiu significativamente a formação de radicais livres induzidos pelo TBARS nas concentrações de 100 µg/mL a 1 mg/mL (RABELO *et al.*, 2013). De acordo com a literatura de plantas medicinais, produtos naturais que apresentam redução da lipoperoxidação a partir de 10 µg/mL são considerados ter alto potencial antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007). O EH40 apresentou IC₅₀ de 7,5 µg/mL (**Figura 26B**), o qual sugere um grande potencial em reduzir a lipoperoxidação *in vitro*.

Uma das razões para a carcinogênese é a produção de ERO e pelos resultados obtidos por este estudo, podemos sugerir que o EH40 além de sua ação pró-apoptótico pode prevenir ou combater o câncer através da minimização dos danos provocados pela geração de radicais livres.

É importante também mencionar que o valor de IC₅₀ (70,96 µg/mL) de EH40 para reduzir a viabilidade de células de fibroblastos foi de 5,41, 29,56, 17,74 e 9,46 vezes superior ao valor de IC₅₀ em testes antioxidantes *in vitro* (EROs, IC₅₀ 13,1 µg/mL; Ferrozina, IC₅₀ 2,4 µg/mL; NO, IC₅₀ 4,0 µg/mL e TBARS, IC₅₀ 7,5 µg/mL, respectivamente), o que não impede a aplicabilidade do extrato como agente antioxidante, uma vez que a concentração terapêutica foi menor do que a concentração tóxica *in vitro* para as células normais de L929.

Entretanto, para uma possível aceitação e comercialização no país, a ANVISA exige que não só os estudos farmacológicos das plantas medicinais sejam realizados, mas também os toxicológicos a fim de proporcionar o uso seguro e eficaz das mesmas. Neste presente estudo, foram realizados os ensaios pré-clínicos de toxicidade aguda e subaguda conforme orientação da ANVISA e OECD.

Na avaliação da toxicidade aguda, o EH40 não ocasionou mortes e nenhuma alteração comportamental indicativo de toxicidade. Segundo ANVISA e OECD, a dose limite deve ser a de 2000 mg/kg, portanto, substâncias que apresentam DL₅₀ acima deste valor pode ser considerada atóxica quando administrada de forma aguda (ANVISA, 2010; OECD, 2008).

As fêmeas apresentaram redução significativa do peso ($p < 0,05$), no entanto, esta redução não está associada ao consumo de ração, uma vez que não houve diferença entre o consumo das fêmeas tratadas com o EH40 e o grupo controle. Os machos apresentaram redução significativa do peso relativo do baço ($p < 0,05$), como também houve aumento significativo do peso relativo do encéfalo ($p < 0,05$). No entanto, a análise anatopatológica destes órgãos não mostrou nenhuma degeneração ou alteração celular dos tecidos, a qual sugere que a administração aguda de 2000 mg/kg do EH40 não ocasionou danos tóxicos funcionais ao baço e ao encéfalo (**Figura 29 e 30**).

Na avaliação da toxicidade subaguda, as doses foram delineadas conforme os dados farmacológicos durante a pesquisa. Os animais foram tratados diariamente com o EH40 nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante 28 dias consecutivos. Durante este experimento, não houve mortalidade dos animais, como também, nenhum sinal comportamental clínico de caráter tóxico, em nenhuma das doses administradas diariamente.

Entretanto, as fêmeas apresentaram redução significativa da evolução do peso ($p < 0,05$) quando tratadas com doses diárias de 200 mg/kg de EH40 que também não foi associada ao maior consumo de ração pelos animais em comparação ao grupo controle. As fêmeas também apresentaram redução significativa do peso médio relativo do fígado ($p < 0,05$) e do pulmão ($p < 0,05$) após o tratamento subagudo de 400 mg/kg do EH40. Entretanto, a histologia destes órgãos sugere que o EH40 não promoveu danos morfológicos dos tecidos (**Figura 32 e 33**).

Em relação aos parâmetros hematológicos, apenas os machos apresentaram redução significativa dos neutrófilos e aumento significativo dos linfócitos após o tratamento diário de 200 ($p < 0,05$) e 400 mg/kg ($p < 0,01$) por 28 dias do EH40. O aumento da quantidade de linfócitos pode estar associado à atividade imunomoduladora do EH40. No entanto, esse resultado apesar de estatisticamente alterado, estão dentro dos valores de referências (neutrófilos: 17,1 - 47,9; linfócitos: 48,7 - 78,1) para parâmetros hematológicos de ratos Wistar (LIMA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2012).

Os machos também apresentaram redução significativa das proteínas totais ($p < 0,05$) relacionadas à diminuição significativa de globulina ($p < 0,05$) após a administração diária de 100 e 200 mg/kg do EH40.

As proteínas totais presentes no soro compreendem a albumina e as globulinas sem o fibrinogênio o qual é totalmente consumido na formação do coágulo sanguíneo após a coleta do sangue. Todas as proteínas, exceto as imunoglobulinas, são sintetizadas nos hepatócitos e a dosagem das proteínas totais é inespecífica para a atividade de síntese hepática, uma vez que outras causas também podem ocasionar sua redução: nefropatia, desnutrição e destruição extensa do tecido hepático (FUHRMAN *et al.*, 2004). Entretanto, nenhum outro parâmetro avaliado bioquimicamente sugeriu alterações hepática, renal e nem alteração indicativo de desnutrição. Adicionalmente, a análise histológica dos rins e dos fígados também não mostrou danos nesses órgãos que indiquem danos tóxicos promovidos pelo o EH40. Realizou-se também a urinálises dos animais tratados subagudamente no final do

experimento e não se observou nenhum parâmetro avaliado diferente dos animais controle que indicasse toxicidade do EH40.

Apesar da alteração estatística, os valores apresentados pelos animais tratados com o EH40 das proteínas totais e das globulinas se encontram também dentro dos valores de referências para ratos Wistar (LIMA *et al.*, 2014), o que nos indica que não houve alteração clínica associada ao consumo do extrato.

Desta forma, frente aos resultados observados nessa pesquisa, podemos sugerir que a *Remirea maritima* apresenta potencial farmacológico frente ao câncer através da indução da apoptose, além da capacidade imunoestimuladora e alto poder antioxidante, sem apresentar alterações relevantes em parâmetros toxicológicos sistêmicos.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos e hidroalcoólicos 40% e 70% da *Remirea maritima* apresentaram em sua constituição química a presença de flavonoides como a luteolina, o cafeoil, a vitexina e a isovitexina, além de derivados do ácido cafenoléico. Além disso, o extrato hidroalcoólico 40% (EH40) também apresentou alto teor de fenóis na sua constituição, sendo que a maior proporção está representada por flavonoides, principalmente, a luteolina.

Apenas o EH40 mostrou atividade citotoxicidade *in vitro* frente às células tumorais humanas, o qual foi selecionado e conduzido aos outros ensaios farmacológicos. O EH40 também apresentou atividade antitumoral *in vivo* contra células do Sarcoma 180 como também demonstrou potencial indutor de apoptose e propriedade imunohumoral pelo aumento de anticorpos contra a ovoalbumina. Adicionalmente, esse extrato apresentou eficaz atividade antioxidante *in vitro* analisado por diferentes mecanismos, sendo que em algumas concentrações os resultados foram melhores que o produto antioxidante comercial padrão (Trolox[®]).

Devido aos resultados promissores apresentados no presente estudo, a avaliação toxicológica foi realizada com o objetivo de avaliar a segurança do uso do EH40. Desta forma, este extrato pode ser considerado seguro quando administrado agudamente por via oral na dose de 2 g/Kg, assim como o uso diário do EH40 nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg não apresentou indícios de toxicidade sobre os parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos, anatomopatológico em ratos *Wistar* de ambos os gêneros.

Portanto, o EH40 apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, com potencial indutor de apoptose, propriedades imunohumoral e antioxidante sem apresentar toxicidade substancial, o que o torna de grande interesse para o desenvolvimento de novos agentes quimiopreventivo ou como adjuvante na quimioterapia, no entanto, mais avaliações devem ser realizadas para confirmar isso.

PERSPECTIVAS

O EH40 apresentou um perfil promissor como planta medicinal. Diante dos resultados, pesquisas direcionadas podem ser realizadas com o objetivo de averiguar o extrato como um nutracêutico na prevenção de doenças relacionadas com produção desequilibrada de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, assim como um agente quimiopreventivo ou como adjuvante na quimioterapia contra o câncer.

REFERÊNCIAS

ABBASI, E.; NASSIRI-ASL, M.; SHAFEEI, M.; SHEIKHI, M. Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid, on pentylenetetrazole-induced seizure in rats. **Chemical Biology & Drug Design**, v.80, p.274–278, 2012.

ABELT, D.A.; MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.394-400, 2007.

ALAM, M.M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v.109, p.8-14, 2014.

ALLAN, R.D.; CORRELL, R.L.; WELLS, R.J. A new class of quinones from certain members of the family Cyperaceae. **Tetrahedron Letters**, v.53, p.4669-72, 1969a.

ALLAN, R.D.; CORRELL, R.L.; WELLS, R.J. Two new phenolic ketones from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **Tetrahedron Letters**, v.53, p.4673-74, 1969b.

ALLAN, R.D.; WELLS, R.J.; MACLEOD, I.K. Flavanone quinones from *Cyperus* species. **Tetrahedron Lett**, v.1, p.7–8, 1973.

ALLAN, R.D.; WELLS, R.J.; MACLEOD, I.K. Further phenolic ketones from *Remirea maritima* Aubl. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.3945-46, 1970.

ALMEIDA, R.N.D. **Psicofarmacologia - Fundamentos práticos**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.

ALONSO-CASTRO, A.J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; ARANA-ARGÁEZ, V.; JUÁREZ-VÁZQUEZ, M.C.; CHÁVEZ, M.; CARRANZA-ÁLVAREZ, C.; GASPÁR-RAMÍREZ, O.; ESPINOSA-REYES, G.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; ORTIZ-ANDRADE, R.; GARCÍA-CARRANCA, A. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p.888–94, 2012.

ALONSO-CASTRO, A.J.; VILLARREAL, M.L.; SALAZAR-OLIVO, L.A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.945–72, 2011.

AMACHER, D.E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Human & Experimental Toxicology**, v.21, p.253-262, 2002.

AMARAL RG. Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da *Mentha x villosa* (Lamiaceae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. 2014.

ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAI, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.2097-2116, 2008.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, p.37-58, 2007.

ANDERSEN, J. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Medicine**, v.10, p.S18–S25, 2004.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determination of the phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of *Acacia podallyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don., Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.231–235, 2007.

ANDROUTSOPOULOS, V.P.; RUPARELIA, K.; ARROO, R.R.J.; TSATSAKIS, A.M.; SPANDIDOS, D.A. CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. **Toxicology**, v.264, p.162-170, 2009.

ANVISA, MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+P+ARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.19, p.325–331, 2008.

ASHTON, N. Physiology of red and white blood cells. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.14, p.261-266, 2013.

ATTOUB, S.; HASSAN, A.H.; VANHOECKE, B.; IRATNI, R.; TAKAHASHI, T.; GABEN, A.M.; BRACKE, M.; AWAD, S.; JOHN, A.; KAMALBOOR, H.A.; SULTAN, M.A.A.; ARAFAT, K.; GESPACH, C.; PETROIANU, G. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 651, p.18–25, 2011.

BADISA, R.B.; MINA, D.A.; LATINWO, L.M.; SOLIMA, K.F.A. Selective Anticancer Activity of Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium on Non-Small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **Anticancer Research**, v.34, p.5447–545, 2014.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, p.453-460, 2014.

BARGER, A.M.; MS, D.V.M. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.33, p.1207-1222, 2003.

BARTZATT, R.; DONIGAN, L. Two Identical Twin Nitrogen Mustard Agents that Express Rapid Alkylation Activity at Physiological pH 7.4 and 37° C. **Letters in Drug Designed & Discovery**, v.1, p.78-83, 2004.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v.20, p.896–900, 2006.

- BELIZÁRIO, J.E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência Hoje**, v.31, p.50-57, 2002.
- BEY, M.B.; MEZIAN, L.; BENCHIKH, Y.; LOUAILECHE, H. Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. *Azenjar*) total phenolic compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.162, p.277–282, 2014.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.39: 801-7, 2006.
- BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALENCAR, N.M.N.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, O.D.L.; CHAVES, J.H.; SILVEIRA, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from Piper species. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p.599-607, 2008.
- BITTENCOURT R, SCALETZKY A, BOEHL JAR. Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre – RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, p.95-101, 2004.
- BOEHM, K; BORRELLI, F; ERNST, E; HABACHER, G; HUNG, SK; MILAZZO, S; HORNEBER, M. Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.8, 2009.
- BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the neutral red (NR) and tetrazolium mtt tests. **Toxicology in Vitro**, v.2, p.1-6, 1988.
- BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P.; SAITO, M.E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.675-677, 2006.
- BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, p.1359-69, 2010.
- BRASIL, MS, **Ministério da Saúde**. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, 2006. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf.

BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p.231–237, 2005.

BRUSOTTI, G.; NGUEYEM, T.A.; BIESUZ, R.; CACCIALANZA, G. Optimum extraction process of polyphenols from *Bridelia grandis* stem bark using experimental design. **Journal of Separation Science**, v.33, p.1692–1697, 2010.

CAN, O.D.; OZKAY, U.D.; UCEL, U.I. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v.699, p.250–257, 2013.

CAO, D.; LI, H.; YI, J.; ZHANG, J.; CHE, H.; CAO, J.; YANG, L.; ZHU, C.; JIANG, W. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. **PLoS One**, v.6, p.e21071, 2011.

CAO, T.; SAW, T.Y.; HENG, B.C.; LIU, H.; YAP, A.U.J.; Ng, M.L. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. **Journal of Applied Toxicology**, v.25, p.101–108, 2005.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.58-65, 2000.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, p.816–823, 2004.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v.52, p.1361–1371, 2003.

CHAN, P.P.K.; KRUGER, C.L.; HAYES, A. W. Toxicity, Acute, Reference Module in Biomedical Sciences, **Encyclopedia of Toxicology**, Third Edition, p.617-625, 2014.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Eosinofilia reacional, leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica idiopática. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, p.395-401, 2010.

CHEN, H.; INBARAJ, B.S.; CHEN, B. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p. 260–285, 2012.

CHENG, N.; WANG, Y.; GAO, H.; YUAN, J.; FENG, F.; CAO, W.; ZHENG, J. Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p.709–714, 2013.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. **Toxicology in Vitro**, v.12, p.251–258, 1998.

CHIU, F.L.; LIN, J.K. Downregulation of androgen receptor expression by luteolin causes inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells and xenografts. **Prostate**, v.68, p.61–71, 2008.

CHOI, J.A.; KIM, J.Y.; LEE, J.Y.; KANG, C.M.; KWON, H.J.; YOO, Y.D. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. **International Journal of Oncology**, v.19, p.837–844, 2001.

CONDE-HERNÁNDEZ, L.A.; GUERRERO-BELTRÁN, J.A. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. **Food Chemistry**, v.142, p.455–460, 2014.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p.567-575, 2012.

COSTA, P.R.F.; MONTEIRO, A.R.G. Benefícios dos antioxidantes na alimentação. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.2, p.87-90, 2009.

COSTA, S.; TEIXEIRA, J.P. Toxicology, Reference Module in Biomedical Sciences, from **Encyclopedia of Toxicology**, Third Edition, p.718-720, 2014.

COTTER, T.G. Apoptosis and cancer: the genesis of a researchfield. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.501–507, 2009.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30; p.15-19, 2010.

DALANHOL, M.; BARROS, M.; MAZUCHELLI, J.; SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; LARGURA, A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, p.16-22, 2010.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sciences**, v.81, p.177-187, 2007.

DAVIES, S.S.; GUO, L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids. Review. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.181, p.1–33, 2014.

DHALLA, N.S.; TEMSAH, R.M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v.18, p.655–673, 2000.

DIAS JUNIOR, R.F.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MARÇAL, W.S.; ROCHA, M.A.; DIAS, R.C.F. Valores de referência e influência da idade no eritrograma de fêmeas bovinas da raça Aquitânica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.311-315, 2006.

DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v.7, p.505–512, 2005.

DO, Q.D.; ANGKAWIJAYA, A.E.; TRAN-NGUYEN, P.L.; HUYNH, L.H.; SOETAREDJO, F.E.; ISMADJI, S.; JU. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, In Press, Corrected Proof. 2013.

DOMÍNGUEZ, M.; NIETO, A.; MARIN, J.C; KECK, A.; JEFFERY, E.; CÉSPEDES, C.L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5889–5895, 2005.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p.421–431, 1990.

DRESCH, M.T.; ROSSATO, S.B.; KAPPEL, V.D.; BIEGELMEYER, R.; HOFF, M.L.; MAYORGA, P.; ZUANAZZI, J.A.;HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p.107–114, 2009.

DUTTA, D.; PARK, I.; MILLS, N.C. Fixation temperature affects DNA integrity in the testis as measured by the TUNEL assay. **Toxicologic Pathology**, v. 40, p. 667-674, 2012.

DUVAL, C.; CANTERO, A.V.; AUGE, N.; MABILE, L.; THIERS, J.C.; NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R. Proliferation and wound healing of vascular cells trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.35, p.1589–1598, 2003.

EKHOLM, S.V.; ZICKERT, P.; REED, S.L.; ZETTERBERG, A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, p.3256-3265, 2001.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.495-516, 2007.

- FAILACE, R. **Manual de Interpretação**. 5ª edição. São Paulo: Editora ARTMED, 2009.
- FERRAZ, R.P.C.; CARDOSO, G.M.B.; SILVA, T.B.; FONTES, J.E.N.; PRATA, A.P.N.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v.141, p.196–200, 2013.
- FRANCA, E.; ALVES, J.G.B. Dislipidemia entre crianças e adolescentes de Pernambuco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87, p.722-727, 2006.
- FUHRMAN, M.; CHARNEY, P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**, v.104, p. 1258-1264, 2004.
- GAO, D.; JIN, F.; LIU, H.; WANG, Y.; JIANG, Y. Metabonomic study on the antitumor effect of flavonoid derivative 3d in HepG2 cells and its action mechanism. **Talanta**, v.118, p.382–8, 2014.
- GAO, D.; JIN, F.; LIU, H.; WANG, Y.; JIANG, Y. Metabonomic study on the antitumor effect of flavonoid derivative 3d in HepG2 cells and its action mechanism. **Talanta**, v.118, p.382–388, 2014.
- GASPARINI, J.R.; SARAIVA, R.A. Tratamento de dor em paciente com tumor sacral inoperável. Relato de caso. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, p.252-260, 2004.
- GIACOMINI, G.; MENEZES, H. Técnicas e perspectivas em imunoterapia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.5, p.567-578, 2012.
- GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v.40, p.959-975, 2001.
- GOMES, K.R.; SANTOS, M.G.C.; FRANCO, D.F.; PIRES, R.B.; SILVA, M.G.; NEVES, M.F.; BASSANI-SILVA, S. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Publicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça/Famed. 2006; Ano III. Número 07.
- GONZAGA, M.L.C.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; DE ALENCAR, M.N.M.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; SOARES, S.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an (1 4)-glucan– b-(1 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, p.32-40, 2009.

