



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**MARINA FERRAZ CORDEIRO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES IMUNOMODULADORA, ANTINEOPLÁSICA E  
ANTIBACTERIANA DE RIZOMAS DE *Limonium brasiliense*, SEMENTES DE  
*Paullinia cupana* E CASCAS DO CAULE DE *Trichilia catigua***

**RECIFE**

**2017**

**MARINA FERRAZ CORDEIRO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES IMUNOMODULADORA, ANTINEOPLÁSICA E  
ANTIBACTERIANA DE RIZOMAS DE *Limonium brasiliense*, SEMENTES DE  
*Paullinia cupana* E CASCAS DE *Trichilia catigua***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica  
da Universidade Federal de Pernambuco,  
como pré-requisito para a obtenção do Título  
de Doutor em Inovação Terapêutica.

**Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo**

**Co-orientadores: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta**

**Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello**

**Recife**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda e Larrazabal da Silva

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO  
TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO  
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. João Policarpo Rodrigues Lima

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

Cordeiro, Marina Ferraz

Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua* Marina Ferraz Cordeiro- 2017.

142 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta e João Carlos Palazzo de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais 2. Taninos 3. Toxicidade- testes I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orient.) II. Pitta, Maira Galdino da Rocha (coorient.) III. Melo, João Carlos Palazzo de (coorient.) IV. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-124

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CORDEIRO, Marina Ferraz

Título: Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*.

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 21/12/2017

### Banca Examinadora

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais,  
Thales e Lucia por toda assistência  
prestada até aqui, ao meu marido,  
Raphael e à minha filha Maria Luísa  
para que possa lhe servir de  
exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Eis que chega este dia... Dia de realizar um dos experimentos mais difíceis de se executar destes últimos 4 anos... A missão de agradecer não costuma ser fácil, porém considero ainda mais difícil agradecer ao final de uma tese de doutorado em que passaram por minha vida de graduanda até aqui, várias pessoas, que deram das mais singelas às complexas contribuições, e que levarei comigo para o resto da vida.

Todo mundo começa agradecendo a Deus e assim como todos não farei diferente, porém, agradeço à Deus não pela execução desta tese, mas pela vida dos meus pais, dos meus avós, dos meus bisavôs, de toda uma geração que culminou em minha vida, a qual dediquei com muito amor e carinho quatro anos para realizar este trabalho. Portanto, obrigada Deus pela minha família e por todo amor nela contido.

Esquecendo por enquanto meu orientador, mas seguindo fielmente os conselhos dele, faço conexão com o parágrafo anterior e agradeço a minha mãe e ao meu pai por todo investimento feito em mim, por ter acreditado que eu aqui chegaria e por continuar acreditando que vou voar ainda mais longe... Obrigada por cada vez que cuidaram da minha filha para eu fazer um experimento, para eu estudar, para eu me dedicar ao futuro... As palavras ficam pequenas quando se tratam de pai e mãe, né?... Enfim, meus sinceros agradecimentos. Amo vocês! Meus avós Alda e Oswaldo (*in memoriam*) que praticamente me criaram e me ensinaram desde as lições de casa às lições da vida. Vó, continua rezando por mim que prometo não te decepcionar... À minha irmã Renata, muito obrigada.

À minha princesinha Malu, a quem dedico toda essa tese. Os filhos têm o dom de ensinar aos pais os melhores caminhos a serem percorridos, pois estes caminhos proporcionam a eles (filhos) aquela segurança que os pais sonham para vida dos seus pequenos. São os filhos os grandes motivadores daqueles pais que ganharam uma vida enquanto ainda construía as suas. Portanto filha, isso tudo aqui foi por você, para que eu possa te dar mais de tudo. Mais educação, mais saúde, mais paz, mais felicidade, mais amor, porque se eu estou feliz fazendo o que amo posso compartilhar contigo mais dessa felicidade e desse amor. Obrigada pelo simples fato de existir. Te amo incondicionalmente.

Na linha família, não posso deixar de agradecer ao meu marido, Raphael, por estar comigo em vários momentos que saí tarde da universidade, que tive que estudar, que cheguei em casa chorando por não ter conseguido aquele resultado... Lá estava ele, passando a mão na minha cabeça e me incentivando a chegar onde eu sempre quis. Gordo, obrigada por toda paciência e amor. Te amo!

Há também aqueles que você carrega pra vida toda, aqueles amigos que são praticamente da sua família... Mais de 10 anos que estamos juntos, e não paro de agradecer a vocês pela amizade e amor desse tempo todo. Uma amizade linda construída, tijolo a tijolo, desde a graduação, e que até hoje vive por termos sido e continuarmos até hoje sendo um o espelho do outro... Em ordem alfabética pra não ter briga, Layse Malagueta muito obrigada por ser meu pilar em vários momentos, mas principalmente por ter me inspirado a sair de onde estava pra seguir o mesmo caminho que você. Marcela Melo, aquela que a vontade de vencer inspira a todos... Tiago Araújo, o que dizer de você que fez por mim o que um irmão faria? Amor é pouco para resumir o que sinto por vocês... Jajá seremos os 4 doutores, JUNTINHOS!

A todos os meus amigos que entenderam que não é fácil ser amigo de doutorando, meus sinceros agradecimentos. Esther Mendonça minha irmã, Tia Sandra Mendonça que me dão amizade e amor há mais de 20 anos, Léa, Rebeca, Suany e a todos os demais. Amo vocês.

Agora tem aqueles que encontrei no laboratório e que vou levar para vida... Só não vou botar em ordem alfabética porque o leonino é com "W". Wagner Oliveira é uma pessoa tão igual a mim que se torna difícil falar de mim mesma... Só dizer que é mais que especial, é o centro das atenções (logicamente) e que amo muito você e nosso *feeling*. Gabriela Melo (Zordja Suellen, minha zordjinha) e Sayonara Gonçalves (Sandymara - Xuxa) quero vocês duas para sempre perto de mim. Priscilla Oliveira, exemplo de pessoa, de profissional, de ética. Muito obrigada meus amores, por todos os conselhos, ajudas, contagens de células, e várias outras situações que passamos juntos... Amo vocês.

Ainda no lab sempre tem aquela pessoa e agora amiga para resto da vida, que foi simplesmente meu tudo, meu braço direito, esquerdo e minhas pernas! Minha Nandinha, minha chefe, minha preferida, minha IC, a quem ensinei tudo que sei e com quem aprendi tudo o que eu não sabia sobre paciência, sobre orientar, sobre lições

de vida mesmo. Uma menina que nunca vi tanta maturidade em um ser tão novo, tão verde.... De uma paciência singular, de uma ética impecável, afff... Não consigo mais... Difícil até de continuar a escrever todos os bons adjetivos do dicionário... Meu amor, só posso dizer que assim como dediquei isso aqui pra Malu, dedico para você também, minha filha científica. Sem você isso aqui não existiria. Muito obrigada.

À professora Maira Pitta, Michelly Pereira e ao Prof. Ivan Pitta por terem me recebido de braços abertos no LINAT, pela co-orientação, por acreditarem em mim e por terem contribuído imensamente com o desenvolvimento da minha vida profissional, muito obrigada.

Aos colegas que fazem o LINAT, muito obrigada, em especial a Flaviana Alves e Lucas Sousa, aos amigos Cecília Melo, Tiago Rafael, Artur, Thiago Lins, Mardonny, Anderson, Kamilla, Maria Andreza. A Paulo Brito, secretário do PPGIT, outro exemplo de profissional dedicado que sempre move céus e terras por nós alunos, muito obrigada. Aos alunos e colegas do IMIP (Marina, Kleber, Júnior, Kamila) e a Dra. Leuridan pelo auxílio prestado no início do doutorado.

Agradeço aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FACEPE e aos INCT\_if na pessoa do Prof. Ivan Pitta pelo desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço agora àqueles que fizeram de mim Doutora, e, de forma mais importante deixo-os por último para prestar todo valor e gratidão que a eles para sempre darei. Portanto, agradeço imensamente ao Prof. Dr. João Palazzo que forneceu todo material das plantas usadas neste trabalho. Agradeço pela confiança, pela parceria, pelo tempo disponibilizado para me orientar. Agradeço também a todos os alunos do laboratório PALAFITO da Universidade Estadual de Maringá que se dispuseram a me ajudar com este trabalho, em especial a Daniella, Raquel, Andressa, Tânia, Renata, Ângelo e Leila.

E por fim, agradeço àquela pessoa mais importante que apareceu durante minha graduação e que continuará sendo um importante exemplo de profissional, amigo, pesquisador, meu orientador. Afinal, como disse um dia desses, chorando, atacada como sempre: “Melhor que colo de mãe, só colo de orientador”. Moacyr Rêgo (Moa), obrigada por todos os ensinamentos científicos e de vida. Você me ensinou de fato, não apenas a desenvolver essa tese, mas me deu a formação necessária pra terminar

o doutorado como Profa. Dra., título esse tão sonhado que com toda certeza acredito estar mais perto do que longe. Agradeço além da orientação, a amizade, a confiança depositada em mim desde que eu era tua IC... Por todas as oportunidades que me destes e que continuas me dando, por toda torcida nos concursos, por todas as dicas, não tenho palavras pra agradecer... Jamais esquecerei de ti e espero um dia poder retribuir tudo que me destes, assim como espero ser pra meus alunos o que fostes pra mim. Amo você!

## RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar as atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de extratos, frações semi-purificadas, sub-frações e taninos condensados isolados de rizomas de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), e extratos e frações semi-purificadas de sementes de *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae) e cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). Inicialmente foram obtidos o extrato bruto (EB), fração aquosa (FAq), fração acetato de etila (FAE), e, posteriormente adquiridas 11 sub-frações oriundas da FAE de *L. brasiliense* seguido do isolamento de três substâncias (Epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), Samarangenina A (SamA) e Samarangenina B (SamB)). Neste estudo foram utilizadas doses que variaram entre 0,1 a 500 µg/mL. O ensaio do MTT avaliou a toxicidade dos extratos, frações, sub-frações e taninos condensados em células não transformadas (Esplenócitos de Balb/c, PBMCs e VERO). Para a avaliação do potencial imunomodulador foram cultivados esplenócitos de camundongos BLB/c tratados com os extratos, frações e sub-frações e posteriormente dosadas citocinas inflamatórias no sobrenadante da cultura celular: IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-1β, IL-17A e IL-22. Através do MTT também foi avaliada a citotoxicidade dos materiais das plantas em células humanas de câncer (HEP-G2, T47-D, MCF-7, HL-60, JUKART e TOLEDO, K562, MOLT-4, SKMEL, PANC-1). A atividade antibacteriana foi identificada através do método de microdiluição para obtenção das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e das Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) de cada extrato, fração e sub-fração. O EB e FAE de *L. brasiliense* reduziram significativamente as citocinas IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17A e IL-22 onde a melhor redução foi observada nos níveis de IL-6 com 10 µg/mL da FAE (p=0,007). As sub-frações de *L. brasiliense* também inibiram significativamente IFN-γ e IL-17A (p=0,03). *P. cupana* apresentou atividade imunomoduladora com valores significativos (p<0,05) reduzindo a liberação das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10 após tratamento com o EB e a FAE. *T. catigua* reduziu os níveis de IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-22, com destaque para a IL-17A (EB (p=0,0010-100µg/mL), FAq (p=0,0005-50µg/mL)). O potencial antineoplásico foi evidenciado com ênfase na linhagem de HL-60 após o tratamento com as sub-frações F e G de *L. brasiliense* (IC50=8,23±0,83; 7,35±0,36 µg/mL respectivamente). A sub-fração G apresentou IC50=7,92±0,86 µg/mL em MOLT-4 e em K562, a SamA obteve IC50=29,24±17,64 µg/mL. Adicionalmente, as sub-frações C, D e F apresentaram potencial anticlonogênico e antimigratório. O efeito bacteriostático e bactericida foi melhor identificado com as sub-frações C e K de *L. brasiliense* frente à *Staphylococcus aureus* sensível à metilicina (CIM=125 µg/mL; CBM=250 µg/mL; CIM=62,5 µg/mL; CBM=250 µg/mL respectivamente) e *E. coli* na sub-fração C (CIM=62,5 µg/mL; CBM=250 µg/mL). Todas as plantas apresentaram atividade imunomoduladora, bacteriostática e antineoplásica, porém esta atividade foi melhor evidenciada com o extrato, frações, sub-frações e a Samarangenina A de *L. brasiliense*.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Baicuru. Guaraná. Catuaba. Taninos

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate immunomodulatory, antineoplastic and antibacterial activities of extracts, semi-purified fractions, sub-fractions and condensed tannins isolated from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) rhizomes, and semi-purified extracts and fractions of *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae) seeds and *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) barks. The crude extract (CE), aqueous fraction (AqF), ethyl acetate fraction (EAF) was obtained, and 11 sub-fractions from *L. brasiliense* EAF were subsequently acquired, followed by the isolation of three substances (Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG), Samarangenin A (Sam A) and Samarangenin B (SamB)). The study of biological activities used doses ranging from 0.1 to 500 µg/mL. MTT assay evaluated extracts, fractions, sub-fractions and condensed tannins cytotoxicity at non-transformed cells (Balb/c splenocytes, PBMCs and VERO). To evaluate the immunomodulatory potential, BLB/c mice splenocytes treated with extracts, fractions and sub-fractions were cultured and subsequently inflammatory cytokines were measured in cell culture supernatant: IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-17A and IL-22. MTT assay also evaluated cytotoxicity of plants materials against human cancer cells lineages (HEP-G2, T47-D, MCF-7, HL-60, JUKART and TOLEDO, K562, MOLT-4, SKMEL, PANC-1). Antibacterial activity was performed through the microdilution method to obtain Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) of each extract, fraction and sub-fraction. *L. brasiliense* CE and EAF significantly reduced IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A and IL-22 cytokines, where the great reduction was observed on IL-6 levels at 10 µg/mL of EAF ( $p=0.007$ ). *L. brasiliense* sub-fractions also significantly inhibited IFN- $\gamma$  and IL-17A ( $p=0.03$ ). *P. cupana* presented immunomodulatory activity with significant values ( $p<0.05$ ) reducing the release of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 cytokines after treatment with CE and EAF. *T. catigua* reduced IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-22 levels, feature to IL-17A (CE ( $p=0.0010$ -100 µg/mL), AqF ( $p=0.0005$ -50 µg/mL)). The CE, fractions and sub-fractions of *L. brasiliense* significantly reduced IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 cytokines at 50 and 100 µg/mL of CE and IL-17A (50 µg/mL) after treatment with CE and with EAF where  $p=0.0078$ . Antineoplastic potential was evidenced in all extracts and fractions with an emphasis on the HL-60 lineage after treatment with *L. brasiliense* F and G sub-fractions ( $IC_{50}=8.23\pm0.83$ ;  $7.35\pm0.36$  µg/mL respectively). Sub-fraction G showed  $IC_{50}=7.92\pm0.86$  µg/mL to MOLT-4 and to K562, SamA obtained  $IC_{50}=29.24\pm17.64$  µg/mL. Additionally, C, D and F sub-fractions presented a antimigratory and anticlonogenic potential. Bacteriostatic and bactericidal effect was better identified with *L. brasiliense* C and K sub-fractions against *Staphylococcus aureus* (MIC=125 µg/mL and MBC=250 µg/mL MIC 62.5 µg/mL and MBC=250 µg/mL respectively) and *E. coli* in sub-fraction C (MIC=62.5 µg/mL and MBC=250 µg/mL). All plants studied showed immunomodulatory, bacteriostatic and antineoplastic activity, however, this activity was better evidenced with extract, fractions, sub-fractions and isolated condensed tannin Samarangenina A of *L. brasiliense*.

Keywords: Medicinal Plants. Baicuru. Guarana. Catuaba. Tannins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |                                                                                                                                                                                                |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -  | Desencadeamento da resposta imunológica mediada por citocinas.....                                                                                                                             | 27 |
| Figura 2 -  | Agentes anticâncer derivados de plantas medicinais utilizados na clínica.....                                                                                                                  | 30 |
| Figura 3 -  | Estrutura química do paclitaxel.....                                                                                                                                                           | 31 |
| Figura 4 -  | <i>Limonium brasiliense</i> . A: Inflorescência de <i>L. brasiliense</i> . B: exsicata das partes aéreas. C: Exsicata das raízes.....                                                          | 36 |
| Figura 5 -  | Hábito de <i>Limonium brasiliense</i> .....                                                                                                                                                    | 37 |
| Figura 6 -  | Estrutura molecular dos compostos identificados na FAE de rizomas de <i>L. brasiliense</i> . (1) ácido gálico, (2) epigalocatequina-3-O-galato, (3) samarangenina A e (4) samarangenina B..... | 38 |
| Figura 7 -  | A: Descrição anatômica de <i>Paullinia cupana</i> . B: Frutos do guaraná.....                                                                                                                  | 41 |
| Figura 8 -  | Principais metilxantinas contidas nas sementes de <i>Paullinia cupana</i> .....                                                                                                                | 42 |
| Figura 9 -  | Folhas, frutos e cascas de <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.....                                                                                                                               | 46 |
| Figura 10 - | Estruturas químicas das cinchonainas encontradas nas cascas de <i>T. catigua</i> . (1) cinchonaina IA, (2) cinchonaina IB, (3) cinchonaina IC, (4) cinchonaina ID.....                         | 47 |
| Figura 11 - | $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose. Padrão máximo de substituição de taninos hidrolisáveis e precursor dos galotaninos e elagitaninos.....                                               | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 12 - Exemplos de Flavan-3-ol. (1): (+)-catequina (C); (2): (-)-epicatequina (EC); (3): (-)-galocatequina (GC); (4): (-)-epigallocatequina (EGC).....                                                                                 | 51 |
| Figura 13 - Estrutura química da EGCG.....                                                                                                                                                                                                  | 52 |
| Figura 14 - Principais doenças combatidas pela EGCG e alguns benefícios associados às suas propriedades farmacológicas.....                                                                                                                 | 53 |
| Figura 15 - Desenho do estudo e colaborações para desenvolvimento do estudo.....                                                                                                                                                            | 55 |
| Figura 16 - Amostras provenientes das sementes de <i>Paullinia cupana</i> .....                                                                                                                                                             | 56 |
| Figura 17 - Extrato, frações e tanino condensado isolado de cascas do caule de <i>Trichilia catigua</i> .....                                                                                                                               | 57 |
| Figura 18 - Amostras de rizomas de <i>Limonium brasiliense</i> analisadas neste estudo.....                                                                                                                                                 | 57 |
| Figura 19 - Citotoxicidade das sub-frações provenientes da FAE de rizomas de <i>L. brasiliense</i> .....                                                                                                                                    | 66 |
| Figura 20 - Avaliação da influência da secreção de citocinas pelos extratos e frações de rizomas de <i>L. brasiliense</i> no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c após 48 h de tratamento com o EB, FAq e FAE..... | 68 |
| Figura 21 - Influência da secreção de IFN- $\gamma$ no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c pelas sub-frações de <i>L. brasiliense</i> .....                                                                       | 69 |
| Figura 22 - Quantificação dos níveis de IL-17A no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c após tratamento com as sub-frações de <i>L. brasiliense</i> .....                                                           | 70 |

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 23 - Níveis de citocinas inflamatórias no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c tratados com o EB e a FAE de sementes de <i>P. cupana</i> .....       | 71 |
| Figura 24 - Quantificação de citocinas inflamatórias no sobrenadante de esplenócitos de camundongos BALB/c tratados por 48h com o EB, FAq e FAE de cascas de <i>T. catigua</i> ..... | 73 |
| Figura 25 - Porcentagem de viabilidade celular de K562 após tratamento com EGCG, SamA e SamB.....                                                                                    | 77 |
| Figura 26 - Avaliação do tipo de morte celular em K562 após tratamento com as sub-frações F, G e K de <i>L. brasiliense</i> por citometria de fluxo.....                             | 78 |
| Figura 27 - Avaliação de morte celular por apoptose e necrose das sub-frações G, H e K de <i>L. brasiliense</i> na linhagem MOLT-4.....                                              | 80 |
| Figura 28 - Avaliação do tipo de morte celular provocada pela SamA em K562.....                                                                                                      | 81 |
| Figura 29 - Atividade anti-migratória das sub-frações C, D e F de <i>L. brasiliense</i> frente à PANC-1.....                                                                         | 83 |
| Figura 30 - Avaliação da inibição da formação de clones celulares após tratamento com as sub-frações C, D e F de <i>L. brasiliense</i> .....                                         | 85 |
| Figura 31 - Viabilidade celular e respectivos valores de IC50 e índice de seletividade do EB e da FAE das sementes de <i>P. cupana</i> para a linhagem HL-60.....                    | 86 |
| Figura 32 - Viabilidade (%) das células K562 após tratamento por 72 h com cinchonina IB nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL.....                                             | 88 |
| Quadro 1 - Linhagens neoplásicas utilizadas na avaliação antineoplásica das plantas medicinais estudadas.....                                                                        | 61 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Toxicidade do EB, FAq e FAE de rizomas de <i>L. brasiliense</i> frente a células normais (PBMCs), HEP-G2 (carcinoma hepatocelular), T47-D (câncer de mama) e HL-60 (leucemia promielocítica)..... | 74 |
| Tabela 2 - Valores de IC50 relativos a citotoxicidade das 11 sub-frações de <i>L. brasiliense</i> frente às linhagens neoplásicas.....                                                                       | 76 |
| Tabela 3 - Atividade antineoplásica do EB e das FAq e FAE de cascas de <i>T. catigua</i> após 72 h de tratamento.....                                                                                        | 87 |
| Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EB, FAq e FAE de rizomas de <i>L. brasiliense</i> .....                                                           | 89 |
| Tabela 5 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória máxima (CBM) de sub-frações obtidas da fração acetato de etila de rizomas de <i>L. brasiliense</i> .....                | 91 |
| Tabela 6 - Atividade antibacteriana do EB e da FAE de sementes de <i>P. cupana</i> .....                                                                                                                     | 92 |
| Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima do EB, FAq e FAE das cascas de <i>T. catigua</i> expressas em µg/mL.....                                                   | 93 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| AMPc          | Adenosina Monofosfato Cíclico                           |
| ANVISA        | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                |
| EB            | Extrato Bruto                                           |
| EGCG          | Epigallocatequina-3-O-galato                            |
| FAE           | Fração Acetato de Etila                                 |
| FAq           | Fração Aquosa                                           |
| IFN- $\gamma$ | Interferon – gama                                       |
| IL            | Interleucina                                            |
| IL-1 $\beta$  | Interleucina-1 beta                                     |
| IS            | Índice de Seletividade                                  |
| LES           | Lúpus Eritematoso Sistêmico                             |
| MBC           | Minimal Bactericidal Concentration                      |
| MIC           | Minimal Inhibitory Concentration                        |
| MS            | Ministério da Saúde                                     |
| NCI           | National Cancer Institute                               |
| NK            | Natural Killer                                          |
| OMS           | Organização Mundial de Saúde                            |
| P,D;I         | Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação                    |
| PNPMF         | Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| RENAME        | Relação Nacional de Medicamentos                        |
| RENISUS       | Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS       |
| SamA          | Samarangenina A                                         |
| SamB          | Samarangenina B                                         |
| SF            | Saúde da Família                                        |
| SNC           | Sistema Nervoso Central                                 |
| SUS           | Sistema Único de Saúde                                  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral – alfa                         |
| WHO           | World Health Organization                               |

## SUMÁRIO

|          |                                                                 |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                               | <b>19</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                | <b>21</b> |
| 2.1      | Objetivo geral                                                  | 21        |
| 2.2      | Objetivos específicos                                           | 22        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>                                    | <b>22</b> |
| 3.1      | Plantas medicinais: Um breve histórico                          | 22        |
| 3.2      | Utilização das plantas medicinais como agentes imunomoduladores | 24        |
| 3.3      | Atividade antineoplásica de plantas medicinais                  | 28        |
| 3.4      | Atividade antibacteriana de plantas medicinais                  | 33        |
| 3.5      | <i>Limonium brasiliense</i>                                     | 35        |
| 3.5.1    | Características gerais                                          | 35        |
| 3.5.2    | Composição química                                              | 37        |
| 3.5.3    | Atividades biológicas                                           | 38        |
| 3.6      | <i>Paullinia cupana</i>                                         | 39        |
| 3.6.1    | Características gerais                                          | 39        |
| 3.6.2    | Composição química                                              | 41        |
| 3.6.3    | Atividades biológicas                                           | 42        |
| 3.7      | <i>Trichilia catigua</i>                                        | 44        |
| 3.7.1    | Características gerais                                          | 44        |
| 3.7.2    | Composição química                                              | 47        |
| 3.7.3    | Atividades biológicas                                           | 48        |
| 3.8      | Taninos                                                         | 49        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                              | <b>54</b> |
| 4.1      | Desenho do estudo                                               | 54        |

|            |                                                                                                 |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.2</b> | <b>Local e período do estudo</b>                                                                | <b>55</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Aspectos éticos</b>                                                                          | <b>55</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Obtenção das amostras das plantas em estudo</b>                                              | <b>56</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Avaliação da citotoxicidade em células não transformadas</b>                                 | <b>57</b> |
| 4.5.1      | Procedimento com Animais                                                                        | 58        |
| 4.5.2      | Obtenção de Esplenócitos                                                                        | 58        |
| 4.5.3      | Ensaio de Citotoxicidade                                                                        | 58        |
| 4.5.4      | Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)                                   | 59        |
| 4.5.5      | Ensaio de citotoxicidade em PBMCs e Vero                                                        | 59        |
| <b>4.6</b> | <b>Atividade imunomoduladora</b>                                                                | <b>60</b> |
| 4.6.1      | Cultura de Células                                                                              | 60        |
| 4.6.2      | Determinação de Citocinas                                                                       | 60        |
| <b>4.7</b> | <b>Atividade antineoplásica</b>                                                                 | <b>61</b> |
| 4.7.1      | Manutenção das células neoplásicas                                                              | 61        |
| 4.7.2      | Ensaio de citotoxicidade em células tumorais                                                    | 61        |
| 4.7.3      | Determinação de IC50 e índice de seletividade                                                   | 62        |
| 4.7.4      | Avaliação do tipo de morte celular                                                              | 62        |
| 4.7.5      | Ensaio de migração celular                                                                      | 63        |
| 4.7.6      | Ensaio Clonogênico                                                                              | 63        |
| <b>4.8</b> | <b>Atividade antibacteriana</b>                                                                 | <b>64</b> |
| 4.8.1      | Isolados bacterianos                                                                            | 64        |
| 4.8.2      | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC) | 64        |
| <b>4.9</b> | <b>Análise estatística</b>                                                                      | <b>65</b> |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS</b>                                                                               | <b>65</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Citotoxicidade em células não transformadas</b>                                              | <b>65</b> |
| 5.1.1      | Citotoxicidade em esplenócitos de BALB/c                                                        | 65        |

|            |                                                                                  |     |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.2      | Citotoxicidade em PBMCs e Vero                                                   | 66  |
| <b>5.2</b> | <b>Atividade imunomoduladora</b>                                                 | 67  |
| 5.2.1      | <i>Limonium brasiliense</i>                                                      | 67  |
| 5.2.2      | <i>Paullinia cupana</i>                                                          | 70  |
| 5.2.3      | <i>Trichilia catigua</i>                                                         | 72  |
| <b>5.3</b> | <b>Atividade antineoplásica</b>                                                  | 74  |
| 5.3.1      | <i>Limonium brasiliense</i>                                                      | 74  |
| 5.3.1.1    | Avaliação do tipo de morte celular provocada pelas sub-frações e Samarangenina A | 77  |
| 5.3.1.2    | Ensaio de migração celular                                                       | 82  |
| 5.3.1.3    | Ensaio clonogênico                                                               | 84  |
| 5.3.2      | <i>Paullinia cupana</i>                                                          | 85  |
| 5.3.3      | <i>Trichilia catigua</i>                                                         | 86  |
| <b>5.4</b> | <b>Atividade antibacteriana</b>                                                  | 88  |
| 5.4.1      | <i>Limonium brasiliense</i>                                                      | 88  |
| 5.4.2      | <i>Paullinia cupana</i>                                                          | 91  |
| 5.4.3      | <i>Trichilia catigua</i>                                                         | 93  |
| <b>6</b>   | <b>DISCUSSÃO</b>                                                                 | 94  |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                 | 106 |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                               | 107 |
|            | <b>ANEXOS</b>                                                                    | 133 |

## 1 INTRODUÇÃO

As mais antigas civilizações da China e da Índia entre os anos de 100 e 200 a.c. já descreviam em suas obras, descobertas sobre a eficácia das plantas medicinais (ALONSO, 1998; CARNEIRO, 2001). No Brasil, algumas plantas descobertas pelos médicos portugueses se tornaram importantes para difusão do conhecimento medicinal como *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Psidium guajava* (guava), *Spilanthes acmella* (jambu), *Tabebuia* sp. (lapacho), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), *Copaifera* sp. (copaíba), e várias outras (BRAGA, 2011; GURIB-FAKIM, 2006).

Desde a antiguidade, as plantas vêm se tornando fontes dos mais diversos princípios ativos, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas drogas e produtos naturais. O Brasil, com toda sua diversidade botânica, possui um amplo arsenal dessas fontes naturais, com grandes potenciais para produção de produtos naturais e novas alternativas terapêuticas para tratamento das mais diversas doenças (PIZZOLATTI et al., 2002; LONGHINI et al., 2017).

*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) é uma planta natural da região central da Amazônia pertencente à Família Sapindaceae. Os extratos de guaraná eram utilizados pelos índios nativos como estimulante energético em festivais e na caça de animais (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Posteriormente foram descritas outras atividades dos extratos de guaraná como antioxidante (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; DE LIMA PORTELLA et al., 2013; DALONSO et al., 2012), antimicrobiana (DA FONSECA et al., 1994; MAJHENIČ et al., 2007), antialérgica (JIPPO et al., 2009).

Outro tipo de planta medicinal, *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze popularmente conhecida como guaicuru é pertencente à família Plumbaginaceae (THE PLANT LIST, 2015). A planta é encontrada na costa sul do Brasil e os extratos de *L. brasiliense* têm sido utilizados no tratamento de infecções do trato gênito-urinário, cólicas menstruais e regulação do período menstrual (USHIROBIRA et al., 2015a). Além dessas propriedades, Murray e colaboradores (2004) descreveram o uso de *L. brasiliense* no tratamento de hemorragias e reumatismo.

*Trichilia catigua* Juss (Meliaceae) é uma espécie encontrada em países da América do Sul popularmente conhecida no Brasil como “catuaba”, “catuama” ou

“catiguá”. A catuaba é utilizada na medicina tradicional como tônico estimulante para o cansaço, estresse, déficits de memória e impotência sexual (BONASSOLI et al., 2012). A catuaba é comercializada no Brasil como um fitoterápico (Catuama®) tônico, estimulante e afrodisíaco. Na composição do referido tônico também são encontradas outras espécies de plantas medicinais como a *Paullinia cupana* (guaraná), *Ptychopetalum olacoides* (muirapuama) e *Zingiber officinale* (gengibre) (MENDES; CARLINI, 2007).

Em geral, as plantas possuem centenas de metabólitos ativos o que torna complexa a atividade de identificar e analisar quantitativamente esses compostos (KLEIN et al., 2012). A importância de estudos que comprovem a existência de todos esses componentes e suas qualidades reflete na transmissão do conhecimento para a população a fim de obter o uso racional de plantas medicinais que muitas vezes é equivocado pela falta de conhecimento sobre seus riscos e/ou benefícios (LONGHINI et al., 2013; JUNIOR et al., 2005).

Um desses metabólitos ativos compreende o grupo dos polifenóis que participam da dieta alimentar saudável sendo encontrados em frutas e vegetais. Por esta razão são considerados importantes compostos com potenciais para proporcionar vários benefícios à saúde além de apresentar consumo seguro (SAITO, 2017). As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados são constituídas por derivados da série flavan-3-ol, um dos grupos mais conhecidos de compostos polifenólicos representados principalmente pela (-) - epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), (+) - catequina e (-) - epicatequina (3) e seus derivados encontrado como análogos nas plantas. Estes compostos têm ganhando interesse por apresentarem importantes atividades biológicas como antiviral (CUSHNIE; LAMB, 2005), antineoplásica (DU; ZHANG, 2012), anti-angiogênica (PESCA et al., 2013), anti-inflamatória (MENA et al., 2014; SAITO, 2017).