GORDON-SMITH, T. Structure and function of red and white blood cells. **Medicine**, v.37, p.119-124, 2009.

GORZALCZANY, S.; MARRASSINI, C.; MINO, J.; ACEVEDO, C.; FERRARO, G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, p.733–738, 2011.

GOVAERTS, R.; SIMPSON, D.A.; GOETGHEBEUR, P.; WILSON, K.L.; EGOROVA, T.; BRUHL, J. World Checklist of Cyperaceae. **The Board of Trustees of the Royal Botanical Garden**, Kew. 2007.

GRIENDLING, K.; FITZGERALD, G. Oxidative stress and cardiovascular injury. **Circulation**, v.108, p.2034–2040, 2003.

GROOT, P.; MUNDEN, R.F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. **Radiologic Clinics of North America**, v.50, p.863–876, 2012.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, p.227-234, 2005.

GUREL, G.; BLAHA, G.; MOORE, P.B.; STEITZ, T.A. U2504 Determines the Species Specificity of the A-site Cleft Antibiotics. The Structures of Tiamulin, Homoharringtonine and Bruceantin Bound to the Ribosome. **Journal of Molecular Biology**, v.389, p.146-158, 2009.

HABR-GAMA, A. Câncer colorretal: a importância de sua prevenção. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.42, p.2-3, 2005.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97, p.1634–1658, 2006.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.231-255, 2004.

HAMID, A.A.; AIYELAAGBE, O.O.; USMAN, L.A.; AMEEN, O.M.; LAWAL, A. Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v.4, p.142–151, 2010.

HARRORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A.; WILSON, K.L. Flavonoids in leaves and inflorescences of Australian Cyperaceae. **Phytochemistry**, v.24, p.151-66, 1985.

HARVEY, AL. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.20, p. 196-8, 1999.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J.; FLAMM, G.; WILLIAMS, G.; LINES, T. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.2179–205, 2007.

HENRY, JB. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**, 20ª edição. São Paulo: Editora Manole LTDA; 2008.

HORVÁTHOVÁ, K.; CHALUPA, I.; SEBOVÁ, L.; TÓTHOVÁ, D.; VACHÁLKOVÁ, A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. **Mutation Research**, v.565, p.105-12, 2005.

HU, Y.; ZHANG, Z.; YANG, C. The determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selective chemiluminescence method. **Analytica Chimica Acta**, v.60, p.95-100, 2007.

HUANG, S.T.; CHEN, C.T.; CHIENG, K.T.; HUANG, S.H.; CHIANG, B.H.; WANG, L.F.; KUO, H.S.; LIN, C.M. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1042, p.387-95, 2005.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Químia Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

HUYNH, K.; BERNARDO, B.C.; MCMULLEN, J.R.; RITCHIE, R.H. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. **Pharmacology & Therapeutics**, v.142, p.375–415, 2014.

HWANG, Y.; HA, H.; MA, J.Y. Acute oral toxicity and genotoxicity of *Dryopteris crassirhizoma*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, p.133–139, 2013.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Coordenação de Prevenção e vigilância de câncer. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

IRIGARAY, P.; NEWBY, J.A.; CLAPP, R.; HARDELL, L.; HOWARD, V.; MONTAGNIER, L.; EPSTEIN, S.; BELPOMME, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.61, p.640–58, 2007.

ITOKAWA, H.; WANG, X.; LEE, K-H. Homoharringtonine and related compounds. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. (eds). **Anticancer agents from natural products**. Boca Raton, Florida, Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, p. 47-70, 2005.

JORDAN, A.S.; CUNNINGHAM, D.G.; MARLES, R.J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to the Knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.243, p. 198-216, 2010.

KANG, M.H.; REYNOLDS, C.P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.1126–1132, 2009.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S. ANDERLINI, P.; TALPAZ, M. Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigation options. **Blood**, v.87, p.3069-3081, 1996.

KAPUY, O.; LIZÁK, B.; STILLER, I.; BÁNHEGYI, G. A Systems Biological Perspective of Cellular Stress-Directed Programmed Cell Death. **Computational Molecular Bioscience**, v.4, p.28-34, 2014.

KARDEH, S.; ASHKANI-ESFAHANI, S.; ALIZADEH, A.M. Review Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v.735, p.150–168, 2014.

KIM, H.; MOON, J.; KIM, H.; LEE, D.; CHO, M.; CHO, H.; KIM, Y.S.; MOSADDIK, A.; CHO, S.K. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. **Food Chemistry**, v.121, p.429–436, 2010.

KIM, K.H.; RODRIGUEZ, A.M.; CARRICO, P.M.; MELENDEZ, J.A. Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.3, p.361–373, 2001.

KLIGERMAN JA. Ampliação da Assistência Oncológica no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.46, p.347-349, 2000.

KLINKEN, S.P. Red blood cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.34, p.1513-1518, 2002.

KNIPPING, K.; GARSSSEN, J.; VAN'T LAND, B. An evaluation of the inhibitory effects against rota-virus infection of edible plant extracts. **Virology Journal**, v.9, p.137, 2012.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, p.433-441, 2003.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.333–343, 2009.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**. 10^a ed., WB Saunders, China, p.260, 2010.

LASEKAN O. Volatile constituents of roasted tigernut oil (*Cyperus esculentus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.1055–61, 2013.

LI, J.; JIANG, Z.; LI, X.; HOU, Y.; LIU, F.; LI, N.; LIU, X.; YANG, L.; CHEN, G. Natural therapeutic agents for neurodegenerative diseases from a traditional herbal medicine *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, p. 53–58, 2015.

LIMA, C.M.; LIMA, A.K.; MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; LEITE, B.L.S.; SERAFINI, M.R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v.10, p. 1-9, 2014.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.A.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.293-303, 2001.

LOMAX, M.E.; FOLKES, L.K.; NEIL, P.O. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. **Clinical Oncology**, v.25, p.578-585, 2013.

LOPES, G.K.; SCHULMAN, H.M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1472, p.142–152, 1999.

LOPEZ-VARELA, S.; GONZALEZ-GROSS, M.; MARCOS, A. Functional foods and the immune system: a review. **European Journal of Nutrition**, v.56, p.29–33, 2002.

LUO, H.; JIANG, B.H.; KING, S.M.; CHEN, Y.C. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. **Nutrition and Cancer**, v.60, p.800–809, 2008.

LYKKESLELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v.380, p.50-58, 2007.

MALTA, L.G.; TESSARO, E.P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G.M.; LIU, R.H. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v.53, p.417-425, 2013.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and câncer: a changing paradigma. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.153-166, 2009.

MANDAVE, P.C.; PAWAR, P.K.; RANJEKAR, P.K.; MANTRI, N.; KUVALEKAR, A.A. Comprehensive evaluation of in vitro antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. **Scientia Horticulturae**, v.172, p.124-134, 2014.

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

MANSUR, A.P.; FAVARATO, D. Mortalidade por Doenças cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.99, p.755-761, 2012.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v.40, p.255–260, 2005.

MARTA, G.N.; HANNA, S.A.; MARTELLA, E.; SILVA, J.L.F.; CARVALHO, H.A. Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização. Artigo de Revisão. **Revistada Associação Médica Brasileira**, v.57, p.468-474, 2011.

MARTÍNEZ-CARPIO, P.A.; MORENO, M.A.N. Factores de crecimiento, lesión celular, proteincinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores: su relevancia en la patología molecular delcáncer humano. Review Article. **Medicina Clínica**, v.120, p.265-271, 2003.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, v.XVII, p.271-278, 2002.

MCLELLAN, S.A.; MCCLELLAND, D.B.L.; WALSH, T.S. Anaemia and red blood cell transfusion in the critically ill patient. **Blood Reviews**, v.17, p.195–208, 2003.

MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do Biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.8, p.1-6, 2012.

MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v.41, p.1088-1093, 2011.

MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, A.S.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3418–3423, 2010.

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

MOUSINHO, K.C.; OLIVEIRA, C.C.; FERREIRA, J.R.O.; CARVALHO, A.A.; MAGALHÃES, H.I.F.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MATOS, M.P.V.; RAMOS, M.V.; MORAES, M.O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v137, p.421–426, 2011.

NAKASHIMA, I.; LIU, W.; AKHAND, A.A.; TAKEDA, K.; KAWAMOTO, Y.; KATO, M.; SUZUKI, H. 4-Hydroxynonenal triggers multi step signal transduction cascades for suppression of cellular functions. **Molecular Aspects of Medicine**, v.24, p.231–238, 2003.

NETO, C.B. HEMOGRAMA: Considerações em Odontologia. **Revista da Associação Paulista dos Cirurgiões Dentista**, v. 47, p.14-15, 2004.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.461–77, 2007.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p.311–335, 2012.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v.407, p.810-16, 2000.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v.59, p.365-78, 2009.

NOUR, V.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R.; JAKOPIC, J. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. **Food Chemistry**, v.141, p.961-966, 2013.

OBERLIES NH, KROLL DJ. Campotothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **Journal of Natural Products**, v.67, p.129-35, 2004.

OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute oral toxicity – fixed dose procedure and repeat dose 28-day oral toxicity study in rodents, 2008.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, v.4, p.592-603, 2004.

OLIVEIRA, I.D.; ARAUJO, A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; PRATA, A.P.N.; SILVA, M.R. Screening fitoquímico e atividade antioxidante da *Remirea maritima* Aubl. Resumo do Encontro de Pós-Graduação da UFS, 2009.

OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para tratamento de tumores sólidos. *Química Nova*, v.25, p.976-984, 2002.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSK, B. Caspases and cancer. *Cell Death Differentiation*, v.18, p.1441-1449, 2011.

OLTERS DORF, T.; ELMORE, S.W.; SHOEMAKER, A.R.; ARMSTRONG, R.C.; AUGERI, D.J.; BELLI, B.A.; BRUNCKO, M.; DECKWERTH, T.L.; DINGES, J.; HAJDUK, P.J.; JOSEPH, M.K.; KITADA, S.; KORSMEYER, S.J.; KUNZER, A.R.; LETAI, A.; LI, C.; MITTEN, M.J.; NETTESHEIM, D.G.; NG, S.; NIMMER, P.M.; O'CONNOR, J.M.; OLEKSIJEW, A.; PETROS, A.M.; REED, J.C.; SHEN, W.; TAHIR, S.K.; THOMPSON, C.B.; TOMASELLI, K.J.; WANG, B.; WENDT, M.D.; ZHANG, H.; FESIK, S.W.; ROSENBERG, S.H. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, v.435, p.677-681, 2005.

OMS, **Organização Mundial da Saúde**. Câncer, 2006. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/globocan2008.php>. Acessado em: 04 de julho de 2014.

OMS, **Organização Mundial da Saúde**. Medicina Tradicional. Ficha informativa, 134, 2003–2005, 2008. Disponível em: www.who.int/medicentre/factsheets/fs134/en

OMS, **Organização Mundial da Saúde**. Câncer 2012. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acessado em: 01 de julho de 2014.

ÖZKAY, Ü.D.; CAN, Ö.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.109, p.23–30, 2013.

PACE, B.; RENNA, M.F.; RENNA, M.; SERIO, F.; ATTOLICO, G. multiple regression models and computer vision systems to predict antioxidant activity and total phenols in pigmented carrots. *Journal of Food Engineering*, v.117, p. 74-81, 2013.

PACE, D.; CAMPOS, A.C.; GRAF, R. EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES (VITAMINA C, VITAMINA E E GINGKO BILOBA) NA VIABILIDADE DE RETALHO CUTÂNEO DORSAL EM RATOS. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v.21, p.77-81, 2006.

PALUMBO, M.O.; KAVAN, P.; MILLER, W.H.; PANASCI, L.; ASSOULINE, S.; JOHNSON, N.; COHEN, V.; PATENAUDE, F.; POLLAK, M.; JAGOE, R.T.; BATIST, G. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology*, v.4, p.1-9, 2013.

PAN, H.C.; JIANG, Q.; YU, Y.; MEI, J.P.; CUI, Y.K.; ZHAO, W.J. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochemistry International*, v. 80, p. 60-71, 2015.

PERDIGÃO, J.; TAVARES, A. Ciclo celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). *Cell Biology*, v.70, p.7-14, 2001.

PEREZ, A.; GONZALEZ-MANZANO, S.; JIMENEZ, R.; PEREZ-ABUD, R.; HARO, J.M.; OSUNA, A.; SANTOS-BUELGA, C.; DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: Correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacological Research*, v.89, p.11-18, 2014.

PISTOLLATO, F.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food and Chemical Toxicology*, v.75, p.58–70, 2015.

POLICASTRO, L.; MOLINARI, B.; LARCHER, F.; BLANCO, P.; PODHAJECER, O.L.; COSTA, C.S.; ROJAS, P.; DURÁN, H. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Molecular Carcinogenesis*, v.39, p.103–113, 2004.

PRATA, A.P.; LÓPEZ, M.G.; SIMPSON, D.A. New combinations in *Bulbostylis* (Cyperaceae) from South America. *Kew Bulletin*, v. 56, p. 1007-9, 2001.

QI, Q.; PENG, J.; LIU, W.; YOU, Q.; YANG, Y.; LU, N.; WANG, G.; GUO, Q. Toxicological studies of wogonin in experimental animals. *Phytotherapy Research*, v.23, p.417-22, 2009.

RABELO, A.S.; OLIVEIRA, I.D.; GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S.; PRATA, A.P.N.; GELAIN, D.P.; VENCESLAU, E.M.; SANTOS, J.P.A.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; SANTOS, A.D.C.; NOGUEIRA, P.C.L.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; ARAÚJO, A.A.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.145, p.11-17, 2013.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; NANDAKUMAR, N.; PALANISWAMI, R.; NISHIGAKI, Y.; NISHIGAKI, I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.86, p.103-112, 2014.

RAJSKI, S.R.; WILLIAMS, R.M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. **Chemical Reviews**, v.98, p.2723-2796, 1998.

RAMAIAH SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1551–1557, 2007.

RAMAIAH, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p.1551–1557, 2007.

RANGANATH, R.M.; NAGASHREE, N.R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**, v.202, p.159-242, 2001.

RAO, A.; RAO, L. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v.55, p.207-216, 2007.

RATNAM, D.; ANKOLA, D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v.113, p.189-207, 2006.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p.1–13, 2003.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p.1302-1319, 2011.

RIBEIRO, F.A.; MOURA, C.F.G.; AGUIAR, O.JR.; OLIVEIRA, F.; SPADARI, R.C.; OLIVEIRA, N.R.; OSHIMA, C.T.; RIBEIRO, D.A. The chemopreventive activity of apple against carcinogenesis: antioxidant activity and cell cycle control. **European Journal of Cancer Prevention**, v.23, p.477-480, 2014.

RIBEIRO-ALVES, M.A.; GORDAN, P.A. Diagnóstico de Anemia em Pacientes Portadores de Doença Renal Crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.29, p.4-6, 2007.

RICCI, M.S.; ZONG, W. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **The Oncologist**, v.11, p.342–357, 2006.

RICH, T.; ALLEN, R.L.; WYLLIE, A.H. Defying death after DNA damage. **Nature**, v.407, p. 777–783, 2000.

RIVOIRE, W.A.; CORLETA, H.V.E.; BRUM, I.S.; CAPP, E. Biologia molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira de Saúde Materna Infantil**, vol.6, p.447-451 2006.

ROBY, M.H.H.; SARHAN, M.A.; SELIM, K.A.; KHALEL, K.I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.827– 831, 2013.

ROOS, W.P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, p.440-50, 2006.

RUFINO, M.S.M; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: **Empraba Agroindústria Tropical**, p.1-4, 2006. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125). Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=202.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S.S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.4, p.421-427, 2014.

SALAS, V.W. Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v.33, p.119-121, 2004.

SAUER, H.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.11, p.173–186, 2001.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, p.308-313, 2004.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M.M.; EMANUELLI, M.P.; SCHOSSLER, J.E. Função Renal de Cães Tratados com Doses Terapêuticas de Flunixin Meglumine e Ketoprofen Durante o Trans e Pós-Operatório. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.16, p.46-51, 2001.

SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W. Dose response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis. **Mutation Research**, v.464, p.13-18, 2000.

SEELINGER, G.; MERFORT, I.; SCHEMPP, C.M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. **Planta Medica**, v.74, p.1667-1677, 2008.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.567–579, 2007.

SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G.; SANTOS, J.P.A.; SANTOS, A.D.C.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; NOGUEIRA, P.C.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v.14, p.1159–1166, 2011.

SHAKYA, R.; NAVARRE, D.A. Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using highperformanceliquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.5253–5260, 2006.

SHOEB, M. Anticancer agentes from medicinal plants. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v.1, p.35-41, 2006.

SIANI, A.C.; SILVA, A.M.P.; NAKAMURA, M.J.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.O.; RAMOS, M.F.S.; KAISER, C.R. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Hydrodistillate from *Mariscus pedunculatu*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, p.354–59, 2001.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.618-626, 2008.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, p.801-807, 2002.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152–178, 1999.

SOUSA, C.M.; SILVA, H.R.E.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-355, 2007.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v.30, p.351–355, 2007.

SOUZA, P.H.; NETO M.H.S.; MAIA, G. Componentes funcionais nos alimentos. **Sociedade Brasileira de Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.37, p.127-135, 2003.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: K. Hostettmann, (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London: Academic Press, pp. 71–133, 1990.

SULLIVAN, G.W.; SAREMBOCK, I.J.; LINDEN, J. The role of inflammation in vascular diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, p.591–602, 2000.

TAN, Z.; ZHANG, Y.; DENG, J.; ZENG, G.; ZHANG, Y. Purified vitexin compound 1 suppresses tumor growth and induces cell apoptosis in a mouse model of human choriocarcinoma. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.22, p.360–66, 2012.

TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v.5, p.203-209, 2013.

TANG, X.H.; YAN, L.; GAO, J.; YANG, X.; XU, Y.; GE, H.; YANG, H. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.51, p.1134–1139, 2012.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.231–241, 2008.

TEKE, G.N.; KUETE, V. Acute and Subacute Toxicities of African Medicinal Plants. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, p.63-98, 2014.

THOMAS, S.; QUINN, B.A.; DAS, S.; DASH, K. R.; EMDAD, L.; DASGUPTA, S.; WANG, X.; DENT, P.; REED, J.C.; PELLECCIA M.; SARKAR, D.; FISHER, P.B. Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy. **Expert Opin Ther Targets**, v.17, p.61–75, 2013.

THOMSON, H.; MACNAB, R. Fluid and electrolyte problems in renal dysfunction. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v.10, p.289-292, 2009.

TOPHAM, C.H.; TAYLOR, S.S. Mitosis and apoptosis: how is the balance set? **Current Opinion in Cell Biology**, v.25, p.1–6, 2013.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.93-98, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell**, v.39, p.44–84, 2007.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.27, p.1-7, 2006.

VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and metabolism**, v.9, p.813-839, 2007.

VITTA, F.A.; PRATA, A.P. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Cyperaceae. **Boletim do Instituto de Botânica**. São Paulo, v.27, p.43-62, 2009.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E.; PALMER, K.H.; MCPHAIL, A.T.; SIM, G.A. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca Acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v.88, p.3888-90, 1966.

WALSH, M.E.; SHI, Y.; REMMEN, H.V. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. **Free Radical Biology and Medicine**, v.66, p.88–99, 2014.

WALSH, V.; GOODMAN, J. Cancer chemotherapy, biodiversity, public and private property: the case of the anti-cancer drug Taxol. **Social Science & Medicine**, v.49, p.1215-1225, 1999.

WARD, R.J.; DEXTER, D.T.; CRICHTON, R.R. Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. xxx, p.xxx-xxx, 2015.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; EDEN, M.E.V.; AUST, S.D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, p.577-83, 2002.

WENDLAND, A.E.; FARIAS, M.G.; MANFROI, W.C. Volume plaquetário médio e doença cardiovascular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, p.371-378, 2009.

WONG, Y.; CHEN, R.; CHEN, B. Core and specific network markers of carcinogenesis from multiple cancer samples. **Journal of Theoretical Biology**, v.362, p.17–34, 2014.

WU, J.Q.; KOSTEN, T.R.; ZHANG, X.Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.46, p.200–206, 2013.

YANG, C.S.; LAMBERT, J.D.; JU, J.; LU, G.; SANG, S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.224, p.265-273, 2007.

ZHANG, L; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v.109, p.33 – 41, 2006.

ZHAO, L.; CHEN, Z.; ZHAO, Q.; WANG, D.; HU, R.; YOU, Q.; GUO, Q. Developmental toxicity and genotoxicity studies of wogonin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.60, p.212-17, 2011.

ZHENG, M.; STORZ, G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. **Biochemical Pharmacology**, v.59, p.1-6, 2000.

ZHENG, Y.; ZHOU, F.; WU, X.; WEN, X.; LI, Y.; YAN, B.; ZHANG, J.; HAO, G.; YE, W.; WANG, G. 23-Hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.615-22, 2010.

ZHOU, Y.J.; LIU, Y.E.; CAO, J.G.; ZENG, G.Y.; SHEN, C.; LI, Y.L.; ZHOU, M.C.; CHEN, Y.; PU, W.; POTTERS, L.; SHI, E.Y. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.5161-69, 2009.

ANEXOS

31/03/2015

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)[Fechar](#)

De: **Ingrid Maier**" <(im_phytomedicine@t-online.de)>

Enviada: sexta-feira, 26 de dezembro de 2014 19:36:56

Para: left.ufs@hotmail.com

Ms. Ref. No.: PHYMED-D-14-00848R1

Title: Antitumor effect, induction of apoptosis and safety of Remirea maritima extracts Abul (Cyperaceae)

Phytomedicine

Original Article

Dear Dr Adriano Antunes de Souza Araujo,

This message is to acknowledge that we have received your revised manuscript for reconsideration for publication in Phytomedicine.

You may check the status of your manuscript by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/phymed/>.

Thank you for submitting your work to Phytomedicine.

Kind regards,

Ingrid Maier
Editorial Office
Phytomedicine

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.

Antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* extracts Abul (Cyperaceae)

G.A.A. Dória^a, P.P. Menezes^a, B.S. Lima^a, B.S. Vasconcelos^a, F.A. Silva^a, R.M. Henriques^b, M.G.D. Melo^a, A.V.F. Alves^c, M.O. Moraes^c, C.Pessoa^c, A.A. Carvalho^b, A.P.N. Prata^d, R.L.C.A. Junior^e, I.B. Lima-Verde^e, L.J. Quintans-Júnior^b, D.P. Bezerra^f, A.A.S. Araujo^{a*}

^aDepartment of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^bDepartment of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^dDepartment of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^eInstitute of Technology and Research, Tiradentes University, Aracaju, Sergipe, Brazil

^fGonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil

*Corresponding author. Address: Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon, Jardim Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. Tel.: +55-79-21056841.

E-mail: adriasa2001@yahoo.com.br (Adriano A. S. Araújo)

Abstract

The present study aimed to investigate the chemical composition and the anticancer potential of *R. maritima* in experimental models. The chemical composition was assessed by HPLC and LC-MS/MS. *In vitro* cytotoxic activity was determined on cultured tumor cell, and the *in vivo* antitumor activity was assessed in Sarcoma 180-bearing mice. Toxicological parameters were also evaluated as well as the humoral immune response. Among the aqueous and hydroalcoholic extracts of *R. maritima*, only 40% hydroalcoholic (40HA) showed *in vitro* cytotoxic potential, presenting IC₅₀ values of 27.08, 46.62 and >50 µg/ml for OVCAR-8, NCI-H385M and PC-3M cells lines, respectively. At the chemical composition, isovitexin, vitexin, luteolin and caffeoyl were identified and 40HA presented the highest amount of luteolin and caffeoyl. In the *in vivo* study, the tumor inhibition rates were 57.16-62.57%, and the tumor morphology presented increasing numbers of apoptotic cells. Additionally, 40HA also demonstrated significantly increased of OVA-specific total Ig. In summary, 40HA exhibited *in vitro* and *in vivo* anticancer properties without substantial toxicity.

Keywords: *Remirea maritima*; antitumor; Sarcoma 180; apoptosis; toxicity; TUNEL

1. Introduction

Cancer is a disease most feared by society because it has become a stigma of death and pain (Almeida et al., 2005). Research realized by the World Health Organization (WHO) in 2005 showed that of the 58 million deaths worldwide, cancer was responsible for 7.6 million, representing 13% (WHO, 2006).

Some natural products, such as taxol and vinca alkaloids (vinblastine and vincristine), introduced a new era whereby medicinal plants were used as anticancer agents (Cragg and Newman, 2005). In addition, topotecan and irinotecan, analogue drugs of camptothecin, which is isolated from the Chinese tree *Campototheca acuminata*, are used to treat colon and ovarian cancer (Oberlies and Kroll, 2004; Wall et al., 1966). Another natural compound, homoharringtonine, isolated from *Cephalotaxus harringtonia*, is used to treat acute and chronic myeloid leukemia (Cragg and Newman, 2005; Kantarjian et al., 1996).

Several species of the Cyperaceae family are used as food or flavoring, and they are known to have biologically active secondary metabolites (Lasekan, 2013), including xanthenes, chalcones, coumarin, flavonoids, triterpenes, benzofurans, etc. (Vitta and Prata, 2009). Some of these metabolites have been reported as antitumor agents (Androutsopoulou et al., 2009; Gao et al., 2014; Qi et al., 2009; Zhao et al., 2011).

Remirea maritima Aubl. is a small perennial species belonging to the Cyperaceae family that is commonly found on sea shores in tropical regions (Allan et al., 1969). In Brazil, it is popularly known as “pinheirinha-da-praia” and has been widely used, as a tea, in the treatment of diarrhea, kidney disease, and high fever and for therapeutic purposes, such as an analgesic and anti-inflammatory (Siani et al., 2001; Vitta and Prata, 2009). To date, only a few studies have examined the chemical and pharmacological properties of *R. maritima*. Recently, the phytochemical screening and evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of the aqueous extract of this plant were performed by Rabelo et al. (2013). Herein, the chemical composition and the anticancer effect of *R. maritima* were investigated.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

R. maritima (whole plant) was collected at the beach area of Pirambu City, Sergipe, Brazil (10°55'S, 35°6'W) on February 2011 and identified by Prof. Ana Paula N. Prata, who is a plant taxonomist from the Department of Biology. A voucher specimen (ASE **20166**) **has been deposited** in the Herbarium of the Department of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. The authors had authorization from the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation from the Brazilian Ministry of the Environment for plant collection (# 25637-1).

2.2 Preparation of extracts of *R. maritima*

The material was cleaned, dried and ground into powder form. Then, the extracts were prepared (aqueous - AE: 15 g powder/300 ml H₂O; 40% hydroalcoholic - 40HA: 15 g powder/300 ml, EtOH/H₂O 40% v/v; and 70% hydroalcoholic - 70HA: 15 g powder/300 ml, EtOH/H₂O 70% v/v) under 30 minutes of heating (100°C) followed by filtration at reduced pressure and lyophilization of the AE and solvent extracts following lyophilization of 40HA and 70HA. Yield: AE - 5.8%, 40HA – 6.2%, 70HA – 8.6%.

2.3 Chemical analyses

2.3.1 Preparation of samples for LC-MS/MS analysis

AE, 40HA and 70HA were diluted using acetonitrile/water milli-q 50:50 until concentration 1 mg/mL. After dilutions all were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore-HVHP, MA, USA) for LC-MS/MS analysis.

2.3.2 HPLC-MS/MS apparatus and conditions

The HPLC analysis were performed on a Shimadzu system consisting of a degasser DGU-20A3, a SIL-20A autosampler, two LC-20AD pumps and a SPD20Avp photodiode array detector (DAD), coupled with a CBM20A interface. The chromatographic separation was performed using a Phenomenex Luna C18 analytical column 250 x 4.6 mm (5 mm particle size). The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 20 µL. The analytical method employed a linear gradient system which consisted of (A) acetic acid:water 1.0 % (v/v) and (B) acetonitrile. The mobile phase consisted of a gradient of water and acetonitrile, starting with 10% and ending at 60% acetonitrile, and was run for 65 min. The gradient elution started with 20% B for 10 minutes, 25 -50% B to 25 minutes, 50 - 55% B to 30 minutes and 55 - 60% B to 40 minutes. A photodiode array detector was set at 340 nm for acquiring chromatograms. The quantification of the compounds in EA, 40HA and 70HA extracts was made from the calibration curves of isovitexin. All the analyses was repeated in triplicate.

Mass spectrometric analysis (MS/MS) was performed on a Bruker mass spectrometer (Walnut Creek, CA, USA) fitted with “ion trap” source. The negative ionization mode was used to analyze the compounds (m/z [M - H]⁻). Ion Trap ionization was operated in MRM and conditions were: Nebulizer pressure: 40 psi; Dry gas flow: 9 L/min; Drying gas temperature: 300 °C; Flow rate: 200 µL/min. Preliminary analysis was carried out using full scan, data dependent MS/MS scanning from m/z 150-800. Identities of the compounds were obtained by matching their molecular ions (m/z) obtained by HPLC-MS/MS with literature data and by their retention time.

2.4 Cell lines

The cytotoxicity of the *R. maritima* extracts was tested against three human tumor cell lines, NCI-H385M (bronchoalveolar lung carcinoma), OVCAR-8 (ovarian adenocarcinoma), and PC-3M (metastatic prostate carcinoma). All tumor cell lines were obtained from the National Cancer Institute of the United States (NCI-US). Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 µg/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Sarcoma 180 tumor cells, which had been maintained in the peritoneal cavity of a Swiss mouse, were obtained from the Laboratory of Experimental Oncology at the Federal University of Ceará.

2.5 Animals

Seventy Swiss mice (male, 25-30 g), obtained from the central animal house of Sergipe Federal University, Brazil, were used. The animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were kept under a 12h:12h light–dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). The animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of CEPA (Comitê de Ética para Pesquisa com Animais), Brazil. The Animal Studies Committee of Sergipe Federal University approved the experimental protocols with number 100/2011.

2.6 Determination of the effect of *R. maritima* extracts on tumor cell lines in culture

Tumor cell growth was determined as the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT) to the purple formazan product, as described by Mosmann (1983). For all experiments, tumor cells were seeded in 96-well plates (0.7×10^5 cells/ml in 100 µl of medium). After 24 h, the extracts (0.78 to 50 µg/ml) dissolved in DMSO were added to each well and incubated for 72 h. At the end of the incubation, the plates were centrifuged, and the medium was replaced by fresh medium (150 µl) containing 0.5 mg/ml of MTT. After 3 h, the formazan product was dissolved in 150 µl of pure DMSO, and the absorbance was measured using a multiplate reader (DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EUA). The drug effect was quantified as the percentage of the control absorbance of the reduced dye at 595 nm. Doxorubicin (purity >98%; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was used as the positive control.

2.7 Determination of the effect of 40HA on the growth of solid tumors in mice

Ten-day-old Sarcoma 180 ascites tumor cells (2×10^6 cell/500 μ l) were implanted subcutaneously into the left hind groin of the experimental mice (Bezerra et al., 2006). One day after inoculation, 40HA (25 and 50 mg/kg) was dissolved in saline solution and administered intraperitoneally once a day for 7 consecutive days. The negative control was injected with saline solution and the positive control was injected with 5-fluorouracil (5-FU, purity >99%; Sigma Chemical Co., 25 mg/kg). On the 8th day, peripheral blood samples were collected from the retro-orbital plexus of the mice while under light ether anesthesia and submitted to further hematological and biochemical analyses. The animals were then sacrificed in a CO₂ chamber. The tumors, livers, spleens, and kidneys were excised, weighed, and examined for morphology. Then, they were fixed in 10% formaldehyde for histological analysis. The inhibition ratio (%) was calculated using the following formula: inhibition ratio (%) = $[(A - B)/A - 1] \times 100$, where A is the average tumor weight of the negative control, and B is the tumor weight of the treated group (Bezerra et al., 2006).

2.8 Systemic toxicological evaluation

2.8.1 Determination of the effect of 40HA on body and organ weight

The mice were weighed at the beginning and end of the experiment, and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. Tumor, livers, kidneys and spleens were removed, weighed and observed for any signs of gross lesions or color changes and hemorrhages.

2.8.2 Determination of the effect of 40HA on biochemical and hematological parameters

Biochemical analyses of serum samples were performed using Clinical Chemistry® kits (Abbott; Architect C 8000). The biochemical parameters that were measured were aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, *alkaline* phosphatase, total protein, globulin and albumin to investigate liver function alterations. Urea, uric acid and creatinine were measured as renal function parameters.

Hematological analyses were performed using optical light microscopy. Hematological parameters, including the total count as well as differential counts of leukocytes, including eosinophils, lymphocytes, neutrophils and monocytes, were measured.

2.8.3 Histopathology and morphological observations

After formaldehyde fixation, the tumors, spleens, liver and kidneys were dehydrated in alcohol, diaphanized in xylene and paraffin-embedded. Subsequently, 5- μ m-thick histological sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. Histological analyses were performed under light microscopy.

2.9 Terminal deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) staining

To assess the mean number of apoptotic cells by the TUNEL technique, histological sections (5- μ m thick, n=5) were obtained from the paraffin-embedded tissue and incubated using an *in situ cell death detection kit*, POD (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). At first, the sections were deparaffinized in xylene (three changes at 3-min intervals with air-drying in between each change for better section adherence), rehydrated in graded alcohol (99, 95 and 70%) for 3 min each, and washed with deionized water. Then, the samples were treated with proteinase K (20 μ l/ml in PBS) to digest the proteins, and endogenous peroxidase activity was quenched with 2% H₂O₂ in PBS for 10 min at room temperature. Thereafter, sections were washed with 50 μ l PBS buffer, diluted TdT enzyme solution was applied, and the sections were incubated at 37°C in a humidified chamber for 1 h. After incubation, the sections were placed in stop wash buffer. Subsequently, 50 μ l of antidigoxigenin peroxidase was added, and the sections were incubated in a humidified chamber for 30 min at room temperature. The sections were again washed with PBS, and diaminobenzidine (DAB)-hydrogen peroxide was used for color development. For negative controls, the TdT enzyme was replaced with PBS on one section on each slide and was processed in parallel. Counterstaining of nuclei was performed with 2% Meyer's hematoxylin and mounted for examination. Apoptotic cells were identified as cells with brown-stained nuclei or as apoptotic bodies (fragments of apoptotic cells engulfed by neighboring cells). The number of TUNEL-positive cells was determined in 1000 counted cells, and the data are shown at the frequency of brown-stained nuclei in the total cell count.

2.10 Immunomodulatory analysis

2.10.1 Subcutaneous immunization

Three groups of five Swiss mice were immunized subcutaneously with a single dose of ovalbumin (OVA) (2 mg/kg), (OVA) (2 mg/kg) plus 40HA (25 mg/kg) or (OVA) (2 mg/kg) plus 40HA (50 mg/kg). The mice were bled from the retroorbital plexus to obtain serum samples prior to immunization and at 7, 14 and 21 days after immunization.

2.10.2 Measurement of specific antibody

Specific antibodies in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). To evaluate the ability of 40HA to increase the response elicited by OVA, the total Ig antibodies against OVA were determined using OVA (10 μ g/well)-coated plates. The plates were incubated at 37 °C for 1 h and washed three times with saline solution plus 0.05% Tween. The plates were blocked with 5% nonfat milk in saline solution for 1-2 h at 37 °C and washed once, after which 100 μ l of the appropriate serum diluted in saline solution was

added, and the plates were re-incubated for 1-2 h at 37 °C. The plates were washed again three times with saline solution plus 0.05% Tween and treated with goat anti-mouse IgG/A/M:HRP (100 µl/well, 1:2000 final dilution) for 1-2 h at room temperature. The reaction was developed by the addition of TMB (3,3'- tetramethylbenzidine) solution followed by incubation for 10 min. The intensity of the resulting color was read at 650 nm using a multiplate reader (Synergy Mx, Biotek, USA).

2.11 Statistical analyses

The data are presented as the mean \pm S.E.M. or IC₅₀ values, and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression. The differences among the experimental groups were compared using ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). All statistical analyses were performed using the GraphPad program 5.0[®].

3. Results

3.1 *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of the *R. maritima* extracts

The *in vitro* cytotoxic effects of the *R. maritima* extracts (AE, 40HA and 70HA) against three human tumor cell lines were determined using the MTT method. Only HE40 showed cytotoxic activity, with IC₅₀ values of 27.08, 46.62 and >50 µg/ml for OVCAR-8, NCI-H385M and PC-3M, respectively, (Table 1). AE and 70HA did not show any significant *in vitro* cytotoxicity at the experimental exposure levels used. Doxorubicin was used as the positive control and showed IC₅₀ values ranging from 0.85 to 1.58 µg/ml in NCI-H385M and PC-3M cells, respectively.

The criteria of the American National Cancer Institute, which considers promising plant extracts, i.e., an IC₅₀ value that must be less 30 µg/ml, was adopted in our experiment (Suffness and Pezzuto, 1990). In this context, only 40HA showed an IC₅₀ < 30 µg/ml and was submitted to an *in vivo* test.