Infere-se que as propriedades farmacológicas apresentadas pelos taninos condensados são devido a pelo menos três características gerais que compreendem (1) a complexação com íons metálicos, (2) o sequestro de radicais livres e atividade antioxidante e (3) a forte interação com proteínas e polissacarídeos (MELLO; SANTOS et al., 2017). Estas características conferem aos taninos condensados propriedades farmacológicas como a atividade contra doenças do sistema venoso, antiviral e antineoplásica evidenciadas nas folhas e cascas de *Hamamelis virginiana* (SANCHEZ-TENA et al., 2012) e antimicrobiana nas raízes de *Krameria triandra*

(MOLLER et al., 2009). O efeito antiespasmódico, antioxidante, diurético e hipotensivo nas folhas, flores e frutos de *Cartaegus monogyma* também são atribuídos a presença de taninos nestas partes das plantas (BELKHIR et al., 2013).

Embora o estudo acerca das atividades biológicas de sementes de *P. cupana* e cascas de *T. catigua* seja bem descrito na literatura, poucos trabalhos relacionam as atividades biológicas destas espécies com a presença de taninos condensados. Já as atividades biológicas dos rizomas de *L. brasiliense*, os quais também contém taninos condensados, ainda permanecem pouco elucidadas, o que dificulta o conhecimento acerca de suas propriedades farmacológicas. Contudo, se observa uma crescente comercialização de plantas com fins terapêuticos, especialmente de *P. cupana* e *T. catigua*, indicando um aumento do consumo destas pela população (ETHUR et al., 2011). Esse aumento deve-se a diversos fatores tais como o alto custo dos produtos sintéticos e o pouco acesso da população à assistência básica de saúde, gerando uma tendência crescente ao consumo de produtos naturais (TOMAZZONI et al., 2006).

Visando a obtenção de um maior enfoque sobre as plantas taníferas e seus potenciais farmacológicos, este estudo busca elucidar as propriedades biológicas de taninos condensados encontrados em extratos destas plantas medicinais. Para tanto, faz-se necessária a abordagem destas espécies de plantas como fontes de novas drogas que possam atender às necessidades da população. Como se sabe, muitas doenças, como por exemplo, àquelas de origem inflamatória, o câncer como um todo e as infecções bacterianas ainda não possuem tratamento eficaz. Além disso, muitos medicamentos disponíveis na clínica apresentam variados efeitos colaterais e, em muitos casos, desenvolvem mecanismos de resistência a tumores e a microorganismos. Neste âmbito, é de grande relevância a continuidade de pesquisas envolvidas na busca por novos agentes terapêuticos oriundos de fontes naturais que possam contribuir no tratamento destas desordens.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana dos extratos, frações, sub-frações e taninos condensados isolados de rizomas de *Limonium brasiliense*, extratos e frações de sementes de *Paullinia cupana*, e extratos, frações e flavolignana isolada das cascas de *Trichilia catigua*.

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato, frações, sub-frações e taninos condensados isolados de rizomas de *Limonium brasiliense*, extrato e frações de sementes de *Paullinia cupana*, e, extrato, frações e flavolignana isolada das cascas de *Trichilia catigua* em células não transformadas;
- Testar a atividade imunomoduladora das amostras das plantas através modulação de citocinas inflamatórias;
- Analisar a atividade antineoplásica do extrato, frações, sub-frações e taninos condensados isolados de rizomas de *Limonium brasiliense*, extrato e frações de sementes de *Paullinia cupana*, e, extrato, frações e flavolignana isolada das cascas de *Trichilia catigua* em linhagens de células neoplásicas;
- Identificar o tipo de morte celular causado pelas sub-frações e substância isolada da fração acetato de etila de rizomas de *L. brasiliense*;
- Descrever o efeito anti-migratório das sub-frações de *L. brasiliense*;
- Analisar o perfil anti-clonogênico das sub-frações de *L. brasiliense*;
- Avaliar a atividade antibacteriana das amostras das plantas estudadas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Plantas medicinais: Um breve histórico

Os primeiros manuscritos sobre a utilização de plantas medicinais foram encontrados na antiga Mesopotâmia e datados de 2.600 A.C., onde foi reportado a existência de um sistema de medicina sofisticado contendo cerca de 1.000 espécies de plantas usadas para fins terapêuticos (BORCHARDT, 2002; CRAAG; NEWMAN, 2013). A medicina egípcia tem seu mais antigo livro, “Papiro Ebers”, publicado em

1.550 A.C., onde há cerca de 700 princípios ativos das quais a maioria são originários de plantas medicinais (SNEADER, 2005). A ayurveda (medicina tradicional indiana) também considerada como uma das mais antigas medicinas tradicionais, data de 1 milênio A.C. Na Índia e na China a medicina tradicional se desenvolveu possuindo uma diversidade de obras escritas sobre plantas medicinais. A obra mais completa da medicina tradicional chinesa, *Modern Day* foi publicada no ano de 1977 e compreende uma lista de quase 6.000 drogas, sendo 4.800 destas de origem vegetal (PATWARDHAN, 2005; BRAGA, 2011).

No Brasil, com o início da colonização percebeu-se que os habitantes nativos já faziam uso das plantas medicinais para cura das doenças de seus povos. Algumas espécies usadas foram logo relatadas aos portugueses como o capim rei, ruibarbo do brejo, ipecacuanha-preta, cabriúva-vermelha, “erva boa”, hortelã-pimenta, que eram utilizadas pelos indígenas contra indigestão, aliviando nevralgias, reumatismos, doenças neurológicas, purgativos e cura de feridas (SILVA, 2004).

O conhecimento adquirido sobre as plantas medicinais, suas utilizações, indicações e manejo compreendem uma herança dos antepassados, que de forma tradicional, difundiram seus conhecimentos através dos povos até os dias atuais. Desta forma, o uso de plantas medicinais em práticas populares e tradicionais como, por exemplo, em remédios caseiros, é conhecido como medicina alternativa. A medicina alternativa desempenha um papel crucial para cura, tratamento e prevenção de várias doenças como, por exemplo, diarreias, infecções urinárias, doenças inflamatórias, distúrbios neurológicos e do sono, no tratamento do cansaço muscular (DUTRA, 2009).

Durante milênios as plantas foram uma fonte riquíssima de agentes terapêuticos, porém usadas de forma tradicional aplicando suas bases empíricas sem nenhum tipo de conhecimento científico, das atividades farmacológicas e de seus componentes químicos (ATANASOV et al., 2015). Com o decorrer dos anos, houve uma necessidade crescente pela busca de fundamentos científicos que comprovassem as atividades das plantas para assegurar a eficácia e segurança de seu consumo (MATHUR; HOSKINS, 2017).

A primeira descoberta racional de drogas derivadas de plantas foi durante o início do século XIX. Cientistas alemães conseguiram isolar do Ópio, substância espessa extraída de espécies de papoulas (gênero *Papaver*), um agente analgésico, relaxante e indutor de sono denominado por eles de Morfina (SERTÜRNER, 1817). Após essa

descoberta foi publicado um artigo onde eles isolaram, cristalizaram, descreveram a estrutura dos cristais, e avaliaram a atividade farmacológica da morfina em experimentos com cães (WAISSE; TARCITANO FILHO, 2015). O isolamento da morfina impulsionou novas pesquisas neste campo levando à descoberta de novas substâncias naturais bioativas derivadas de plantas como a nicotina, cafeína, cocaína, quinina, colchicina, etc (CORSON; CREWS, 2007; KAISER, 2008; FOWLER; SCRAGG, 2013).

A afirmação científica destes produtos promoveu um aumento do interesse mundial na utilização de produtos naturais. Porém, com a ascensão da indústria farmacêutica moderna pós Segunda Guerra Mundial os medicamentos purificados derivados de plantas medicinais foram ficando em segundo plano em relação aos compostos sintéticos industrializados (DAVID et al., 2014). As tecnologias da química combinatória e do *High Throughput Screening* (HTS) que embora sejam técnicas complexas para testes com produtos naturais, nas últimas décadas retomaram as possibilidades de descobertas de novas moléculas derivadas de plantas medicinais. Entre os anos de 1981 e 2010, em um grupo de 1073 novas moléculas descobertas, apenas 36% foram puramente sintéticas e mais da metade foram compostas por moléculas provenientes da natureza ou semissintéticas (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Em 1998 Yue-Zhong Shu estimava que cerca de 60% das drogas antitumorais e anti-infecciosas disponíveis no mercado ou em fase de pesquisa clínica eram de origem natural. Já no ano de 2013 este percentual não obteve alterações, confirmando as estimativas de 1998 (POMPILHO et al., 2013; NEWMAN et al., 2012). A exemplo deste dado percentual o paclitaxel derivado da espécie *Taxus*, alcaloides derivados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don como a vincristina e vimblastina, e a camptotecina e seus análogos (Topotecan, Irinotecan) descobertos inicialmente da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* Decne são alguns dos vários medicamentos antitumorais atualmente disponíveis na clínica (KINGHORN et al., 2011). Outro potencial agente anticâncer e antimalárico é a artemisina derivado de uma erva da medicina tradicional chinesa, *Artemisia annua* L. (KLAYMAN et al., 1984). Esses medicamentos já disponíveis no mercado e utilizados no serviço médico reforçam a afirmação da necessidade pela busca de novos compostos bioativos na diversidade que existe na flora do planeta (DUTRA, 2009).

### **3.2 Utilização das plantas medicinais como agentes imunomoduladores**

Um imunomodulador pode ser definido como uma substância sintética ou biológica que tem a capacidade de modular, suprimir ou estimular os elementos do sistema imunológico incluindo os componentes da resposta imune inata e adaptativa. Os imunomoduladores são fisiologicamente usados quando o sistema imunológico se apresenta debilitado de modo que eles possam afetar e/ou corrigir, estimulando ou suprimindo, o sistema imune (SHAFI et al., 2015). Agentes imunoestimulantes e imunossupressores vêm sendo amplamente estudados na busca pelas melhores substâncias que exerçam estas atividades representando um amplo campo de interesse em todo mundo (MUKHERJEE et al., 2014).

Embora haja um número considerado de drogas sintéticas usadas em doenças imunológicas como as ciclosporinas, corticosteroides e azatioprina, estas podem gerar graves efeitos adversos aos usuários como nefrotoxicidade, anemia, trombocitopenia e supressão da medula óssea (RACHH et al., 2014; MATHUR; HOSKINS, 2017). Um exemplo clássico é a ciclofosfamida usada rotineiramente para tratamento de linfomas, leucemias e em doenças autoimunes como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). A ciclofosfamida atua induzindo a supressão da resposta humoral e um dos efeitos adversos mais comuns é a anemia. Dessa maneira, estes e outros medicamentos sintéticos reforçam a importância da identificação da atividade imunomoduladora dos extratos de plantas medicinais bem como das substâncias isoladas destas plantas (BIN-HAFEEZ et al., 2001).

Nesse contexto, várias plantas medicinais são alvo de investigações a respeito de suas atividades imunomoduladoras (MUKHERJEE et al., 2014). Como exemplo, o óleo da casca de *Cedrus deodora* possui atividade sobre os neutrófilos, diminuindo a atividade fagocítica, a liberação de enzimas lisossomais e atuando também nos mediadores envolvidos na inflamação (AWAD, 2015). Quanto à citotoxicidade, o extrato etanólico das sementes de *Psoralea corylifolia* aumenta a atividade citotóxica dependente de anticorpos mediada pelo sistema complemento, além de combater as células tumorais através da ativação das células *Natural Killers* (NK). Esses resultados demonstram uma atividade imunomoduladora mediada tanto pelo aumento da resposta imune celular quanto pela resposta humoral, ressaltando a importância da ligação entre as respostas imunes desencadeadas pelas células NK e macrófagos, principalmente em ensaios envolvendo tumores (LATHA et al., 2000).

Um dos mecanismos da resposta imunológica envolve as citocinas, que representam um conjunto de várias moléculas, como interleucinas e quimiocinas que participam da emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento de uma resposta imune e compõem um dos elementos chave para perfeita regulação do sistema imunológico (Figura 1) (NETEA et al., 2015). Um exemplo de extrato que possui propriedade imunomoduladora relacionada às citocinas é o extrato etanólico da raiz de *Boerhaavia diffusa* que exhibe essa atividade inibindo a produção de IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-15, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-4, IL-5 e IL-10, moléculas importantes no controle da resposta inflamatória e das respostas mediadas por linfócitos T e B (MEHROTRA et al., 2002).

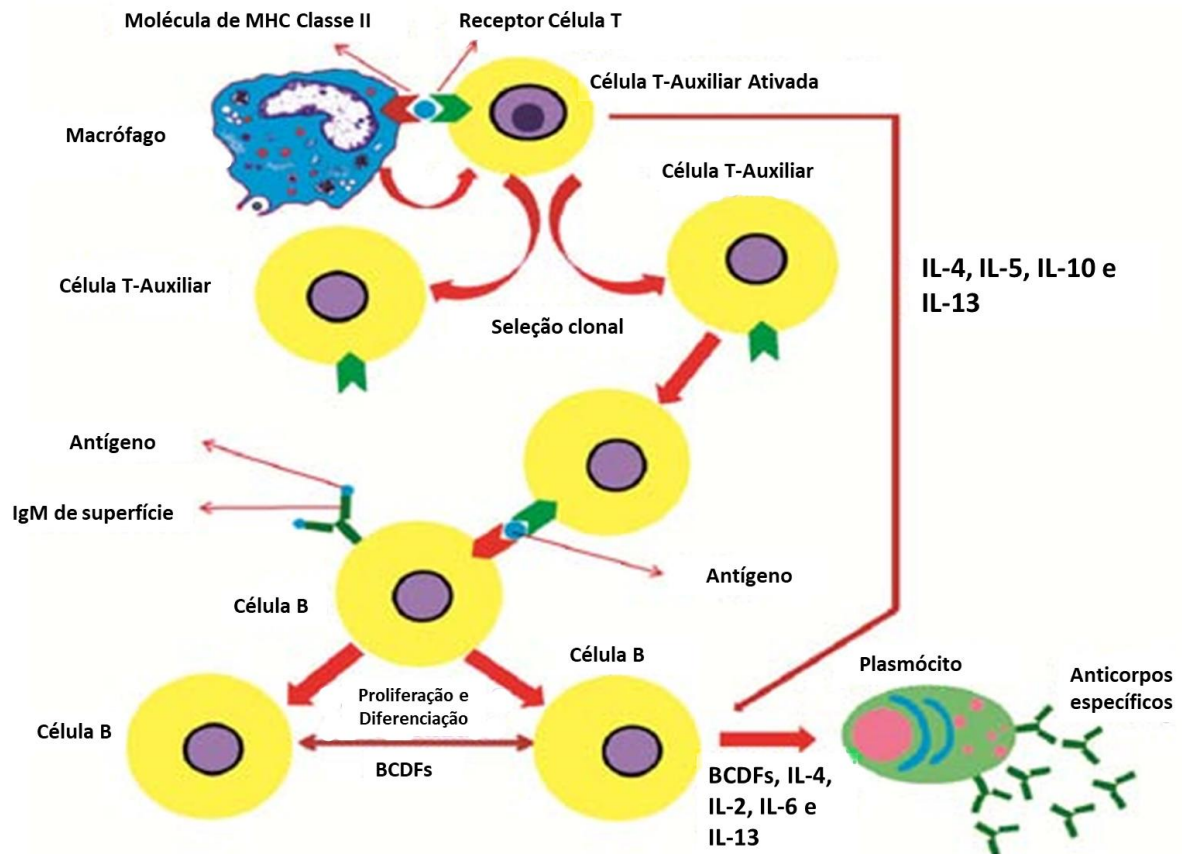
Uma variedade de substâncias oriundas de plantas medicinais é capaz de estimular o sistema imunológico (DA SILVA; PARENTE, 2001). A atividade anti-inflamatória de plantas medicinais está relacionada a presença de compostos tais como flavonoides, terpenoides, alcaloides. Dentre esses, os flavonoides compreendem um grupo com notável efeito anti-inflamatório, e podem ser classificados em chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e biflavonoides. (KIM et al., 2004).

Alguns desses flavan-3-ols como as proantocianidinas ou taninos condensados apresentam propriedades imunomoduladoras relacionadas com a inibição de citocinas inflamatórias descritas em vários estudos (LI et al., 2017; Wang et al., 2017; SALINAS-SÁNCHEZ et al., 2017; TANAKA et al., 2017). Os taninos são componentes de várias plantas medicinais que desempenham esse tipo de atividade. Como exemplo pode-se citar o extrato metanólico de caules de *Serjania schiedeana* no qual sua fração acetato de etila, sub-frações e taninos condensados isolados demonstraram uma redução significativa de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-17 em modelo murino de artrite reumatoide (SALINAS-SÁNCHEZ et al., 2017). Frações de proantocianidinas obtidas de cascas de *Metasequoia glyptostroboides* também apresentaram atividade imunomoduladora frente às citocinas inflamatórias IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17 no sobrenadante de cultura celular de esplenócitos de camundongos com dermatite alérgica induzida (CHEN et al., 2015).

Estes estudos demonstram que muitas investigações acerca dos flavonoides, incluindo as proantocianidinas, possuem atividade anti-inflamatória em diferentes modelos animais de inflamação. Além disso, estabelecem que variedades destas

moléculas possuem potencial para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios providos de fontes naturais (TANAKA et al., 2017).

Figura 1 - Desencadeamento da resposta imunológica mediada por citocinas.



Fonte: MUKHERJEE et al. (2014).

Um dos grupos de plantas mais conhecidos por suas propriedades medicinais são as plantas adaptógenas. Os adaptógenos melhoram as condições de saúde e disposição, reduzem a fadiga e o estresse, recuperam ou melhoram o desempenho atlético, a acuidade mental, aumentam o apetite, aliviam a insônia, melhoram o humor e aumentam a resistência contra as infecções. Desta forma, a intenção terapêutica quando se utiliza um adaptógeno é promover uma resposta fisiológica ideal para as tensões internas e externas. Em outras palavras, os adaptógenos melhoram a capacidade do organismo de "adaptar-se" ao seu ambiente (KELLY, 1999). As características dos adaptógenos, estão associadas diretamente ao eixo neuroendócrino-imunológico como provedor do bem-estar físico e mental, especialmente em condições de estresse e na defesa contra as infecções (SEQUEIRA, 2013).

No Brasil, várias são as plantas empregadas pela população para melhorar a memória, o desempenho físico e sexual ou para manter um estado saudável, genericamente chamadas de tônicas ou fortificantes. Essas plantas, além de conter outros componentes, apresentam altos teores de taninos condensados em suas diferentes partes. São exemplos bem conhecidos o guaraná (*Paullinia cupana*), a catuaba (*Trichilia catigua* e outras espécies), o nó-de-cachorro (*Heteropterys aphrodisiaca*), a muirapuama (*Ptychopetalum olacoides*) e a fáfia ou ginseng brasileiro (*Pfaffia* sp.). Dentre estas, o guaraná e a catuaba possuem amplo conhecimento tradicional, sendo indicados como tônicos e estimulantes (SEQUEIRA, 2013). Contudo, suas atividades biológicas, em especial a atividade imunomoduladora, ainda não está completamente elucidada (CARVALHO, et al., 2016).

Diante destas abordagens, a pesquisa científica das propriedades medicinais de plantas tem sido explorada nos últimos anos, porém o mecanismo de ação da maioria dos constituintes dessas plantas é ainda um grande desafio a ser superado. Os estudos relacionados aos efeitos imunomoduladores de plantas medicinais incluindo àquelas adaptógenas são uma fonte promissora de novas moléculas tanto por estas apresentarem uma rica diversidade de aporte na natureza, quanto pelo baixo custo e por causar poucos efeitos colaterais (MUKHERJEE et al., 2014). O conhecimento tradicional com sua abordagem holística e sistemática suportada por evidências experimentais serve como um modelo para o desenvolvimento de medicamentos imunomoduladores mais eficazes, seguros e menos tóxicos (MURUGESAN; DEVIPONNUSWAMY, 2014).

### **3.3 Atividade antineoplásica de plantas medicinais**

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento anormal e exacerbado de populações celulares que pode afetar qualquer parte do organismo (WHO, 2017). Assim como em outras doenças crônicas, no câncer existem alguns mecanismos patogênicos comuns como a inflamação crônica, danos ao DNA, estresse oxidativo dentre outros (FERNANDO; RUPASINGHE, 2013). A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que consiste nas fases de inicialização, promoção e progressão tumoral. Durante a progressão, células tumorais podem, em um estágio mais avançado da doença invadir a corrente sanguínea e

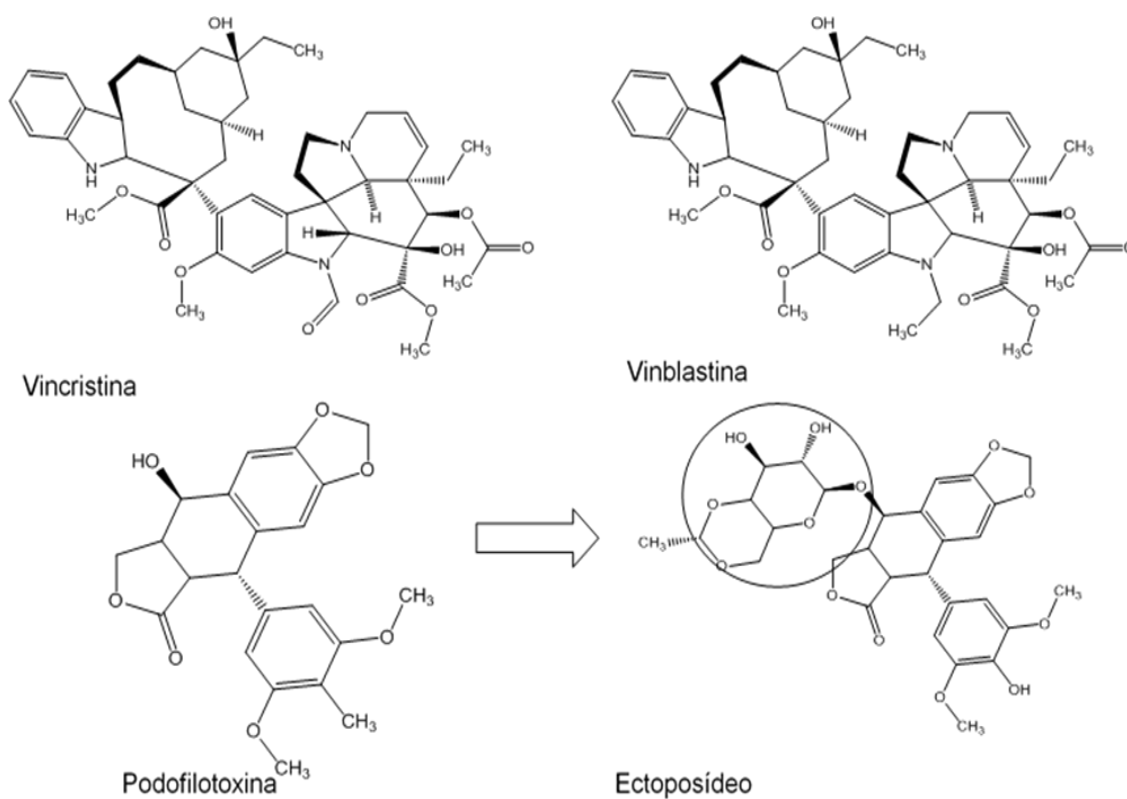
adentrar em outros tecidos e órgãos, caracterizando o processo de metástase tumoral (DE FLORA et al., 2005; SEBASTIAN et al., 2012).

A Sociedade Americana do Câncer divulgou que no ano de 2012 os números de casos de câncer corresponderam a 14,1 milhões de pessoas diagnosticadas e mais da metade, 8,2 milhões, representaram o número de mortes em todo mundo. As mortes por câncer representam cerca de 2 a 3% do total de mortes por outras causas e em 2015 foi responsável por 8,8 milhões de mortes em todo mundo. O número esperado de novos casos a serem diagnosticados em 2030 é de 21,7 milhões com 13 milhões de mortos pela doença (SMITH et al., 2015; WHO, 2017).

Os gastos em pesquisas no combate ao câncer passam de bilhões de dólares. Mesmo com esses altos índices de investimentos e gastos em pesquisas para o tratamento desta doença, as principais terapias atualmente utilizadas, os quimioterápicos e a radioterapia, possuem efeitos colaterais prejudiciais ao paciente além de, ainda hoje persistir uma alta taxa de mortalidade mesmo com estas estratégias terapêuticas disponíveis (FREEDMAN et al., 2015).

Diante desta problemática, a descoberta de moléculas com potencial atividade anticâncer de origem natural, especialmente de plantas, é atualmente alvo de investigações. O *screening* de alvos terapêuticos antitumorais derivados de plantas medicinais teve início na década de 50 onde foram identificados e caracterizados os alcaloides da Vinca, a vincristina e a vimblastina, além do isolamento da podofilotoxina (Figura 2) que posteriormente daria origem ao etoposídeo e teniposídeo (FERNANDO; RUPASINGHE, 2013).

Figura 2 - Agentes anticâncer derivados de plantas medicinais utilizados na clínica.

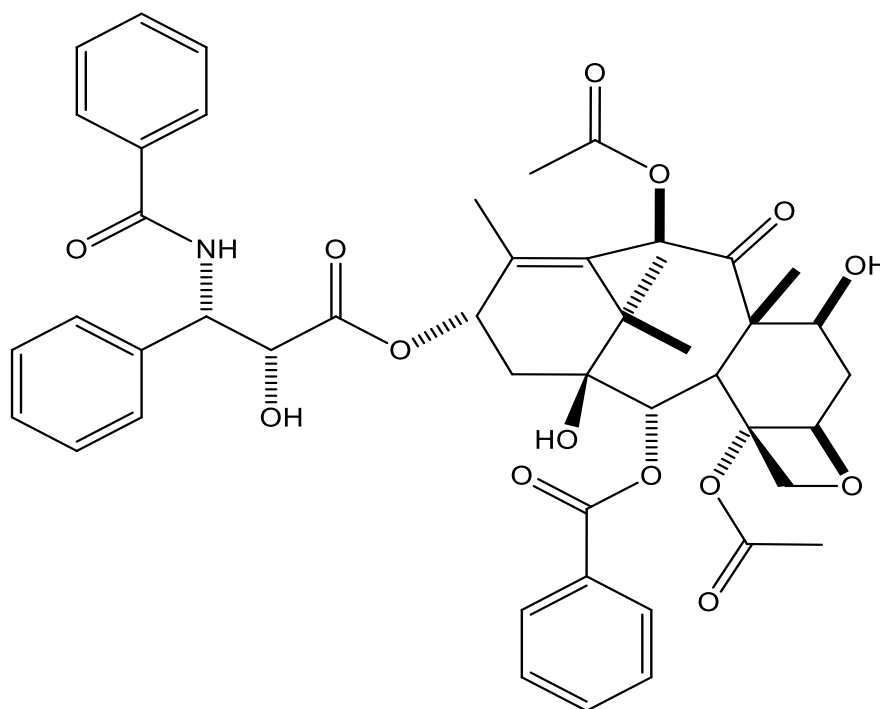


Fonte: Do Autor (2017).

A vincristina e a vinblastina foram isoladas de *Catharanthus roseus* G. Don., e representaram o marco da nova era dos agentes antitumorais derivados de plantas medicinais. A vincristina e a vinblastina foram inicialmente utilizadas em associação com outros quimioterápicos já usados na clínica para tratamento de vários tipos de câncer como nas leucemias, linfomas, no câncer testicular avançado, câncer de pulmão e Sarcoma de Kaposi (BARRALES-CUREÑO, 2015).

Outro agente antineoplásico que obteve sucesso como droga derivada de planta medicinal foi descoberto da casca do Teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) denominado como paclitaxel (Taxol®) (Figura 3). Sua estrutura química foi elucidada em 1971 e sua introdução clínica no mercado foi iniciada na década de 90 para o tratamento do câncer de pulmão, de mama e de ovário (WANI et al., 1971; ROWINSKY et al., 1990).

Figura 3 - Estrutura química do paclitaxel.



Fonte: Do Autor (2017).

A camptotecina um alcaloide quinolinico inibidor da Topoisomerase I, foi isolada de *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) e posteriormente levada para fase de ensaios clínicos pelo *National Cancer Institute* (NCI) em 1970, mas o estudo foi interrompido devido a sua capacidade de causar toxicidade severa na bexiga (POTMESIL; PINEDO, 1994). Contudo, outras drogas semi-sintéticas derivadas da camptotecina foram introduzidas na clínica como o topotecan e irinotecan, usados para o tratamento de tumores de ovário e câncer de pequenas células do pulmão, além do câncer colorretal, respectivamente (CREEMERS et al., 1996; BERTINO, 1997). Epipodofilotoxina, um isômero da podofilotoxina foi isolada das raízes das espécies de *Podophyllum* como agente antineoplásico. Dois derivados semissintéticos da epipodofiloxina, o etoposídeo e o teniposídeo, inibidores de Topoisomerase II são atualmente usados no tratamento de linfomas, câncer bronquial e testicular (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Um agente derivado de planta medicinal em uso na clínica para o tratamento da leucemia mielóide crônica, Omacetaxine, consiste em uma mistura racêmica da harringtonina e homoharringtonina, alcaloides de *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* (Sieb and Zucc.) (Cephalotaxaceae) atuando como inibidor da tradução

proteica (LÜ; WANG, 2014). Já o Elliptinium, um fármaco antineoplásico citostático, é derivado da ellipticina isolado da planta medicinal Fijian *Bleekeria vitensis* A.C. Sm. e é atualmente comercializado na França (ITOKAWA et al., 2005; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Um elevado número de compostos químicos originários de plantas medicinais está atualmente em fase de pesquisa clínica, porém uma quantidade considerável destes compostos naturais é baseada no paclitaxel, camptotecina, vimblastina, vincristina e epipodofilotoxina. Alguns compostos derivados de plantas medicinais que fazem exceção e estão em fases de ensaios clínicos são compostos semissintéticos como ácido betulínico, o fosfato de combretastatina A4, a curcumina, o flavopiridol, o licopeno e vários outros (MADHURI; PANDEY, 2009).

Outra classe de moléculas que têm sido objeto de diferentes estudos devido a seus potenciais benefícios para a saúde são as proantocianidinas, constituídas por unidades de flavan-3-ols condensadas. Estas moléculas vêm ganhando destaque por apresentarem atividade antioxidante e por desempenhar papel importante como agentes antineoplásicos, anti-inflamatórios, dentre outros (NAVARRO et al., 2017; SHERIF et al., 2017). As proantocianidinas ou taninos condensados, são alvo de várias pesquisas envolvidas na abordagem de diferentes plantas medicinais como *Blechnum orientale* que apresenta proantocianidinas nas suas folhas, as quais conferem uma propriedade antineoplásica em linhagem de câncer de cólon (LAI et al., 2013). Já as proantocianidinas que compõem as cascas do caule de *Ficus virens* apresentam potencial antineoplásico em linhagens sensível e resistente de câncer de mama, além de diminuírem os sintomas de mucosite intestinal provocada pelo uso do quimioterápico sintético 5-Fluorouracil (CHEN et al., 2017).

Como visto, a busca por novas substâncias bioativas presente nas plantas foi impulsionada pelas indústrias deste a década de 90 com a descoberta destas moléculas agora conhecidas. Essa busca perdura até hoje através de pesquisas básicas de pesquisadores da área utilizando extratos, óleos e peptídeos destas plantas, especialmente àquelas encontradas em regiões de floresta tropical onde se concentra grande parte da biodiversidade (PINTO et al., 2002). Neste âmbito a compreensão destes estudos acerca de compostos obtidos de plantas com propriedades medicinais, em especial, as proantocianidinas, se faz extremamente necessária diante da grande diversidade química estrutural de possíveis moléculas

promissoras a serem encontradas nas plantas como potenciais agentes antitumorais (PAN et al., 2012).

### 3.4 Atividade antibacteriana de plantas medicinais

Muito antes da descoberta da existência dos microrganismos patogênicos, a ideia de que as plantas tinham poder de cura já era bem aceita. Desde a antiguidade, os humanos tratavam seus males com plantas medicinais como, por exemplo, o bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) e o cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) usados no tratamento de infecções do trato urinário, a erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e a árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*) (HEINRICH et al., 2012).

No Brasil, grande parte das plantas estudadas é usada na forma de extratos brutos para tratar infecções comuns. Neste sentido, a investigação de produtos naturais como fonte de metabólitos com atividade antimicrobiana vem aumentando potencialmente a cada ano (SARAIVA, 2012). Além disso, alguns estudos utilizando extratos de plantas mostram resultados relevantes quando associados a antibióticos já utilizados na clínica, potencializando sua ação antibacteriana (DE AZEVEDO CALLOU et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; AIYEGORO et al. 2011). Os achados destes estudos sugerem a existência de compostos bioativos nas plantas medicinais que conferem uma característica antibacteriana a estes produtos naturais (SARAIVA, 2012).