3.2 Chemical analyses

In the choice of the HPLC conditions, the complex composition of the *R. maritima* extract required the use of a gradient elution system. This system allowed also the shortening the analysis time. The mobile phase, consisted of acetonitrile:water, showed suitable resolution and peaks separation in the extract. The analysis time was also appropriate since all the compounds were eluted in less than 40 minutes.

The HPLC analysis of the *Remirea maritima* extracts (AE, 40HA and 70HA) revealed the presence of three major peaks analyzed (340 nm) and obtained well separated with great resolution in the same retention time each (Fig. 1). Peaks were identified according with the

retention time and MS/MS analysis, and the content of compounds in the freeze-dried extracts are shown in Table 2.

The peak 1 (P1) was identified as a mixture of isovitexin-2"-O-β-D-glucopyranoside and vitexin-2"-O-β-D-glucopyranoside (Rt=4 min) with [M-H]⁻ ions at a m/z of 593 [M-H]⁻; the peak 2 (P2) was recognized as O-glycoside luteolin-7-O-glucuronide (Rt=22 min) with [M-H]⁻ ions at a m/z of 461 [M-H]⁻ (Rabelo et al, 2013), and the peak 3 (P3) was characterized as caffeoyl-D-glucose (Rt=28 min) with m/z of 339 [M-H]⁻ (Chen et al., 2012).

The others peaks present in the chromatograms exhibited UV spectra patterns of caffeoylquinic acid derivatives, with UV-max absorption bands at 340 nm, suggesting that this class of polyphenols could be the major constituent in the ES polyphenol fraction.

3.3 *In vivo* antitumor evaluation of 40HA

The effects of 40HA on mice inoculated with Sarcoma 180 tumors are presented in fig.2. A significant reduction in tumor weight in 40HA-treated animals was observed at both doses (25 and 50 mg/kg) ($p < 0.05$, fig. 2A). On the 8th day, the average tumor weight of the control mice inoculated with Sarcoma 180 was 1.59 ± 0.14 g. Mice treated intraperitoneally with 40HA presented tumor weights of 0.68 ± 0.09 and 0.59 ± 0.06 g and inhibition ratios of 57.16 and 62.57% at doses of 25 and 50 mg/kg, respectively. The administration of 5-FU reduced the tumor weight to 77.50% within the same period.

Histopathological analysis of the tumors excised from control mice showed intense cellular and nuclear pleomorphisms (Fig. 2B). Muscle invasion, mitosis, coagulation, necrosis and the presence of tumor cell emboli within blood vessels were also observed in the control group. In the tumors removed from animals treated with 5-FU (25 mg/kg), peripheral nerve sheath invasion by tumor cells was observed.

Apoptotic cell death was also detected in the tumors removed from all experimental groups using the TUNEL assay (Fig. 3). TUNEL-positive cells showed brown-stained nuclei and were found in all groups. However, the average number of brown-stained nuclei was significantly increased in the 5-FU group and in both groups treated with 40HA when compared with the control group ($p < 0.05$).

3.4 Systemic toxicological evaluation

There was no significant difference on body weight gain after treatment with 40HA (25 and 50 mg/kg) compared with the control group. After 40HA treatment, no significant changes in the weights of the livers or kidneys were observed in mice inoculated with Sarcoma 180 tumors (Table S1). However, spleen weights were significantly increased when compared to the control group when administered a dose of 25 mg/kg 40HA ($p < 0.05$). The 5-FU group showed a significant decrease in spleen weight ($p < 0.05$).

Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, *alkaline* phosphatase, total protein, globulin and albumin were measured to investigate liver function alterations. Urea, uric acid and creatinine were measured to assess the renal parameters. No significant changes in the renal or liver parameters were observed in Sarcoma 180-inoculated mice treated with 40HA (Table S2). On the other hand, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were significantly decreased in 5-FU-treated animals ($p < 0.05$).

In the peripheral blood from mice inoculated with Sarcoma 180 tumors, 40HA at both dosages did not induce a significant change (Table S3). The 5-FU group showed a significant reduction in the total leukocytes ($p < 0.05$).

Histopathological analyses of spleens removed from animals treated with 40HA, in doses, showed a moderate increase in the white pulp and nest of megakaryocytes (Fig. 4), which suggests immunomodulatory activity (Mousinho et al., 2011; Vasconcelos et al., 2007). Visible atrophy was observed in the spleens of 5-FU-treated animals. Histopathological analyses of the livers and kidneys removed from all groups showed no remarkable changes in the morphology of their tissues (Fig. S1 and S2).

3.5 Immunomodulatory analysis

To investigate the effect of 40HA on induction of the humoral immune response, mice were immunized with a single dose of OVA (2 mg/kg), OVA (2 mg/kg) plus 40HA (25 mg/kg) or OVA (2 mg/kg) plus 40HA (50 mg/kg). The OVA-specific antibody levels, at a dilution of 1:20, in the serum were measured prior to and 7, 14 and 21 days after immunization by ELISA. The amount of OVA-specific total Ig in the sera was significantly increased by 40HA at dose of 50 mg/kg in compared with the OVA control ($p < 0.05$, fig. S3).

4. Discussion

Herein, we provide the first report on the anticancer activity of *R. maritima*. In addition, isovitexin, vitexin, luteolin and caffeoyl were identified in the plant extract. Supporting our findings, Rabelo et al. (2013) have also identified isovitexin, vitexin, luteolin in aqueous extracts of *R. maritima*.

Flavone C-glucosides, such as isovitexin and vitexin, are present in many food stuffs and nutraceuticals and have received much attention recently because of their antioxidant and anticancer properties (Can et al., 2013; Huang et al., 2005; Tan et al., 2012). Moreover, luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) is a flavonoid member and is found in several vegetables and fruits, such as celery, peppers, olive oil, carrots peppermint, rosemary, thyme and oregano, which have been previously demonstrated to exhibit a variety of pharmacological actions, including anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative effects (Chiu and Lin, 2008).

In this context, Attoub et al. (2011) have shown that luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) (25–200 μ M) reduced the viability of human cancer cell lines originating from lung (LNM35), colon (HT29), liver (HepG2) and breast (MCF7/6 and MDA-MB231-1833). Luteolin effectively increased the sub-G1 (apoptotic) fraction of cells through caspase-3- and caspase-7-dependent pathways. The authors have suggested that luteolin is a safe molecule with clinical potential for use in cancer therapy.

It is the first time that caffeoyl-D-glucose compound is isolated in Cyperaceae species and there has been no previous report on the antitumor effect or pharmacological activities of Caffeyol-D-glucose.

In our study, 40HA showed cytotoxicity to tumor cell lines, with an IC_{50} value of 27.08 μ g/ml for OVCAR-8. According to Suffness and Pezzuto (1990), extracts presenting IC_{50} values below 30 μ g/ml for tumor cell line assays are considered promising for anticancer drug development. As in the current study, 40HA was able to inhibit the growth of Sarcoma180 tumor cells, and these effects might be related to its chemical constituents, particularly luteolin, since its anticancer effect already described and the 40HA had higher amounts of this constituent compared with AE and 70HA. However, 40HA also presented the greatest content of caffeyol which could be beneficial or more likely their association.

Apoptosis is a genetically regulated programmed cell death phenomenon, and it is important in host defense and cancer suppression (Khan et al., 2008). Many anticancer therapies work by inducing apoptosis in cancer cells as a result of a cascade of biochemical events that promote the typical changes in cell morphology, such as membrane blebbing, DNA fragmentation and formation of apoptotic bodies, resulting in cell death (Chen et al., 2010; Elmore, 2007). The TUNEL assay is a widely accepted technique for detecting DNA fragmentation in apoptotic cells (Dutta et al., 2012). In our experimental model, we observed that 40HA significantly increased the number of TUNEL-positive cells in Sarcoma 180 tumors. Therefore, these results suggest that the antitumor effect of 40HA may be related, at least in part, to its pro-apoptotic effect.

One the biggest challenges regarding the development of new chemotherapeutics against cancer are minimization of the adverse side effects of these drugs. Therefore, the systemic toxicological parameters were also examined in 40HA-treated animals. None of the analyzed systemic toxicological parameters were affected by 40HA treatment. On the other hand, 5-FU, a clinically useful chemotherapeutic agent, induced a significant decrease in body weight, relative spleen weight and total leukocytes. In addition to the atrophy of the spleen white pulp, these findings are indicative of the immunotoxicity of this drug, as demonstrated in previous reports (Gonzaga et al., 2009). However, the serum levels of *transaminases* (aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase) were decreased in this study. These findings might be explained by the lower growth of the tumors in 5-FU-treated animals in comparison with the saline-treated animals, which would ultimately result in less invasion-derived tissue damage and consequent lower release of these transaminases into the serum.

In contrast, 40HA seemed to act as an immunostimulatory agent, as suggested by the increased relative spleen weight, the number of megakaryocytic nests and the production of OVA-specific antibodies in 40HA-treated mice.

In conclusion, 40HA showed *in vitro* and *in vivo* antitumor effects without presenting substantial toxicity. This activity seemed to be related to its cytotoxic and immunostimulant properties.

Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES, CNPq, FINEP and FAPITEC/SE for financial support and fellowships. This work was performed according to the special authorization for access to genetic resources in Brazil # 010240/2013-6, issued by CNPq/MCTI.

References

- Allan, R.D., Correll, R.L., Wells, R.J., 1969. Two New Phenolic Ketones from *Remirea maritima* (Cyperaceae). *Tetrahedron Lett.* 10(53), 4673-4674.
- Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, C.A., Donnici, C.L., 2005. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. *Quím. Nova.* 28(1), 118-129.
- Androutsopoulos, V.P., Ruparelia, K., Arroo, R.R.J., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2009. CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Toxicology.* 264(3), 162-170.
- Attoub, S., Hassan, A.H., Vanhoecke, B., Iratni, R., Takahashi, T., Gaben, A.M., Bracke, M., Awad, S., John, A., Kamalboor, H.A., Sultan, M.A.A., Arafat, K., Gespach, C., Petroianu, G., 2011. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 651(3), 18–25.
- Bezerra, D.P., Castro, F.O., Alves, A.P.N.N., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Elmiro, F.J.M., Costa-Lotufo, L.V., 2006. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 801–807.
- Brancalion, P.H.S., Tay, D., Novembre, A.D.L.C., Rodrigues, R.R., Marcos Filho, J., 2010. Priming of Pioneer tree *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) seed evaluated by an automated computer imaging system. *Sci. Agric.* 67, 274-279.
- Can, O.D., Ozkay, U.D., Ucel, U.I., 2013. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 699, 250–257.

- Chen, F., Wang, W., El-Deiry, W.S., 2010. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 80, 724–730.
- Chen, H., Inbaraj, B.S., Chen, B., 2012. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *Int. J. Mol. Sci.* 13(1), 260–285.
- Chiu, F.L., Lin, J.K., 2008. Down regulation of androgen receptor expression by luteolin causes inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells and xenografts. *Prostate*.68, 61–71.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as source of anticancer agentes. *J. Ethnopharmacol.* 100, 72-79.
- Dutta, D., Park, I., Mills, N.C., 2012. Fixation temperature affects DNA integrity in the testis as measured by the TUNEL assay. *Toxicol. Pathol.* 40(4), 667-674.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35(4), 495–516.
- Gao, D., Jin, F., Liu, H., Wang, Y., Jiang, Y., 2014. Metabonomic study on the antitumor effect of flavonoid derivative 3d in HepG2 cells and its action mechanism. *Talanta*, 118, 382–388.
- Gonzaga, M.L.C., Bezerra, D.P., Alves, A.P.N.N., De Alencar, M.N.M., Mesquita, R.O., Lima, M.W., Soares, S.A., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., 2009. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an (1 4)-glucan– b-(1 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *J. Nat. Med.* 63(1), 32-40.
- Huang, S.T., Chen, C.T., Chieng, K.T., Huang, S.H., Chiang, B.H., Wang, L.F., Kuo, H.S., Lin, C.M., 2005. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1042, 387-95.
- Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Anderlini, P., Talpaz, M., 1996. Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigation options. *Blood*.87, 3069-3081.
- Khan, N., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2008. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1333–1339.
- Lasekan, O., 2013. Volatile constituents of roasted tigernut oil (*Cyperus esculentus* L.). *J. Sci. Food Agric.* 93(5), 1055–1061.
- March, R.E., Lewars, E.G., Stadey, C. J., Miao, X., Zhao, X., Metcalfe, C.D., 2006. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 248(1-2), 61–85.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1-2), 55–63.
- Mousinho, K.C., Oliveira, C.C., Ferreira, J.R.O., Carvalho, A.A., Magalhães, H.I.F, Bezerra, D.P., Alves, A.N.N.N., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., Matos, M.P.V., Ramos, M.R., Moraes, M.O., 2011. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. *J. Ethnopharmacol.* 137, 421–426.

- Oberlies, N. H., & Kroll, D. J. (2004). Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J. Nat. Prod.*, 67, 129-135.
- Qi, Q., Peng, J., Liu, W., You, Q., Yang, Y., Lu, N., Wang, G., Guo, Q., 2009. Toxicological studies of wogonin in experimental animals. *Phytother. Res.* 23(3), 417-422.
- Rabelo, A.S., Oliveira, I.D., Guimarães, A.G., Quintans, J.S.S., Prata, A.P.N., Gelain, D.P., Venceslau, E.M., Santos, J.P.A., Quintans-Júnior, L.J., Bonjardim, L.R., Barison, A., Campos, F.R., Santos, A.D.C., Nogueira, P.C.L., Costa, E.V., Moraes, V.R. S., Araújo, A.A.S., 2013. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). *J. Ethnopharmacol.* 145, 11-17.
- Siani, A.C., Silva, A.M.P., Nakamura, M.J., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.O., Ramos, M.F.S., Kaiser, C.R., 2001. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Hydrodistillate from *Mariscus pedunculatu*. *J. Brazil. Chem. Soc.* 12(3), 354 - 359.
- Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: K. Hostettmann, (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London: Academic Press, pp. 71–133.
- Tan, Z., Zhang, Y., Deng, J., Zeng, G., Zhang, Y., 2012. Purified vitexin compound 1 suppresses tumor growth and induces cell apoptosis in a mouse model of human choriocarcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 22, 360–366.
- Vasconcellos, M.C., Bezerra, D.P., Fonseca, A.M., Pereira, M.R.P., Lemos, T.L.G., Pessoa, O.D.L., Pessoa, C., Moraes, M.O., Alves, A.P.N.N., Costa-Lotufo, L.V., 2007. Antitumor Activity of Biflorin, an *o*-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora*. *Biol. Pharm. Bull.* 30(8), 1416—1421.
- Vitta, F.A., Prata, A.P., 2009. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Cyperaceae. *Bol. Inst. Bot. (São Paulo)*, 27, 43-62.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., Sim, G.A., 1966. The Isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca Acuminate*. *J. Am. Chem. Soc.* 88(16), 3888-3890.
- WHO (World Health Organization). Cancer, 2006. URL <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np31/en/>. Accessed 02/04/2014.
- Zhao, L., Chen, Z., Zhao, Q., Wang, D., Hu, R., You, Q., Guo, Q., 2011. Developmental toxicity and genotoxicity studies of wogonin. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 60(2), 212-217.

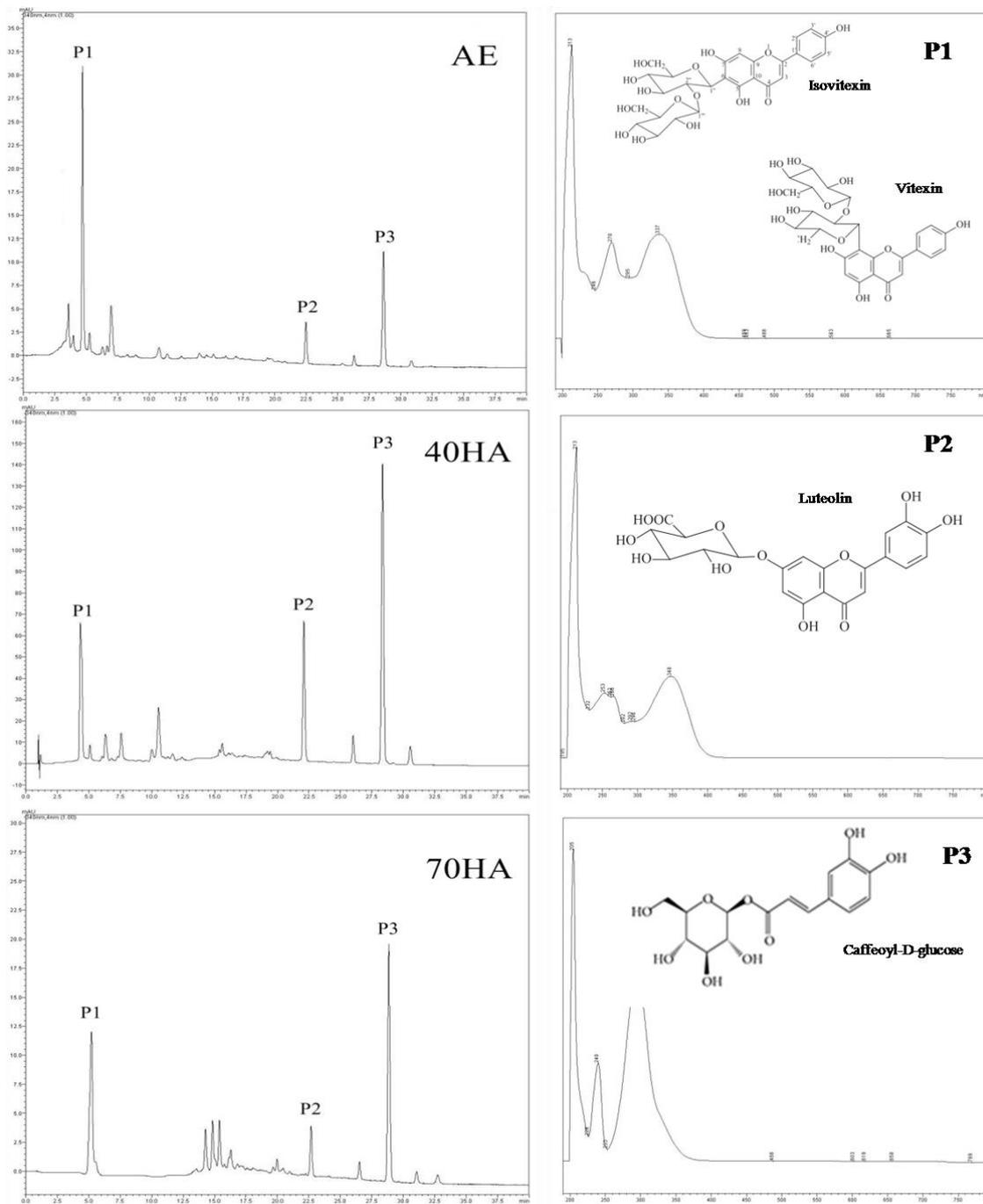


Figure 1. HPLC profile at 340 nm, diode array spectra at 200-400 nm and the chemical structures of the compounds isolated from *Remirea maritima* extracts.

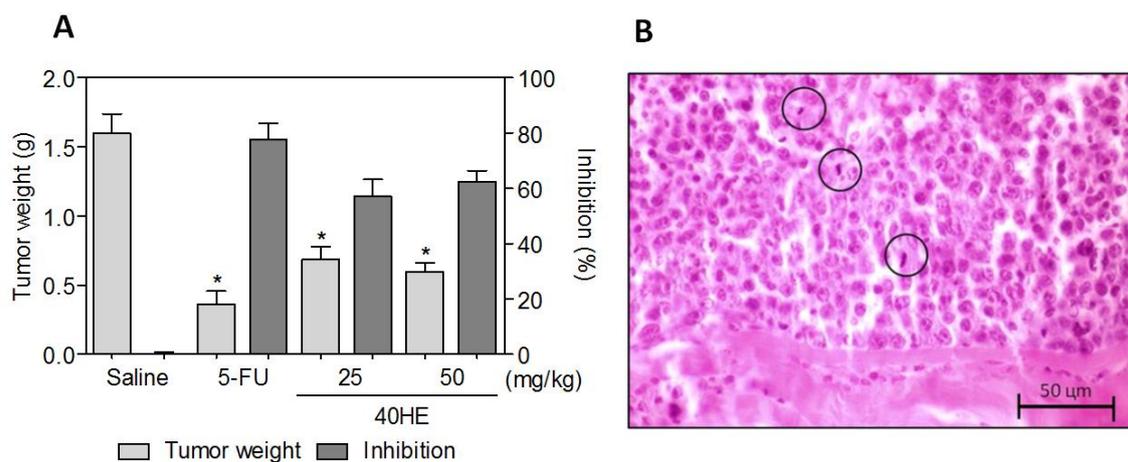


Figure 2. Effect of the 40% hydroalcoholic extract (40HA) of *Remirea maritima* on mice inoculated with Sarcoma 180 tumors. **(A)** The inhibition rate of 40HA on tumor growth. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of 10-17 animals. * $p < 0.05$ compared with the saline group by ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. **(B)** Histopathology of Sarcoma 180 tumor cells. The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy (total magnification 400x). Circles show the presence of mitosis. 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg) was used as the positive control, and the negative control was treated with saline solution.

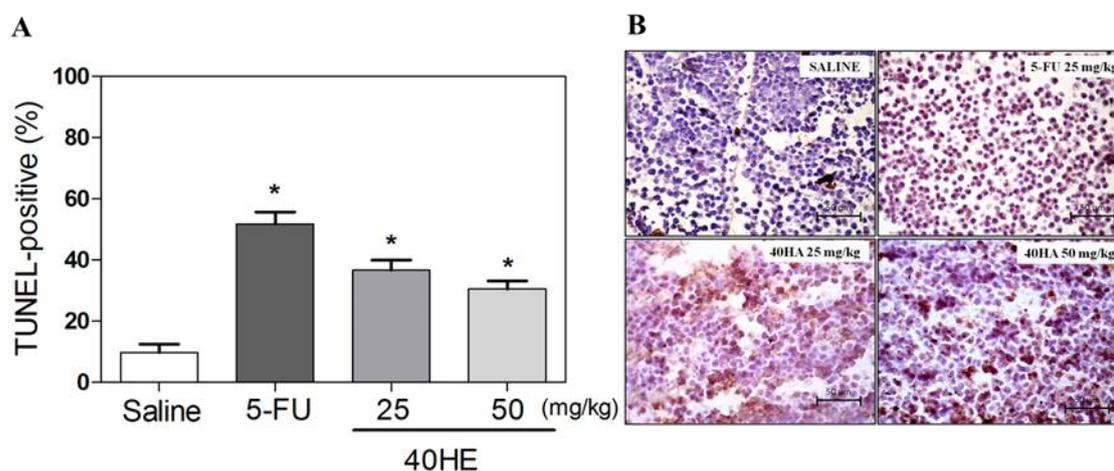


Figure 3. The effect of 40% hydroalcoholic extract (40HA) of *Remirea maritima* on *in situ* apoptotic cell labeling, as shown by the TUNEL assay. **(A)** The rate of increase of TUNEL-positive cells in 40HA-treated mice. One thousand cells were counted. * $p < 0.05$ compared with the saline group by ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. **(B)** Immunohistochemistry of apoptotic cells in Sarcoma 180 tumors. The tissue sections were stained by the terminal deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) technique and analyzed by light microscopy (total magnification 400x). 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg) was used as the positive control, and the negative control was treated with saline solution.

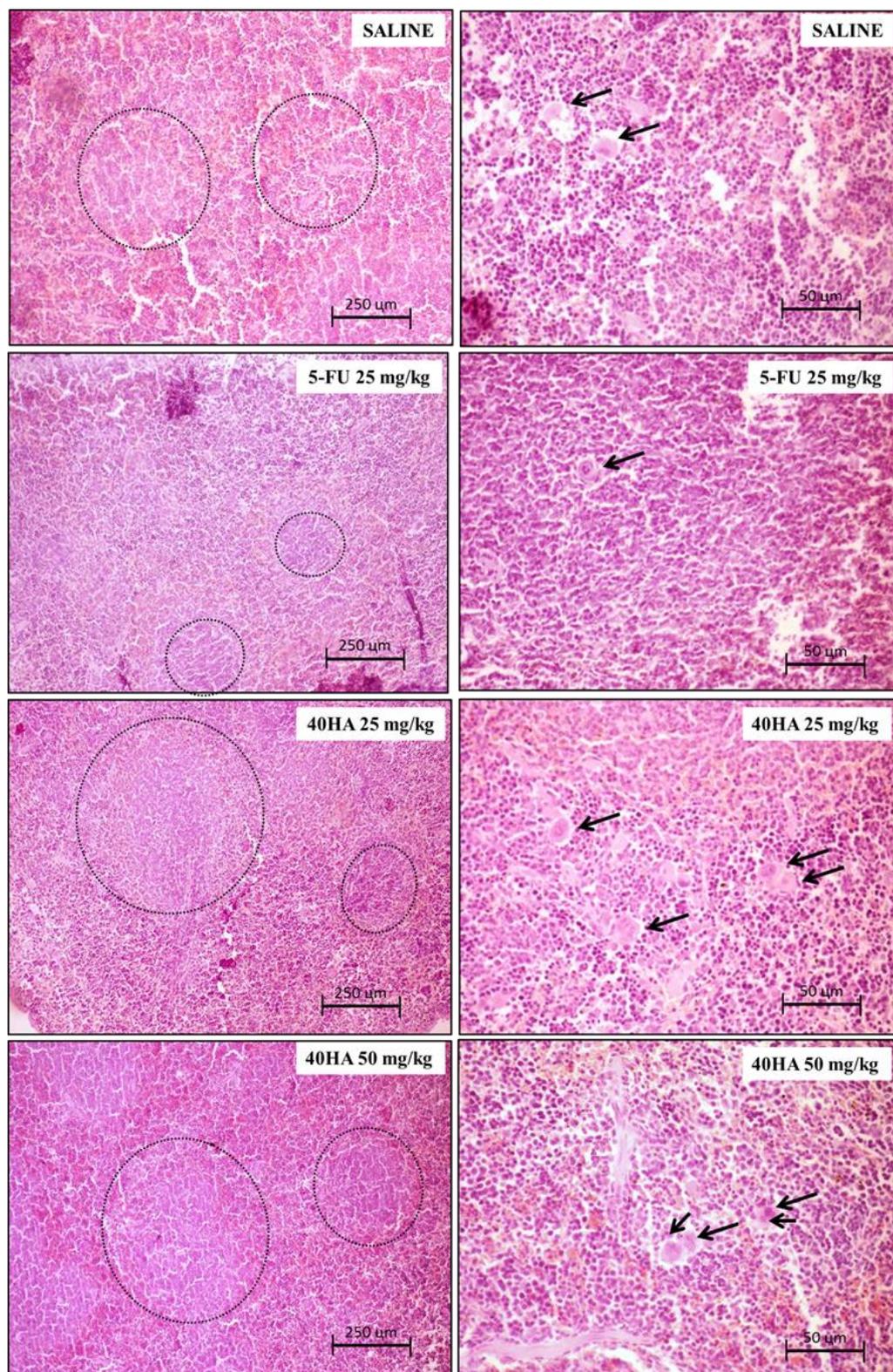


Figure 4. Histopathology of a spleen from a mouse inoculated with a Sarcoma 180 tumor. The size of white pulp (circle) and the number of megakaryocytes (arrow) are presented. The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy (total magnification 400x). 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg) was used as the positive control, and the negative control was treated with saline solution.

Table 1. *In vitro* cytotoxic activity of the 40% hydroalcoholic extract (40HA) of *Remirea maritima*.

Data are presented as IC₅₀ values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression from

Cell lines	Histotype	40HA(µg/ml)	Doxorubicin
NCI-H385M	Bronchoalveolar lung carcinoma	46.62	0.85
		40.59 – 53.53	0.56 – 1.30
OVCAR-8	Ovarian adenocarcinoma	27.08	1.19
		24.97 – 29.36	0.90 – 1.56
PC-3M	Metastatic prostate carcinoma	>50	1.58
			1.07 – 2.36

four independent MTT assays. Doxorubicin was used as the positive control.

Table 2. Content of compounds in the freeze-dried from *R. maritima* extracts.

Peak	Rt (min)*	Compound	[M – H] ⁻	[M – H] ⁻ (daughter ions)	Content (%)		
					AE	40HA	70HA
P1	4	Isovitexin and vitexin- <i>O</i> - β-D-glucopyranoside	m/z 593	293	13.0	8.6	9.0
P2	22	Luteolin-7- <i>O</i> -glucuronide	m/z 461	285	3.0	11.0	4.3
P3	28	Caffeoyl-D-glucose	m/z 339	179	4.9	25.0	11.4

*Retention time

31/03/2015

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)[Fechar](#)

De: **Wei Zhang** (wei.zhang@mdpi.com)
Enviada: terça-feira, 31 de março de 2015 06:04:03
Para: Adriano Araujo (left.ufs@hotmail.com)
Cc: Grace Doria (gracedoria@hotmail.com); Anderson Santos (andersonfarmacia@yahoo.com.br); Leonardo Bittencourt (lsbittencourt@hotmail.com); Rafael Bortolin (rafaelbortolin@hotmail.com); Paula Menezes (paulamenezes_16@yahoo.com.br); Bruno Vasconcelos (bruninho_farma@hotmail.com); Rebeca Souza (reoliveiradesouza@gmail.com); Maria Jose Fonseca (magika@fcfrp.usp.br); Alan Santos (alandiego0@yahoo.com.br); Francilene Silva (farmsilva@hotmail.com); Daniel Gelain (dgelain@yahoo.com.br); Jose Moreira (00006866@ufrgs.br); Ana Prata (apprata@yahoo.com.br); Lucindo Quintans-Júnior (lucindojr@gmail.com); Molecules Editorial Office (molecules@mdpi.com)

Dear Dr. Araujo,

Thank you very much for providing the revised version of your paper:

Manuscript ID: molecules-72572

Type of manuscript: Article

Title: Redox-active profile characterization of Remirea maritima extracts and its cytotoxic effect in mouse fibroblasts (L929) and melanoma (B16F10) cells

Authors: Grace Doria, Anderson Santos, Leonardo Bittencourt, Rafael Bortolin, Paula Menezes, Bruno Vasconcelos, Rebeca Souza, Maria Jose Fonseca, Alan Santos, Francilene Silva, Daniel Gelain, Jose Moreira, Ana Prata, Lucindo Quintans-Júnior, Adriano Araujo *

Received: 8 December 2014

E-mails: gracedoria@hotmail.com, andersonfarmacia@yahoo.com.br, lsbittencourt@hotmail.com, rafaelbortolin@hotmail.com, paulamenezes_16@yahoo.com.br, bruninho_farma@hotmail.com, reoliveiradesouza@gmail.com, magika@fcfrp.usp.br, alandiego0@yahoo.com.br, farmsilva@hotmail.com, dgelain@yahoo.com.br, 00006866@ufrgs.br, apprata@yahoo.com.br, lucindojr@gmail.com, left.ufs@hotmail.com

Submitted to section: Natural Products,

http://www.mdpi.com/journal/molecules/sections/natural_products

Natural Antioxidants and Ageing

http://www.mdpi.com/journal/molecules/special_issues/natural_antioxidants_ageing

We will continue processing your paper and will keep you informed about the status of your submission.

Kind regards,

Wei Zhang

Article

Redox-active profile characterization of *Remirea maritima* extracts and its cytotoxic effect in mouse fibroblasts (L929) and melanoma (B16F10) cells

Grace A.A. Dória^a, Anderson R. Santos^a, Leonardo S. Bittencourt^b, Rafael C. Bortolin^b, Paula P. Menezes^a, Bruno S. Vasconcelos^a, Rebeca O. Souza^c, Maria José V. Fonseca^c, Alan D.C. Santos^d, Shanmugam Saravanan^a, Francilene A. Silva^a, Daniel P. Gelain^b, José C.F. Moreira^b, Ana P.N. Prata^e, Lucindo J. Quintans-Júnior^d, Adriano A.S. Araujo^{a*}

^aDepartment of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^bDepartment of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

^cDepartment of Pharmacy, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil,

^dDepartment of Physiology and Chemistry, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^eDepartment of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

* Corresponding author. Address: Department of Pharmacy, Federal University; of Sergipe, Av. Marechal Rondon, Jardim Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil. Tel: +55-79-21056841. Fax: +55-79-21056827. E-mail: left.ufs@hotmail.com (Adriano A. S. Araújo)

External editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: *Remirea maritima* is a tropical plant with reticulated root system belonging to the family Cyperaceae, is also known to have biologically active secondary metabolites. However, very few data of *R. maritima* biological actions are available and there is no reports regarding redox-active profile of this plant. In this study, we carried out the total phenolic content of *Remirea maritima* hydroalcoholic (RMHA) extracts, redox properties against different reactive species generated *in vitro* and their cytotoxic effect against fibroblasts (L929) and melanoma (B16F10) cells. Total reactive antioxidant potential index (TRAP) and

total antioxidant reactivity (TAR) results revealed RMHA at all concentration tested showed significant antioxidant capacity. RMHA also effective against hydroxyl radical formation, reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} and scavenging nitric oxide (NO) radicals. In *in vitro*, the level of lipid peroxidation was reduced by RMHA extract and the data showed significant oxidative damage protection. The RMHA cytotoxicity was evaluated by neutral red assay in fibroblast (L929) and melanome (B16F10) cells obtained results showed that the RMHA (40 and 80 $\mu\text{g/mL}$ respectively) reduced 70% of the viable cells. In conclusion, this study represents the first milestone regarding the potential of *R. maritima* as antioxidant and anti-proliferative properties against B16F10 melanoma cells.

Keywords: *Remirea maritima*; free radicals; cellular viability; oxidative stress; cytotoxicity; total phenol

1. Introduction

Pathogenesis of numerous chronic diseases has been related with unbalancing of free radicals on systemic tissues [1]. Epidemiological surveys indicate that diet plays an important role in preventing chronic diseases due to the antioxidants [2,3,4].

Plant-based foods contain significant amounts of phytochemicals which possess numerous health benefits [5]. Mostly the phytochemicals are the phenols which can be divided into at least 10 types depending on their basic structure, including flavonoids as the most important types of polyphenolic compounds [6]. Several studies have been reported previously all these phytochemicals having their antioxidant activity, anti-carcinogenic and anti-mutagenic effects by inhibiting cell proliferation [7,8,9,10]. Furthermore, antioxidants are the main compounds considered to exert anti-inflammatory, anti-aging and health-promoting effects in the human body [11].

Remirea maritima Aubl. is a tropical plant belonging to the family Cyperaceae with reticulated root system, developing their rhizomes through below the sand. This family is known to have biologically active secondary metabolites as xanthones, chalcones coumarin, flavonoids, triterpenes, benzofurans, etc [12]. *R. maritima* is popularly employed in medicinal preparations for the treatment of diarrhea, kidney disease, fever, pain, and inflammatory processes [13,14]. At the moment, there are few studies about chemistry and pharmacology of *R. maritima* plant has reported. Recently, the aqueous extract was evaluated for chemical composition, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and nitric oxide (NO) assays, anti-inflammatory and antinoceptive properties. The phytochemical profile of the aqueous extract showed three flavone glycosides (vitexin, isovitexin and luteolin) and presented an effective anti-inflammatory activity and reduced NO and lipid peroxidation [15]. The phytochemical characterization, and antitumor effect of RMHA were performed by our group and showing vitexin, isovitexin, luteolin and cafeoil in it composition and showed antitumor activity

(manuscript submitted). Thus, this study provided the first evidence regarding the complete redox-active properties *in vitro* and the cytotoxicity of *R. maritima* hydroalcoholic extracts.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride), Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), 2-Deoxy-D-ribose, glycine, Griess reagent, SNP (sodium nitroprusside), TBA (2-thiobarbituric acid), (4,6-dihydroxypyrimidine-2-thiol), H₂O₂ (hydrogen peroxide), DMSO (Dimethyl sulfoxide), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, Ferric Chloride, Sodium Acetate, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Materials used in cell culture were acquired from Gibco[®]/Invitrogen (São Paulo, SP, Brazil) and from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Plant material and preparation of *R. maritima* extracts

R. maritima, the whole plant, was collected at beach area of Pirambu city, Sergipe, Brazil (10°55'S, 35°6'W), on February 2011 and it was identified by Prof. Ana Paula Prata, plant taxonomist, from the Department of Biology/UFS. A voucher specimen (No. ASE 20166) has been deposited in the Herbarium of Department of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. The permission for plant collection was given by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation from the Brazilian Ministry of the Environment (# 25637-1).

The whole plant was cleaned, dried and grounded into powder form. The hydroalcoholic extract of *R. maritima* (RMHA) were prepared under 30 minutes heating (15 g powder/300 mL, EtOH/H₂O 40% v/v), followed by filtration, solvent extraction and lyophilization (Yield: RMHA – 6.2%). The extract re-dissolved readily in distilled water which was used as the vehicle.

2.3 Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content was performed by using the Folin–Ciocalteu reagent, with slight modification of Singleton et al. [16]. The RMHA (1 mg) was diluted to 1 mL of water. An aliquot (100 µL) of RMHA was added to 6 mL of deionized water and 500 µL of the Folin–Ciocalteu reagent. The mixture was shaken for 1 minute. After addition 2 mL of 15% Na₂CO₃ solution, the mixture was shaken for 0.5 minute. The solution was then diluted with deionized water to a final volume of 10 mL. After incubation for 120 minutes at 23°C, the total phenolic content was determined by using a spectrophotometer at 750 nm. Gallic acid was used as the standard, and total phenolic content was expressed as (mg gallic acid equivalents/g of RMHA) through the calibration curve with gallic acid. The calibration curve range was 20–350 mg/mL (R² = 0.999).