A propriedade antibacteriana das plantas medicinais está principalmente ligada ao conteúdo de flavonoides, onde derivados de flavon-3-ol como as proantocianidinas desempenham importante papel no exercício dessa atividade (FERNANDES et al., 2017). A ação destes flavonoides contra bactérias e fungos é mediada pela sua ação na parede celular microbiana. Eles interagem com proteínas de membrana presentes na parede celular de bactérias levando a permeabilidade e ruptura da parede celular. As catequinas que também fazem parte do grupo dos flavonoides exibem atividade inibidora contra bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (RADULOVIC et al., 2013).

O chá das folhas de *Camellia sinensis* (chá verde) é bastante conhecido na medicina tradicional por possuir atividade antibacteriana contra diferentes patógenos, principalmente contra infecções do trato urinário. Seus extratos possuem catequinas, responsáveis por conferir esta propriedade antibacteriana. As catequinas mais

importantes no chá verde são (-) -epicatequina (EC), (-) -epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-) -epigallocatequina (EGC), (-) -epicatequina-3-galato (ECG) (NOORMANDI; DABAGHZADEH, 2015). O estudo de Ikigai e colaboradores (1993) evidenciou que a EGCG possui maiores efeitos antibacterianos frente à *E. coli* e *S. aureus* apresentando valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) relativos à 573 µg/mL e 73 µg/mL, respectivamente. Além destas moléculas, pode-se evidenciar as proantocianidinas do suco de cranberry (*Vaccinium oxycoccos*) inibem a adesão de *E. coli* no urotélio. A conformação estrutural destas proantocianidinas parece desempenhar um importante papel de anti-adesão uma vez que outras proantocianidinas oriundas de outras fontes como da maçã e da uva não apresentam essa propriedade (MICALI et al., 2014).

Além das infecções do trato urinário as infecções diarreicas são consideradas doenças de frequente ocorrência acometendo principalmente as crianças. Os principais patógenos causadores da diarreia são *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* e estão associados com baixas condições de higiene e saneamento básico (TOIYN et al., 2012). Diante disso, os estudos com extratos de plantas e substâncias oriundas de fontes naturais refletem uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antidiarreicos. O extrato aquoso das sementes de *Myrtus communis* L., por exemplo apresentou atividade antibacteriana frente à *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e *Bacillus cereus* (JABRI et al., 2016). Em sua composição foi identificada a presença de taninos condensados os quais parecem estar associados a esta atividade, uma vez que a atividade antimicrobiana de taninos condensados é atribuída aos efeitos de antimotilidade, antissecretório e/ou efeitos antimicrobianos (FARTHING, 2000; JABRI et al., 2016).

Em geral os taninos condensados exercem vários efeitos farmacológicos como anti-inflamatório, anticâncer, antioxidante, antimicrobiano, dentre outros (SIMÕES et al., 2017). Acredita-se que esses compostos interferem no crescimento bacteriano por meio de mecanismos que incluem a inibição de enzimas extracelulares pelos compostos oxidados, possivelmente através de reações com grupos sulfidrilas ou através de interações mais inespecíficas com proteínas, levando frequentemente à inativação da proteína da membrana e à perda de função, com extravazamento de citoplasma ou ação direta sobre o metabolismo microbiano (MARÍN et al., 2015).

O potencial antibacteriano das proantocianidinas está bem descrito na literatura, contudo, estudos sobre a biodisponibilidade e os dados farmacocinéticos destes fitoquímicos ainda são escassos. Novas pesquisas também são necessárias para esclarecer melhor como estes metabolitos são capazes de atravessar a barreira intestinal para exercer suas propriedades biológicas (SMERIGLIO et al., 2017).

No Brasil, nos últimos anos, várias pesquisas relacionadas à atividade antibacteriana de extratos e substâncias isoladas de plantas de várias regiões foram realizadas, porém ainda há um grande desafio a ser superado quando pensamos no fato de que apenas 0,5% da flora brasileira foram explorados (BLAINSKI et al., 2017; MICALI et al., 2014; FARTHING, 2000; JABRI et al., 2016; MARÍN et al., 2015). Porém, esforços vêm sendo feitos no tocante à descoberta de novos medicamentos naturais com atividade antibacteriana de modo que o conhecimento científico de seus componentes químicos possa elucidar mecanismos para obtenção de fármacos mais seguros e eficazes (SILVA, 2010).

### **3.5 *Limonium brasiliense***

#### **3.5.1 Características gerais**

O gênero *Limonium* pertencente à família Plumbaginaceae, apresenta 163 espécies aceitas de acordo com o “The Plant List” (THE PLANT LIST, 2015). Este gênero é bem representado na região mediterrânea da Europa e em países asiáticos, porém pode ser encontrado em regiões costeiras da América do Sul e América do Norte, no sul da África e na Austrália (MOBOT, 2015). Em geral, as espécies de *Limonium* vivem como plantas halófitas, incluindo em regiões alpinas (USHIROBIRA et al., 2015b). Na China, as raízes e caules de espécies de *Limonium* são usados na medicina tradicional, porém devido a suas semelhanças morfológicas a identificação das espécies se torna uma tarefa difícil de ser praticada utilizando métodos tradicionais (DING et al., 2012).

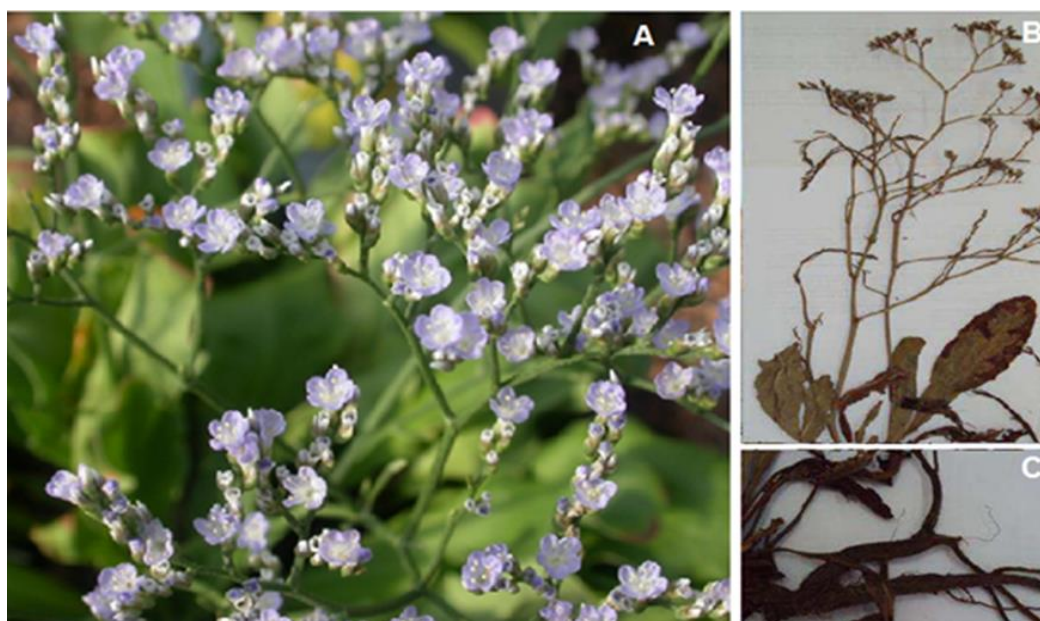
*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, encontrada no Brasil, é uma erva popularmente conhecida como guaicuru e essa espécie habita pântanos de água salgada nas regiões da costa brasileira e estados da região Sul e Sudeste, incluindo Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná e alguns países como Uruguai e Argentina

(USHIROBIRA et al., 2015b). A espécie é cultivada e comercializada como planta medicinal em regiões estuárias do Rio da Prata (USHIROBIRA et al., 2015a).

*Limonium brasiliense* é um subarbusto perene que pode chegar até 40 centímetros (cm) de altura, possui raízes grossas com presença de escamas, folhas com até 12 cm de comprimento por 2,5 de largura e inflorescências em grandes panículas de coloração azulada (Figura 4 e Figura 5) (FIOR et al., 2008). A primeira descrição botânica de *L. brasiliense* foi feita no século XIX e em 1920 Dias da Silva descreveu a estrutura anatômica detalhada, notando as características organolépticas da planta fresca e um odor característico que desaparecia com sua dissecação.

Mais recentemente, em um estudo morfoanatômico, Antonelli-Ushirobira et al. (2015) identificaram que muitos estudos haviam descrito as raízes de *L. brasiliense* de uma forma conceitual errônea, uma vez que sua descrição morfológica condiz com a presença de rizomas. No estudo identificaram os trabalhos de Corrêa (1952), Coimbra (1958), Cruz (1982), Moura et al. (1985), Murray et al. (2004), Fenner et al. (2006) and Blainski et al. (2013) haviam cometido este erro conceitual, porém após a caracterização morfo-anatômica confirmaram a presença dos rizomas de *L. brasiliense* (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015).

Figura 4 - *Limonium brasiliense*. A: Inflorescência de *L. brasiliense*. B: exsicata das partes aéreas. C: Exsicata das raízes.



Fonte: FIOR et al. (2008); BLAINSKI (2010).

Figura 5 - Hábito de *Limonium brasiliense*.



Fonte: BLAINSKI (2010).

### 3.5.2 Composição química

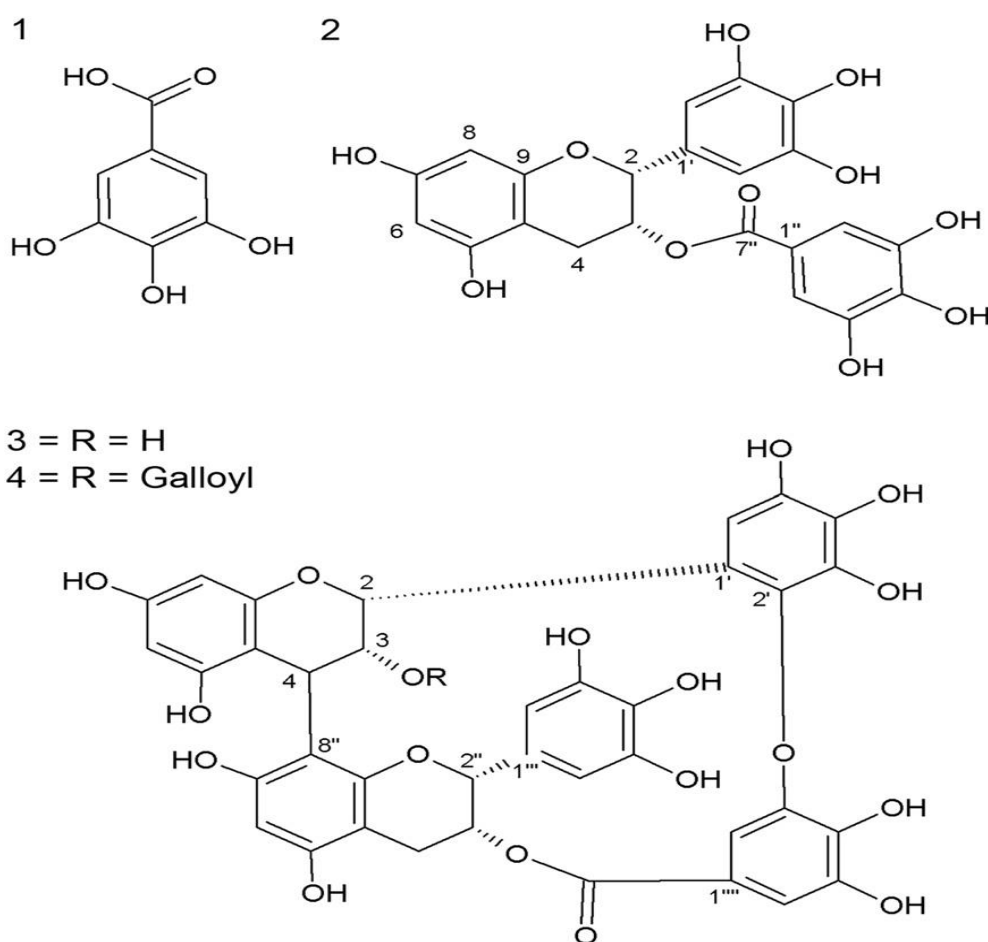
Estudos sobre *Limonium brasiliense* têm sido realizados frequentemente no Estado do Paraná, e o consumo da planta na medicina tradicional para tratar distúrbios do trato gênito-urinário é bastante difundido no Estado do Rio Grande do Sul, porém ainda há poucos relatos na literatura que indiquem os principais componentes presentes na planta (USHIROBIRA et al., 2015a).

Dentre os poucos estudos sobre a planta, os taninos hidrolisáveis, leucoantocianinas, demais flavonoides,  $\beta$ -sitosterol, saponinas e cumarinas são substâncias encontradas em extratos de rizomas de *L. brasiliense* (MOURA, 1985; JANHS; CRESCENTE, 1974; MURRAY et al., 2004; FENNER et al., 2006). Outro grupo de pesquisadores reportaram a presença de taninos condensados (epigallocatequina, galocatequina e epigallocatequina-3-O-galato) e hidrolisáveis (leucoantocianidinas, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico) (MURRAY et al., 2004). Cumarinas, ácido 4-methoxy-gálico,  $\beta$ -sitosterol, saponinas, miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnopiranosídeo, benzoato de benzil, sacarose, flavona, isoflavona, e flavonona também foram observadas e descritas por Moura et al., (1985) e Murray et al., (2004).

Além destas, recentemente, duas outras substâncias foram encontradas no extrato acetona:água de rizomas de *L. brasiliense*, identificadas como Samarangenina

A e Samarangenina B (CALEARE, et al., 2017). CALEARE e colaboradores (2017) também relataram a presença de ácido gálico e epigallocatequina-3-O-galato na composição do extrato estudado (Figura 6). Poucos estudos acerca destas duas Samarangeninas foram descritos na literatura, porém algumas atividades biológicas foram relatadas, como a atividade de inibição da adesão de *Porphyromonas gingivalis* em células epiteliais (CALEARE, et al., 2017) e a atividade antiviral contra o Herpes vírus (KUO et al., 2002; LIN et al., 2000).

Figura 6 - Estrutura molecular dos compostos identificados na FAE de rizomas de *L. brasiliense*. (1) ácido gálico, (2) epigallocatequina-3-O-galato, (3) samarangenina A e (4) samarangenina B.



Fonte: CALEARE, et al., 2017.

### 3.5.3 Atividades biológicas

*Limonium brasiliense* é usada na medicina tradicional como antisséptico em infecções do trato geniturinário, como adstringente e depurativo e especialmente

usado contra cólicas menstruais e na regulação do período menstrual (MOURA et al., 1985). Murray e colaboradores (2004) relataram o uso da planta no tratamento de hemorragias e de doença reumática além de relatar uma possível atividade cardio preventiva. A atividade antioxidante de frações semi-purificadas das raízes da planta também foi elucidada por estes pesquisadores pela determinação de sua IC<sub>50</sub> (MURRAY et al., 2004).

A atividade anti-inflamatória foi demonstrada com extratos etanólicos (JAHNS; CRESCENTE, 1976), em extratos semi-purificados e no composto isolado miricetina-3-O-ramnosídeo (RODRIGUES et al., 2015). Moura et al. (1985) também demonstraram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de rizomas de *L. brasiliense* injetado por via intraperitoneal (250 mg/kg) em edema de pata induzido por carragenina *in vivo*.

Em um estudo com *L. brasiliense* foi descrito que esta espécie é usada para tratar úlceras, leucorreias e há relatos de sua utilização no tratamento de algumas infecções fúngicas (FENNER et al., 2006). Outra atividade relatada foi a antiviral *in vitro* de extratos etanólicos da planta contra o *Herpes simplex* vírus tipo I foi demonstrada com EC<sub>50</sub> de 185 µg/mL (MEDINI et al., 2014).

Entre os anos de 1980 e 1990, preparações farmacêuticas obtidas das raízes das plantas eram comercializadas no Brasil em forma de chá com o propósito de tratar as infecções do trato geniturinário. Mais tarde, a ANVISA cancelou a certificação desses produtos e seu uso foi descontinuado por falta de bases científicas que comprovassem os efeitos biológicos com mais clareza e confiabilidade (CARDOSO, 1990; FENNER et al., 2006; BLAINSKI et al., 2013).

### **3.6 *Paullinia cupana***

#### **3.6.1 Características gerais**

*Paullinia cupana* var. *sorbilis* é uma planta pertencente à família Sapindaceae que apresenta mais de 140 gêneros e 2000 espécies distribuídas pelo mundo (ÂNGELO et al., 2008). Na Amazônia brasileira, além de *Paullinia cupana*, há oito espécies deste gênero incluindo *Paullinia seminuda* Radlk., *Paullinia paullinoides* Radlk., *Paullinia verrucosa* Radlk., *Paullinia rufescens* Rich. exJuss., *Paullinia*

*caloptera* Radlk., *Paullinia selenoptera* Radlk., *Paullinia pinnata* L. e *Paullinia pseudota* Radlk. ex Warm (SCHIMPL et al, 2013).

Esta espécie é popularmente conhecida como guaraná e em relação a sua origem e distribuição há algumas controvérsias, porém, seu habitat natural corresponde às regiões da bacia do Rio Maués-Açu que coincide com o território dos Índios Sateré-Mawé (FILOCHE; PINTON, 2014). A palavra guaraná significa, no dialeto indígena, “videira” por apresentar em seu hábito de crescimento gavinhas que podem chegar até 10 metros de comprimento prendendo-se às árvores vizinhas (SCHIMPL et al., 2013).

Os índios Sateré-Mawé iniciaram o processo de domesticação do guaraná e, mais tarde, com a expansão comercial das sementes para uso em bebidas, na indústria cosmética e para fins terapêuticos, pequenos agricultores iniciaram o processo de plantio no sul da Bahia. A expansão do guaraná se deu rapidamente nos solos baianos devido às condições climáticas e ao solo fértil e próprio para o cultivo. Hoje, a Amazônia e a Bahia são responsáveis por 95% da produção do guaraná no Brasil (FILOCHE; PINTON, 2014; SCHIMPL et al., 2013).

Com o processo de domesticação da planta, sua morfologia inicial foi perdendo algumas características e seus arbustos desenvolvidos nas áreas de cultivo podem chegar de 2 a 3m de altura (MONTEIRO, 1965). Em geral, vivem cerca de 35 anos. A planta é adaptada à baixa altitude, clima quente e úmido com 85% de umidade relativa, 26°C de temperatura média anual e precipitação anual entre 1500 e 2000 mm (MIRANDA; METZNER, 2010). As folhas da planta são distribuídas alternadamente possuindo um folheto terminal. Os folhetos possuem forma oval e comprimento de aproximadamente 10 a 14 cm por 27 a 33 cm de largura (Figura 7 A) (SCHIMPL et al., 2013). É uma planta monóica com um tipo de inflorescência racemosa que pode atingir tamanhos maiores de 30 cm. Os frutos são formados por uma cápsula de cor avermelhada com um pedúnculo desenvolvido e em sua forma madura expõem uma polpa branca com uma semente preta, assemelhando-se ao olho humano, o que representa uma característica marcante na identificação do guaraná (Figura 7 B) (SMITH; ATROCH, 2010).

O processo de obtenção do pó do guaraná é feito através da secagem das sementes, podendo ser realizado manualmente, como faziam os índios, ou por métodos automatizados. No processo manual as sementes são retiradas dos frutos após passarem por três dias de fermentação. Já no processo automático elas são

processadas imediatamente após a colheita. Logo após, são lavadas para retirada do arilo e levadas para secagem durante um intervalo de 3 a 5 horas. Após secagem é obtido o extrato bruto do guaraná (WALKER et al., 2000).

Figura 7 – A: Descrição anatômica de *Paullinia cupana*. B: Frutos do guaraná.

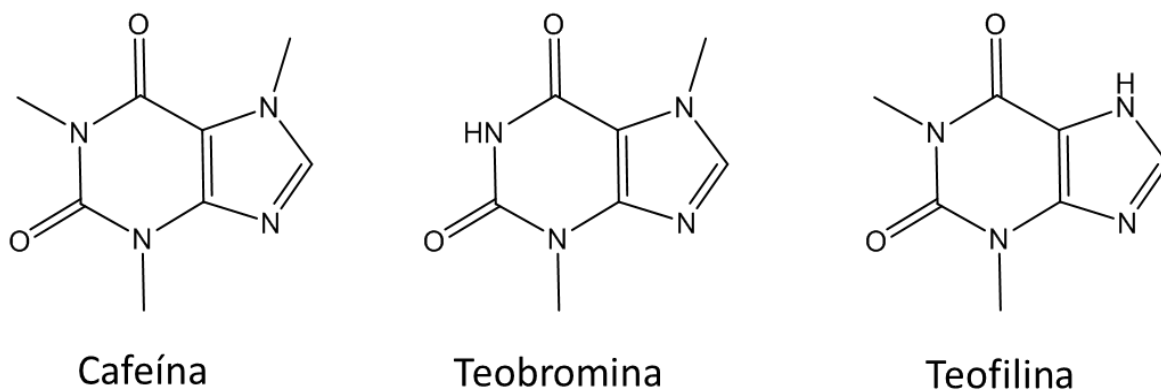


Fonte: SCHIMPL et al. (2013).

### 3.6.2 Composição química

A semente do guaraná é a parte comercializada da planta devido a presença de alcaloides púricos ou metilxantinas em sua composição (1,3,7-tri-metilxantina) (cafeína), aos quais é atribuída a propriedade de estimulante (KOFINK et al., 2007). A cafeína é encontrada no guaraná em diferentes quantidades (2,5 a 6%), a depender do método utilizado para extração, da época da colheita e de outros fatores que podem influenciam no teor desse alcaloide. Outros alcaloides púricos também foram posteriormente encontrados no guaraná, porém em pequenas proporções (0,3%) como teobromina (3,7-dimetilxanina) e teofilina (1,3-dimetilxantina) (OLIVEIRA, 2010). Esses três alcaloides são os principais constituintes de *Paullinia cupana* (Figura 8) (HAMERSKI et al., 2013).

Figura 8 - Principais metilxantinas contidas nas sementes de *Paullinia cupana*.



Fonte: Do autor (2017).

Outras análises indicaram a presença de taninos nas sementes do guaraná, como as catequinas e epicatequinas (USHIROBIRA et al., 2004; BASILE et al., 2005), flavonoides (MATTEI et al., 1998) e saponinas em pequenas quantidades (PECKOLT, 1868). O conteúdo total de taninos condensados (procianidinas B1, B2, B3, B4, A2, e C1) foi descrito em alguns estudos (MELLO et al., 2010; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; HAMERSKI et al., 2013).

As sementes de guaraná geralmente contêm acilglicerois e cianolipídeos, que são lipídeos de plantas restritos a algumas famílias como a Sapindaceae, Hippocastanaceae e Boraginaceae (HAMERSKI et al., 2013).

### 3.6.3 Atividades biológicas

Durante séculos o guaraná tem sido utilizado pelos índios da Região Amazônica como estimulante, antidiarreico, diurético e no tratamento de dores em geral (GALVÃO et al., 2002; MENDES; CARLINI, 2007; MENDES, 2011). O guaraná é bastante admirado por suas propriedades energéticas e, quando foi introduzido no mercado, seu uso como planta medicinal era relacionado a suas propriedades de estimulante físico, mental e promoção da perda de peso. Com o passar dos anos seu uso foi relacionado a diversas outras atividades e efeitos em desordens fisiológicas como afrodisíaco, tônico para os rins, músculos, coração, para controle do colesterol, regulação do apetite, para tratar dores de cabeça, leucorreia, neuralgias, aterosclerose, cólicas menstruais, etc (CARLSON; THOMPSON, 1997; SMITH;

ATROCH,2007). Sua utilização perdura até os dias atuais, pois o extrato das sementes do guaraná apresenta baixa toxicidade e diferentes atividades farmacológicas (VERMAAK et al., 2011; MELLO et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2010).

Baseado no uso tradicional, em 1817, pesquisadores de Paris foram quem primeiro descobriram as propriedades medicinais do guaraná como tônico estomacal, afrodisíaco e antipirético, bem como para o tratamento de diarreias e disenterias (CADET DE GASSICOURT, 1817; SCHIMPL et al., 2013). Mais tarde foram elucidadas as atividades farmacológicas das metilxantinas como estimulantes do sistema nervoso central. No bulbo, essas substâncias estimulam o centro respiratório e produzem efeito relaxante na musculatura lisa dos brônquios e bronquíolos. Estimulam também o sistema cardiovascular, aumentando o batimento cardíaco e o fluxo sanguíneo. Os mecanismos de ação das xantinas incluem: aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, inibição de fosfodiesterases e efeitos diretos na concentração intracelular de cálcio (MIRANDA; METZNER, 2010; KUSKOSKI et al., 2005).

A teofilina e a teobromina têm efeito imunomodulador, anti-inflamatório, e ação broncoprotetora retardando o processo de envelhecimento impedindo a deposição de colesterol nas artérias e facilitando o aporte sanguíneo em todo o organismo. Em geral, os taninos, em especial o catecol, conferem propriedades adstringentes úteis em estados diarreicos. Foi demonstrado também atividades dos extratos aquosos de guaraná por via oral e parenteral inibindo a agregação plaquetária e reduzindo a síntese de tromboxano, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BYDLOWSKI et al., 1987).

O extrato de sementes do guaraná possui atividade antioxidante por inibir o processo de peroxidação lipídica (BASILE et al., 2005; MATTEI et al., 1998). Além disso, Bittencourt e colaboradores (2013) relataram que o guaraná possui efeito antioxidante sobre o óxido nítrico (NO) em situações de altos níveis celulares de NO. A propriedade antioxidante do guaraná é atribuída à presença de taninos em seus extratos atuando principalmente na captura de radicais livres e prevenindo doenças coronarianas e cânceres (HAMERSKI et al., 2013).

A atividade antimicrobiana foi demonstrada com o uso do extrato alcoólico do guaraná, que mostrou atividade contra fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* e *Penicillium cyclopium*, e contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, e *Streptococcus mutans* (MAJHENIC, 2007; YAMAGUTI-SASAKI, 2007;

BASILE, 2005). Devido a sua propriedade antimicrobiana e antioxidante, *P. cupana* é usada como aditivo natural em produtos cosméticos como xampu, sabonetes, loções, etc (MAJHENIC et al., 2007).

Os extratos de guaraná também apresentam ações estimulantes no sistema nervoso central (SNC) como antidepressivo, ansiolítico e contra perdas de memória. O efeito antidepressivo depois de um longo período de tratamento pode ser comparado com o da imipramina, um antidepressivo tricíclico, resultando em um efeito benéfico na cognição sem alterações de atividade motora (SCHOLEY; HASKELL, 2008; OTOBONE et al., 2007; RONCON et al., 2011).

*P. cupana* tem sido investigada por apresentar atividades quimioproláticas na carcinogênese e antigenotóxica *in vivo* (FUKUMASU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2005, 2010; LEITE et al., 2011). Além disso, foi observada uma proteção contra lesões gástricas induzidas pelo álcool e indometacina *in vivo* (CAMPOS et al., 2003). Campos e colaboradores (2011) demonstraram que o guaraná também apresenta atividades contra fadiga em pacientes com câncer de mama em tratamento com quimioterápicos sistêmicos.

Dentre os efeitos adversos da *Paullinia cupana* encontram-se: insônia, nervosismo, ansiedade, palpitação, náuseas, vômitos, cefaleia e espasmos abdominais (DUKE, 1992).

A cafeína tem sido o principal foco dos estudos com o guaraná devido a seu elevado conteúdo presente nas sementes. Além da cafeína, os taninos condensados também fazem parte da composição das sementes do guaraná, porém em menor quantidade (MACHADO et al., 2018). Por este motivo, os estudos acerca dos taninos das sementes do guaraná são escassos, havendo a necessidade de evidências científicas que comprovem suas atividades biológicas. Diante deste fato são de relevante importância estudos adicionais sobre os aspectos de caracterização, isolamento e descoberta das atividades biológicas da planta de modo a aumentar a produtividade e qualidade do produto final bem como seu consumo (WOODS, 2012; MACHADO et al., 2018).

### **3.7 *Trichilia catigua***

#### **3.7.1 Características gerais**

*Trichilia catigua* A. Juss é uma planta pertencente à família Meliaceae popularmente conhecida como catuaba, catuaba amarelo, catuaba vermelho, angelim rosa, pombeiro ou veludo (Figura 9). A catuaba é uma árvore de grande importância ecológica, uma vez que seus frutos são avidamente consumidos por várias espécies de aves (LAGOS et al., 2007).

É uma árvore de porte baixo variando entre 3 a 8m de altura, suas hastes são ramificadas, densamente cobertas com uma casca fina e lisa. As plantas florescem principalmente entres os meses de janeiro a maio, porém há registros de florescência nos meses de julho a dezembro. Sua inflorescência predomina na cor amarela. É uma espécie decídua possuindo flores unissexuais encontradas principalmente na região axial ou agregadas em um broto racemoso axial. As folhas são pinadas com os últimos pares de folíolos orientados para simular um folíolo terminal de 6 a 12 cm. A produção de frutos (Figura 9) acontece cerca de dois meses após florescerem. Sua madeira é flexível, de textura fina, macia ao corte e muito resistente ao ataque de organismos xilófagos (NAYAK et al., 2013).

*T. catigua* é uma planta seletiva higrófito e ocorre preferencialmente em solos úmidos de planícies aluviais e início de encostas. Predomina em regiões de floresta ombrófila (Amazônia), floresta ciliar (Cerrado), Caatinga e Mata Atlântica (SLAVIEIRO et al., 2014). São de ampla distribuição na região da América Central e América do Sul podendo ser encontrada em países como Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia. No Brasil predomina nos estados entre Minas Gerais e Rio Grande do Sul (CORREA JÚNIOR ; MING, 2001).

Figura 9 - Folhas, frutos e cascas de *Trichilia catigua* A. Juss.

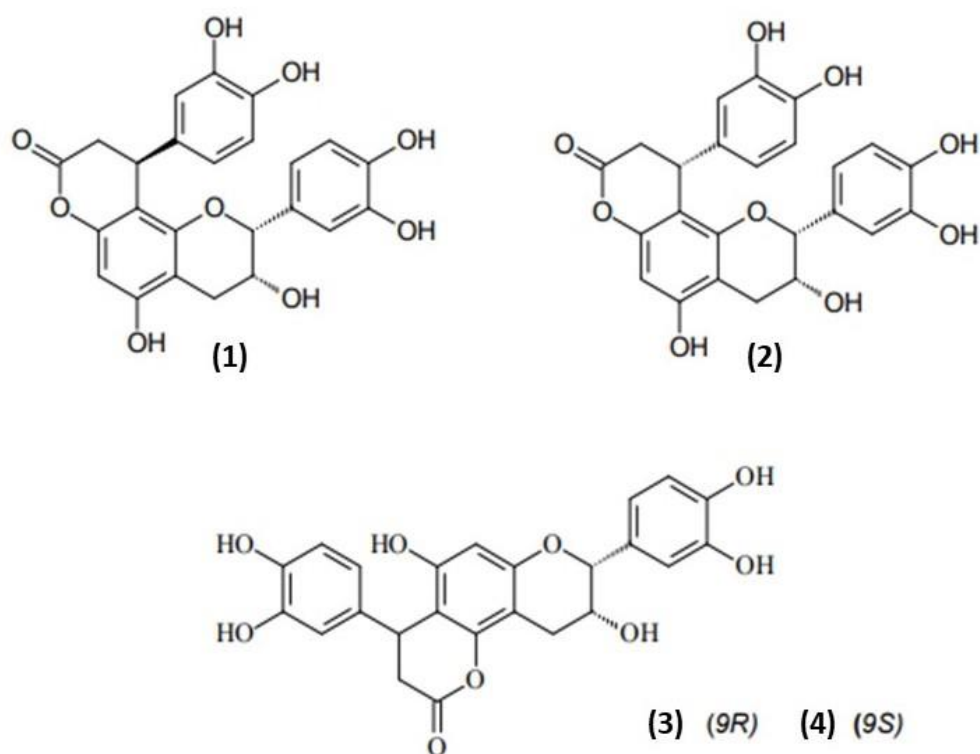


Fonte: LONGHINI et al. (2017). Acima aparecem o hábito com as folhas, flores e sementes de *T. catigua*, e, abaixo a visão macroscópica das cascas de *T. catigua*.