2.5 *In vitro* redox-active profile

2.5.1 Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR)

Total reactive antioxidant potential (TRAP) is an *in vitro* non-enzymatic method that is based on provided by antioxidants action on the fluorescence decay of luminol-enhanced chemiluminescence generated by reaction of luminol (o-aminophthaloylhydrazide) with the peroxy radicals produced by thermal decomposition of free radical generator 2,2'-Azobisisobutyramidinium chloride (AAPH) [17, 18]. First, the AAPH (120 mM final concentration) solution was prepared by adding the AAPH reagent in 100 mM glycine buffer pH 8.6 (20 mL final volume) followed by addition of 4 μ L luminol (0.001 mM final concentration) in the dark and then we allowed the system stabilize for 2h before first reading [19]. Different concentrations of RMHA were added and the luminescence produced by the free radical reaction was quantified in a liquid scintillator counter (Wallac 1409, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) for 2h. The system was considered the chemoluminescence emitted by AAPH thermolysis alone. The data were transformed in area under curve (AUC) calculated by software (GraphPad software[®] San Diego, CA; version 5.0) as previously described [20].

The Total antioxidant reactivity (TAR) readings were performed in the same experiment. These results were calculated as the ratio of light intensity in absence of samples (I_0)/light intensity after RMHA addition [21].

2.4.2 Hydroxyl radical-scavenging activity

The assay measures the ability of the antioxidants to scavenge the hydroxyl radicals generated by reaction Fe^{2+} and H_2O_2 (Fenton reaction). The antioxidant capacity is indirectly determined by measuring (in the presence or absence of extracts) of the malondialdehyde (MDA) amount generated by reaction between 2-deoxy-D-ribose and hydroxyl radical. MDA amount was determined by absorbance measuring at 532 nm of chromophore generated in the reaction between MDA and thiobarbituric acid (TBA) [22,18]

The reactions were started by the addition of 100 μ L Fe^{2+} ($FeSO_4$ 6 μ M final concentration) to solutions containing 100 μ L 50 mM 2-deoxyribose (5 mM final concentration), 100 μ L of 1 mM H_2O_2 (100 μ M final concentration) and 700 μ L 20 mM of phosphate buffer (pH 7.2).

To measure RMHA antioxidant activity against hydroxyl radicals, different concentrations (0.1 to 100 μ g/ μ L) of RMHA were added to the system before Fe^{2+} addition. Reactions were performed for 15 minutes at room temperature and were stopped by the addition of 4% phosphoric acid (v/v) followed by 500 μ L 1% TBA addition (w/v, in 50 mM NaOH). Solutions were boiled for 15 min at 95°C, and then cooled at room temperature. After cooling, the absorbance was measured at 532 nm and results were expressed as percentage of MDA formed related to reaction system.

2.4.3 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

This assay is used to determine the ability of iron reduction by antioxidants. Briefly, in dark environment, we added 90 μL of each RMHA extract in tested concentrations in screw tubes followed by addition of 270 μL distilled water and 2.7 mL of FRAP reagent (2.5 mL of 10 mM TPTZ, 2.5 mL of 20 mM Ferric Chloride and 25mL of 0.3 M Acetate Buffer pH 3.6). After the mixture was homogenated and incubated in 37°C for 30 minutes and readings were performed at 595 nm. A standard curve from a 5 mM ferrous sulphate (Fe^{2+} source) standard were performed to calculate the amount of Fe^{2+} produced during the reduction of Fe^{3+} by RMHA extracts.

2.4.4 Fe^{2+} Chelation Assay

The ferrous ion-chelating activity of RMHA was estimated as previously described by Cheng et al [23]. Each RMHA concentration was incubated with 50 μL of 2 mM FeCl_2 for 10 min. The reaction was initiated by adding 200 μL of 5 mM ferrozine followed by incubation for 5 minutes at room temperature. The Ferrozine reacts with free iron yielding a red chromophore with absorbance measured at 562 nm. EDTA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a standard chelating agent, served as the positive control. The Fe^{2+} chelating activity was calculated using the equation below:

$$\text{Chelating activity (\%)} = (1 - \text{Absorbance of sample}/\text{Absorbance of control}) \times 100$$

2.4.5 Nitric oxide (NO^\cdot) scavenging activity

Nitric oxide scavenging activity of RMHA extracts was determined from decomposition of sodium nitroprusside in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) generating NO. Nitrite ions produced by interaction between NO generated with oxygen was measured by the Griess reaction [24]. The reaction mixture is composed by 10 mM sodium nitroprusside (SNP) in phosphate buffer (pH 7.4) and RMHA at different concentrations totaling 1 mL final volume. This mixture were incubated at 37°C for 1 h and after this, an aliquot of 0.5 mL was taken and homogenized with 0.5 mL Griess reagent. The absorbance of chromophore was measured at 540 nm. Results were expressed as percentage of nitrite formed compared to SNP alone representing 100% nitrite production.

2.4.6 Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay was employed to quantify lipid peroxidation [25]. TBARS method was used to measure the antioxidant capacity of RMHA extract using egg yolk homogenate as lipid rich substrate [26]. First, egg yolk was homogenized (1% w/v) in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4), sonicated at power 4 and 1 mL of emulsion was mixed with 0.1 mL of RMHA at different concentrations. Then, 0.1 mL of

AAPH solution (0.12 M) was added as peroxy radical generating source to induce the lipid peroxidation. Incubation medium alone (egg yolk + PB 20 mM) without AAPH was used as control. Reactions were carried out at 37°C. Samples for 30 min and an aliquot (0.5 mL) were centrifuged with 0.5 mL of trichloroacetic acid (final concentration 10%) at 10000g for 10 min. 0.5 mL from supernatant was mixed with 0.5 mL TBA (0.67%) and heated at 95°C for 30 min heated and cooled at room temperature. Sample's absorbance was measured by using a spectrophotometer at 532 nm and the results were expressed as percentage of MDA formed compared to induced control (AAPH alone).

2.5 Cells line and culture conditions

The cytotoxicity assay of RMHA was performed using against L929 (mouse fibroblasts) and B16F10 (melanoma) cell lines, all obtained from the Cell bank of the Rio de Janeiro, Brazil. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. The medium was replaced every two days and the cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.5.1 In vitro cytotoxicity assay

Cytotoxic activity was performed by Neutral Red assay. This method is based on the uptake of dye by the lysosomes of viable cells [27, 28].

Cells were seeded at a density of 10⁵ cells/well into 96-well plates and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Then, 20 µL of the RMHA, at different concentrations (10–360 µg mL⁻¹) in water was added to the culture plates for 24 h.

After treatment, cells were rinsed once with saline. Cells were then incubated for 3 h with neutral red solution (50 µg/mL in the well). Thereafter the medium was removed, the cells were washed quickly with an aqueous solution of 1% of formaldehyde and 1% of CaCl₂, and then 200µL of a solution of 1% acetic acid and 50% ethanol was added to each well to extract the dye. After agitation the plate was transferred to a microplate reader equipped with a 540 nm filter (Cary 50 Bio UV-Visible, Spectrophotometer, Varian, Inc, Melbourne, Australian) to measure absorbance. The cellular viability is express as the percentage of viable cells compared to the control group.

For each assay, RMHA (6.25 mg mL⁻¹) was dissolved in distilled water and serial dilutions were obtained from this stock solution.

3. Statistical analysis

The *in vitro* antioxidant assays were carried out with RMHA extract n = 3 (i.e., 3 vials per group). The differences among data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. The results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. The cell culture experiments were performed with n = 4 and the results were expressed as mean ± standard error of the mean

(SEM) of four independent experiments. The IC_{50} was calculated by non-linear regression fit analysis. In all cases differences were considered significant if $p < 0.05$. Data analyses were performed using the (GraphPad software[®] San Diego, CA; version 5.0).

3. Results

3.1 Determination of total phenolic content (TPC)

The determination of total phenolic in RMHA was analyzed by the Folin-Ciocalteu and estimated by chemical equivalent content through comparison with standard phenolic compound (gallic acid). Total phenolic content of the extract was 582.5 mg gallic acid equivalent/gm of RMHA extract.

3.2 Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR)

The general antioxidant capacity of RMHA extract was evaluated by TRAP and TAR assays. In the TRAP assay, RMHA concentrations ranging from 0.001 to 100 $\mu\text{g/mL}$ showed a significant antioxidant effects in a dose-dependent manner (Fig. **1A**). At the level of 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$, concentrations of RMHA extract revealed the better results similar to the TROLOX[®] (75 $\mu\text{g/mL}$) used as a reference antioxidant. RMHA concentration ranges 0.1 to 100 $\mu\text{g/mL}$ also showed a significant antioxidant capacity in TAR assay (Fig. **1B**) and concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ RMHA extract shows enhanced result when compared to control and TROLOX[®] groups.

3.3 Hydroxyl radical-scavenging activity

Degradation of the 2-DR by hydroxyl radicals generated *in vitro* by Fenton reaction was used to evaluate the hydroxyl radical scavenging capacity of RMHA extract. Concentrations at 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$ of RMHA extract were effective in scavenging the hydroxyl radicals (Fig. **2A**), also showing similar results of the TROLOX[®] (75 $\mu\text{g/mL}$). Concentration level at 100 $\mu\text{g/mL}$ results of RMHA extract were better in reducing the hydroxyl radicals than TROLOX[®] (200 nM). We also calculated the IC_{50} of RMHA hydroxyl scavenging activity it showed IC_{50} values of 13.1 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. **2B**).

Figure 1. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of RMHA in different concentration. (A) TRAP analysis; (B) TAR values calculated. TROLOX[®] (75 $\mu\text{g/mL}$) was used as standard antioxidant. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test).

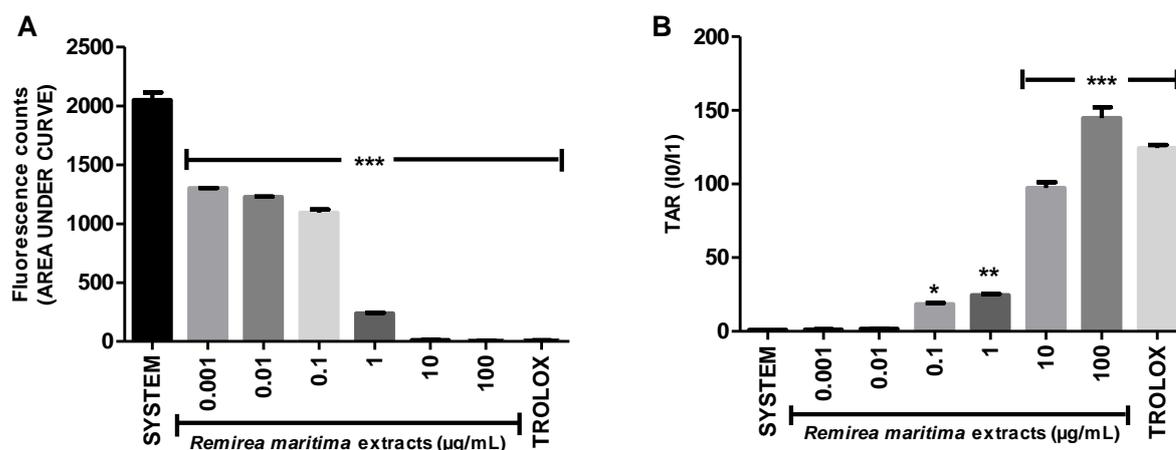
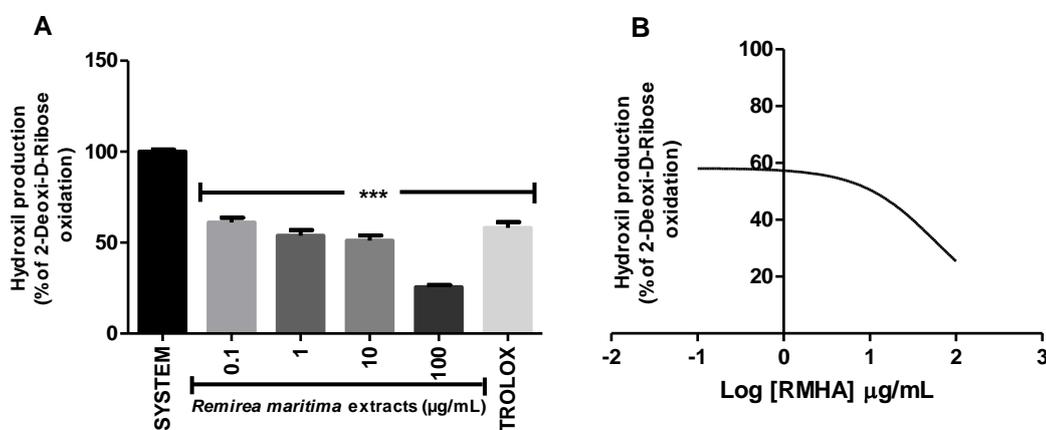


Figure 2. Hydroxyl scavenging activities. (A) Hydroxyl radical-scavenging activity was quantified using 2-deoxyribose oxidative degradation *in vitro*; (B) Log IC₅₀ of RMHA hydroxyl scavenging activity. TROLOX[®] (75 µg/mL) was used as standard antioxidant. Bars represent mean ± SEM. *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test).

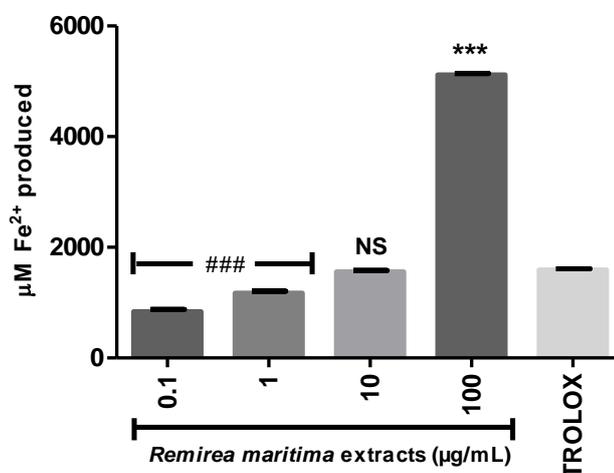


3.4 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and Fe²⁺ Chelation Assay

To evaluate the RMHA are able to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺, we performed the FRAP assay. All tested concentrations are able to reduce iron however at concentration of 10 µg/mL of RMHA were exhibit similar results to TROLOX[®] (75 µg/mL) and at the concentration of 100 µg/mL RMHA were more efficient than standard antioxidant in reducing the iron (Fig. 3).

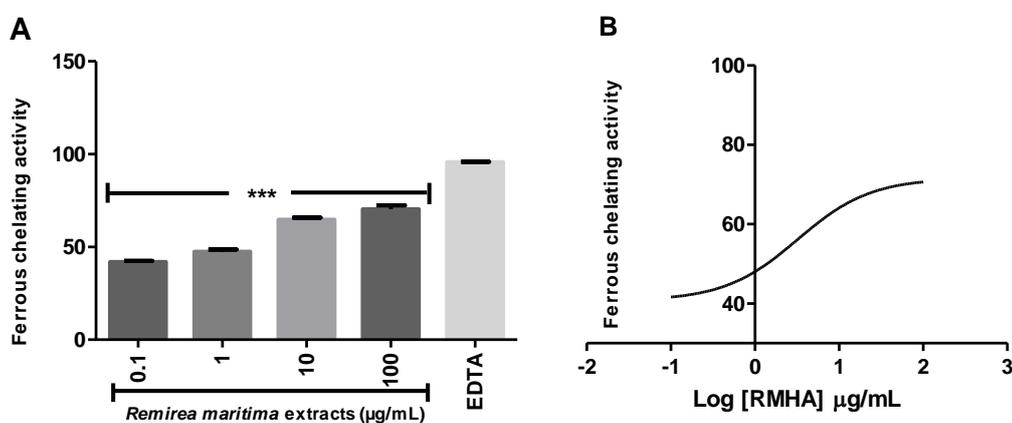
Figure 3. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). TROLOX[®] (75 µg/mL) was used as standard antioxidant. ### $p < 0.0001$ indicating less efficient than TROLOX[®], NS Non-Significant compared to TROLOX[®], *** $p < 0.0001$ indicating

higher efficiency than TROLOX[®] (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test). Bars represent mean \pm SEM.



Ferrous ion-chelating activity is considered an important indicator in any oxidative stress involving ferrous ion. Ferrozine can form complexes with Fe²⁺ yielding a red chromophore quantifiable by spectrophotometry. However, in the presence of chelating agents, such as RMHA extracts, the complex formation is disrupted or prevented, resulting in a decrease in the red color of the complex. Measurement of color reduction therefore allows for estimation of the metal chelating activity of the analysed extract. All RMHA extracts were efficient in chelating ferrous ion (Fig. 4A), thus preventing the aforementioned Fenton reaction and at low IC₅₀ (2,4 µg/mL) (Fig. 4B).

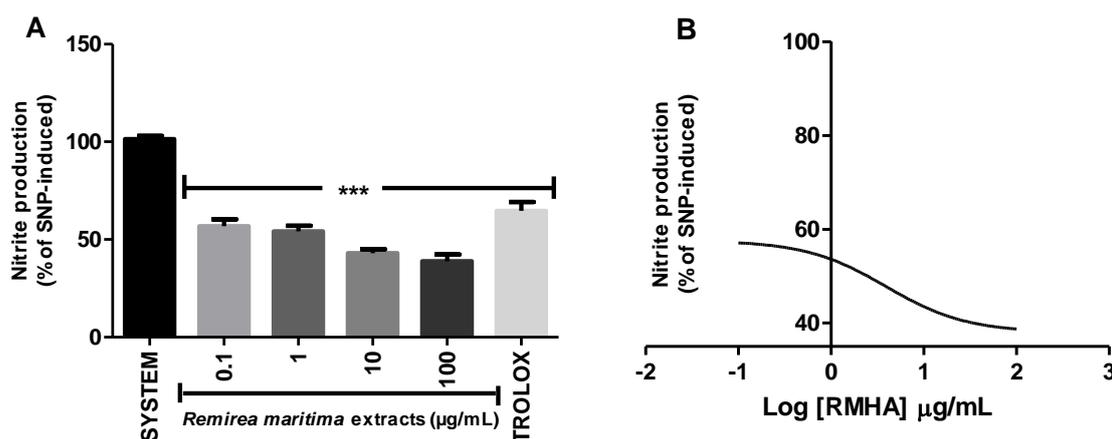
Figure 4. Chelating activity evaluated by Ferrozine assay. (A). The ability of RMHA extracts in prevent the Fe²⁺-Ferrozine complex formation, thus decreasing the red color compared to control. (B) Graphic of Log IC₅₀. EDTA was used as standard iron chelating agent. Bars represent average \pm SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$. One-Way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.