### 3.7.2 Composição química

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de constituintes químicos presentes na catuaba com diversas atividades farmacológicas. Dois dos principais constituintes são taninos condensados isolados da casca do caule, as epicatequinas, denominadas de catiguanina A e catiguanina B (TANG et al., 2007). Além dessas, outros taninos condensados também têm sido isolados da casca da catuaba como as cinchonaina IA (1), cinchonaina IB (2), cinchonaina IC (3) e cinchonaina ID (4) (Figura 10), cinchonaina IIA, IIB, IIC e apocinina E, também chamadas de flavolignananas (BELTRAME et al., 2006). Catequinas e procianidinas B2, B4 e C1 também são substâncias encontradas no extrato acetona:água das cascas de *T. catigua* (RESENDE et al., 2011).

Figura 10 - Estruturas químicas das cinchonainas encontradas nas cascas de *T. catigua*. (1) cinchonaina IA, (2) cinchonaina IB, (3) cinchonaina IC, (4) cinchonaina ID.



Fonte: Do autor (2017).

Alguns constituintes de extratos de *Trichilia catigua* identificados são os ômega-fenil alcanos, ácidos ômega-fenil alcanóicos, ômega-fenil-gama lactonas, alquil-gama lactonas, alcenil-gama lactonas, sesquiterpenos, ácidos graxos que variam entre C-14 a C-26,  $\beta$  - sitosterol, estigmasterol, campesterol e taninos (LAGOS et al., 2007; PIZZOLATI et al., 2002; LONGHINI et al., 2017).

### 3.7.3 Atividades biológicas

A catuaba é uma planta empregada empiricamente na medicina tradicional como afrodisíaco e neuroestimulante (KAMDEM et al., 2012). Vários estudos abordaram a existência de atividades farmacológicas como efeitos antidepressivos, anti-inflamatórios, antioxidante, antimicrobianos. Além disso, a segurança de efeitos não tóxicos dos extratos já foi previamente demonstrada em testes com voluntários humanos (OLIVEIRA et al., 2005).

Vários processos patológicos em que *Trichilia catigua* tem efeitos benéficos estão associados à produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio, causando alterações no metabolismo energético através de alterações oxidativas em componentes chaves presentes na mitocôndria (VENKATESH et al., 2009). A atividade antioxidante da catuaba tem sido relacionada à presença de compostos químicos presentes na planta como os flavonoides, taninos e fenilpropanoides (TANG et al., 2007; KAMDEM et al., 2012).

Estudos sobre a ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das cascas de catuaba revelaram bons resultados *in vivo*, porém neste mesmo trabalho foi observado que mediadores pró-inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e Prostaglandina E não apresentavam alterações indicando que este extrato não possui ação anti-inflamatória (VIANA et al., 2011). Já Barbosa et al. (2004) analisaram a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das cascas de catuaba sugerindo a utilização da planta para estudos futuros com a finalidade da descoberta de uma nova classe de agentes anti-inflamatórios.

A atividade antimicrobiana foi observada com a fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico das cascas de catuaba que inibiu bactérias Gram-positivas como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Houve também inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas (PIZZOLATI et al., 2002). Segundo estes pesquisadores, flavolignanas, cinchonaínas Ia e Ib isoladas desses extratos são responsáveis pela

inibição das bactérias Gram-positivas, porém o mecanismo de ação deve ser melhor estabelecido (PIZZOLATI et al., 2002). Gonçalves et al. (2014) também demonstraram atividade antibacteriana do extrato bruto de catuaba contra *Staphylococcus aureus*. Poucos estudos foram descritos relacionando a atividade antibacteriana dos extratos de catuaba havendo a necessidade de elucidar esta ação em bactérias sensíveis e, em especial, nas bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado (LONGHINI et al., 2017).

A atividade antidepressiva dos extratos de *Trichilia catigua* foi demonstrada por Campos et al (2005) *in vivo*. Quando comparado com a droga padrão (fluoxetina), o extrato hidroalcoólico das cascas demonstrou melhor evidência farmacológica e bioquímica através de mecanismos primariamente envolvidos na ativação da via dopaminérgica (CAMPOS et al., 2004; VIANA et al., 2011).

No geral, as moléculas presentes em extratos de plantas, em especial os taninos condensados possuem atividades fisiológicas e farmacológicas como algumas previamente mencionadas (antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, imuno estimulante, anticâncer, antialérgicas, vasodilatadora, etc). Há evidências de que os taninos condensados têm a capacidade de inibir enzimas como, por exemplo, algumas tirosinas quinases e a topoisomerase II (BABY et al., 2007; NATH et al., 2017). Este fato permite avaliações mais precisas de possíveis mecanismos de ação de muitos extratos de plantas e taninos isolados contra a ação dos tumores (NATH et al., 2017).

### 3.8 Taninos

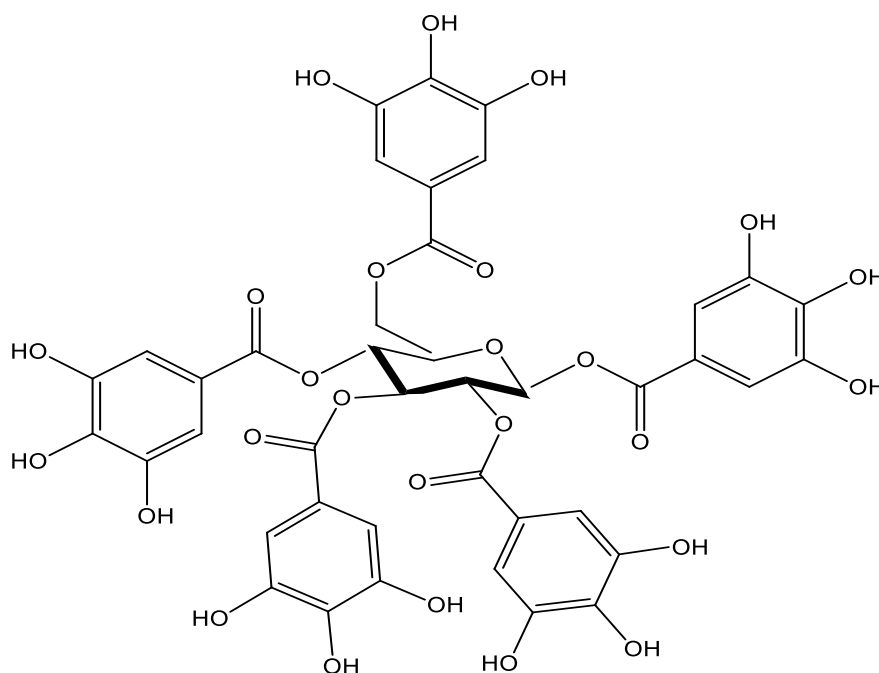
Os compostos bioativos naturais de uma planta são classificados como: metabólitos primários, ligados ao desenvolvimento e crescimento vegetal, e os metabólitos secundários que geralmente se associam com a atração de dispersores/polinizadores, a proteção e a competição planta-planta (TAIZ ; ZEIGER, 2009). Portanto, os metabólitos secundários representam uma classe de moléculas com importante papel na adaptação dos organismos vivos às condições do meio ambiente em que vivem (FRANÇA, 2017).

Vários desses metabólitos secundários têm sido explorados quanto às suas atividades biológicas, seus efeitos farmacológicos e à segurança de sua utilização. Os taninos representam uma desses grupos de moléculas, constituindo a classe dos polifenóis, importante classe de metabólitos secundários dos vegetais (MELLO;

SANTOS, 2017). Originalmente, os taninos são divididos em dois grandes grupos de acordo com sua estrutura química, os taninos hidrolisáveis e taninos condensados, e, esses dois grupos são encontradas em quase a totalidade de partes das plantas como no caule, nas raízes, nas folhas, frutos, sementes, cascas etc (OKUDA; ITO, 2011).

Os taninos hidrolisáveis diferenciam-se dos taninos condensados por possuírem um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, nas quais as hidroxilas encontram-se esterificadas com o ácido gálico (Figura 11). Além disso, os taninos hidrolisáveis podem apresentar duas classes: galotaninos e elagitaninos. Já os taninos condensados, que também podem ser chamados de proantocianidinas por produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, correspondem a polímeros e oligômeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Lipińska et al., 2014; Berry et al., 2016; De Jesus et al., 2012). Unidades de flavan-3-ol, podem apresentar diferenças no padrão de hidroxilação dos anéis A e B, e podem diferir também na estereoquímica do carbono 3 (C-3), porém as modificações mais comuns representam os diastereoisômeros (+)-catequina (C) (1) / (-)-epicatequina (EC) (2) e (-)-galocatequina (GC) (3) / (-)-epigalocatequina (EGC) (4) (Figura 12).

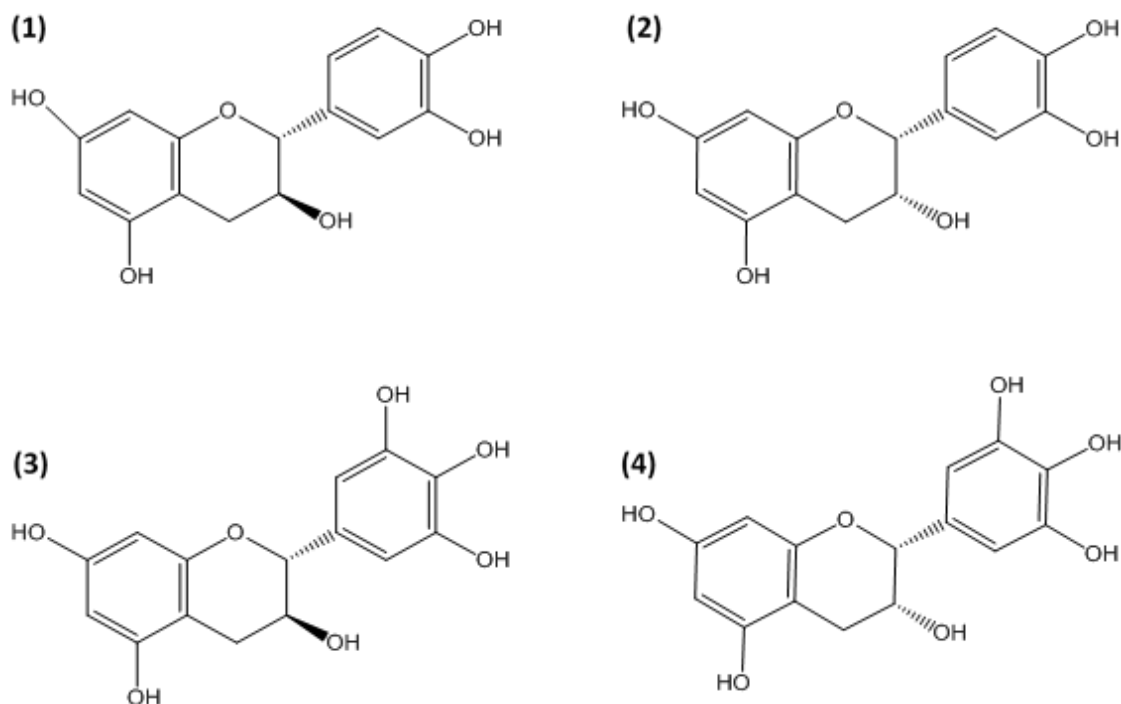
Figura 11 -  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagalactil-D-glicose. Padrão máximo de substituição de taninos hidrolisáveis e precursor dos galotaninos e elagitaninos.



Fonte: Do autor (2017).

Em geral, as plantas que contêm grandes quantidades de taninos são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de várias doenças como, hemorragias, feridas, câncer, diarreia, infecções bacterianas, doenças inflamatórias, dentre várias outras utilizações (SERRANO et al., 2009). Diz-se que essas propriedades farmacológicas dos taninos são atribuídas ao menos a três características principais, a saber: (1) a ligação com íons metálicos, (2) a atividade antioxidante e o sequestro de radicais livres e, (3) a forte interação com proteínas e polissacarídeos (MELLO; SANTOS, 2017).

Figura 12 - Exemplos de Flavan-3-ol. (1): (+)-catequina (C); (2): (-)-epicatequina (EC); (3): (-)-galocatequina (GC); (4): (-)-epigallocatequina (EGC).



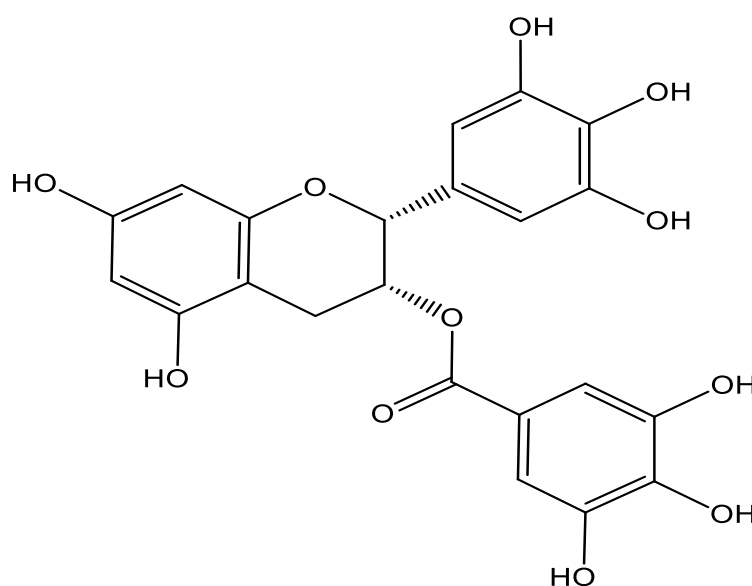
Fonte: Do autor (2017).

Relacionando a interação dos taninos às proteínas, estes podem formar complexos de forma reversível através de pontes de hidrogênio, ou de forma irreversível por meio de ligações covalentes. Acredita-se que as pontes de hidrogênio são formadas entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as porções carbonílicas das ligações peptídicas protéicas. Entretanto, as ligações covalentes podem ocorrer entre os anéis aromáticos dos taninos com as cadeias laterais dos aminoácidos protéicos (alifáticas ou aromáticas) (LUCK et al., 1994). Essa propriedade de complexação com proteínas compreende peça chave para o desempenho de várias

atividades biológicas, uma vez que essa complexação confere aos taninos a capacidade de inibição enzimática, a qual representa o mecanismo de ação de muitos fármacos disponíveis na clínica para tratar doenças distintas (BLAINSKI, 2010).

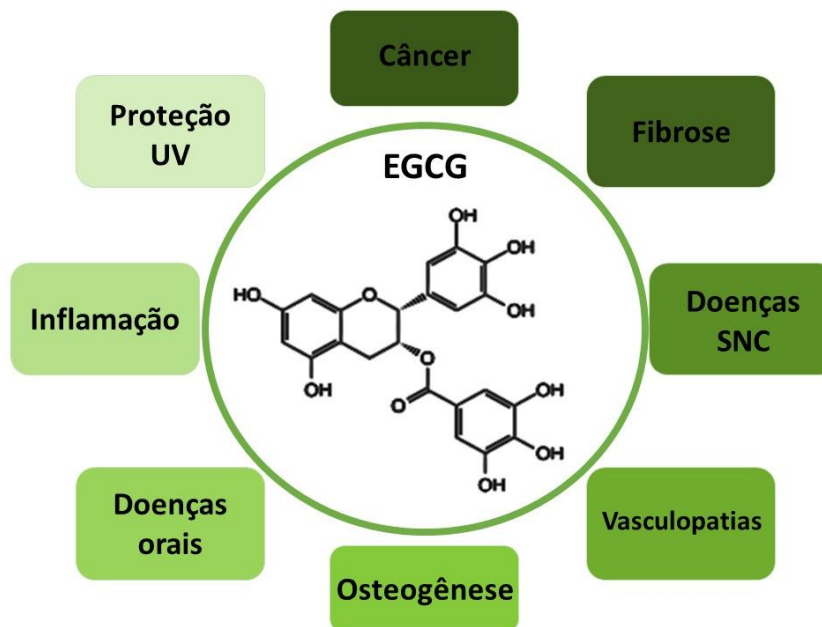
O flavan-3-ol epigallocatequina-3-galato (EGCG) é um éster de epigallocatequina com ácido gálico, e, é bastante conhecido na literatura devido a suas diversas atividades biológicas além de ser frequentemente encontrado como o mais abundante polifenol presente no chá verde [*Camellia sinensis* L. Ktze. (Theaceae)] (Figura 13). Estudos acerca das propriedades do EGCG apontaram uma série de efeitos farmacológicos que incluem principalmente o potencial anticâncer, anti-inflamatório, antioxidante, etc. Dessa forma, EGCG é alvo de diversos de estudos relacionados às mais diversas doenças e aos benefícios associados a essa substância, como mostra a figura 14 (STONER; MUKHTAR, 1995; NAGLEA et al., 2006; ZHAO et al., 2012; LANDIS-PIWOWAR et al., 2013; CHU et al., 2017).

Figura 13 - Estrutura química da EGCG.



Fonte: Do autor (2017)

Figura 14 - Principais doenças combatidas pela EGCG e alguns benefícios associados às suas propriedades farmacológicas.



Fonte: Do autor (2017).

Além de EGCG, outros taninos condensados como procianidinas diméricas e epicatequinas presentes em folhas e cascas de *Hamamelis virginiana* L. e nas raízes de *Krameria triandra*, respectivamente, são responsáveis também por certas atividades biológicas já conhecidas. Os extratos das cascas e folhas de *Hamamelis virginiana* L. apresentam atividade antineoplásica em linhagem humana de câncer de colon. Já os extratos das raízes de *Krameria triandra* possuem efeito adstringente devido ao conteúdo de taninos condensados. Os extratos desta planta são usados para obtenção de tinturas que servem para tratamento de infecções orofaríngeas e para tratamento de hemorroidas (SANCHEZ-TENA et al., 2012; MELLO; SANTOS, 2017).

Assim como nessas plantas descritas, os taninos são encontrados em várias outras espécies desempenhando atividades biológicas semelhantes, como foi observado por Carvalho e colaboradores (2016), onde foram evidenciadas as atividades antineoplásica, antibacteriana e imunomoduladora da fração acetato de etila das sementes de *Paullinia cupana*. Outra planta, amplamente conhecida como catuaba, também apresentou quantidades de taninos em sua fração acetato de etila das cascas de *Trichilia catigua*, os quais mostraram efeitos significativos no sistema

nervoso central de ratos tratados com esta fração, aumentando o desempenho cognitivo (CHASSOT et al., 2011).

Recentemente, o estudo de Blainski et al (2017) demonstrou a presença de taninos como ácido gálico, epigallocatequina e galocatequina representando os componentes majoritários da fração acetato de etila de rizomas de *Limonium brasiliense*. No estudo, a fração apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias multi-resistentes *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina indicando a ligação dos taninos a esta atividade biológica (BLAINSKI et al., 2017).

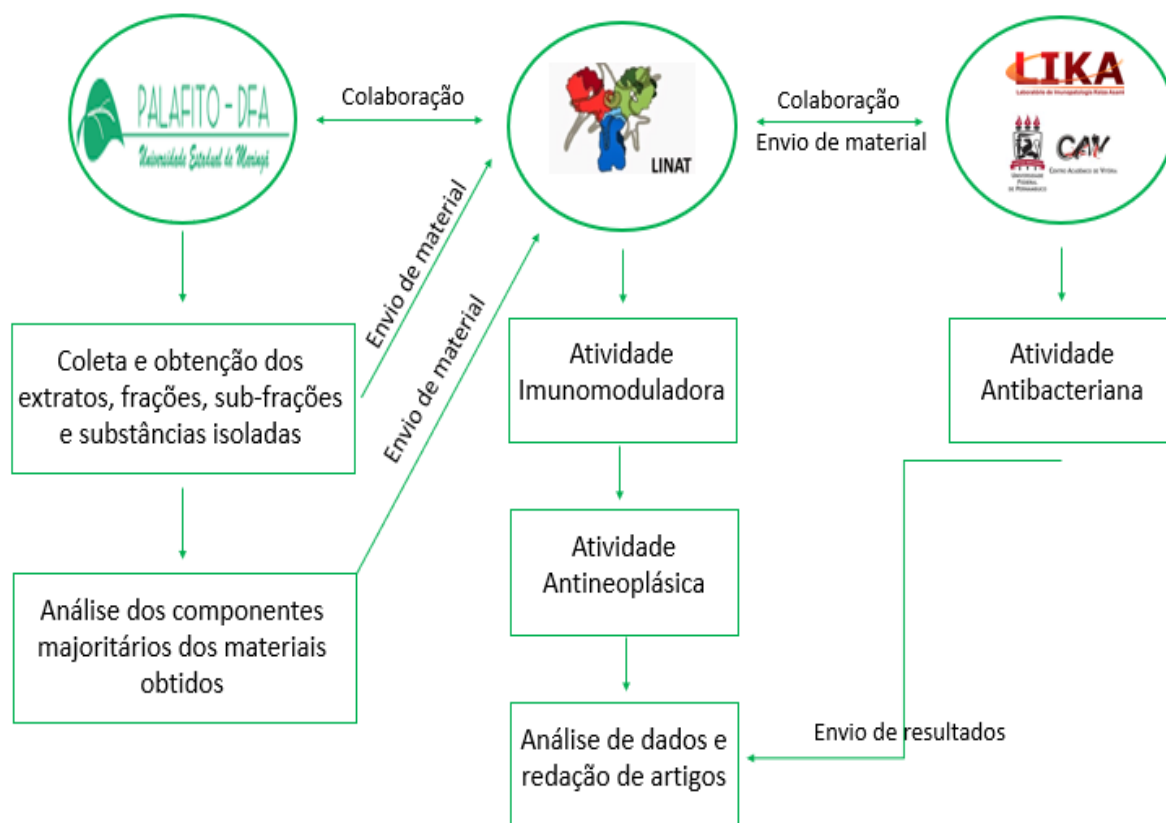
Conforme foi abordado, os taninos, em especial os taninos condensados, apresentam várias atividades biológicas já identificadas em diversas plantas. Porém, estudos acerca das atividades biológicas das moléculas isoladas desses extratos e frações, ainda compreendem um desafio devido ao seu difícil processo de caracterização e isolamento (SAITO, 2017). Entretanto, uma vez isolados e caracterizados, estes taninos, podem representar moléculas promissoras para o tratamento de vários tipos de doenças, tornando a pesquisa de taninos uma fonte de benefícios à sociedade (CHACKO et al., 2010).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Desenho do estudo**

Este estudo tem caráter exploratório e translacional, desenvolvido através de colaborações com pesquisadores de Recife-PE e Maringá-PR conforme apresentado no fluxograma a seguir (Figura 15).

Figura 15 – Desenho do estudo e colaborações para desenvolvimento do estudo.



Fonte: Do Autor (2017).

## 4.2 Local e período do estudo

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco, no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica – Suely Galdino (NUPIT-SG) e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), com início em março de 2014 e término em dezembro de 2017.

## 4.3 Aspectos éticos

A experimentação com humanos foi iniciada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CCS - UFPE) sob número de parecer 1.285.288, (Anexo 1).

Os procedimentos com animais também foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética Animal – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de

Pernambuco (CCB-UFPE) sob número de processo 23076.041556/2015-62, (Anexo 2).

#### 4.4 Obtenção das amostras das plantas em estudo

As amostras das plantas foram obtidas através de colaboração com a Universidade Estadual de Maringá (UEM) na pessoa do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Melo, responsável-chefe do laboratório PALAFITO – UEM e chefe do departamento de farmácia da UEM. Inicialmente foram enviados ao LINAT o extrato bruto (EB) e a fração acetato de etila (FAE) de sementes de *P. cupana* (Figura 16). Além do EB e da FAE, também foi enviada a fração aquosa (FAq) das cascas do caule de *T. catigua* (Figura 17) e dos rizomas de *L. brasiliense* (Figura 18).

Posteriormente, a substância cinchonaina IB (Godinho et al., 2017) isolada da FAE de *T. catigua* também foi entregue ao LINAT para análise neste estudo (Figura 17). Subsequentemente, foram enviadas ao LINAT onze sub-frações provenientes da fração acetato de etila de *L. brasiliense* nomeadas por ordem alfabética: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K. Em seguida, três substâncias isoladas da FAE de *L. brasiliense* no estudo de CALEARE et al. (2017) também foram enviadas para avaliação de suas atividades biológicas, a saber: Epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), Samarangenina A (SamA) e Samarangenina B (SamB) (Figura 18).

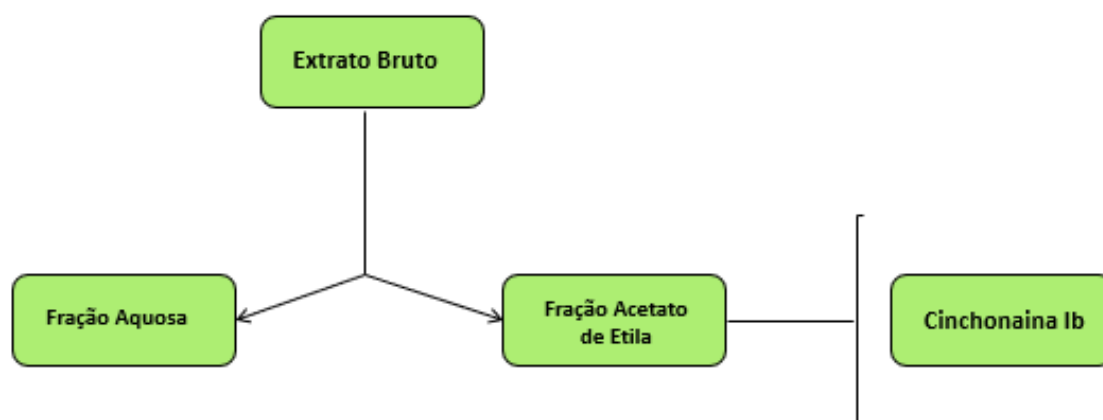
O período de coleta das plantas bem como sua localização geográfica e o processo de obtenção do extrato e frações foram previamente descritos na literatura (BLAINSKI et al., 2017; MARQUES et al., 2016; GODINHO et al., 2017).

Figura 16 - Amostras provenientes das sementes de *Paullinia cupana*.



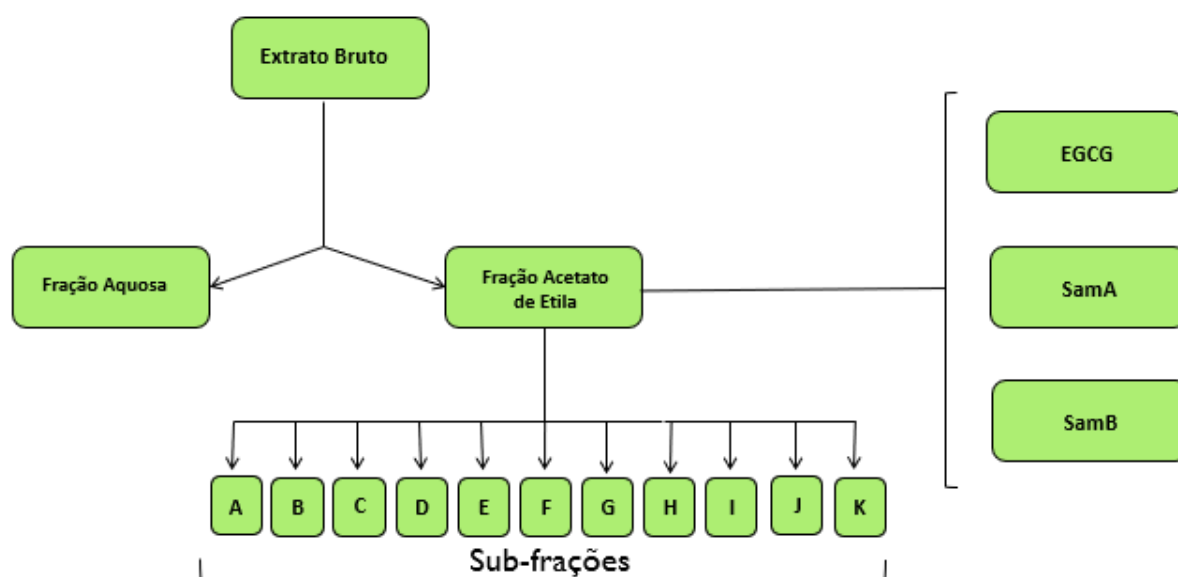
Fonte: Do autor (2017).

Figura 17 - Extrato, frações e tanino condensado isolado de cascas do caule de *Trichilia catigua*.



Fonte: Do autor (2017).

Figura 18 - Amostras de rizomas de *Limonium brasiliense* analisadas neste estudo.



Fonte: Do autor (2017).

#### 4.5 Avaliação da citotoxicidade em células não transformadas

Para avaliação da citotoxicidade em células não transformadas foram utilizados esplenócitos de camundongos Balb/c, células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs, do Inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) e células epiteliais de rim de macaco, Vero (ATCC® CCL-81™). Os procedimentos realizados com estas células estão descritos a seguir.

#### 4.5.1 Procedimento com Animais

Os animais utilizados (Total n=20) foram provenientes do biotério do LIKA. Todos os animais utilizados foram camundongos do tipo BALB/c, fêmeas, com 45 dias de idade.

#### 4.5.2 Obtenção de Esplenócitos

Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> estando de acordo com a Resolução n.1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os camundongos tiveram seus baços retirados e transferidos para placa de Petri contendo Meio RPMI 1640 (Gibco). O baço de cada animal foi levado à cabine de fluxo para desagregação de células. Os esplenócitos em suspensão foram recuperados, filtrados em Cell Strainer 40µm (BD Bioscience) e centrifugados a 300 G por 10 minutos, com aceleração 6, freio 4. Caso necessário, o precipitado de células foi tratado com a solução *Red Blood Cells* (RBC) lysis Buffer 1x (eBioscience) para lisar as células vermelhas presentes nas amostras. Os esplenócitos foram contados em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão com de azul de tripan.

#### 4.5.3 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo método do MTT. O método do MTT é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, por enzimas mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas. O teste de citotoxicidade dos extratos brutos, e das frações acetato de etila e aquosa, foi realizado *in vitro* em esplenócitos de camundongos Balb/c. Para tal estudo, foram realizados os experimentos em placas de 96 poços com concentração final de  $1 \times 10^6$  células/poço. Diferentes doses do extrato, frações e sub-frações foram adicionadas em triplicata. Para o extrato e frações foram utilizadas as doses de 10, 50, 100 e 200 µg/mL e para as sub-frações, as doses de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL. Após 48 horas em estufa a 5%

de CO<sub>2</sub> e a 37°C, foi adicionada a solução de MTT (0,5 mg/mL), e novamente incubado por 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionada a solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS) à 20%. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de placa a 570 nm, após 24 horas. O cálculo da viabilidade celular foi elaborado de acordo com a fórmula (1):

$$\frac{[MC - MB (\text{Extrato}) \times 100]}{MC - MB (\text{DMSO ou RPMI})} \quad (1),$$

onde MC é a média dos três poços de célula, MB é a média dos três poços do branco. DMSO 0,1% ou RPMI representam os dois veículos utilizados para a diluição dos extratos e frações, portanto considerados controles negativos.

#### 4.5.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Após aplicação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=3). Foram excluídos voluntários que faziam utilização de medicamentos imunomoduladores e que apresentaram doenças de base de cunho inflamatório. Foram excluídos também indivíduos que apresentaram algum sintoma agudo de doença, que tenha ingerido álcool nas últimas 48 horas e que possuíam histórico de tabagismo.

Após a coleta de sangue, as PBMCs contidas em tubos com heparina foram isoladas por centrifugação com Ficoll Paque TM Plus (GE Healthcare Bio-Sciences) e recuperadas para ensaio de citotoxicidade com os extratos e frações das plantas.

#### 4.5.5 Ensaio de citotoxicidade em PBMCs e Vero

O teste de citotoxicidade do extrato, frações e sub-frações foi realizado *in vitro* nas PBMCs dos voluntários saudáveis pertencentes ao grupo controle. Os testes foram realizados em triplicata. O método utilizado foi o método do MTT descrito anteriormente conforme realizado para o teste de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos (Item 5.5.3). Porém, a quantidade de PBMCs utilizadas por poço foi de  $5,5 \times 10^5$  células/poço. As células de doadores sadios foram usadas apenas quando

apresentaram viabilidade igual ou superior a 98%. As doses utilizadas do extrato e frações foram de 10, 50, 100 e 200 µg/mL e, as doses utilizadas das sub-frações foram 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL.

A avaliação da citotoxicidade das substâncias isoladas da FAE de rizomas de *L. brasiliense* e da FAE de *T. catigua* foi realizada com linhagem celular epitelial não transformada de rim de macaco (*Cercopithecus aethiops*) denominada Vero (ATCC® CCL-81™) nas mesmas concentrações das sub-frações (0,1 a 100 µg/mL) e pelo mesmo método anteriormente descrito.

## 4.6 Atividade imunomoduladora

### 5.6.1 Cultura de Células

Os esplenócitos foram cultivados em placas de 24 poços ( $2 \times 10^6$  por poço) em Meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro bovino fetal 10% (Gibco), HEPES 10mM (Gibco) e penicilina e estreptomicina 200 U/mL (Gibco). As células foram estimuladas com ConA na concentração de 100 ng/mL. Foram utilizados, ainda como controle, um poço apenas com células e outro com Metilprednisolona (MP) na concentração de 100 µM. Os poços foram tratados com extratos, frações e sub-frações de acordo com os resultados obtidos do teste de citotoxicidade sendo incubados em doses que variaram de 0,1 a 100 µg/mL em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.6.2 Determinação de Citocinas

Após as 48 horas do início do cultivo, o sobrenadante de cada poço foi recolhido e colocado em microtubos para a dosagem das citocinas com kits ELISA sanduíche, do Inglês *Immuno Sorbent Enzyme Linked Assay*, para camundongo seguindo as informações recomendadas pelos fabricantes. Foram determinados valores para IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17A e IL-22.

Os limites inferiores de detecção de kits de ELISA foram de 7,81 pg/mL para IL-6 (BD Biosciences), IL-10 (BD Biosciences), IL-17A (eBiosciences), IL-22 (eBiosciences) e IL-1β, e 4,68 pg/mL para IFN-γ (BD Biosciences).

## 4.7 Atividade antineoplásica

### 4.7.1 Manutenção das células neoplásicas

O estudo da atividade antineoplásica foi realizado com linhagens tumorais humanas adquiridas no BCRJ (Banco de células do Rio de Janeiro). As linhagens de estudo estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Linhagens neoplásicas utilizadas na avaliação antineoplásica das plantas medicinais estudadas.

| <b>Linhagem</b>  | <b>Características</b>                                            | <b>Concentração de células no poço</b> |
|------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>HEP-G2</b>    | Hepatocarcinoma bem diferenciado, não tumorigênica em camundongos | $1 \times 10^4$                        |
| <b>T47D</b>      | Adenocarcinoma mamário                                            | $2 \times 10^4$                        |
| <b>MCF-7</b>     | Adenocarcinoma mamário com metástase pleural                      | $1 \times 10^4$                        |
| <b>SK-MEL 28</b> | Melanoma maligno                                                  | $1 \times 10^4$                        |
| <b>PANC-1</b>    | Carcinoma epitelióide de pâncreas                                 | $1 \times 10^4$                        |
| <b>HL-60</b>     | Leucemia Promielocítica Humana                                    | $4 \times 10^4$                        |
| <b>K562</b>      | Leucemia Mieloide Crônica                                         | $5 \times 10^3$                        |
| <b>MOLT-4</b>    | Leucemia Linfoblástica Aguda                                      | $3 \times 10^4$                        |
| <b>TOLEDO</b>    | Linfoma Não-Hodgkin de Células B                                  | $1 \times 10^4$                        |

Fonte: Do Autor (2017).

As linhagens foram cultivadas em garrafa de cultura de células em meio RPMI 1640 ou DEMEM suplementados com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal, 10 mM de HEPES e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina em estufa de CO<sub>2</sub> 5 % a 37°C.

### 4.7.2 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais

As células foram plaqueadas na concentração indicada no quadro 1, de acordo com o *doubling time* de cada linhagem (NCI60) em placas de 96 poços contendo um volume de 100  $\mu$ L. Foram utilizadas as mesmas condições dos extratos para os controles sadios e as células tumorais, como descritos no item 5.6.3. Após 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, foi adicionado 20  $\mu$ L da solução de MTT (0,5 mg/mL), e incubado por 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionado a solução de SDS à 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm, após 24 horas.

#### 4.7.3 Determinação de IC50 e índice de seletividade

Com os resultados obtidos da citotoxicidade pelo método do MTT, foi calculado o IC50 (OringPro8 Software) que representa a concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular e o Índice de seletividade (IS) que indica se o extrato estudado é seletivo para a linhagem neoplásica ou para a linhagem normal (BÈZIVIN et al, 2003). Assim, o IS corresponde a divisão entre o valor da IC50 de cada extrato, fração, sub-fração e substâncias isoladas na linhagem de células normais (PBMC) e o valor da IC50 de cada extrato nas linhagens de células neoplásicas. ( $IS = IC_{50} \text{ PBMC} / IC_{50} \text{ células neoplásicas}$ ).

Foram considerados seletivos os extratos e frações com  $IS \geq 3$ , ou seja, este valor significa que o composto é três vezes mais seletivo para a linhagem de células neoplásicas do que para as células normais (BÈZIVIN et al, 2003).

#### 4.7.4 Avaliação do tipo de morte celular

As sub-frações (F, G, H e K) e substância isolada (Sam A) que conseguiram matar as células tumorais em baixas concentrações (IC50 até 40  $\mu$ g/mL) foram utilizadas nesta etapa do estudo. Para tanto, cada linhagem tumoral foi plaqueada em placas de 6 poços em quantidades de acordo com o *doubling time* de cada célula. Após o plaqueamento as células foram mantidas por 24h em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C antes da introdução das sub-frações e substância isolada. Após este período, as células receberam tratamento com os os materiais de estudo nas concentrações de 10 e 50  $\mu$ g/mL e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 48 h.

A porcentagem de células neoplásicas que entraram em apoptose e necrose após exposição às sub-frações e à substância isolada foi identificada por citometria de fluxo, após marcação com Iodeto de propídio (PI – *Propidium iodide*) (eBioscience) e, adicionalmente com Annexin V-eFluor 450 (eBioscience). Os resultados foram analisados pelo do software FlowJo V10.

#### 4.7.5 Ensaio de migração celular

Para cada experimento as células foram plaqueadas em placas de 24 poços numa densidade de  $1 \times 10^5$  por poço, e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Após esse período foi realizado um risco com o auxílio de uma ponteira (1000 µL), para retirar as células dando origem a um espaço em branco (ferida) ao centro de cada poço. As sub-frações C, D e F testadas em diferentes concentrações baseadas em seus IC<sub>50</sub> (76,81, 45,54 e 58,65 µg/mL, respectivamente), entraram em contato com esta cultura e a capacidade de inibição da migração (cicatrização da ferida) foi avaliada com o auxílio de um microscópio acoplado a um sistema de captura de imagens. Foram feitas fotografias dos poços nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas com subsequente análise dos resultados em relação ao controle não tratado (DMSO), realizada com auxílio do programa ImageJ. DMSO na concentração de 0,1% foi utilizado como controle negativo.

#### 4.7.6 Ensaio Clonogênico

Foram plaqueadas  $3 \times 10^4$  células, em duplicata, em placa de 6 poços e após o tratamento com as sub-frações C, D e F por 24 e 48h, as células foram desagregadas, contadas, e, 300 células foram plaqueadas em placas de 6 poços sendo mantidas em cultura até o surgimento de clones. Aproximadamente 13 a 15 dias após o surgimento dos clones, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com formaldeído 7%, lavadas novamente com PBS 1x, coradas com cristal violeta 0,1%. Por fim foram novamente lavadas com PBS 1x e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem manual dos clones por dois observadores e a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da média da contagem

entre os dois observadores.

## 4.8 Atividade antibacteriana

### 4.8.1 Isolados bacterianos

Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (LMB) e *Staphylococcus epidermidis* foram obtidos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e conservados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco (CAV-UFPE). Essas cepas foram previamente identificadas como MRSA e *Staphylococcus epidermidis* de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2014). Cepas de referência foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), como por exemplo MRSA ATCC 33591, *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 29922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC)

A atividade antibacteriana de extratos, frações e sub-frações foi avaliada pelo método de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines* (CLSI, 2014). Inicialmente, foi adicionado Mueller-Hinton (MHC) em placas de microdiluição de 96 poços, cada extrato, fração e sub-fração foi dissolvido em 0,5% de DMSO e diluído para obter uma faixa de concentração de 0,5 a 250 µg/mL. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram ajustadas quanto a turbidez no 0,5 da escala de McFarland e diluídas para atingir uma concentração final de  $10^5$  CFU/mL em cada poço. As placas foram então incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. A atividade antibacteriana foi detectada pela adição de 20 µL de solução aquosa de 0,5% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC, Vetec). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração dos extratos que inibiu visualmente o crescimento bacteriano como indicado pelo marcador TTC (células mortas não foram marcadas pelo TTC) (TODARO et al., 2013). A Concentração Bactericida Mínima

(CBM) foi determinada pelo subcultivo das amostras de cada poço com concentrações abaixo da CIM em novas placas de ágar Müller-Hinton (MHA). A CBM foi considerada a menor concentração dos extratos associada à ausência de crescimento bacteriano. DMSO (0,5%) foi usado na mesma concentração do experimento para avaliar possíveis efeitos deste solvente no crescimento bacteriano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.9 Análise estatística**

A análise estatística para a atividade imunomoduladora foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6. A análise de distribuição normal das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Após a verificação de uma distribuição não normal das variáveis foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon na análise da dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura e os gráficos foram representados pelo valor da mediana com seus valores máximo e mínimo. A IC50 referente à toxicidade frente às linhagens neoplásicas foi calculada pelo software OriginPro versão 8.0. Os resultados foram considerados significantes quando o  $p < 0,05$ .

### **5 RESULTADOS**

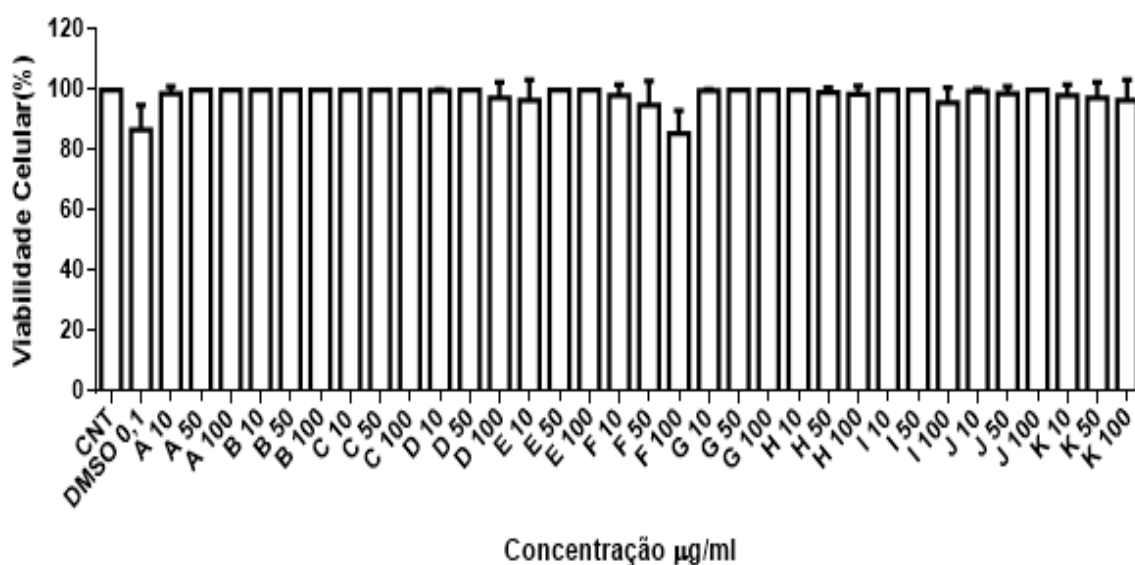
#### **5.1 Citotoxicidade em células não transformadas**

##### **5.1.1 Citotoxicidade em esplenócitos de BALB/c**

Após avaliação do método de MTT foi possível identificar que tanto o EB quanto a FAq e a FAE das três plantas estudadas apresentaram toxicidade aos esplenócitos na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  onde foi identificada viabilidade celular igual a 0%, contudo, não foi observada citotoxicidade nas concentrações abaixo de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Portanto, para avaliação da atividade imunomoduladora, foram utilizadas na cultura de esplenócitos apenas as concentrações de 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A citotoxicidade das sub-frações obtidas da FAE de rizomas de *L. brasiliense* foi avaliada nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL e todas as sub-frações não apresentaram toxicidade (Figura 19).

Figura 19 - Citotoxicidade das sub-frações provenientes da FAE de rizomas de *L. brasiliense*.



Fonte: Do Autor (2017). Citotoxicidade em esplenócitos de camundongos BALB/c comparada com o veículo DMSO na concentração de 0,1%. CNT = controle não tratado.

### 5.1.2 Citotoxicidade em PBMCs e Vero

Através do método do MTT foi possível analisar o perfil citotóxico dos materiais das plantas em questão. Após análise dos dados, foi observado que o EB, a FAq e a FAE dos rizomas de *L. brasiliense* apresentaram IC<sub>50</sub> igual a 96,78±3,75, maior que 200 e 75,82±10,81 µg/mL em PBMCs, respectivamente. Já as sub-frações, apresentaram IC<sub>50</sub> maior que 100 µg/mL em PBMCs e, a EGCG, SamA e SamB apresentaram IC<sub>50</sub> maior que 100 µg/mL em células Vero.

Os EB, FAq e FAE de sementes de *P. cupana* e cascas de *T. catigua* não apresentaram citotoxicidade tendo, portanto, IC<sub>50</sub> maior que 200 µg/mL em PBMCs. Da mesma maneira, em células Vero a cinchonina Ib isolada da FAE de *T. catigua* não apresentou citotoxicidade na maior dose testada (100 µg/mL para as sub-frações

e substâncias isoladas) onde foi verificado 100% de viabilidade celular para todos os materiais das plantas analisados nestas linhagens.

## 5.2 Atividade imunomoduladora

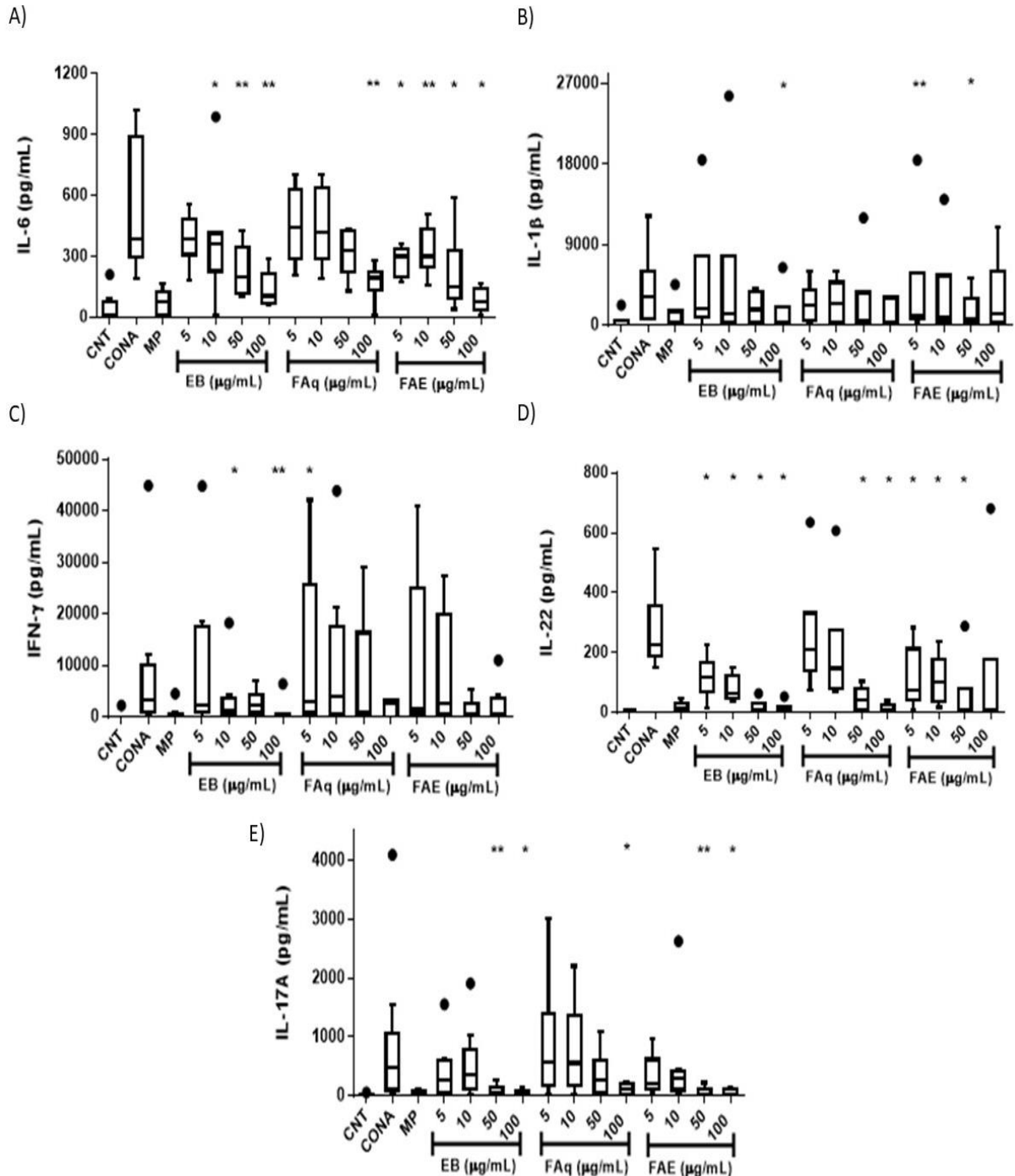
### 5.2.1 *Limonium brasiliense*

O extrato bruto, a fração aquosa e a fração acetato de etila de rizomas de *L. brasiliense* apresentou atividade imunomoduladora através da inibição ou redução dos níveis de citocinas inflamatórias conforme exposto na figura 20. Na citocina IL-6, o extrato bruto e as frações testadas reduziram significativamente os seus níveis apresentando um padrão dose resposta (Figura 20 A). A fração acetato de etila se mostrou mais eficiente, reduzindo os níveis desta citocina já na dose de 5 µg/mL ( $p=0,02$ ). As demais doses da FAE também apresentaram valores significativos, onde em 10 µg/mL  $p=0,007$ , 50 µg/mL  $p=0,01$  e 100 µg/mL  $p=0,03$ . O extrato bruto também conseguiu reduzir significativamente os níveis desta citocina nas doses de 10, 50 e 100 µg/mL ( $p=0,03$ ;  $p=0,007$ ;  $p=0,007$ , respectivamente). A fração aquosa inibiu os níveis de IL-6 na dose de 100 µg/mL, onde  $p=0,007$ .

O extrato bruto na dose de 100 µg/mL ( $p=0,03$ ) e a fração acetato de etila nas doses de 5 e 50 µg/mL ( $p=0,03$  para ambas as doses) inibiram significativamente os níveis de IL-1 $\beta$  (Figura 20 B). Em relação a citocina IFN- $\gamma$ , apenas a FAq e o EB conseguiram reduzir significativamente seus níveis nas doses de 10 e 100 do µg/mL EB ( $p=0,01$  e  $p=0,007$  respectivamente) e na dose de 5 µg/mL da FAq ( $p=0,01$ ), porém a FAE apresentou padrão de inibição dose-resposta (Figura 20 C).

O EB, FAq e FAE reduziram significativamente os níveis de IL-22, onde todos apresentaram padrão dose-resposta, podendo-se destacar o EB, o qual obteve valores significativos nas quatro doses testadas ( $p=0,03$  para todas as doses) e a FAE que apresentou redução nas três menores doses ( $p=0,03$  para 5, 10 e 50 µg/mL) (Figura 20 D). Além disso, nas doses de 50 e 100 µg/mL, o EB e a FAE apresentaram valores significativos de redução da IL-17A (50 µg/mL: EB –  $p=0,007$ ; FAE –  $p=0,007$  / 100 µg/mL: EB –  $p=0,01$  FAE –  $p=0,04$ ) (Figura 20 E).

Figura 20 - Avaliação da influência da secreção de citocinas pelos extratos e frações de rizomas de *L. brasiliense* no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c após 48 h de tratamento com o EB, FAq e FAE.

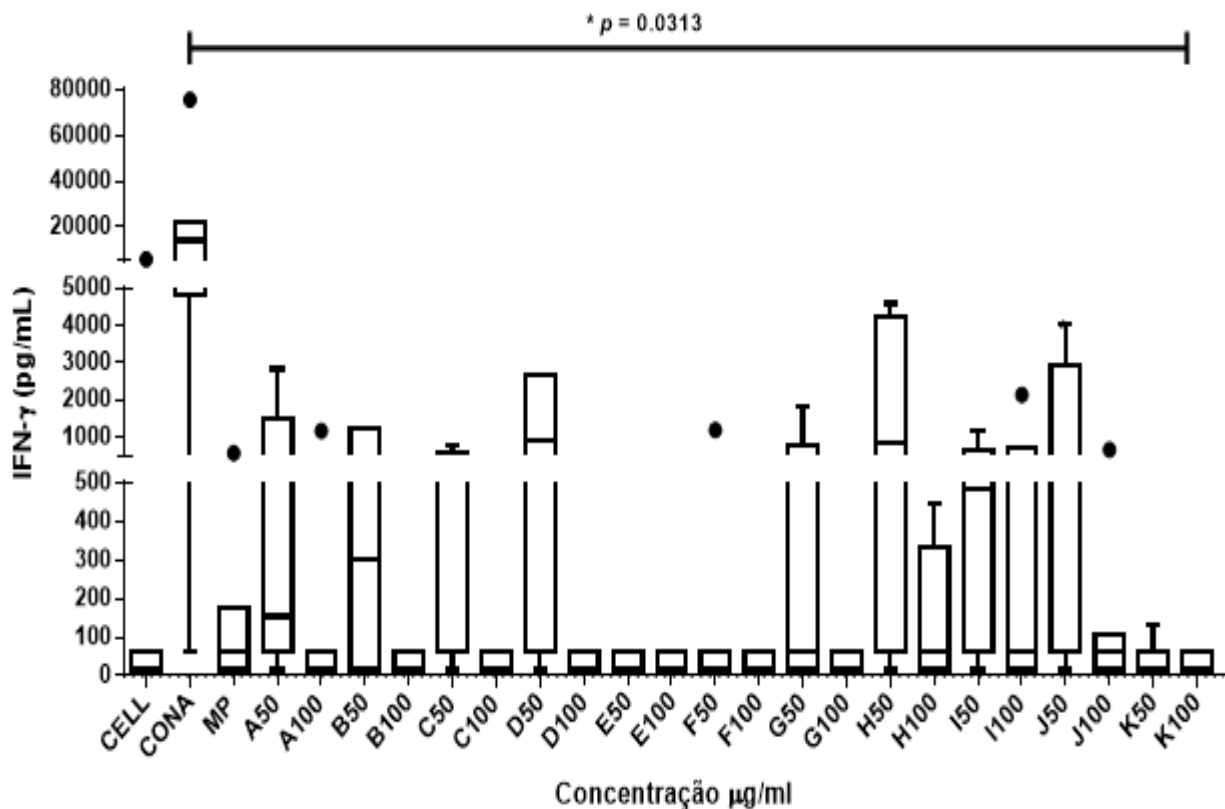


Fonte: Do autor (2017). Doses utilizadas: 5, 10, 50 e 100 μg/mL, comparados com a condição controle estimulada (ConA). A condição controle não estimulada e não tratada aparece como CNT e o fármaco imunomodulador padrão como MP (metilprednisolona). Valores significativos em relação à ConA aparecem com um (\*) ( $p < 0,05$ ) ou dois (\*\*) ( $p < 0,007$ ) asteriscos de acordo com o grau de significância.

A) IL-6; B) IL-1 $\beta$ ; C) IFN- $\gamma$ ; D) IL-22; E) IL-17A. Os pontos fora da mediana (*Outliers*) estão apresentados nos gráficos pelo símbolo •.

As onze sub-frações obtidas da FAE dos rizomas de *L. brasiliense* também foram identificadas como sub-frações com atividade imunomoduladora visto que todas elas reduziram significativamente os níveis de IFN- $\gamma$  em 500 e 100  $\mu$ g/mL ( $p=0,03$  para todas as sub-frações) (Figura 21). Pode-se destacar as sub-frações E, F e K, as quais apresentaram grandes reduções já na dose de 50  $\mu$ g/mL.

Figura 21 - Influência da secreção de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c pelas sub-frações de *L. brasiliense*.

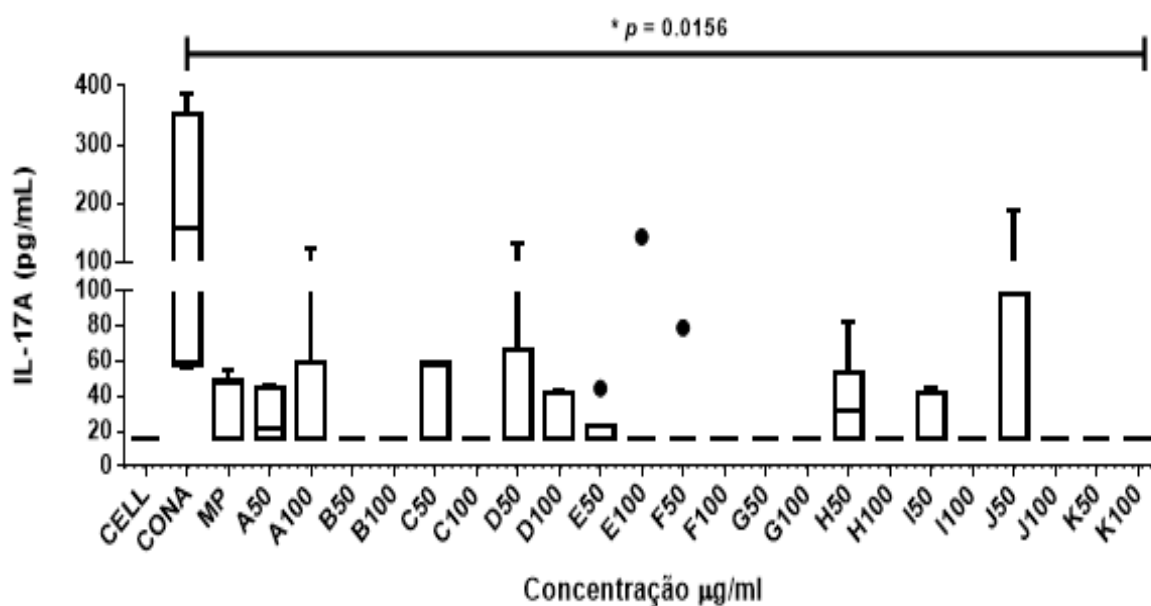


Fonte: Do autor (2017). Gráfico relativo a 48 h de tratamento com o sub-frações obtidas da FAE de rizomas de *L. brasiliense* nas doses de 50 e 100  $\mu$ g/mL, comparados com a condição controle estimulada (ConA). A condição controle não estimulada e não tratada aparece como CNT e o fármaco imunomodulador padrão como MP (metilprednisolona). Valores significativos em relação à ConA aparecem com um (\*) asterisco indicando que  $p<0,05$ . Os *Outliers* estão apresentados nos gráficos pelo símbolo •.

A figura 22 apresenta os valores em pg/mL de IL-17A após o tratamento com as sub-frações. Através da observação pode-se identificar que as sub-frações “B”, “E”, “F”, “G” e “K” reduziram significativamente os níveis desta citocina na menor

concentração (50 µg/mL) e as demais sub-frações obtiveram uma maior inibição de IL-17A na dose de 100 µg/mL ( $p=0,015$ ).

Figura 22 - Quantificação dos níveis de IL-17A no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c após tratamento com as sub-frações de *L. brasiliense*.



Fonte: Do autor (2017). Valores relativos a 48 h de tratamento com as sub-frações obtidas da FAE de rizomas de *L. brasiliense* nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. O valor de significância foi obtido por comparação com a condição controle estimulada (ConA). A condição controle não estimulada e não tratada aparece como CNT e o fármaco imunomodulador padrão como MP (metilprednisolona). Valores significativos em relação à ConA aparecem com um asterisco (\*). Os pontos fora da mediana (*Outliers*) estão apresentados nos gráficos pelo símbolo •.

### 5.2.2 *Paullinia cupana*

O EB e as FAq e FAE de sementes de *P. cupana* não apresentaram citotoxicidade em células não transformadas. Desta forma, as concentrações destes em 5, 10, 50 e 100 µg/mL foram utilizadas para avaliar o potencial imunomodulador deste extrato e frações (CARVALHO, et al., 2016).

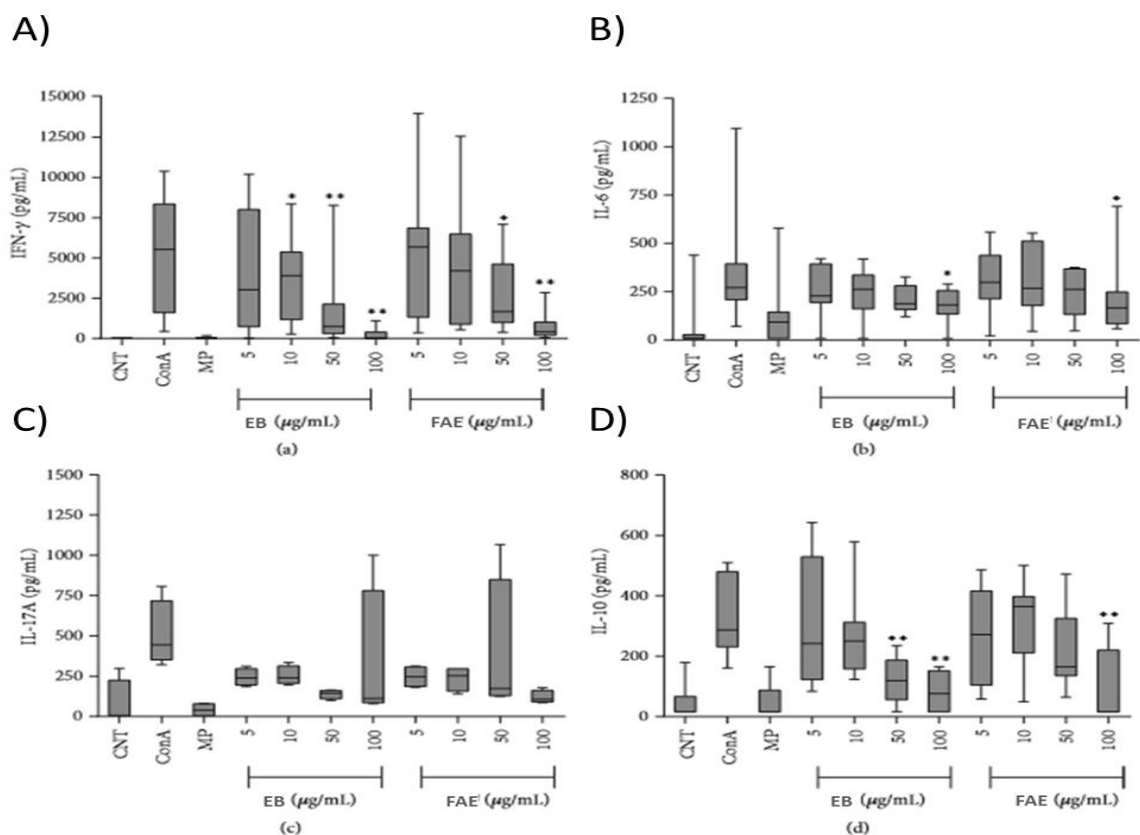
Conforme mostra a figura 23 A, os níveis de IFN-γ foram reduzidos após o tratamento com o EB nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL ( $p=0,01$  nas doses de 10 e 50 µg/mL e  $p=0,007$  – 100 µg/mL). Já a FAE apresentou valores significativos a partir da dose de 50 µg/mL ( $p=0,01$ ), aumentando o grau de significância na dose

de 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,007$ ). O EB e a FAE apresentaram um padrão de inibição do tipo dose-resposta para esta citocina (CARVALHO, et al., 2016).

A IL-6 teve seus níveis reduzidos após o tratamento com o EB e a FAE, também apresentando perfil dose-resposta, porém apenas com significância na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  para ambos extratos ( $p=0,03$  – EB;  $p=0,01$  FAE) (Figura 23 B) (CARVALHO, et al., 2016).

Já para a IL-17A o EB e a FAE reduziram seus níveis, contudo de forma não significativa (Figura 23 C). Em contrapartida, ambos EB e FAE reduziram significativamente os níveis de IL-10. O EB apresentou valores significativos nas doses de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,007$ ;  $p=0,003$ , respectivamente) e a FAE apenas na dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,007$ ) (Figura 23 D) (CARVALHO, et al., 2016).