3.6 Nitric oxide (NO) scavenging activity

To investigate the ability of RMHA to scavenge NO was measured by quantifying the production of nitrite derived from sodium nitroprusside (SNP) by the Griess reaction. All 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$, concentrations of RMHA tested showed capacity to scavenge NO radicals generated *in vitro* (Fig. 5A). The obtained results of RMHA were greater than TROLOX[®]. IC₅₀ of RMHA scavenging effect upon SNP-induced NO production was also calculated it showed IC₅₀ values of 4.04 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5B).

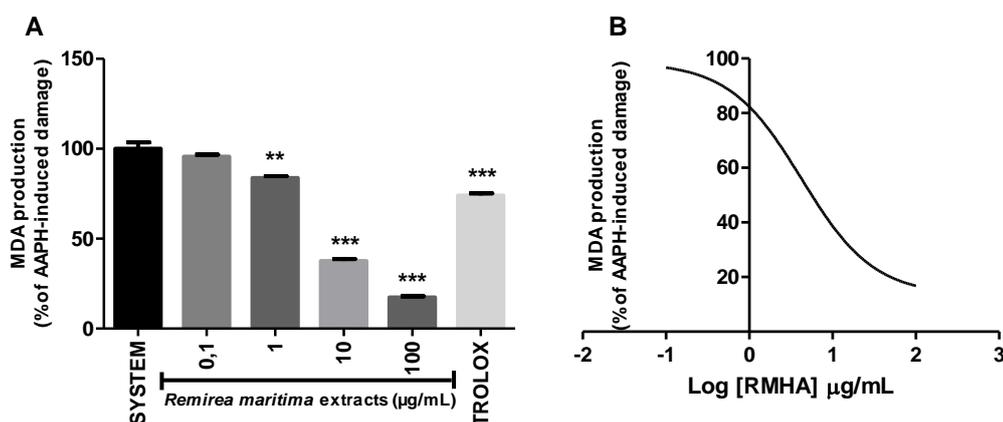
Figure 5. Nitric oxide (NO). (A) NO scavenging assay. Nitric oxide was generated from spontaneous decomposition of sodium nitroprusside (SNP) in the presence of oxygen, producing nitrite ions, which were measured by the Griess reaction. TROLOX[®] (75 $\mu\text{g/mL}$) was used as standard antioxidant. (B) Log IC₅₀ of RMHA NO scavenging activity. Bars represent mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test).



3.7 Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

The capacity of RMHA to protect oxidative damage from lipid peroxidation was measured by quantification of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) generated by AAPH in a lipid-rich incubation medium. The effect of different concentrations of RMHA on lipid peroxidation is shown in (Fig. 6A). At concentrations of 1-100 $\mu\text{g/mL}$, the results of RMHA reduced the AAPH-induced lipid peroxidation when compared with standards. At concentrations of 10-100 $\mu\text{g/mL}$, RMHA shows to protect the lipid peroxidation better than TROLOX[®]. Fig. 6B shows IC₅₀ values of the ability from RMHA to prevent lipid peroxidation and it was 4.04 $\mu\text{g/mL}$.

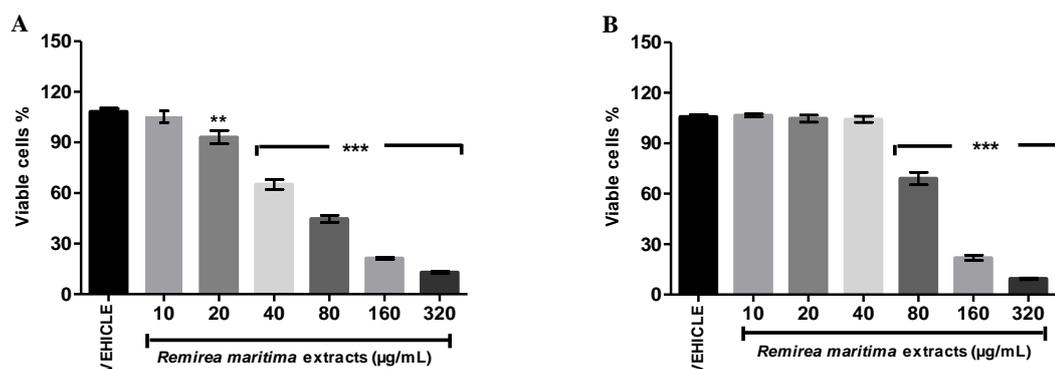
Figure 6. Lipid peroxidation by production of Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) *in vitro*. (A) Effect of different concentrations of RMHA on the lipid peroxidation; (B) Log IC₅₀ of RMHA lipid peroxidation activity. TROLOX[®] (75 µg/mL) was used as standard antioxidant. Bars represent mean ± SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test).



3.8 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity evaluation was conducted in two strains of cells, normal cells of L929 fibroblast (Fig. 7A) and tumor cells, melanoma B16F10 (Fig. 7B). RMHA showed cytotoxic activity with IC₅₀ values of 70.96 µg/mL (65.59 – 77.96) in fibroblasts cells (L929) and IC₅₀ values of 108.30 µg/mL (101.90 – 115.00) in melanoma cells (B16F10). At the 80 µg/mL of RMHA were observed a significant reduction of melanoma viable cells, while were seen a significant decreased of normal cells at the 20 µg/mL of RMHA.

Figure 7. Effect of RMHA on cell viability at different concentration on reaction medium assessed by Neutral Red assay. (A) L929 – fibroblasts cells and (B) B16F10 – melanoma cells. Control group was used **distilled** water (1:1). n=4 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test).



4. Discussion

Several evidences already reported that reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are involved in the pathogenesis of several diseases such as cancer, inflammatory diseases, neurodegenerative disorders, hypertension, diabetes and cardiovascular disorders [29, 30, 31, 32, 33].

ROS/NOS are free radicals which are atoms or groups with highly reactive unpaired electrons [34]. ROS represent a class of most important free radicals produced in living systems. Oxygen is essential to survival of aerobic beings, however, the process of reduction of oxygen and water to generate ATP can generate ROS as intermediates, such as superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) and non-free radicals, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), which causes potential damage to cells[31].

On the other hand, ROS/NOS, under normal physiological conditions, participate as regulatory molecules, intracellular messengers, tissue protection against further insults, controlling cell proliferation by inducing apoptosis and defending against cancer [35, 36, 37]. Thus, ROS, as byproducts of oxygen metabolism, are constantly produced in the human body and removed by antioxidant defense by different pathways, antioxidants compounds, antioxidants enzymes, proteins and exogenous components as carotenoids, flavonoids, and other phenolic compounds, including vitamin E, vitamin C and coumarin derivatives [38, 39, 40].

Briefly, oxidative stress can play an important role in the pathogenesis of diseases in according to scavenging systems that balance ROS generation and elimination [41].

Antioxidants are compounds that prevent or interfering in the oxidation of oxidisable substrate such as DNA, lipids, and proteins, at low concentrations. In biological systems, there are two main classes of the antioxidants systems: enzymatic and nonenzymatic [42] antioxidant systems.

Several studies have shown that the redox activity from natural antioxidants is related to the total content of phenolic compounds [43, 44, 45]. Generally these compounds are highly present in vegetable and fruits which observed capacity to reducing oxidative stress [46, 47, 6].

The TPC was evaluated by using the Folin–Ciocalteu reagent the plant extract showed a higher level of phenolic compounds (582.5 mg gallic acid/g RMHA extract) compared to TPC of several plants, such as *Acacia podallyriifolia* (206.4 – 338.5 mg gallic acid/g) [48], *Terminalia brasiliensis*, *Terminalia fagifolia*, *Copernicia cerifera*, *Cenostigma macrophyllum*, *Qualea grandiflora* (250.0 – 763.6 mg gallic acid/g) [49], *Thai indigenous* (5.4 – 180.5 mg gallic acid/g) [50] and *Morinda citrifolia* (196.8 mg gallic acid/g) [51]. Hence, the high TPC that led us to investigate the redox-active profile of RMHA extracts since phenolic compounds are described to have antioxidant properties [52, 53]. The redox properties of RMHA was evaluated using different approaches to understand the possible effects in different reactive species generating sources, such as superoxide radical (O_2^-), hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), peroxy, nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) and redox active metals.

TRAP/TAR assays showed general antioxidant ability of RMHA. TRAP and TAR are different methods employed to estimate the general antioxidant potential and capacity of samples *in vitro*. In the **Fig. 1A**, the bars represent the area under the curve of a kinetic measurement of AAPH-induced luminescence during 120 minutes (TRAP measurement); at the TAR, the immediate effect of the addition of an antioxidant compound in the free radical-induced chemiluminescence is measured [54]. The RMHA extracts was able to maintain the AAPH-induced free radical production inhibited during 120 min (TRAP assay) in all tested concentrations (**Fig. 1A**). Regarding TAR measurements, RMHA showed high efficiency in inhibit the AAPH-induced free radical production when immediately added to a system, in the concentrations ranging from 0.1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Fig. 1B**). As we can see in figure 1A, the concentrations 0.001 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presented suitable antioxidant kinetic behavior, but low antioxidant quality when the TAR measurements were analyzed (**Fig. 2B**), thus justifying the reason why such concentrations were chosen for the other analysis described in this study.

Peroxyl radicals formed in the reaction of TRAP participates in the initiation and propagation steps of the lipid peroxidation and can produce cytotoxic and genotoxic products. These toxic products promote cell damage involved in the pathogenesis of many diseases [55, 1].

Moreover, RMHA was capable to quench hydroxyl radicals. The extract was highly effective in inhibiting 2-DR hydroxyl-induced damage. At the doses 0.1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed a significant antioxidant activity, which was similar to TROLOX[®] (**Fig. 2**). The Fenton reaction is an important source of hydroxyl radicals. This reaction is due to the combination of hydrogen peroxide and free iron inside the cell. In this study, we demonstrated that the RMHA extracts are able to quench hydroxyl radicals, and thinking about Fenton chemistry, one last question needed to be answered. The RMHA extracts are capable of reducing and chelating iron thus minimizing chemical Fenton? In all tested concentrations, RMHA proved to be efficient in reducing free iron, but only 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed similar or better performance, respectively, to TROLOX[®] (**Fig. 3**). The ferrous ion (Fe^{2+}) is required for oxygen transport, electron transport and the activities of many enzymes and it is founded in the physiological concentrations in human body capable to participate of Fenton reaction, generating hydroxyl radicals [34]. The RMHA extracts were able in chelate Fe^{2+} in all tested concentrations, thus preventing the hydroxyl radical generation (**Fig. 4**). It is important to mention that aforementioned redox active metals are involved in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer, where high iron concentrations were found in neural plaques, increasing the oxidative damage, whereas the amyloid-beta deposition enhance the H_2O_2 generation and consequently the generation of hydroxyl radicals by Fenton chemistry. Based on this results, RMHA could represent a promising alternative to prevent or decrease the oxidative damage caused by the most reactive and harmful radical, the hydroxyl radical.

NO^\bullet is an important mediator of acute and chronic inflammation by stimulation cyclooxygenase (COX) activity resulting in unbalanced production of pro-inflammatory

prostaglandins. The ability of RMHA to scavenge NO[•] was measured by quantifying the production of nitrite derived from sodium nitroprusside (SNP) by the Griess reaction. The data shows that 0.1 to 100 µg/mL concentrations of RMHA were significantly decreased SNP-derived nitrite formation, indicating a potential role as NO-scavenging compound (**Fig. 5**) and, therefore, it might regulate the production of these reactive species in biological systems. Rabelo et al. [15] have evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Remirea maritima* and the results suggested that this extract has an anti-inflammatory action probably mediated via inhibition of peripheral mediators (such as the synthesis of prostaglandins, NO, ROS). However, the aqueous extract only reduced NO formation at concentrations of 100 µg/mL to 1 mg/mL [15], while the RMHA showed significantly decreased nitric oxide production at 0.1 to 100 µg/mL and all of them were greater than TROLOX[®] (**Fig. 5**). In neurodegenerative diseases the inflammatory scenario is considered as a pivotal feature, that contributes significantly to the increase in oxidative stress and hence the progression of the disease. A pro-inflammatory condition, could lead to a nitric oxide overload, increasing the oxidative damage due the peroxynitrite formation.

The lipid peroxidation can be defined as a cascade of biochemical events resulting from the action of free radicals on the unsaturated lipids of cell membranes, which leads to alteration of permeability, loss of selectivity for input and/or output of nutrients and toxic substances to the cell, DNA changes, oxidation of LDL and commitment of extracellular matrix components [56].

RMHA was capable to prevent the *in vitro* lipid peroxidation as evidenced from the TBARS assay at 1 to 100 µg/mL concentration (**Fig. 6A**). Rabelo et al. [15] also tested the lipid peroxidation ability of aqueous extract of *Remirea maritima* and this extract inhibited significantly free radical-induced by TBARS at concentrations of 100 µg/mL to 1 mg/mL [15]. According to literature of medicinal plants, natural products which present a reduction in lipid peroxidation from 10 µg/mL are considered to have high antioxidant potential [54, 57]. RMHA showed IC₅₀ values of 7.5 µg/mL (**Fig. 6B**), indicating a strong potential in decreasing lipid peroxidation *in vitro*.

In this study, the RMHA extracts presented more efficient antioxidant activities in TRAP/TAR, FRAP, chelating activity, hydroxyl and Nitric Oxide scavenging activities compared with plant extracts or isolated compounds assessed by other groups, using the same approach used in the present work to investigate them [15, 52, 58, 59, 60, 61].

Some studies consider that water/alcohol solvent is better than water solvent for phenolic agents extraction [6, 57]. Since the antioxidant activity is related to total phenolic content, it is probably that RMHA redox properties might be due the presence of high polyphenol content. Several polyphenol substances found in plant-derived dietary, have shown to be able to inhibit proliferation and induce apoptosis in tumor cells [7, 8, 10]. One of the reasons for carcinogenesis is ROS production. In addition, ROS can specifically trigger certain pathways involved in tumor proliferation, contributing to genomic instability [38].

The global incidence of skin cancer is high in the world and 132,000 melanoma skin cancers occur globally each year [62], thus, the RMHA was evaluated for cytotoxicity in normal cell and for ability to inhibit the proliferation of melanoma cell lines. The selective index (SI) is often used to evaluate the differential toxicity of a compound, which is determined as a ratio between IC_{50} values of normal and cancerous cells. An SI value less or equal of 2 suggests the general toxicity of pure compound in cells [63]. The SI between fibroblasts and melanoma cells was 0.65, therefore, the results showed that, although, it presented a significantly reduction of viable cells of B1610 melanoma cells at concentration 80 to 320 $\mu\text{g/mL}$, RMHA was not selective for melanoma skin cancer cells when compared with normal fibroblast cells (**Fig. 9**).

It is important to mention that the IC_{50} value (70.96 $\mu\text{g/mL}$) of RMHA to reduce the fibroblasts cells viability is 5.41, 29.56, 17.74 and 9.46 times higher than IC_{50} value showed at *in vitro* antioxidants tests (EROs, IC_{50} 13.1 $\mu\text{g/mL}$; Ferrous ion-chelating, IC_{50} 2.4 $\mu\text{g/mL}$; NO scavenging, IC_{50} 4.0 $\mu\text{g/mL}$ and TBARS, IC_{50} 7.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively), which does not preclude its applicability as antioxidant agent since the therapeutic concentration is less than the toxic concentration for normal cells.

A previous chemical characterization of RMHA extracts performed by our group identified the compounds luteolin, vitexin and isovitexin. These compounds are flavonoids, which is previously reported in *Remirea* genus [15], and are known for their antioxidant properties [64, 65, 66].

Luteolin is flavone found in a variety of plants, especially vegetables [67, 68]. Previous studies showed a stronger antioxidant properties and lower potential pro-oxidant activity of luteolin when compared to various common flavonoids, such as quercetin and myricetin, which propose potential health benefits for humans [69].

Horváthová et al. [70] suggest that luteolin have a protective effect against H_2O_2 -induced DNA damage and possess a protective effect on chromosomal aberrations induced by cytostatic drug, melphalan, in metastasis of malignant melanoma cells.

Besides, luteolin was able to induce apoptotic cell through modulating both the extrinsic pathway and intrinsic pathways, indicating that it triggers caspase-dependant apoptosis [71]. Previous studies have shown that luteolin also reduced the viability of diverse human cancer cell lines. In this study, this flavone was capable to increase the apoptotic of cells through caspase-3- and caspase-7-dependent pathways and was suggested that luteolin is a safe molecule with clinical potential for use in cancer therapy [72].

Isovitexin and vitexin are a flavone glycoside present in some drugs, medicinal plants and nutraceuticals [73]. Isovitexin is already known to exhibit a potential antioxidant (inhibition of lipid peroxidation), to reduce the amount of hydrogen peroxide and to inhibit the production and, or release of tumor necrosis factor and prostaglandin E2 (PG2) in inflammatory processes induced by lipopolysaccharide (LPS) in mouse macrophage. These findings suggested that suppression of ROS-mediated COX-2 expression by isovitexin is beneficial in reducing inflammation and carcinogenesis [65].

Vitexin have already showed, in different studies anti-oxidant [74], peripheral analgesic and central anti-inflammatory [75, 76], anti-viral [77] and anti-convulsant [78] properties. In addition vitexin also showed anti-tumor and anti-metastatic activities and they were associated through proapoptotic process, which is mediated by a decreased Bcl-2/Bax ratio and activation of caspases [79, 80].

Based on this, it would be reasonable to suppose that the broad spectrum of *in vitro* antioxidant and its anti-proliferative effects in melanoma cells presented by RMHA extracts in this study are due to these flavonoids alone or in their association. Crude extracts generally consist of a mixture of several different compounds that can acting with antagonistic or synergistic effects. Therefore, it is interesting suppose that the fractionation of the extract could eliminate toxic compounds of it which can became fractions with selective antiproliferative effects.

5. Conclusion

In conclusion, the hydroalcoholic extract of *R. maritima* containing a higher amount of total phenols and previous studies show the presence of some flavonoids, which has potential anti-tumor, anti-metastatic, anti-inflammatory and anti-oxidant activities. However, the constituents are known to present several beneficial activities, until at the moment no study has shown antioxidant *in vitro* and anti-proliferative to skin cells in synergism with these compounds. The strong and efficiency antioxidant properties of RMHA presented in this study for the first time by different mechanisms and from the some concentration of this extract exhibit the antioxidant capacity which is greater than a commercial standard antioxidant product TROLOX[®]. Further, promising results obtained in this presented study also suggest that *in vivo* approaches are needed to better evaluate the RMHA potential profile as herbal medicine to prevent various diseases related to unbalanced production of oxygen and nitrogen reactive species. Additionally, it could serve as chemopreventive agent or as adjuvant in chemotherapy against melanoma cells, however, further evaluations should be performed to confirm anti carcinogenic activity of this plant extracts.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES, CNPq, FINEP and FAPITEC/SE for financial support and fellowships. This work was performed according to the special authorization for access to genetic resources in Brazil # 010240/2013-6, issued by CNPq/MCTI.