Figura 23 - Níveis de citocinas inflamatórias no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c tratados com o EB e a FAE de sementes de *P. cupana*.



Fonte: CARVALHO et al (2016). Concentrações de 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os níveis de citocinas após 48 h tratamento foram comparados com o controle não tratado e estimulado. Os asteriscos estão representados por grau de significância. CNT = Controle não tratado e não estimulado. ConA = Controle não tratado e estimulado. MP = Metilprednisolona. A) Níveis de IFN- $\gamma$ ; B) Dosagem de IL-6; D) IL-17A;

E) Níveis de IL-10. Todos os valores quantificados estão expressos em pg/mL (CARVALHO, et al., 2016).

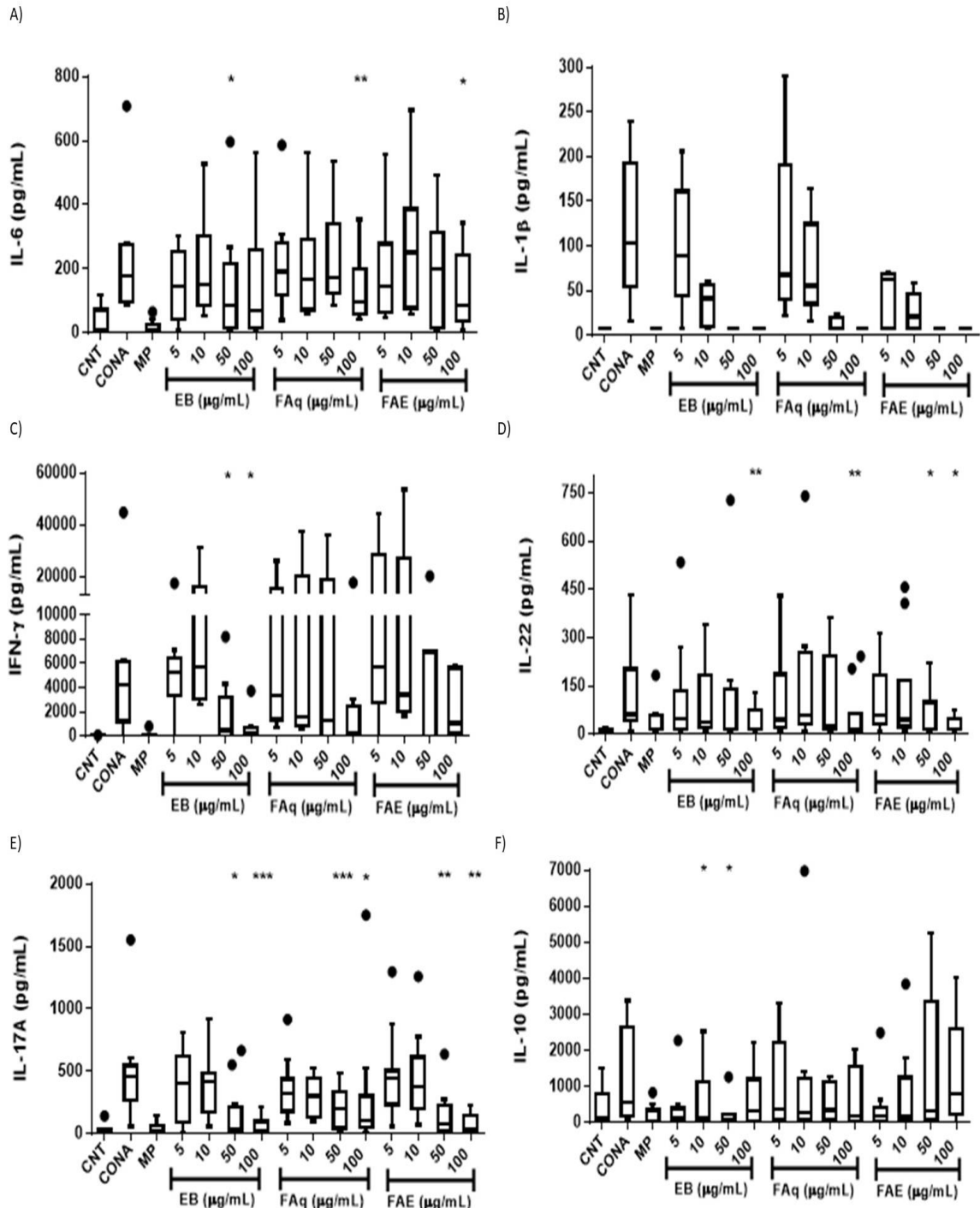
### 5.2.3 *Trichilia catigua*:

O EB e as FAq e FAE das cascas de *T. catigua* mostrou resultados significativos quanto a atividade imunomoduladora conforme pode-se observar para citocina IL-6 que teve seus níveis reduzidos após o tratamento com os três extratos. O EB reduziu significativamente os níveis de IL-6 na concentração de 50 µg/mL ( $p=0,01$ ) assim como a FAE ( $p=0,01$ ). Já a FAq mostrou maior significância na dose de 100 µg/mL onde  $p=0,007$  (Figura 24 A).

O EB e as duas frações reduziram os níveis de IL-1 $\beta$  de modo dose-dependente, porém não apresentaram valores significativos (Figura 24 B). Contudo, o EB reduziu significativamente os níveis de IFN- $\gamma$  nas doses de 50 e 100 µg/mL ( $p=0,03$  e  $p=0,01$ , respectivamente) (Figura 24 C). Em relação à citocina IL-22, o EB e as duas frações diminuíram significativamente os níveis desta na dose de 100 µg/mL ( $p=0,003$  – EB;  $p=0,003$  - FAq;  $p=0,03$  – FAE), porém, a FAE diminuiu também os níveis de IL-22 na dose de 50 µg/mL ( $p=0,02$ ) (Figura 24 D).

O EB e as frações aquosas e acetato de etila mostraram melhor atividade na redução dos níveis de IL-17A (Figura 24 E), onde todos eles tiveram valores significativos nas doses de 50 e 100 µg/mL. O EB nestas concentrações apresentou valores de “p” equivalentes a 0,03 na dose de 50 µg/mL e 0,001 na concentração de 100 µg/mL. O valor mais significativo foi obtido com a FAq na concentração de 50 µg/mL ( $p=0,0005$ ) e, na dose de 100 µg/mL,  $p=0,01$ . A FAE reduziu IL-17A com  $p=0,004$  na concentração de 50 µg/mL e  $p=0,003$  em 100 µg/mL. Contudo, a IL-10 apenas teve seus níveis reduzidos após o tratamento com o EB em 10 e 50 µg/mL ( $p=0,02$  e  $p=0,03$ , respectivamente) (Figura 24 F).

Figura 24 - Quantificação de citocinas inflamatórias no sobrenadante de esplenócitos de camundongos BALB/c tratados por 48h com o EB, FAq e FAE de cascas de *T. catigua*.



Fonte: Do autor (2017). Os valores encontrados foram comparados com o controle não tratado e estimulado – Concanavalina A (ConA). CNT = Controle não tratado e estimulado. MP = metilprednisolona (fármaco padrão). A) IL-6; B) IL-1b; C) IFN-g; D) IL-22; E) IL-17A; F) IL-10. Os valores quantificados de cada citocina está expresso em pg/mL. Valores significativos em relação à ConA aparecem com um (\*), dois (\*\*) ou (\*\*\*) asteriscos de acordo com o grau de significância. Os pontos fora da mediana (*Outliers*) estão apresentados nos gráficos pelo símbolo •.

### 5.3 Atividade antineoplásica

#### 5.3.1 *Limonium brasiliense*:

A atividade antineoplásica do EB, da FAq e da FAE está descrita na tabela 1. A linhagem HL-60, de leucemia promielocítica, foi a que melhor respondeu ao tratamento com a FAq e a FAE. Os valores calculados do índice de seletividade apontaram maior preferência destas duas frações para a célula tumoral, uma vez que os valores para FAq e FAE corresponderam a uma seletividade quatro vezes maior das frações para a célula neoplásica do que para as células normais (4,02 e 4,39, respectivamente).

Tabela 1 - Toxicidade do EB, FAq e FAE de rizomas de *L. brasiliense* frente a células normais (PBMCs), HEP-G2 (carcinoma hepatocelular), T47-D (câncer de mama) e HL-60 (leucemia promielocítica).

|            | PBMC        | HEP-G2                    | T47-D                      | HL-60                      |
|------------|-------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>EB</b>  | 96,78±3,75  | >200<br>(IS = 0,48)       | 90,68±10,64<br>(IS = 1,08) | 61,69±8,5<br>(IS = 1,56)   |
| <b>FAq</b> | >200        | 67,97±8,66<br>(IS = 2,94) | >200<br>(IS = 1,00)        | 49,68±15,74<br>(IS = 4,02) |
| <b>FAE</b> | 75,82±10,81 | 59,47±5,55<br>(IS = 1,27) | 77,7±11,03<br>(IS = 0,48)  | 17,26±0,28<br>(IS = 4,39)  |

Fonte: Do autor (2017). Os Valores de IC50 estão expressos em µg/mL. Índice de seletividade (IS) calculado através da razão entre os IC50 das células normais os IC50 nas células neoplásicas.

A atividade antineoplásica das sub-frações obtidas da FAE de *L. brasiliense* está descrita na tabela 2. Após observação da tabela, pode-se chamar atenção para as sub-frações “F”, “G”, “H” e “K” nas linhagens HL-60 e MOLT-4. Em HL-60 as sub-frações “F” e “G” apresentaram valores muito baixos de IC50 indicando melhor

atividade antineoplásica em baixas doses ( $IC_{50}=8,21\pm0,83$  ( $IS=12,18$ ) e  $7,35\pm0,36$   $\mu\text{g/mL}$  ( $IS=13,60$ ), respectivamente).

Já na linhagem MOLT-4, após o tratamento com as sub-frações “G”, “H” e “K” foram identificados baixos valores de  $IC_{50}$  que corresponderam a  $7,92\pm0,86$  ( $IS=12,62$ ),  $20,36\pm7,84$  ( $IS=4,91$ ) e  $9,62\pm4,61$   $\mu\text{g/mL}$  ( $IS=10,39$ ), respectivamente. A avaliação da atividade antineoplásica na linhagem K562 também apresentou baixos valores de  $IC_{50}$  com as sub-frações “F”, “G” e “K”, porém mais altos que os valores encontrados para HL-60 e MOLT-4 ( $36,13\pm6,13$ ,  $40,88\pm3,86$  e  $37,77\pm5,45$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). As sub-frações não foram citotóxicas para a linhagem SKMEL.

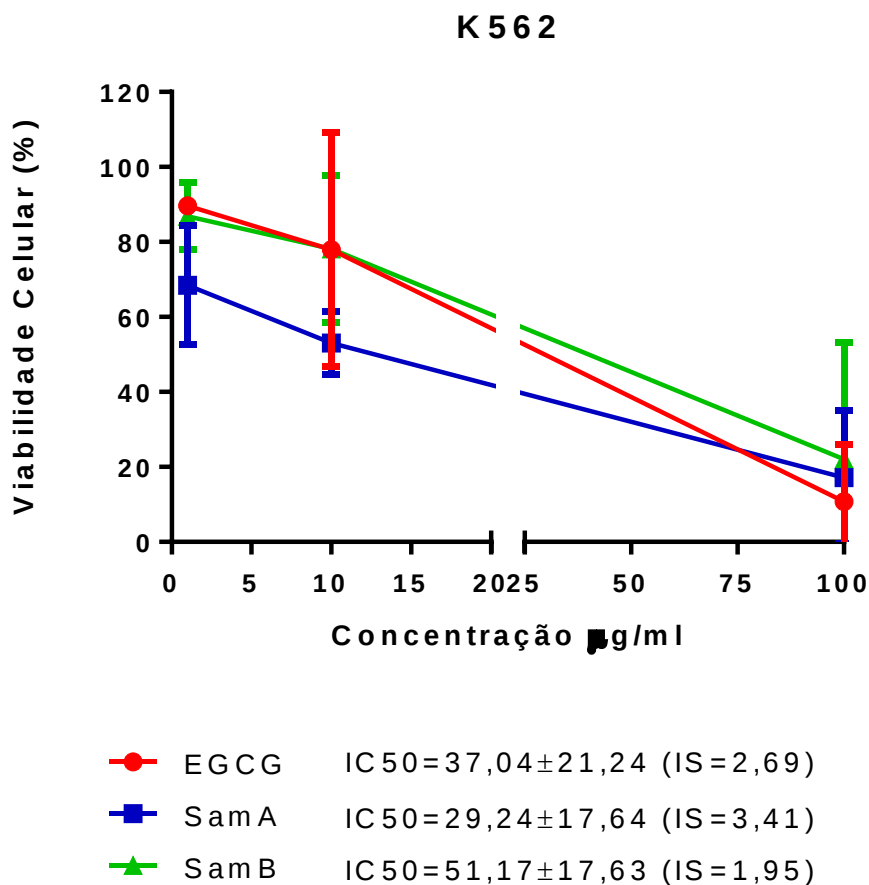
Tabela 2 - Valores de IC50 relativos a citotoxicidade das 11 sub-frações de *L. brasiliense* frente às linhagens neoplásicas.

|             | TOLEDO     | HL-60            | MOLT-4            | K562              | PANC-1     |
|-------------|------------|------------------|-------------------|-------------------|------------|
| <b>A</b>    | 57,46±8,81 | 53,27±2,14       | 37,43±0,50        | 43,72±1,94        | >100       |
| <b>B</b>    | 57,02±1,5  | 35,48±9,83       | 34,34±1,81        | 52,21±4,9         | >100       |
| <b>C</b>    | 61,29±1,22 | 44,28±7,19       | 35,99±6,9         | 52,75±3,32        | 76,81±6,25 |
| <b>D</b>    | 54,09±5,63 | 41,63±5,96       | 46,47±2,31        | 43,95±2,98        | 45,54±8,01 |
| <b>E</b>    | 55,29±2,78 | 43,62±6,71       | 45,25±3,53        | 47,79±4,38        | >100       |
| <b>F</b>    | 55,29±2,78 | <b>8,21±0,83</b> | 40,42±4,22        | <b>36,13±6,13</b> | 58,65±3,35 |
| <b>G</b>    | 54,32±2,34 | <b>7,35±0,36</b> | <b>7,92±0,86</b>  | <b>40,88±3,86</b> | >100       |
| <b>H</b>    | 57,36±2,04 | 45,58±4,93       | <b>20,36±7,84</b> | 49,91±11,15       | >100       |
| <b>I</b>    | 60,65±1,25 | 55,6±3,69        | 54,92±0,35        | 51,85±1,53        | >100       |
| <b>J</b>    | 58,68±4,12 | 54,06±4,93       | 52,76±3,4         | 50,16±2,54        | >100       |
| <b>K</b>    | 59,38±2,09 | 53,32±2,14       | <b>9,62±4,61</b>  | 37,77±5,45        | >100       |
| <b>AMSA</b> | 0,5±0,6    | 1,0±0,6          | NT                | 0,9±0,6           | >100       |

Fonte: Do autor (2017). Valores descritos em µg/mL ± desvio padrão. AMSA= Amsacrina, fármaco padrão. NT = Não testado.

Como as sub-frações apresentaram resultados satisfatórios quanto a atividade antineoplásica nas linhagens avaliadas, foi então estudada a atividade antineoplásica dos três componentes majoritários da FAE, descritos por CALEARE et al. (2017). A atividade antineoplásica da EGCG da SamA e SamB frente a K562 está apresentada na figura 25. Estes taninos condensados isolados da FAE de *L. brasiliense* apresentaram valores de IC50 que correspondem a 46,21±3,9, 29,24±17,64 e 51,17±17,63 µg/mL, respectivamente.

Figura 25 - Porcentagem de viabilidade celular de K562 após tratamento com EGCG, SamA e SamB.

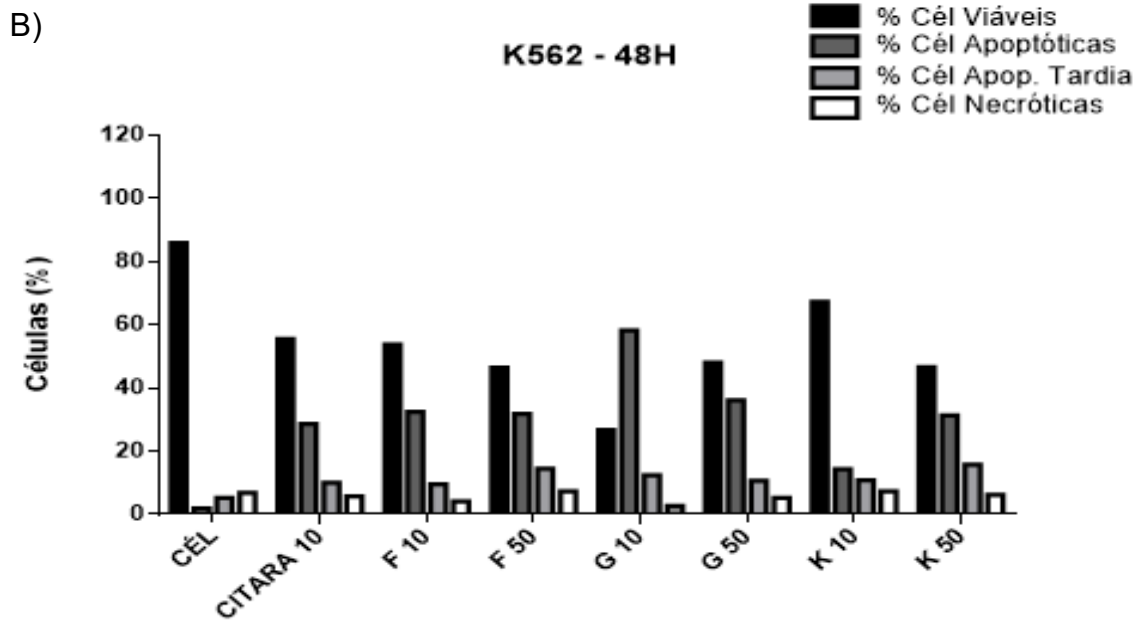
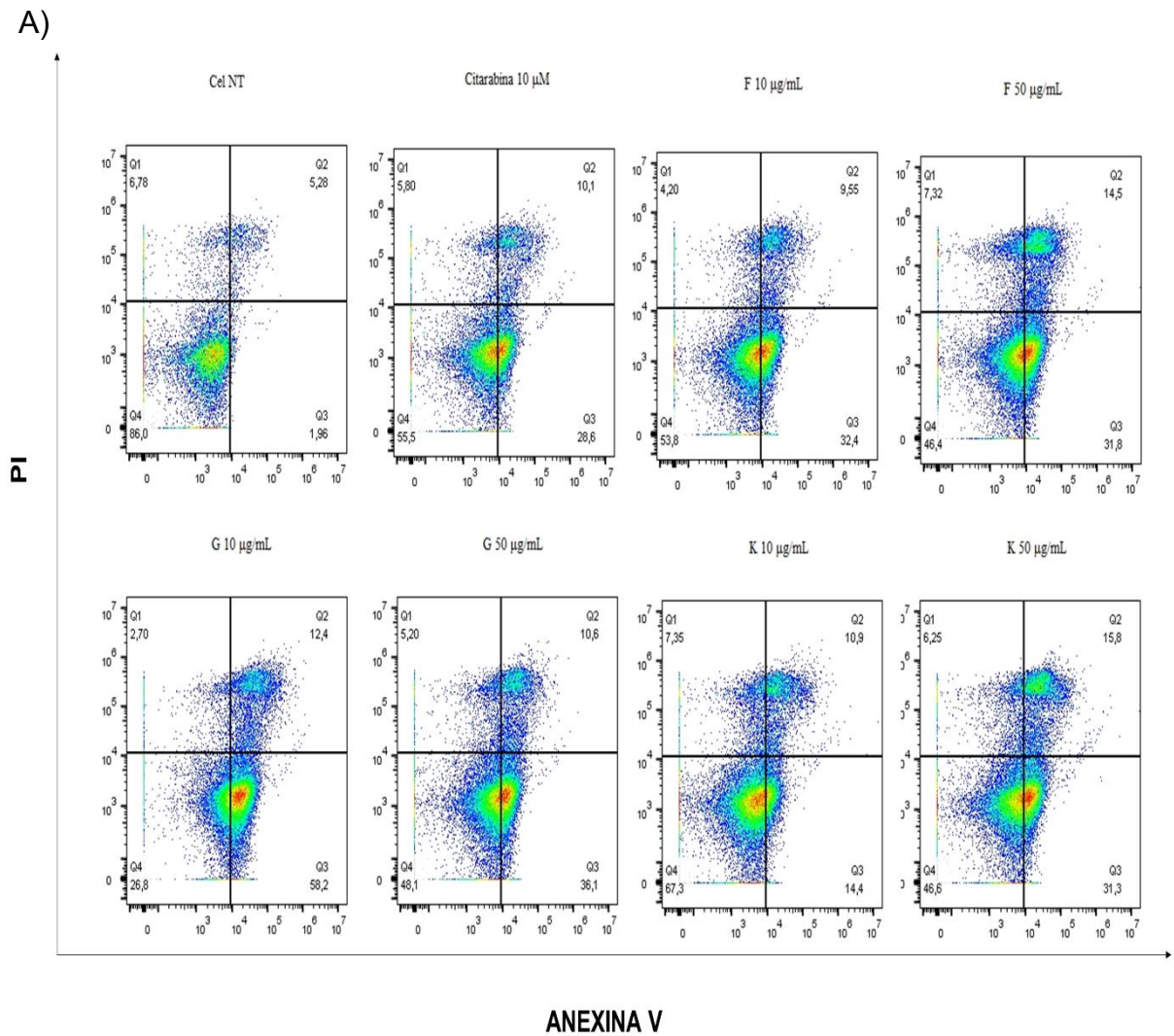


Fonte: Do autor (2017). As três substâncias foram testadas nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Os respectivos valores de IC<sub>50</sub> estão expressos em µg/mL. IS = Índice de Seletividade.

#### 5.3.1.1 Avaliação do tipo de morte celular provocada pelas sub-frações e Samarangenina A

Após obtenção destes resultados, foram avaliados o tipo de morte celular provocada pelas sub-frações que apresentaram melhores valores de IC<sub>50</sub>, a saber: F, G e K na linhagem K562 e as sub-frações G, H e K na linhagem MOLT-4. Além destas, também foi avaliado o tipo de morte celular provocado pela SamA na linhagem K562. A figura 26 apresenta os gráficos relativos ao percentual de células marcadas com PI e Anexina V na condição controle (Cel NT), fármaco padrão (Citarabina) e as sub-frações estudadas.

Figura 26 - Avaliação do tipo de morte celular em K562 após tratamento com as sub-frações F, G e K de *L. brasiliense* por citometria de fluxo.



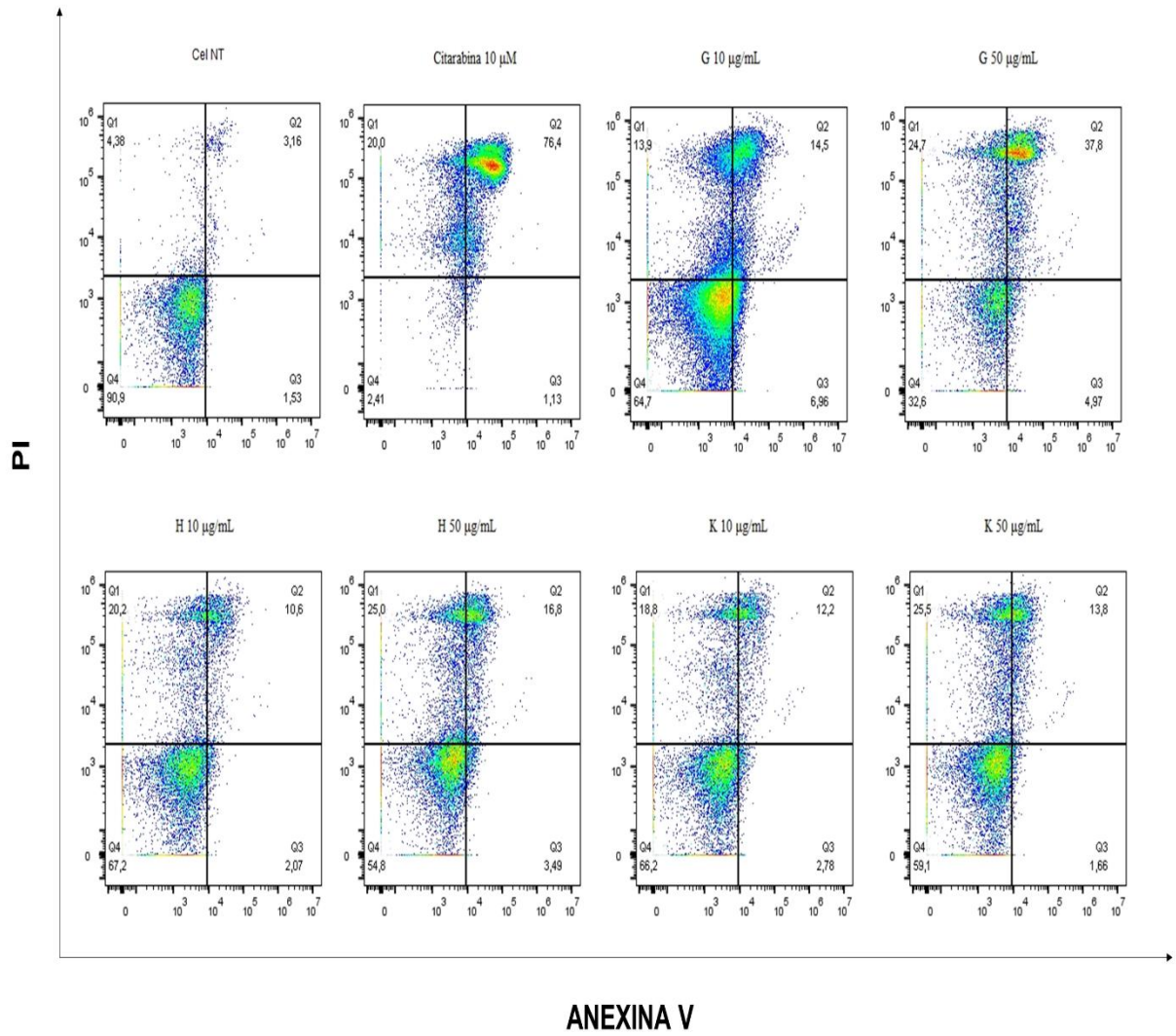
Fonte: Do autor (2017). As três sub-frações foram testadas nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . A) Gráficos *dot plot* da marcação PI versus Anexina V. B) Gráfico relativo aos valores representativos dos gráficos *dot plot* (A)

Os resultados apresentados demonstram uma melhor indução de morte por apoptose com a sub-fração G na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  quando comparada ao controle não-tratado e à citarabina após 48h de tratamento.

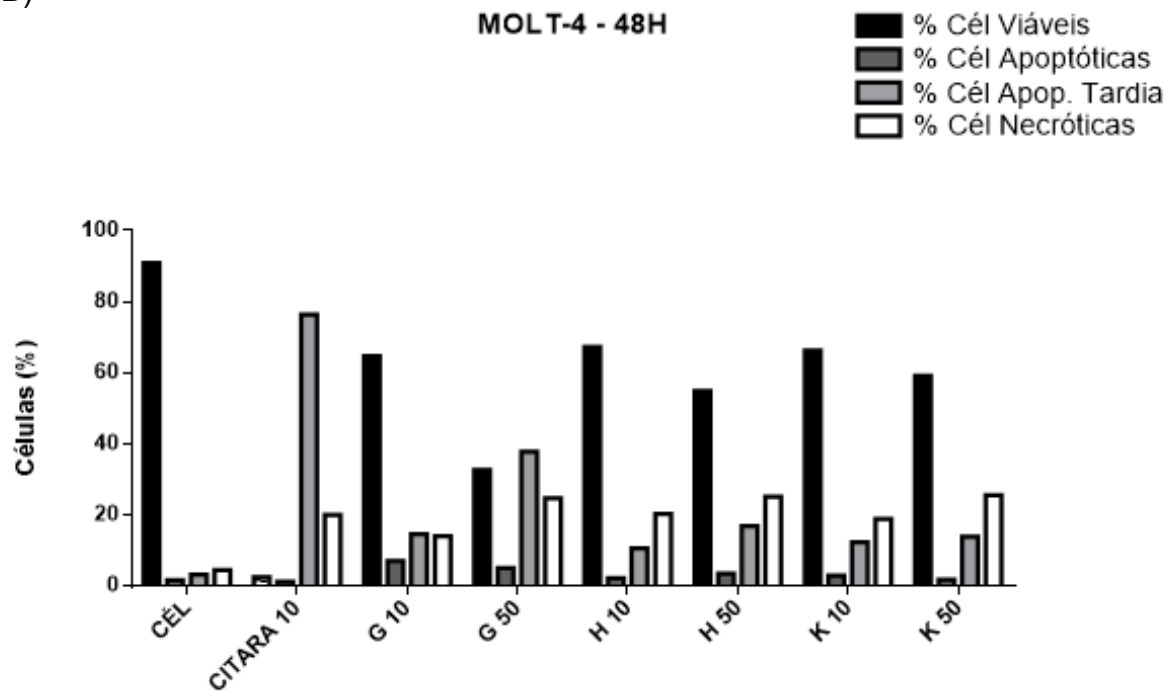
Na linhagem MOLT-4 as sub-frações mostraram citotoxicidade celular causando apoptose tardia e necrose. A sub-fração G na dose de 50  $\mu\text{g/mL}$  apresentou maior percentual de células mortas por apoptose tardia (37,8%) e necrose (24,7%) (Figura 27) comparado com a condição não tratada, porém a porcentagem de células em apoptose tardia foi menor que a porcentagem encontrada para a citarabina (fármaco padrão).

Figura 27 - Avaliação de morte celular por apoptose e necrose das sub-frações G, H e K de *L. brasiliense* na linhagem MOLT-4.

A)



B)

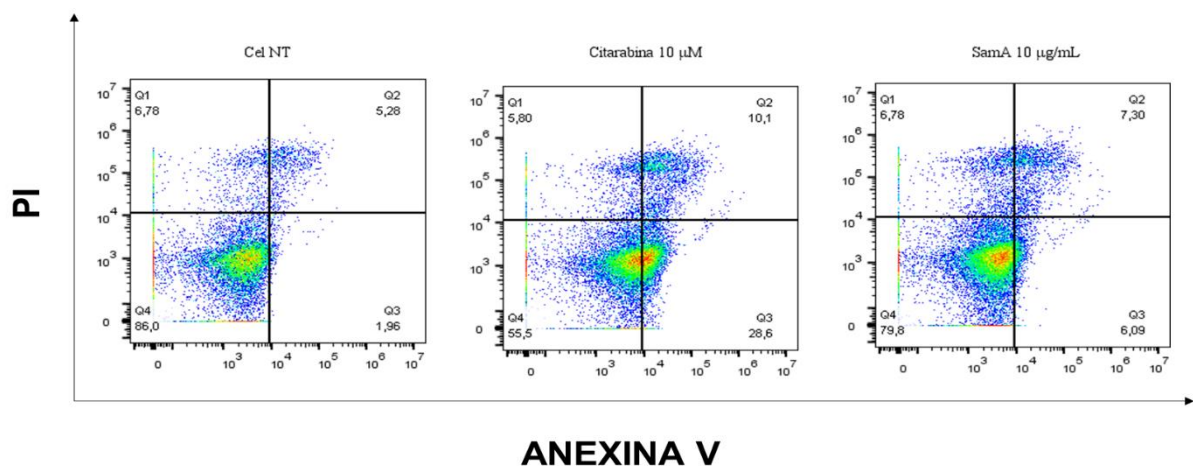


Fonte: Do autor (2017). As sub-frações G, H e K foram avaliadas nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . A) Gráficos *dot plot* da marcação PI versus Anexina V. B) Gráfico relativo aos valores representativos dos gráficos *dot plot* (A). Cél = Controle não tratado.

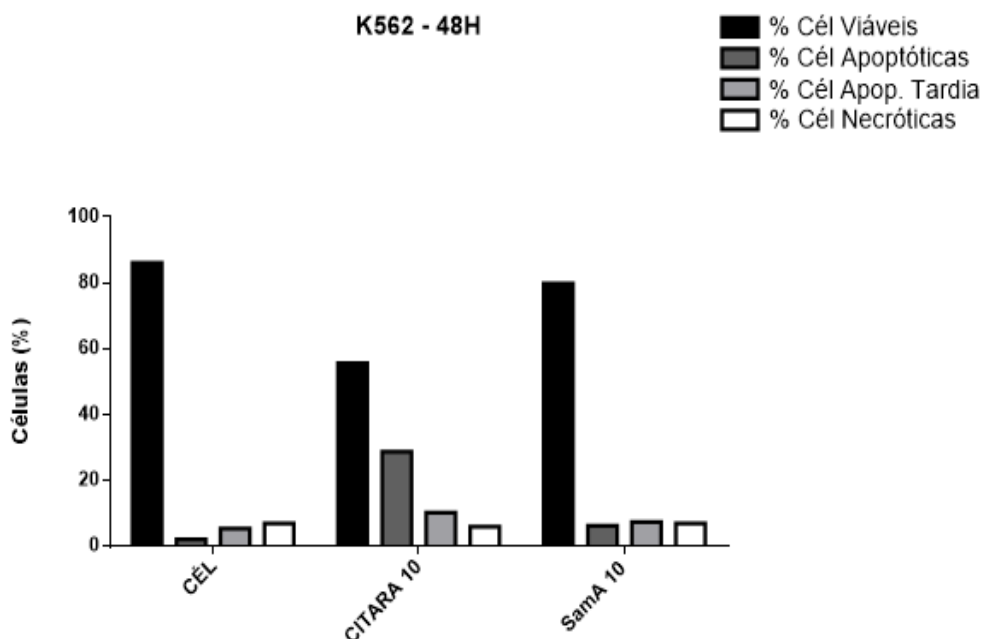
A figura 28 demonstra que a SamA não causou morte celular significativa quando comparada aos controles após 48h de tratamento.

Figura 28 – Avaliação do tipo de morte celular provocada pela SamA em K562.

A)



B)

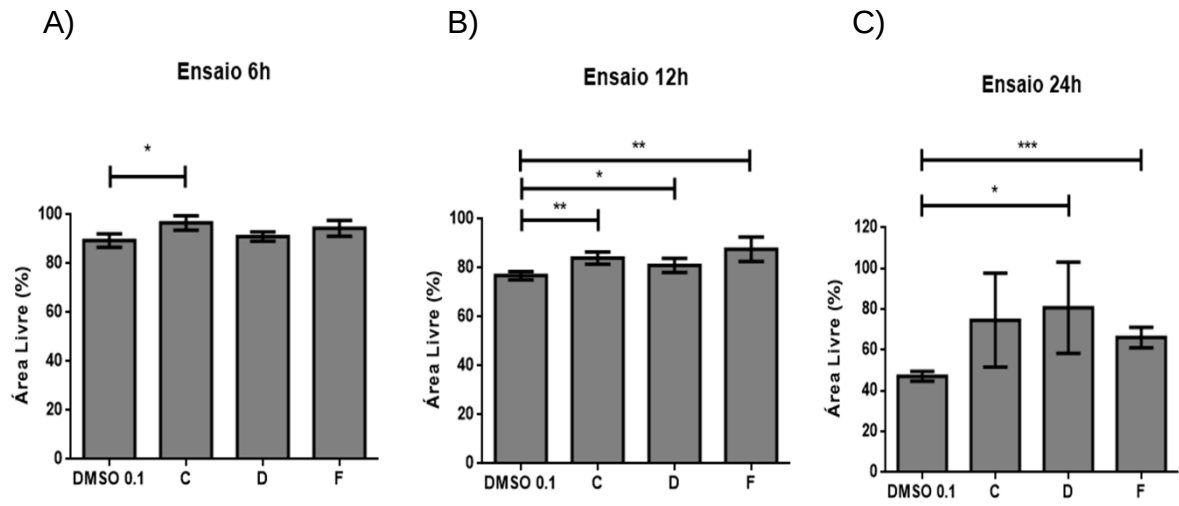


Fonte: Do autor (2017). A SamA foi avaliada na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ . A) Gráficos *dot plot* da marcação PI versus Anexina V. B) Gráfico relativo aos valores representativos dos gráficos *dot plot* (A). Cél = Controle não tratado.

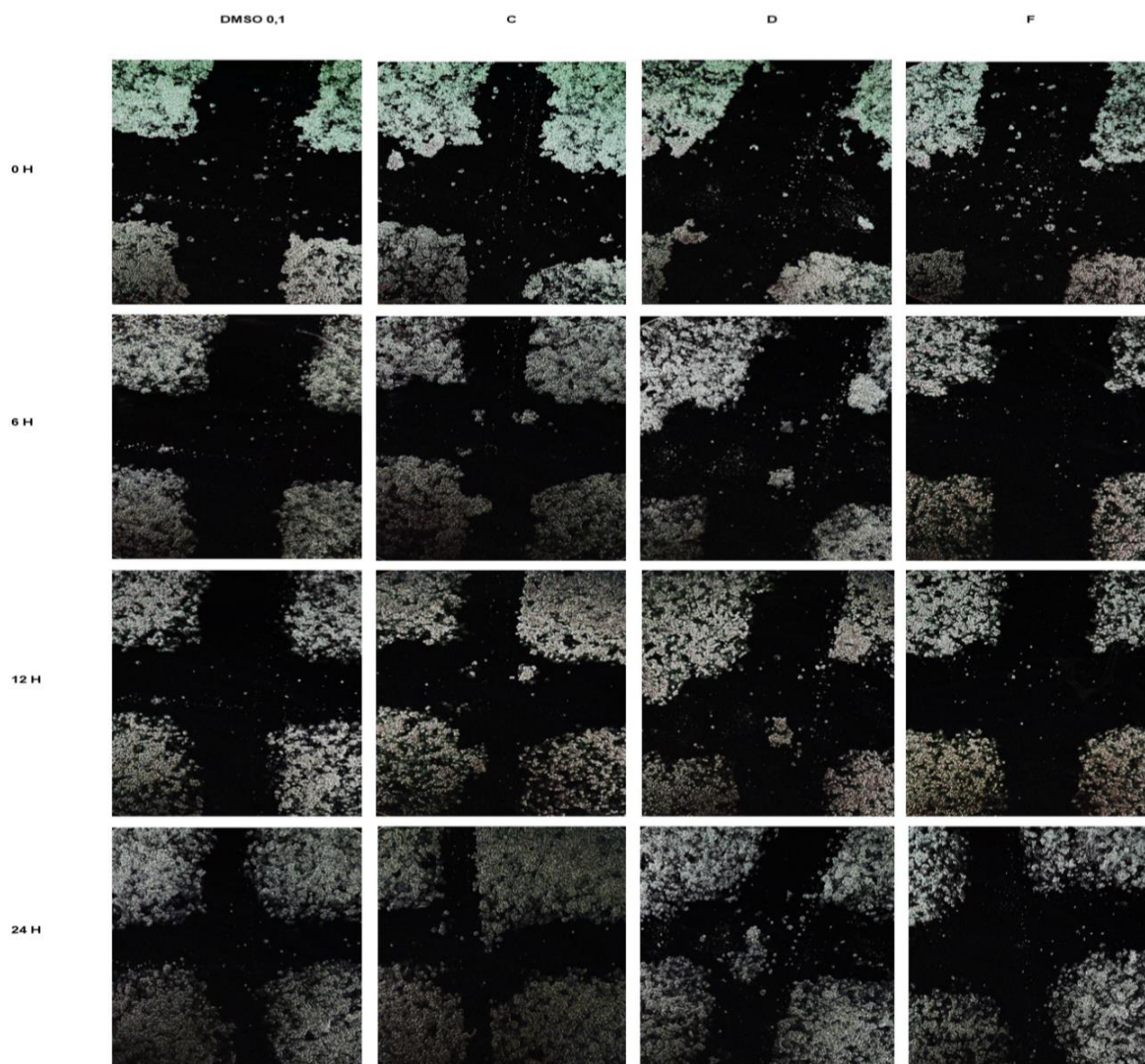
#### 5.3.1.2 Ensaio de migração celular

Em relação ao potencial anti-migratório estudado na linhagem PANC-1 a sub-fração C no tempo de 6h apresentou significância ( $p=0,015$ ) relacionada a manutenção do percentual da área livre da ferida (Figura 29 A). No tempo de 12h, todas as sub-frações apresentaram significância em relação ao controle não-tratado (DMSO 0,1%). A sub-fração C obteve  $p=0,0031$ , a sub-fração D apresentou  $p=0,042$  e na sub-fração F  $p=0,0061$  (Figura 29 B). A figura 29 C apresenta os resultados referentes ao tempo de 24h, no qual as sub-frações D ( $p=0,02$ ) e F ( $p=0,0005$ ) apresentaram significância relativa a manutenção do percentual da área livre da ferida. Estes achados demonstram que as sub-frações C, D e F impediram a migração de células tumorais caracterizando um potencial anti-migratório, especialmente da sub-fração F no tempo de 24h. A figura 29 D apresenta imagens relativas à exposição de PANC-1 às sub-frações avaliadas, onde pode-se observar o melhor potencial anti-migratório identificado com o tratamento por 24h utilizando a sub-fração F.

Figura 29 - Atividade anti-migratória das sub-frações C, D e F de *L. brasiliense* frente à PANC-1.



D)

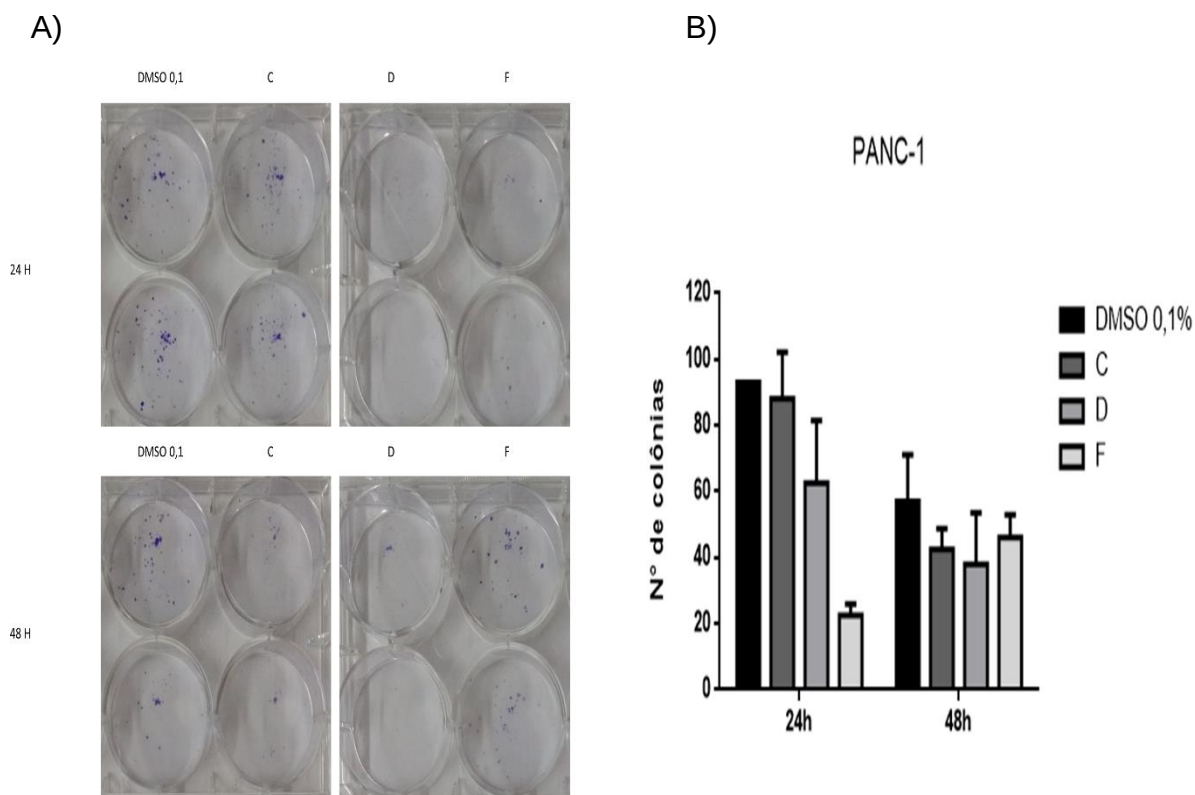


Fonte: Do autor (2017). As sub-frações C, D e F foram utilizadas em seus respectivos IC<sub>50</sub>, a saber: 76,80, 45,54 e 58,65 µg/mL. A) Gráfico relativo à exposição das sub-frações em PANC-1 no tempo 6h. B) Gráfico relativo aos valores representativos ao percentual da área livre no tempo 12h. C) Gráfico do ensaio no tempo 24h. D) Imagens referentes à exposição de cada sub-fração em todos os tempos de análise.

### 5.3.1.3 Ensaio clonogênico

Após análise da capacidade de inibição da formação de clones de células PANC-1 em 24 e 48h, foi identificado que as sub-frações D e F obtiveram melhores resultados (Figura 30). A sub-fração F no tempo de 24h conseguiu inibir a formação de colônias de células (número de colônias = 22) no IC<sub>50</sub> de 58,65 µg/mL quando comparado à condição controle (DMSO 0,1%) (número de colônias = 93).

Figura 30 - Avaliação da inibição da formação de clones celulares após tratamento com as sub-frações C, D e F de *L. brasiliense*.

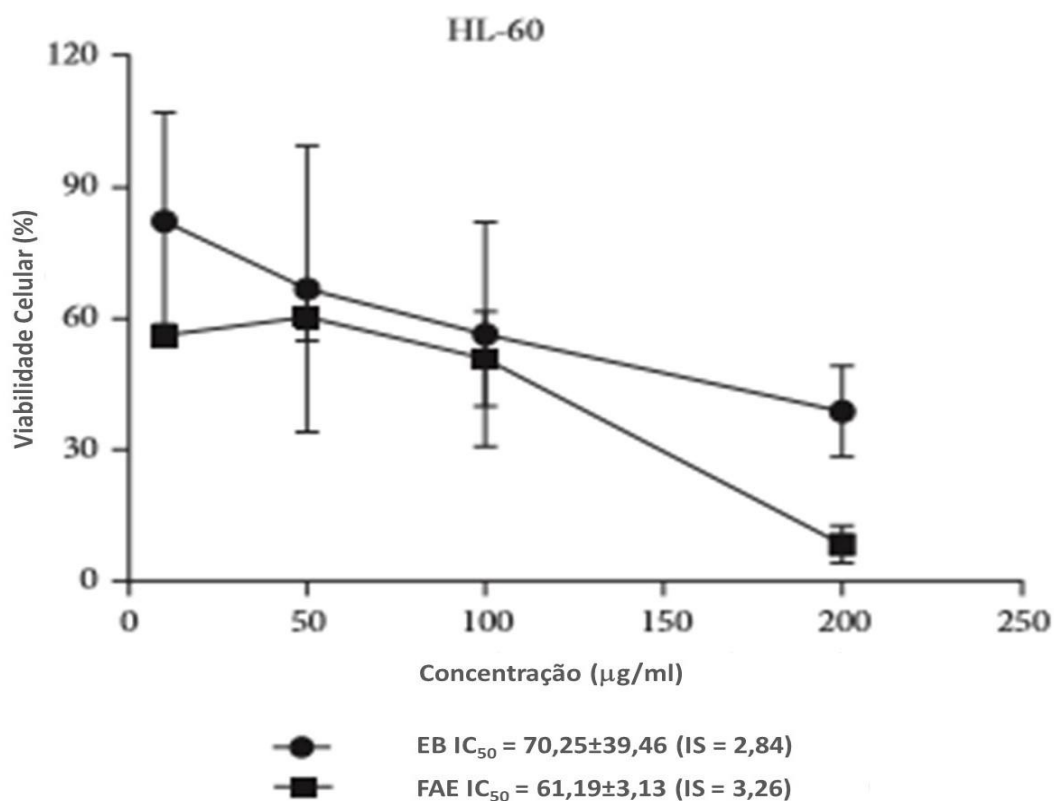


Fonte: Do autor (2017). As sub-frações C, D e F foram utilizadas em seus respectivos IC<sub>50</sub>, a saber: 76,80, 45,54 e 58,65 µg/mL. A) Gráfico relativo à exposição das sub-frações em PANC-1 no tempo 6h. B) Gráfico relativo aos valores representativos ao percentual da área livre no tempo 12h. C) Gráfico do ensaio no tempo 24h. D) Imagens referentes à exposição de cada sub-fração em todos os tempos de análise.

### 5.3.2 *Paullinia cupana*

Os resultados relacionados à atividade antineoplásica do EB, e das FAq e FAE foram descritos recentemente por Carvalho e colaboradores (2016) (Anexo 3), no qual apenas o EB e a FAE apresentaram resultados satisfatórios na linhagem HL-60 com IC<sub>50</sub> de 70,25 ± 39,46 µg/mL com o EB e 61,19 ± 3,13 µg/mL para a FAE (Figura 31). A FAE se mostrou três vezes mais seletiva para a célula neoplásica do que para PBMCs indicando ser mais eficiente que o EB para o tratamento desta linhagem celular.

Figura 31 - Viabilidade celular e respectivos valores de IC<sub>50</sub> e índice de seletividade do EB e da FAE das sementes de *P. cupana* para a linhagem HL-60.



Fonte: CARVALHO et al. (2016).

### 5.3.3 *Trichillia catigua*:

O EB, e as FAq e FAE apresentaram toxicidade em algumas linhagens neoplásicas, as quais são apresentadas na tabela 3. A atividade antineoplásica deste extrato e das frações foi observada na linhagem HL-60 após o tratamento com o EB e com a FAE (IC<sub>50</sub>=65,93±31,79 e IC<sub>50</sub>=71,91±15,76 µg/mL, respectivamente), porém, o EB se mostrou mais seletivo para a célula neoplásica do que a FAE (IS=3,03 e IS=2,78, respectivamente).

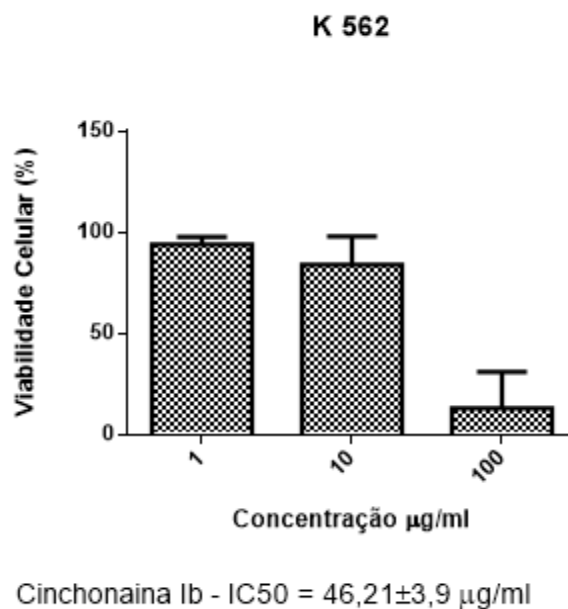
Tabela 3 - Atividade antineoplásica do EB e das FAq e FAE de cascas de *T. catigua* após 72 h de tratamento.

|            | PBMC | HEP-G2                     | MCF-7                     | T47-D               | TOLEDO                      | HL-60                      |
|------------|------|----------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>EB</b>  | >200 | 100,34±0,18<br>(IS = 1,99) | > 200<br>(IS = 1,00)      | >200<br>(IS = 1,00) | 98,09±2,91<br>(IS = 2,03)   | 65,93±31,79<br>(IS = 3,03) |
| <b>FAq</b> | >200 | >200<br>(IS = 1,00)        | >200<br>(IS = 1,00)       | >200<br>(IS = 1,00) | 100,71±0,007<br>(IS = 1,98) | 85,63±2,35<br>(IS = 2,33)  |
| <b>FAE</b> | >200 | >200<br>(IS = 1,00)        | 91,07±6,57<br>(IS = 2,19) | >200<br>(IS = 1,00) | 94,42±9,11<br>(IS = 2,11)   | 71,91±15,76<br>(IS = 2,78) |

Fonte: Do autor (2017). Os valores de IC50 estão descritos em µg/mL. IS = Índice de Seletividade.

A atividade antineoplásica frente a K562 da cinchonaina IB isolada da FAE das cascas de *T. catigua* está representada na figura 32 com seu respectivo IC50. O índice de seletividade desta substância na linhagem K562 foi igual a 2,16, abaixo do recomendado (IS ≥ 3).

Figura 32 - Viabilidade (%) das células K562 após tratamento por 72h com cinchonaina IB nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL.



Fonte: Do autor (2017).

## 5.4 Atividade antibacteriana

### 5.4.1 *Limonium brasiliense*:

A atividade antibacteriana do EB, FAq e FAE de *L. brasiliense* está descrita na tabela 4 através dos valores da CIM e CBM expressos em µg/mL. Os melhores resultados obtidos foram obtidos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e MRSA ATCC 33591 após tratamento com o extrato bruto e com as frações aquosa e acetato de etila, os quais apresentaram CIM igual a 62,5 µg/mL. O EB, FAq e FAE apresentaram CIM=250 µg/mL frente à *Escherichia coli*, isolado clínico de *Staphylococcus epidermidis* e LMB 2 ao LMB 10.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EB, FAq e FAE de rizomas de *L. brasiliense*.

|                                                                              | EB   |      | FAq  |      | FAE  |      |
|------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                                                              | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922*                                       | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>ATCC 29665*                                  | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853*                                 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| Isolado clínico de<br><i>Staphylococcus epidermidis</i>                      | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 29213                                   | 62,5 | >250 | 62,5 | >250 | 62,5 | >250 |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>resistente à meticilina<br>(MRSA) ATCC 33591 | 62,5 | >250 | 62,5 | >250 | 62,5 | >250 |
| LMB 1                                                                        | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| LMB 2                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 3                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 4                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 5                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 6                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 7                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 8                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 9                                                                        | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 10                                                                       | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |

Fonte: Do autor (2017). Os valores estão expressos em µg/mL.

A partir dos resultados da atividade antibacteriana do EB, FAq e FAE, a atividade das sub-frações foi avaliada frente à MSSA ATCC 29213, MRSA ATCC 33591 e *E. coli*. Estas sub-frações obtidas da FAE de *L. brasiliense* apresentaram resultados mais satisfatórios que os resultados do EB, FAq e FAE, onde foi encontrado valores de CBM para grande parte das sub-frações (Tabela 5).

A inibição do crescimento de MSSA ATCC 29213 foi melhor observado após o tratamento com as sub-frações “E”, “H” e “K”, onde o CIM correspondeu a 62,2 µg/mL com respectivos CBM de 500, 500 e 125 µg/mL. A sub-fração “C” apresentou CIM=125 µg/mL e CBM=250 µg/mL indicando atividade bactericida em menor dose do que nas demais sub-frações. Na cepa resistente, MRSA ATCC 33591, foi identificado menor valor de CIM após tratamento com a sub-fração “E” (62,5 µg/mL), porém a CBM foi maior que 500 µg/mL. Já as sub-frações “H” e “J” apresentaram CBM igual a 500 µg/mL e CIM igual a 250 e 125 µg/mL, respectivamente.

Os melhores resultados referentes à inibição do crescimento e do potencial bactericida para *E. coli* foram identificados nas sub-frações “B” e “C”. Na sub-fração “B”, CIM=62,5 µg/mL e CBM=500 µg/mL e, na sub-fração “C”, a CIM foi igual a 62,5 µg/mL e a CBM foi igual a 250 µg/mL.

Tabela 5 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória máxima (CBM) de sub-frações obtidas da fração acetato de etila de rizomas de *L. brasiliense*.

|   | MSSA ATCC 29213         |       | MRSA ATCC 33591 |       | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |       |
|---|-------------------------|-------|-----------------|-------|---------------------------|-------|
|   | MIC                     | MBC   | MIC             | MBC   | MIC                       | MBC   |
|   | $\mu\text{g}/\text{mL}$ |       |                 |       |                           |       |
| A | 250                     | 500   | 250             | > 500 | 250                       | 500   |
| B | 125                     | 500   | 125             | > 500 | 62,5                      | 500   |
| C | 125                     | 250   | 125             | > 500 | 62,5                      | 250   |
| D | 250                     | > 500 | 125             | > 500 | 125                       | > 500 |
| E | 62,5                    | 500   | 62,5            | > 500 | 125                       | > 500 |
| F | 250                     | > 500 | 500             | > 500 | 250                       | > 500 |
| G | 125                     | > 500 | 250             | > 500 | 250                       | 500   |
| H | 62,5                    | 500   | 250             | 500   | 125                       | 500   |
| J | 125                     | 500   | 125             | 500   | 125                       | > 500 |
| K | 62,5                    | 250   | 125             | > 500 | 125                       | > 500 |

Fonte: Do autor (2017). Os valores estão apresentados em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 5.4.2 *Paullinia cupana*

Os resultados relativos à atividade antibacteriana do EB, FAq e FAE das sementes de *P. cupana* estão descritos na tabela 6. O extrato e a fração acetato de etila das sementes do guaraná não apresentaram baixos valores de CIM e CBM. Com exceção das bactérias LMB 1, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665\* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853\* que apresentaram CIM e CBM maior que 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todas as demais bactérias estudadas tiveram seu crescimento inibido na concentração de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após o tratamento com o EB e a FAE do guaraná (CARVALHO et al., 2016).

Tabela 6 – Atividade antibacteriana do EB e da FAE de sementes de *P. cupana*.

|                                                                        |             | EB   |      | FAE  |      |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|------|------|------|------|
|                                                                        |             | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  |
| <i>Escherichia coli</i>                                                | ATCC        | 250  | >250 | 250  | >250 |
| 25922*                                                                 |             |      |      |      |      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                           | ATCC 29665* | >250 | >250 | >250 | >250 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                          |             | >250 | >250 | >250 | >250 |
| ATCC 27853*                                                            |             |      |      |      |      |
| Isolado clínico de <i>Staphylococcus epidermidis</i>                   |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213                                |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) ATCC 33591 |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 1                                                                  |             | >250 | >250 | >250 | >250 |
| LMB 2                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 3                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 4                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 5                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 6                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 7                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 8                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 9                                                                  |             | 250  | >250 | 250  | >250 |
| LMB 10                                                                 |             | 250  | >250 | 250  | >250 |

Fonte: CARVALHO et al. (2016). Os valores apresentados em µg/mL referem-se às concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM).

### 5.4.3 *Trichilia catigua*

O extrato bruto e as frações aquosas e acetato de etila das cascas de *T. catigua* apresentaram melhor atividade antibacteriana ao comparar com os demais EB, FAq e FAE das plantas avaliadas neste estudo. Após análise foi possível observar que em *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e em MRSA ATCC 33591 a FAE apresentou valor de CIM igual a 31,5 µg/mL (Tabela 7), indicando que nesta concentração foi inibido o crescimento destas bactérias. Ainda nestas duas cepas, a FAq e o EB também apresentaram valores de CIM, porém maiores que o valor apresentado pela FAE (62,5 e 125 µg/mL, respectivamente).

O crescimento de *E. coli*, isolado clínico de *Staphylococcus epidermidis*, e dos LMB 2 ao LMB 10 foram inibidos na concentração de 250 µg/mL do EB, e das FAq e FAE de *T. catigua*. Contudo, apenas o EB inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853\* nesta mesma concentração. Ademais, nenhum extrato e frações de *T. catigua* apresentaram atividade bactericida (CBM>250 µg/mL).

Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima do EB, FAq e FAE das cascas de *T. catigua* expressas em µg/mL.

|                                                      | EB   |      | FAq  |      | FAE  |      |
|------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                                      | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  |
| <b><i>Escherichia coli</i><br/>ATCC 25922*</b>       | 250  | >250 | 250  | >250 | 250  | >250 |
| <b><i>Klebsiella pneumoniae</i><br/>ATCC 29665*</b>  | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br/>ATCC 27853*</b> | 250  | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |

|                                                                               |      |      |      |      |       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|-------|------|
| <b>Isolado clínico de</b>                                                     | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>                                      |      |      |      |      |       |      |
| <b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213</b>                                | 125  | >250 | 62,5 | >250 | 31,25 | >250 |
| <b><i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) ATCC 33591</b> | 125  | >250 | 62,5 | >250 | 31,25 | >250 |
| <b>LMB 1</b>                                                                  | >250 | >250 | >250 | >250 | >250  | >250 |
| <b>LMB 2</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 3</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 4</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 5</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 6</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 7</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 8</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 9</b>                                                                  | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |
| <b>LMB 10</b>                                                                 | 250  | >250 | 250  | >250 | 250   | >250 |

Fonte: Do autor (2017).

## 6 DISCUSSÃO

Os extratos de plantas medicinais representam em primeira instância a fase inicial de estudos para desenvolvimento de medicamentos naturais e têm sido bastante explorados em pesquisas científicas com fins terapêuticos por apresentarem uma grande diversidade molecular em sua composição (ATANASOV et al., 2015). De acordo com JONES E KINGHORN (2005), a primeira etapa para testar a atividade biológica de uma planta é a preparação do seu extrato bruto e de frações semi-purificadas. Os extratos brutos apresentam misturas complexas com uma grande quantidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários que dificultam o

entendimento de que substâncias estão desempenhando determinada atividade biológica encontrada. Desta maneira, o próximo passo deste processo, o sub-fractionamento seguido do isolamento de compostos fitoquímicos bioativos, depende diretamente dos resultados preliminares com os extratos brutos (JONES E KINGHORN, 2005; RADULOVIC, et al., 2013).

A grande disponibilidade de compostos fitoquímicos encontrados em plantas medicinais representa o objeto maior de estudos para descoberta de novas fontes terapêuticas. Por isso, a identificação dessas moléculas, presentes em extratos e frações de plantas, é peça-chave para validação de estudos envolvendo as atividades biológicas das plantas. Compostos naturais já identificados e usados atualmente na clínica como, taninos, canabidióis, colchicinas, forbol ésteres, dentre outros obtidos de plantas, são consideradas importantes substâncias para farmacologia, fisiologia e estudos bioquímicos (RATES, 2001).

Os taninos condensados representam uma ampla gama de substâncias encontradas em várias partes das plantas, e possuem importantes efeitos farmacológicos já conhecidos como, por exemplo os efeitos anticâncer, anti-inflamatório, antibacteriano, antioxidante, dentre outros (SMERIGLIO et al., 2017). Recentemente, vários estudos têm concentrado esforços na identificação das propriedades farmacológicas da EGCG, um tanino condensado encontrado principalmente nas sementes da uva (CHU et al., 2017; BLAINSKI, 2010; LANDIS-PIWOWAR et al., 2013; BLAINSKI et al, 2017; KHAN et al., 2015). Além desta molécula, várias outras substâncias oriundas de fontes naturais são isoladas e estudadas, afim de se obter novas descobertas para o tratamento eficaz de diferentes desordens que afetam corriqueiramente os seres humanos. Por estes e outros motivos, os produtos naturais representam importantes ferramentas para a indústria farmacêutica e biotecnológica, uma vez que muitos medicamentos sintéticos são desenvolvidos tendo como base moléculas provenientes da natureza, por estes, muitas vezes, apresentarem menos toxicidade e efeitos adversos (MATHUR; HOSKINS, 2017).

A busca incessante por substâncias imunomoduladoras provenientes de fontes naturais é um grande exemplo da procura por produtos menos tóxicos ao organismo, e, é impulsionada pelos vários efeitos adversos encontrados nas drogas sintéticas

disponíveis no mercado. Ciclosporinas, corticosteroides, azatioprina são exemplos de imunomoduladores que podem induzir o aparecimento de nefro toxicidade, anemias, trombocitopenia, supressão da medula óssea, etc. Taninos, saponinas, cumarinas e alguns ácidos, como ácido elágico, ácido gálico, dentre outros, são substâncias encontradas em algumas espécies de plantas que apresentam, em geral, baixa toxicidade e possuem atividade imunomoduladora já conhecida, (RACHH et al., 2014).

A atividade anti-inflamatória de *L. brasiliense* foi inicialmente demonstrada por MOURA no ano de 1984, e, até o presente momento, não foi descrito nenhum registro de estudo relacionado a esta atividade nesta planta. MOURA (1984) em seu estudo observou a inibição do edema de pata provocada pela carragenina em ratos, e, esta inibição foi associada principalmente a presença de taninos (fração tanante do extrato etanólico) nos rizomas da planta. Corroborando com os resultados demonstrados por MOURA (1984), neste trabalho, o extrato bruto e as frações aquosa e acetato de etila de rizomas de *L. brasiliense* apresentaram redução significativa de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17A e IL-22. O extrato bruto conseguiu inibir significativamente todas as citocinas avaliadas, provavelmente pela ação sinérgica da grande quantidade de moléculas que este tipo de extrato contém (MACHANA et al., 2012). Além disso, as sub-frações obtidas da FAE de *L. brasiliense*, também apresentaram redução significativa das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17A. Tal atividade encontrada, pode ser atribuída a presença de substâncias já identificadas na FAE de rizomas de *L. brasiliense*, dentre estas, taninos hidrolisáveis e condensados, como as leucoantocianinas, ácido hidroxicinâmico, ácido elágico, EGCG, além de catequina, galocatequina, samarangenina A, samarangenina B e vários outros (BLAINSKI, 2010; CALEARE et al., 2017).