Conflicts of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

- [1] Wu, L.; Hsu, H.; Chen, Y.; Chiu, C.; Lin, Y.; Ho, J.A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem* **2006**, *95*, 319–327.
- [2] Bauman, A.E. Updating the evidence that physical activity is good for health: an epidemiological review 2000–2003. *J Sci Med Sport* **2004**, *7*, 6–19.
- [3] Rosillo, M.A.; Sánchez-Hidalgo, M.; Cárdeno, A.; Aparicio-Soto, M.; Sánchez-Fidalgo, S.; Villegas, I.; Lastra, C.A. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res* **2012**, *66*, 235–242.
- [4] Chen, A.Y.; Chen Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. Review Article. *Food Chem* **2013**, *138*, 2099–2107.
- [5] Liu, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* **2003**, *78*, 517–520.
- [6] Miguel, M.G.; Nunes, S.; Dandlen, S.A.; Cavaco, A.M.; Antunes, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol* **2010**, *48*, 3418–3423.
- [7] Androutsopoulos, V.P.; Ruparelia, K.; Arroo, R.R.J.; Tsatsakis, A.M.; Spandidos, D.A. CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Toxicology* **2009**, *264*, 162–170.
- [8] Gao, D.; Jin, F.; Liu, H.; Wang, Y.; Jiang, Y. Metabonomic study on the antitumor effect of flavonoid derivative 3d in HepG2 cells and its action mechanism. *Talanta* **2014**, *118*, 382–388.
- [9] Kim, H.; Moon, J.; Kim, H.; Lee, D.; Cho, M.; Choi, H.; Kim, Mosaddik, Y.A.; Cho, S.K. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chem* **2010**, *121*, 429–436.
- [10] Malta, L.G.; Tessaro, E.P.; Eberlin, M.; Pastore, G.M.; Liu, R.H. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. *Food Res Int* **2013**, *53*, 417–425.
- [11] Becker, K.; Schroecksnadel, S.; Gostner, J.; Zaknun, C.; Schennach, H.; Überall, F.; Fuchs, D. Comparison of *in vitro* tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 164–171.
- [12] Lasekan, O. Volatile constituents of roasted tigernut oil (*Cyperus esculentus* L.). *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 1055–1061.
- [13] Allan, R.D.; Wells, R.J.; Macleod, I.K. Flavanone quinones from *Cyperus* species. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *1*, 7–8.
- [14] Siani, A.C.; Silva, A.M.P.; Nakamura, M.J.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.O.; Ramos, M.F.S.; Kaiser, C.R. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Hydrodistillate from *Mariscus pedunculatu*. *J Braz Chem Soc* **2001**, *12*, 354 – 35.
- [15] Rabelo, A.S.; Oliveira, I.D.; Guimarães, A.G.; Quintans, J.S.S.; Prata, A.P.N.; Gelain, D.P.; Venceslau, E.M.; Santos, J.P.A.; Quintans-Júnior, L.J.; Bonjardim, L.R.; Barison, A.; Campos, F.R.; Santos, A.D.C.; Nogueira, P.C.L.; Costa, E.V.; Moraes,

- V.R.S.; Araújo, A.A.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). *J Ethnopharmacol* **2013**, *145*, 11-17.
- [16] Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* **1999**, *299*, 152–178.
- [17] López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta* **2013**, *763*, 1-10.
- [18] Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J* **2013**, *21*, 143–152.
- [19] Bittencourt, L.S.; Zeidán-Chuliá, F.; Yatsu, F.K.J.; Schnorr, C.E.; Moresco, K.S.; Kolling, E.A.; Gelain, D.P.; Bassani, V.L.; Moreira, J.C.F. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. *Phytother Res* **2014**, *28*, 1615–1624.
- [20] Dresch, M.T.; Rossato, S.B.; Kappel, V.D.; Biegelmeyer, R.; Hoff, M.L.; Mayorga, P.; Zuanazzi, J.A.; Henriques, A.T.; Moreira, J.C. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* **2009**, *385*, 107–114.
- [21] Lissi, E.A.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Del Castillo, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) from luminol enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* **1995**, *18*, 153-158.
- [22] Lopes, G.K.; Schulman, H.M.; Hermes-Lima, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1472*, 142–152.
- [23] Cheng, N.; Wang, Y.; Gao, H.; Yuan, J.; Feng, F.; Cao, W.; Zheng, J. Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. *Food Chem Toxicol* **2013**, *59*, 709–714.
- [24] Basu, S.; Hazra, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytother Res*, **2006**, *20*, 896–900.
- [25] Draper, H.H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* **1990**, *186*, 421–431.
- [26] Melo, M.G.D.; Santos, J.P.A.; Serafini, M.R.; Caregnato, F.F.; Pasquali, M.A.B.; Rabelo, T.K.; Rocha, R.F.; Quintans-Jr, L.J.; Araújo, A.A.S.; Silva, F.A.; Moreira, J.C.F.; Gelain, D.P. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol In Vitro* **2011**, *25*, 462–468.
- [27] Borenfreund, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the neutral red (NR) and tetrazoliummtt tests. *Toxicol In Vitro*. **1988**, *2*, 1-6.

- [28] Cao, T.; Saw, T.Y.; Heng, B.C.; Liu, H.; Yap, A.U.J.; Ng, M.L. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol* **2005**, *25*, 101–108.
- [29] Ceriello, A.; Motz, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism under-lying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* **2004**, *24*, 816–823.
- [30] Huynh, K.; Bernardo, B.C.; McMullen, J.R.; Ritchie, R.H. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther* **2014**, *142*, 375–415.
- [31] Montezano, A.C.; Touyz, R.M. Review: molecular mechanisms of hypertension—reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol* **2012**, *28*, 288–295.
- [32] Seifried, H.E.; Anderson, D.E.; Fisher, E.I.; Milner, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* **2007**, *18*, 567–579.
- [33] Wu, J.Q.; Kosten, T.R.; Zhang, X.Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog. Neuro psychopharmacol. Biol Psych* **2013**, *46*, 200–206.
- [34] Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **2007**, *35*, 1147–1150.
- [35] Becker, L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* **2004**, *61*, 461–470.
- [36] Martin, K.R.; Barrett, J.C. Reactive oxygen species as double-edgeds words in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol* **2002**, *21*, 71–75.
- [37] Nakashima, I.; Liu, W.; Akhand, A.A.; Takeda, K.; Kawamoto, Y.; Kato, M.; Suzuki, H. 4-Hydroxynonenal triggers multi step signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Mol Asp Med* **2003**, *24*, 231–238.
- [38] Kardeh, S.; Ashkani-Esfahani, S.; Alizadeh, A.M. Review Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur J Pharmacol* **2014**, *735*, 150–168.
- [39] Kowaltowski, A.J.; Souza-Pinto, N.C.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **2009**, *47*, 333–343.
- [40] Witaicenis, A.; Seito, L.N.; Chagas, A.S.; Junior, L.D.A.; Luchini, A.C.; Rodrigues-Orsi, P.; Cestari, S.H.; Stasi, L.C. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 240–246.
- [41] Thannickal, V.J. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2003**, *284*, L24–L25.
- [42] Gongora, M.C.; Qin, Z.; Laude, K.; Laude, K.; Kim, H.W.; Folz, J.R.; Dikalov, S.; Fukai, T.; Harrison, D.G. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* **2006**, *48*, 473–481.

- [43] Brusotti, G.; Ngueyem, T.A.; Biesuz, R.; Caccialanza, G. Optimum extraction process of polyphenols from *Bridelia grandis* stem bark using experimental design. *J Sep Sci* **2010**, *33*, 1692–1697.
- [44] Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys* **2008**, *476*, 107–112.
- [45] Nour, V.; Stampar, F.; Veberic, R.; Jakopic, J. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chem* **2013**, *141*, 961–966.
- [46] Mandave, P.C.; Pawar, P.K.; Ranjekar, P.K.; Mantri, N.; Kuvalekar, A.A. Comprehensive evaluation of *in vitro* antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. *Sci Hort* **2014**, *172*, 124–134.
- [47] Pace, B.; Renna, M.F.; Renna, M.; Serio, F.; Attolico, G. multiple regression models and computer vision systems to predict antioxidant activity and total phenols in pigmented carrots. *J Food Eng* **2013**, *117*, 74–81.
- [48] Andrade, C.A.; Costa, C.K.; Bora, K.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; Kerber, V.A. Determination of the phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don., Leguminosae-mimosoideae. *Rev Bras Farmacogn* **2007**, *17*, 231–235.
- [49] Souza, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr, G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351–355.
- [50] Maisuthisakul, P.; Suttajit, M.; Pongsawatmanit, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem* **2007**, *100*, 1409–1418.
- [51] Serafini, M.R.; Santos, R.C.; Guimarães, A.G.; Santos, J.P.A.; Santos, A.D.C.; Alves, I.A.; Gelain, D.P.; Nogueira, P.C.L.; Quintans-Júnior, L.J.; Bonjardim, L.R.; Araújo, A.A.S. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. *J Med Food* **2011**, *14*, 1159–1166.
- [52] Beevi, S.S.; Narasu, M.L.; Gowda, B.B. Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant Foods Hum Nutr*, **2010**, *65*, 8–17.
- [53] Bhandari, S.R.; Kwak, J. Chemical composition and antioxidant activity in different tissues of *Brassica* vegetables. *Molecules* **2015**, *20*, 1228–1243.
- [54] Silva, E.G.; Behr, G.A.; Zannotto-Filho, A.; Lorenzi, R.; Pasquali, M.A.; Ravazolo, L.G.; Bordignon Jr, C.L.; Silva, F.A.; Aboy, A.L.; Bassani, V.L.; Henriques, A.T.; Reginatto, F.H.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J.C. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 1488–1496.
- [55] Lima, E.S.; Abdalla, D.A.P. Lipid peroxidation: mechanisms and evaluation in biological samples. *Braz J Pharmaceut Sci* **2001**, *37*, 293–303.

- [56] Davies, S.S.; Guo, L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids. Review. *Chem Phys Lipids* **2014**, *181*, 1–33.
- [57] Conde-Hernández, L.A.; Guerrero-Beltrán, J.A. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chem* **2014**, *142*, 455-460.
- [58] Li, X.; Lin, J.; Han, W.; Mai, W.; Wang, L.; Li, Q.; Lin, M.; Bai, M.; Zhang, L.; Chen, D.; Antioxidant Ability and Mechanism of *Rhizoma Atractylodes macrocephala*. *Molecules* **2012**, *17*, 13457-13472.
- [59] Sun, L.; Gao, Wan; Zhang, M.; Li, Cheng; Wang, A.; Su, Y.; Ji, T. Composition and Antioxidant Activity of the Anthocyanins of the Fruit of *Berberis heteropoda* Schrenk. *Molecules* **2014**, *19*, 19078-19096.
- [60] Fu, W.; Chen, J.; Cai, Y.; Lei, Y.; Chen, L.; Pei, L.; Zhou, D.; Liang, X.; Ruan, J. Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching. *J Ethnopharmacol* **2010**, *130*, 521-528.
- [61] Ibrahim, M.M.; Sahli, A.A.A.A.; Alaraidh, I.A.; Al-Homaidan, A.A.; Mostafa, E.M.; EL-Gaaly, G.A. Assessment of antioxidant activities in roots of Miswak (*Salvadora persica*) plants grown at two different locations in Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci*, **2015**, *22*, 168–175.
- [62] WHO (World Health Organization). Cancer **2012**. Available online: URL http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. (accessed on 01 November 2014).
- [63] Badisa, R.B.; Mina, D.A.; Latinwo, L.M.; Solima, K.F.A. Selective Anticancer Activity of Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium on Non-Small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Anticancer Res* **2014**, *34*, 5447–545.
- [64] Caruso, Í.P.; Vilegas, W.; Souza, F.P.; Fossey, M.A.; Cornélio, M.L. Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays. *J Pharmaceut Biomed* **2014**, *98*, 100–106.
- [65] Huang, S.T.; Chen, C.T.; Chieng, K.T.; Huang, S.H.; Chiang, B.H.; Wang, L.F.; Kuo, H.S.; Lin, C.M. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Ann N Y Acad Sci* **2005**, *1042*, 387-395.
- [66] Zhang, T.; Wu, W.; Li, D.; Xu, T.; Zhu, H.; Pan, D.; Zhu, S.; Liu, Y. Anti-oxidant and anti-apoptotic effects of luteolin on mice peritoneal macrophages stimulated by angiotensin II. *Int J Immunopharmacol* **2014**, *20*, 346–351.
- [67] Chiu, F.L.; Lin, J.K. Downregulation of androgen receptor expression by luteolin causes inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells and xenografts. *Prostate* **2008**, *68*, 61–71.
- [68] Lopez-Lazaro, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem*. **2009**, *9*, 31–59.

- [69] Seelinger, G.; Merfort, I.; Schempp, C.M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* **2008**, *74*, 1667–1677.
- [70] Horváthová, K.; Chalupa, I.; Sebová, L.; Tóthová, D.; Vachálková, A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutat Res* **2005**, *565*, 105–112.
- [71] Park, Y.K.; Hikegaki, M.; Abreu, J.A.S.; Alcici, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Food Sci and Technol* **1998**, *18*, 313–318.
- [72] Attoub, S.; Hassan, A.H.; Vanhoecke, B.; Iratni, R.; Takahashi, T.; Gaben, A.M.; Bracke, M.; Awad, S.; John, A.; Kamalboor, H.A.; Sultan, M.A.A.; Arafat, K.; Gespach, C.; Petroianu, G. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur J Pharmacol* **2011**, *651*, 18–25.
- [73] Can, O.D.; Ozkay, U.D.; Ucel, U.I. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* **2013**, *699*, 250–257.
- [74] Cao, D.; Li, H.; Yi, J.; Zhang, J.; Che, H.; Cao, J.; Yang, L.; Zhu, C.; Jiang, W. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. *PLoS One* **2011**, *6*, e21071.
- [75] Gorzalczany, S.; Marrassini, C.; Mino, J.; Acevedo, C.; Ferraro, G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. *J Ethnopharmacol* **2011**, *134*, 733–738.
- [76] Özkay, Ü.D.; Can, Ö.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacol Biochem Be* **2013**, *109*, 23–30.
- [77] Knipping, K.; Garssen, J.; van't Land, B. An evaluation of the inhibitory effects against rota-virus infection of edible plant extracts. *Virol J* **2012**, *9*, 137.
- [78] Abbasi, E.; Nassiri-Asl, M.; Shafeei, M.; Sheikhi, M. Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid, on pentylenetetrazole-induced seizure in rats. *Chem Biol Drug Des* **2012**, *80*, 274–278.
- [79] Tan, Z.; Zhang, Y.; Deng, J.; Zeng, G.; Zhang, Y. Purified vitexin compound 1 suppresses tumor growth and induces cell apoptosis in a mouse model of human choriocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **2012**, *22*, 360–366.
- [80] Zhou, Y.J.; Liu, Y.E.; Cao, J.G.; Zeng, G.Y.; Shen, C.; Li, Y.L.; Zhou, M.C.; Chen, Y.; Pu, W.; Potters, L.; Shi, E.Y. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 5161–5169.

Sample Availability: Samples of the *Remirea maritima* extract are available from the authors.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).


INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:
				2/3
Título do Documento:			Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2
			Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO

6.2 Qualificação: DOUTOR

6.3 CPF: 83134948400

6.4 Endereço Completo: AV. MELÍCIO MACHADO, COND. MARIA RESENDE MACHADO, 4000 CASA08

6.5 CEP: 49050-480

6.6 Telefone: (79) 9192-4545

6.7 FAX: (79) 2105-6841

6.8 E-mail: adriasa2001@yahoo.com.br

 continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:
 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

 continua em folha anexa

10. Listagem de seqüências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001
				Versão:	2
				Procedimento:	DIRPA-PQ006

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

Documentos Anexados			folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	5
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	1
<input type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) <u>DOU, CNH, Termo de Poss, Declaração dos inven- tores</u>	11

12. Total de folhas anexadas: 19 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

São Cristóvão, 07 de junho de 2014
Local e Data

Angelo Roberto Antonioli
Assinatura e Carimbo

Prof. Dr. Angelo Roberto Antonioli
Reitor

6. Inventor (72)

Nome: **GRACE ANNE AZEVEDO DÓRIA**

Qualificação: Estudante de Doutorado

CPF 828039355-20

Endereço: Rua Permínio de Souza, 1119

Telefone: (79) 9988-5572

E-mail: gracedoria@hotmail.com

Nome: **DANIEL PEREIRA BEZERRA**

Qualificação: Doutor em Farmacologia

CPF 846.758.293.68

Endereço: Rua Dr. Rômulo Serrano, 261, Ed. Palazzo Garibaldi, apt. 1304, Engenho Velho da Federação, Salvador, BA

Telefone: (71) 9337 8600

E-mail: danielpbezerra@gmail.com

Nome: **LUCINDO JOSÉ QUINTANS JÚNIOR**

Qualificação: Farmacêutico e Doutor em Farmacologia de Produtos Naturais

CPF 930.961.434-04

Endereço: Rua Benjamin Fontes, 151, Cond. Pacífico Norte, Ed. Santa Bárbara, apt 804, bairro: Luzia, Aracaju-SE

Telefone: (79)3217-9196 / 8801-5026

E-mail: lucindo_jr@yahoo.com.br;

lucindo@pq.cnpq.br

Nome: **ANA PAULA DO NASCIMENTO PRATA**

Qualificação: Doutora em Botânica

CPF 65335910453

Endereço: Avenida Oceânica 2151, Condominio Pátio Coroa do Meio, Ed. Sevilla, apto. 201, Bairro Coroa do Meio, Aracaju-SE

Telefone: (79) 98752602

E-mail: apprata@yahoo.com.br

Nome: **MAIRIM RUSSO SERAFINI**

Qualificação: farmacêutica e Doutora em Ciências da Saúde

CPF 008.937.850-40

Endereço: Rua B nº 50 apto 307 bloco 2 Farolândia, Aracaju-SE

Telefone: (79) 8804-9977

E-mail: maiserafini@hotmail.com

Nome: **PAULA DOS PASSOS MENEZES**

Qualificação: graduanda em farmácia

CPF: 044.180.155-23

Endereço: Av. Governador João Alves Filho, nº 497, Rosa Elze, São Cristóvão, SE,

Telefone: (79)99580958

E-mail: paulamenezes_16@yahoo.com.br

Nome: **BRUNO VASCONCELOS SANTANA**

Qualificação: Estudante de Farmácia

CPF 03801755509

Endereço: Rua Jorge Pereira Porto, n: 248, Cond. Vilaggio di Roma, Apt. 104

Telefone: (79) 99864000

E-mail: bruninho_farma@hotmail.com