O efeito imunomodulador da EGCG foi demonstrado por alguns autores ao identificar que a EGCG inibe a entrada de NF- $\kappa\beta$  para o núcleo celular, impedindo a transcrição de genes como COX-2 e iNOS, importantes mediadores da resposta inflamatória (NAGAI et al., 2002; TEDESCHI et al., 2004). Além disso, KIM e colaboradores (2006) demonstraram que a EGCG inibe a produção da quimiocina IL-8, outra molécula importante relacionada com o processo inflamatório. A ação da EGCG na inibição IL-8 foi identificada em células epiteliais do trato respiratório de camundongos, reduzindo a condução do processo inflamatório para distantes locais

do aparelho respiratório. Contudo, ainda não foram reportados na literatura os efeitos imunomoduladores da SamA e SamB. Desta forma, não se sabe ao certo qual destas moléculas conferem a atividade imunomoduladora identificada.

Os efeitos imunomodulatórios de extratos de *P. cupana* vêm sendo descritos por alguns pesquisadores (ANVERSA et al., 2015; CANICEIRO, 2012), porém ainda há poucos trabalhos relacionando esta propriedade com extratos das sementes dessa planta. Há poucos anos, um estudo utilizando modelo animal, verificou que as sementes de *P. cupana* apresentaram atividade anti-inflamatória reduzindo a expressão de NF-K $\beta$  e COX2, bem como diminuíram significativamente a expressão de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (DEL GIGLIO e DEL GIGLIO, 2015). A capacidade anti-inflamatória dessas sementes está relacionada com a presença de compostos bioativos como, por exemplo, metilxantinas, teobrominas e teofilinas, sendo as metilxantinas também encontradas em nossos extratos e frações de *P. cupana* (ANVERSA et al., 2015). O potencial imunomodulador do extrato bruto e da FAE das sementes desta planta foi apresentado neste trabalho, no qual foi demonstrada uma diminuição significativa da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10, confirmando esta propriedade. Esta atividade pode ser atribuída à presença de metilxantinas (ANVERSA et al., 2015), como a cafeína, encontrada no extrato bruto (MARQUES et al., 2016) e na FAE de sementes de *P. cupana* analisados (CARVALHO et al., 2016).

Além da cafeína encontrada no EB e na FAE de *P. cupana*, MARQUES et al. (2016) e CARVALHO et al. (2016) também identificaram a presença de catequina e epicatequina nos dois materiais desta planta, utilizados neste estudo. Nessa entrelinha, recentemente, a epicatequina foi relacionada com a prevenção da inflamação do tecido adiposo e da resistência à insulina em ratos, mediada pela supressão da expressão de CCL19 uma quimiocina envolvida no processo inflamatório (SANO et al., 2017). Desta forma, esta molécula pode contribuir para o efeito imunomodulador encontrado neste estudo.

Na literatura, poucos são os estudos que abordam a atividade imunomoduladora dos extratos de *Trichilia catigua*. BARBOSA (2004) demonstrou a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das cascas de *Trichilia catigua* onde foi observada uma inibição da PLA<sub>2</sub>, uma fosfolipase que participa da síntese de

prostaglandinas na fase inicial do processo inflamatório. Esse resultado demonstra o potencial anti-inflamatório das cascas de *T. catigua*, assim como no presente trabalho, onde ficou evidenciada a diminuição de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A e IL-22 e o aumento da citocina anti-inflamatória, IL-10, após o tratamento com o extrato bruto e as frações aquosas e acetato de etila.

Os taninos condensados encontrados em extratos das cascas de *T. catigua* representam uma classe de compostos fenólicos que possuem atividade anti-inflamatória já conhecida (BARBOSA et al., 2004). No trabalho de GODINHO e colaboradores (2017) foi demonstrada a presença de taninos condensados na composição da FAE das cascas de *T. catigua* utilizada no presente estudo. Moléculas como procianidina B2, epicatequina, cinchonainas e catequina foram identificadas nesta fração e demonstraram refletir uma diminuição da inflamação após indução de isquemia cerebral global em ratos (GODINHO et al., 2017). Portanto, os componentes bioativos encontrados por GODINHO et al (2017) contribuem para entender o comportamento imunomodulador do extrato bruto e frações de *T. catigua* utilizados neste trabalho.

Nos últimos anos, vários estudos foram publicados a respeito da atividade antineoplásica de plantas medicinais (BARONE et al., 2018; QUI et al., 2017; INTHUWANARUD et al., 2016; FANTINI et al., 2015), porém ainda não há relatos na literatura relacionados à atividade antineoplásica de *L. brasiliense*. Contudo, a atividade antineoplásica das plantas medicinais está ligada principalmente à presença de flavonoides em geral, terpenos, flavolignanas, alcaloides, terpenoides, fenóis e esteroides (FERNANDO E RUPASINGHE, 2013). A presença de compostos fenólicos nos rizomas de *L. brasiliense* foi demonstrada há alguns anos (BLAINSKI et al. 2013; BLAINSKI et al., 2016). Estes compostos podem estar desempenhando um papel chave para a atividade antineoplásica apresentada principalmente na linhagem de HL-60 com índice de seletividade de 4,39 após tratamento com a FAE de *L. brasiliense*. As linhagens HEP-G2 e T47-D também apresentaram valores de IC50 para a FAE (59,47  $\mu$ g/mL e 77,7  $\mu$ g/mL, respectivamente), conferindo a esta fração uma atividade antineoplásica.

Dessa maneira, a avaliação antineoplásica de sub-frações obtidas da FAE de rizomas de *L. brasiliense* tornou-se necessária, uma vez que esta fração obteve

resultados mais satisfatórios para a atividade biológica em questão. De acordo com estudos recentes, extratos e frações semi-purificadas de rizomas de *L. brasiliense*, incluindo a FAE utilizada no presente trabalho, apresentam como componentes majoritários a EGCG, Samarangenina A e B, galocatequina e epigallocatequina (BLAINSKI et al., 2017; CALEARE et al., 2017). As sub-frações, por possivelmente apresentarem estas substâncias mais concentradas que na FAE, obtiveram resultados melhores, quando comparados com a FAE. A sub-fração G obteve melhor IC50 na linhagem HL-60 ( $7,35 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$ ) e na linhagem MOLT-4 ( $7,92 \pm 0,86 \mu\text{g/mL}$ ). A SamA apresentou IC50 igual a  $29,24 \pm 17,64 \mu\text{g/mL}$  para linhagem neoplásica K562, e, nenhuma sub-fração apresentou citotoxicidade para linhagem não transformada, vero, indicando possuir boa seletividade para as linhagens neoplásicas estudadas. De acordo com (OGBOLE et al., 2017), uma molécula moderadamente seletiva tem IS entre 1 e 10, sendo, portanto, estas sub-frações e a SamA consideradas agentes promissores.

Vários mecanismos podem estar associados à atividade antineoplásica encontrada após tratamento com as sub-frações e com a SamA, porém, ainda não há relatos na literatura sobre a atividade antineoplásica de SamA. Em contrapartida, a EGCG, atualmente é uma molécula bem caracterizada e descrita na literatura, havendo várias descrições de sua utilização, de suas atividades biológicas e, em especial, dos mecanismos antitumorigênicos por ela desempenhados (STOCKFLETH, 2011; LANDIS-PIWOWAR et al., 2013; CHU et al., 2017). Dentre as pesquisas relacionadas à EGCG, há algumas que abordam a ligação desta com receptores de laminina, uma proteína altamente expressa em células carcinogênicas, causando citotoxicidade e morte celular (TACHIBANA et al., 2004; SAITO et al., 2017), assim como também há estudos que mostraram a inibição da proliferação de células neoplásicas por ação antiangiogênica demonstrando seu potencial anticâncer (SHANKAR et al., 2013; BRAICU et al., 2013; MANTENA et al., 2005). Estudos acerca do potencial antimigratório e indutor de morte celular por apoptose de EGCG também já foram descritos na literatura (KOH et al., 2011; KWAK et al., 2011; KUSHIMA et al., 2009).

Os achados demonstrados por estes autores corroboram com os resultados apresentados neste trabalho onde a sub-fração G a  $10 \mu\text{g/mL}$ , demonstrou aumentar

o percentual de células K562 apoptóticas comparado com a citarabina, fármaco padrão para tratamento de leucemia. As demais sub-frações, nesta mesma linhagem, também apresentaram quantidades maiores de células apoptóticas comparada com a citarabina. Na linhagem K562, a SamA não apresentou citotoxicidade, possivelmente pelo tempo de exposição de 48h, uma vez que a IC50 (8 µg/mL) identificada nesta linhagem, através do MTT, foi encontrada após tratamento por 72h, ou até mesmo, por esta molécula causar morte celular por outros mecanismos ainda desconhecidos. Na linhagem MOLT-4 foi identificado maior quantidade de células em apoptose tardia e necrose após o tratamento com as sub-frações, especialmente com a sub-fração G, porém, a citarabina demonstrou melhor atividade que sub-frações estudadas. Além destes, em conformidade com o estudo de KWAK et al. (2011) foi identificado o potencial antimigratório e anticlonogênico das sub-frações, principalmente da sub-fração F. Como demonstrado por CALEARE et al. (2017), sub-frações obtidas da FAE de rizomas de *L. brasiliense* apresentam, dentre outras substâncias, a EGCG, SamA e SamB as quais possivelmente contribuem para o potencial apoptótico, antimigratório e antiproliferativo identificado.

Outra planta estudada neste trabalho, *P. cupana*, possui atividade antineoplásica demonstrada por alguns autores (FUKUMASU, 2008; FUKUMASU; LATORRE; DAGLI, 2011; HERTZ et al., 2015). FUKUMASU (2008) utilizou modelos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade antineoplásica de *P. cupana* em linhagens de células de melanoma. Este pesquisador revelou que a atividade antineoplásica do pó das sementes de *P. cupana* ocorre devido ao aumento de células apoptóticas e a inibição da proliferação celular. Outro estudo utilizando o pó de sementes de *P. cupana* em linhagem de câncer de mama (MCF-7) mostrou apresentar atividade de inibição da proliferação celular nas concentrações de 5 e 10 µg/mL em associação com quimioterápicos usados na clínica, paclitaxel e 5-fluoracil (HERTZ et al., 2015). Porém, estes pesquisadores não observaram citotoxicidade do pó de *P. cupana* sem associação com as drogas padrão, em MCF-7.

Corroborando com os achados iniciais de HERTZ et al. (2015), porém utilizando o EB e a FAE de *P. cupana*, no presente trabalho não foram encontradas atividades antineoplásica nesta linhagem de câncer de mama. Foi evidenciado, neste estudo, a atividade antineoplásica na linhagem de leucemia promielocítica (HL-60) com IC50

igual a 70 µg/mL e 61 µg/mL após tratamento com o EB e a FAE, respectivamente. Alguns estudos documentaram a relação da presença de metilxantinas com a atividade antineoplásica em tumores humanos e murinos (NOMURA et al., 2005; HE et al., 2003; JANG et al., 2002). Desta maneira a atividade encontrada da FAE na linhagem HL-60 está possivelmente relacionada ao teor de cafeína identificado neste extrato. O resultado obtido para o EB pode estar associado à um efeito sinérgico de moléculas como catequinas, metilxantinas e outras moléculas nele presentes, potencializando a ação antineoplásica (MACHANA et al., 2012).

A pesquisa acerca da atividade antineoplásica de *T. catigua* ainda é pouco explorada. Apenas um estudo relata a atividade antineoplásica desta planta, porém, neste estudo foi avaliado o potencial antineoplásico de um limonoide isolado das cascas de *T. catigua* em linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231). Estes autores ainda descreveram as características antiproliferativas, anti-adesiva, antimigratória e anti-invasiva desta molécula (FUZER et al., 2013).

Já o estudo de ITO et al. (2000) descreveu a relação de moléculas como procianidinas com a atividade antineoplásica em tumores humanos. Nesse contexto, foi observada a atividade antineoplásica de cascas de *Trichilia catigua* nas linhagens MCF-7 e HL-60 com a FAE, podendo esta atividade ser atribuída à presença de procianidinas nesta fração. Ademais, na linhagem HL-60 foi obtida uma melhor resposta antineoplásica com o EB das cascas de *T. catigua*. A resposta aumentada do EB em relação às demais frações deve-se ao fato de seu conteúdo fitoquímico provavelmente possuir um maior número de moléculas com características distintas. A utilização de solventes orgânicos possibilita a extração de grupos de substâncias, como por exemplo, os taninos, que são extraídos com melhor eficiência pelo acetato de etila, devido suas características químicas apresentarem afinidade a esta classe de moléculas (MARTINEZ et al., 2013; YOTSU-YAMASHITA et al., 2013; JUNG et al., 2014; SURGET et al., 2016; LI et al., 2017). Portanto, as diversas classes de substâncias presentes no EB, podem agir sinergicamente potencializando a resposta antineoplásica encontrada neste estudo (MACHANA et al., 2012).

Por outro lado, as atividades biológicas de algumas flavolignanas isoladas das cascas de *T. catigua* foram demonstradas na literatura, como por exemplo, a atividade antioxidante (BRUYNE et al., 1999; TANG et al., 2007; RESENDE, 2007) e

antimicrobiana (PIZZOLATTI et al., 2002) das cinchonainas, porém a atividade antineoplásica destas moléculas ainda não foi elucidada. No presente estudo foi identificada a ausência de citotoxicidade em linhagem não transformada (Vero) e o potencial antineoplásico da Cinchonaina Ib, a qual obteve valor de IC<sub>50</sub> na linhagem K562 igual a 46,21 µg/mL. O potencial antineoplásico de cinchonainas foi identificado por TABANCA et al. (2007), porém as substâncias foram isoladas das cascas de *Anemopaegma arvense*, uma espécie utilizada como catuaba, no Brasil (LONGHINI et al., 2017). TABANCA et al. (2007) demonstraram que as cinchonainas Ia (isômero da cinchonaína Ib) e IIa não apresentaram citotoxicidade em linhagens celulares não transformadas, porém apresentaram citotoxicidade em linhagens neoplásicas de hepatocarcinoma (HEP-G2), melanoma (SK-MEL), carcinoma ovariano (SK-OV3), câncer de mama (BT-549), carcinoma de células escamosas (KB) e leucemia promielocítica (HL-60), confirmando os resultados encontrados do presente trabalho.

Vale ressaltar que os índices de seletividades encontrados são considerados “virtuais”, uma vez que não foram identificados valores de IC<sub>50</sub> para as PBMCs na maior dose testada. Desse modo, na realidade, esses valores são maiores, mostrando que o EB e as frações estudadas são ainda mais seletivos para as linhagens neoplásicas hematológicas do que para células normais, portanto considerados agentes promissores (BÈZIVIN et al, 2003).

Como foi visto, a procura por novas moléculas com atividade terapêutica é atualmente um grande desafio, principalmente quando se trata de drogas antibacterianas. Os problemas de saúde relacionados a diferentes infecções microbianas se tornam ainda mais preocupantes diante da grave ocorrência da resistência bacteriana aos medicamentos já disponíveis na clínica (CARVALHO et al., 2016). A resistência microbiana, o surgimento de novos patógenos, e o ressurgimento de patógenos antigos são fatores determinantes para a busca por novas alternativas que forneçam um amplo arsenal terapêutico, uma vez que a resistência bacteriana persistirá (WHO, 2012). Neste contexto, estudos com extratos e frações de plantas medicinais representam a fase inicial de pesquisas para identificação de novas moléculas naturais com potencial antimicrobiano (RADULOVIC, et al., 2013). Alguns estudos associam a atividade antibacteriana de extratos de plantas com a presença de taninos condensados (BLAINSKI et al., 2017), flavolignanas (PIZZOLATI et al., 2002), alcaloides (KLAUSMEYER et al., 2004), flavonoides (SOHN et al., 2004),

sesquiterpenos lactonas (LIN et al., 2003), diterpenos (EL-SEEDI et al., 2002), triterpenos (KATERERE et al., 2003) e naftoquinonas (MACHADO et al., 2003). Holetz e colaboradores (2002) classificaram em seu estudo uma substância susceptível quando a mesma apresentar valores de MIC menores que 100 µg/mL, assim como valores entre 100 a 500 µg/mL representam boa atividade, entre 500 e 1000 µg/mL, atividade moderada e maior que 1000 µg/mL uma substância sem atividade antibacteriana.

Dentre estes, compostos como taninos hidrolisáveis, sitosterol, ácido 4-O-metilgálico, saponinas triterpênicas e taninos condensados foram primariamente identificados em *Limonium brasiliense* (ROSITO, 1975). Posteriormente, verificou-se nas raízes desta planta a existência de outros compostos como leucoantocianinas, ácido hidroxicinâmico, e ácido elágico (MURRAY et al., 2004). A presença de alguns desses compostos em rizomas de *L. brasiliense* como, por exemplo, taninos hidrolisáveis, condensados,  $\beta$  - sitosterol e saponinas triterpênicas reflete na atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico frente à *E. coli*, *B. mycoides*, *S. aureus*, dentre outros demonstrada por ROSITO (1975) através do teste de difusão do disco (zona inibida  $\geq 10$  mm).

Os taninos condensados é uma classe de metabólitos que possui atividade antibacteriana bem documentada na literatura. Estes compostos fitoquímicos são responsáveis por exercer alguns mecanismos de ação conhecidos, como por exemplo, a ação direta sobre o metabolismo microbiano ou a inibição de enzimas da parede celular, causando perda de sua função e consequente extravasamento de citoplasma (SMERIGLIO et al., 2017; MARÍN et al., 2015).

Os estudos acerca da atividade antibacteriana de *L. brasiliense* ainda são pouco explorados na literatura, porém, recentemente BLAINSKI et al. (2017) identificaram a atividade bacteriostática da FAE de rizomas de *L. brasiliense* contra as cepas de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (CIM=19 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) (CIM=39 µg/mL), e, CALEARE et al. (2017) mostraram a inibição da adesão de *Porphyromonas gingivalis* em células epiteliais após o tratamento com a FAE de rizomas de *L. brasiliense* utilizada no presente estudo. Em conformidade com os resultados encontrados por estes dois autores, foi identificada no presente trabalho a atividade bacteriostática frente às cepas MSSA e

MRSA (CIM=62,5 µg/mL) após o tratamento com a FAE, FAq e EB. Portanto, de acordo com a classificação do estudo de Holetz et al. (2002), as cepas MSSA e MRSA são consideradas susceptíveis à ação do extrato bruto e das frações de rizomas de *L. brasiliense*.

As sub-frações provenientes da FAE de *L. brasiliense* também apresentaram atividade bacteriostática e adicionalmente atividade bactericida frente às cepas de *E. coli* e MSSA após tratamento com a sub-fração C (CBM=250 µg/mL em ambas as cepas), e novamente contra MSSA com a sub-fração K, onde CBM=250 µg/mL. Além destas as demais sub-frações, com exceção das sub-frações D e F, obtiveram CBM=500 µg/mL para MSSA, MRSA ou *E. coli*. Dessa maneira, a presença de taninos condensados na FAE como EGCG, Samarangenina A e B demonstrada por CALEARE et al. (2017) reforçam a ligação destas moléculas com a atividade antibacteriana encontrada nas sub-frações.

Já *Paullinia cupana*, apresenta atividade antimicrobiana demonstrada por alguns estudos (MAJHENIC, 2007; YAMAGUTI-SASAKI, 2007; BASILE, 2005). O extrato alcoólico das sementes de *P. cupana*, por exemplo, apresentou atividade antimicrobiana contra alguns fungos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* e *Penicillium cyclopium* (MAJHENIC, 2007). Da mesma maneira, este mesmo extrato, apresentou grande atividade contra bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, e *Streptococcus mutans* (CIM=32 µg/mL) (YAMAGUTI-SASAKI, 2007). A presença de taninos nas sementes de *P. cupana* confere certa atividade antibacteriana demonstrada por alguns grupos de pesquisa (YAMAGUTI-SASAKI, 2007; USHIROBIRA-ANTONELLI et al., 2007; MAJHENIC, 2007). BAZZAZ e colaboradores (2016) identificaram a atividade bactericida de taninos condensados como a epicatequina e EGCG contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém mostraram que as metilxantinas, obtidas comercialmente, não apresentam atividade bactericida, contudo, possuem atividade bacteriostática contra essas cepas.

No presente estudo foram apresentadas atividades bacteriostáticas do EB e FAE de *P. cupana* contendo compostos como catequinas, epicatequinas, cafeína, dentre outros (CARVALHO et al., 2016). Estes extratos não apresentam valores de CIM semelhantes aos encontrados por BASILE et al. (2005). Ao contrário, apresentam

valores de CIM semelhantes às metilxantinas comerciais (CIM>200 µg/mL) estudadas por BAZZAZ et al. (2016). A diferença entre os resultados encontrados por BASILE et al. (2005) pode estar associada a diferentes componentes presentes no extrato etanólico e ausentes nos extratos utilizados neste trabalho. Contudo, a atividade bacteriostática encontrada no EB e na FAE de *P. cupana* (CIM=250 µg/mL em todas as cepas avaliadas) pode estar relacionada à presença de catequina e epicatequina (BAZZAZ et al., 2016) que associada às metilxantinas presentes no EB e na FAE podem ter reduzido o efeito bacteriostático. O período da coleta das sementes bem como a forma de obtenção dos extratos são fatores que também podem estar contribuindo para a diferença de resultados da atividade antibacteriana de *P. cupana* (MACIEL et al., 2002).

Os extratos das cascas de *T. catigua* geralmente apresentam em sua composição compostos fitoquímicos como, omega-fenil alcanos, omega-fenil ácidos alcanóicos, omega-fenil-gama-lactonas, alquil-gama-lactonas, alquenil-gama-lactonas, ácidos graxos, β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, epicatequinas, cinchonainas (Ia, Ib, IIa, IIb), catiguaninas A e B, procianidinas B2 e C1, taninos e uma mistura de flavolignanas (KAMDEM et al., 2012). Algumas dessas substâncias são importantes por apresentar atividade antibacteriana já identificada, como por exemplo, as flavolignanas: cinchonaína Ia e Ib encontradas na FAE, as quais possuem atividade bactericida contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (PIZZOLATI et al., 2002). Essas substâncias, isoladas da FAE por estes autores obtiveram melhor atividade frente às bactérias Gram-positivas quando comparada a atividade nas bactérias Gram-negativas. Resultados semelhantes foram apresentados neste trabalho, onde o extrato bruto e frações das cascas de *T. catigua*, em evidência a FAE que possui a substância cinchonaína Ib (GODINHO et al., 2017), apresentaram atividade bacteriostática frente a cepas de MSSA e MRSA demonstrando seu potencial bacteriostático.

Portanto, após esta criteriosa análise, fica clara a importância da busca por novas alternativas terapêuticas que possam contribuir no tratamento das mais diferentes desordens humanas.

## 7 CONCLUSÃO

- Os extratos, frações e sub-frações de rizomas de *Limonium brasiliense* não apresentaram citotoxicidade em PBMCs de indivíduos sadios e esplenócitos de camundongos Balb/c até 100 µg/mL. Da mesma forma, a EGCG, SamA e SamB não apresentaram citotoxicidade em células Vero. Igualmente, o extrato bruto e frações de *P. cupana* e *T. catigua* também não apresentaram citotoxicidade em PBMCs e esplenócitos de camundongos Balb/c, assim como a Cinchonaina Ib não foi citotóxica em células Vero;

- Todos os materiais das três plantas avaliadas apresentaram características imunomoduladora por inibir a liberação de citocinas inflamatórias. Portanto, possuem potencial imunomodulador;

- O extrato e frações de *Limonium brasiliense* apresentaram citotoxicidade nas linhagens testadas, porém, a FAE apresentou melhores resultados. Como consequência, as sub-frações obtidas da FAE também mostraram potencial antineoplásico, em especial nas linhagens HL-60 e MOLT-4. As substâncias isoladas da FAE, EGEG, SamA e SamB apresentaram citotoxicidade em K562, porém a SamA apresentou melhor potencial antineoplásico. A FAE de *Paullinia cupana* apresentou atividade antineoplásica apenas contra HL-60, assim como a FAE de *Trichilia catigua* que também apresentou atividade antineoplásica para HL-60. Cinchonaina Ib apresentou citotoxicidade em K562;

- As sub-frações F, G e K induziram morte por apoptose na linhagem K562, especialmente a sub-fração G que apresentou maior percentual de células apoptóticas que a citarabina. Já em MOLT-4 as sub-frações G, H e K induziram morte por necrose, porém em menor quantidade que a citarabina. A SamA não induziu apoptose em K562 após 48h de tratamento;

- As sub-frações C, D e F de *L. brasiliense* impediram significativamente a migração de células PANC-1, conferindo a elas um potencial antimigratório;

- As sub-frações C, D e F de *L. brasiliense* conseguiram inibir o crescimento de clones de células PANC-1, porém a sub-fração F obteve melhor resultado;

• Os extratos e frações de *L. brasiliense* e *T. catigua* apresentaram atividade bacteriostática contra MSSA e MRSA. As sub-frações C e K de *L. brasiliense* possuem atividade bactericida contra MSSA e *E. coli*. As sub-frações H e J são bactericidas frente à MRSA. *P. cupana* não apresentou atividade antibacteriana.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. P.; ASSUNÇÃO, M. Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration (Review). **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 1, p. 4-14, 2012.

ÂNGELO, P. C. S.; NUNES-SILVA, C. G.; BRÍGIDO, M. M.; AZEVEDO, J. S.; ASSUNÇÃO, E. N.; SOUSA, A. R.; PATRÍCIO, F. J.; REGO, M. M.; PEIXOTO, J. C.; OLIVEIRA, W. P. JR.; FREITAS, D. V.; ALMEIDA, E. R.; VIANA, A. M.; SOUZA, A. F.; ANDRADE, E. V.; ACOSTA, P. O.; BATISTA, J. S.; WALTER, M. E.; LEOMIL, L.; ANJOS, D. A.; COIMBRA, R. C.; BARBOSA, M. H.; HONDA, E.; PEREIRA, S. S.; SILVA, A.; PEREIRA, J. O.; SILVA, M. L.; MARINS, M.; HOLANDA, F. J.; ABREU, R. M.; PANDO, S. C.; GONÇALVES, J. F.; CARVALHO, M. L.; LEAL-MESQUITA, E. R.; DA SILVEIRA, M. A.; BATISTA, W. C.; ATROCH, A. L.; FRANÇA, S. C.; PORTO, J. I.; SCHNEIDER, M. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; BRAZILIAN AMAZON CONSORTIUM FOR GENOMIC RESEARCH (REALGENE) Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 117-124, 2008.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Isis Ediciones, 1998. 1039 p.

ANVERSA, A. M.; ROGALSKI, F.; BARBISAN, F.; ASSMAN, C. E.; AZZOLIN, V. F.; SEEHABER, A. D.; CAPELETTO, D.; CARDENAS, G.; ROSA, B. S.; DA CRUZ, I. B. M. The in vitro effect of guarana (*Paullinia cupana*) extract on human peripheral blood mononuclear cells exposed to a high glucose level. **Diabetology ; Metabolic Syndrome**. v. 7, p. 11-18, 2015.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AIYEGORO, O.; ADEWUSI, A.; OYEDEMI, S.; AKINPELU, D.; OKOH, A. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azela Africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 7, p. 4477-4487, 2011.

AWAD, E.; AWAAD, A. S.; ESTEBAN, M. A. Effects of dihydroquercetin obtained from deodar (*Cedrus deodara*) on immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish ; Shellfish Immunology**, v. 43, n. 1, p. 43-50, 2015.

BABY, A. R.; MIGLIATOII, K. F.; MACIELI, C. P. M.; ZAGUEI, V.; PINTOI, C. A. O.; SALGADOII, H. R. N.; KANEKOI, T. M.; VELASCOI, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 405-412, 2007.

BARRALES-CUREÑO, H. J. Aplicaciones farmacológicas y producción biotecnológica in vitro de los alcaloides anticancerígenos de *Catharanthus roseus*. **Biotecnología Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 1101-1110, 2015.

BARBOSA, N. R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 11, p. 942-944, 2004.

BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M. D.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.

BELKHIR, M.; REBAI, O.; DHAOUADI, K.; CONGIU, F.; TUBEROSO, C. I.; AMRI, M.; FATTOUCH, S. Comparative analysis of Tunisian wild *Crataegus azarolus* (Yellow azarole) and *Crataegus monogyna* (Red azarole) leaf, fruit and traditionally derived syrup: phenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities on the aqueous-acetone extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9594-9601, 2013.

BELTRAME, F. L.; FILHO, E. R.; BARROS, F. A.; CORTEZ, D. A.; CASS, Q.B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonin Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1, p. 257-263, 2006.

BERTINO, J. R. Irinotecan for colorectal cancer. **Seminars Oncology**, v. 24, p. S18-S23, 1997.

BERRY, A. C.; NAKSHABENDI, R.; ABIDALI, H.; ATCHANEEYASAKUL, K.; DHOLARIA, K.; JHONSON, C.; KISHORE, V. A.; BALTZ, A. C. Adverse Effects of Grape Seed Extract Supplement: A Clinical Case and Long-Term Follow-Up. **Journal of Dietary Supplements**, v.13, n. 2, p. 232-235, 2016.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6, p. 499-503, 2003.

BIN-HAFEEZ, B.; AHMAD, I.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 75, n. 1, p. 13-18, 2001.

BITTENCOURT, L. S. MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; DOS SANTOS, G. F.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; SOARES, F. A.; BARBISAN, F.; ATHAYDE, M. L.; CRUZ, I. B. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 119-125, 2013.

BLAINSKI, A. Estudos farmacognósticos, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. (Plumbaginaceae) – Baicuru. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2010.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.

BLAINSKI, A.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; GODOY, G.; LEITE, E. V. S.; DE MELLO, J. C. P. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p.162-169, 2017.

BELKHIR, M.; REBAI, O.; DHAOUADI, K.; CONGIU, F.; TUBEROSO, C. I.; AMRI, M.; FATTOUCH, S. Comparative analysis of Tunisian wild *Crataegus azarolus* (yellow azarole) and *Crataegus monogyna* leaf, fruit and traditionally derived syrup: phenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities os the aqueous-acetone extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, n. 40, p. 9594-601, 2013.

BONASSOLI, V. T.; MICHELI, CHASSOT, J.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C. P.; DE OLIVEIRA, R. M. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-

acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 179-184, 2012.

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.

BRAGA, C. M. Histórico da utilização de plantas medicinais. **Monografia**. Licenciatura em Biologia, Brasília, 2011.

BRAICU, C.; GHERMAN, C. D.; IRIMIE, A.; BERINDAN-NEAGOE, I. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behavior of triple negative breast cancer cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, n. 1, p. 632–637, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>> Acessado em: Dezembro de 2015.

BRUYNE, T.D.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.27, n.4, p. 445-459, 1999.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 21, n. 3, p. 535-538, 1987.

CADET DE GASSICOURT, C. L. Sur le Guarana. **Journal de Pharmacie et des Sciences**, v. 6, p. 259-260, 1817.

CALEARE, A. O. HENSEL, A.; MELLO, J. C.; PINHA, A. B.; PANIZZON, G. P.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; NAKAMURA, C. V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. **Fitoterapia**, v. 118, p.87-93, 2017.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L. B.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 757-764, 2004.

CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 1, p. 45-53, 2005.

CANICEIRO, B. D. Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos bioativos na modulação da resposta imune. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2012.

CARDOSO, M. L. C. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): desenvolvimento galênico de extratos. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guarana. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 691-701, 1997.

CARNEIRO, N. M. Fundamentos da acupuntura médica. **Florianópolis: Editora Sistema**, p. 709, 2001.

CHACKO, S. M.; THAMBI, P. T.; KUTTAN, R.; NISHIGAKI, I. Beneficial effect of green tea: a literature review. **Chinese Medicine**, v. 5, 2010.

CHASSOT, J. M., LONGHINI, R., GAZARINI, L., MELLO, J. C., de OLIVEIRA, R. M. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.11, p.1143–1148, 2011.

CHEN, F.; YE, X.; YANG, Y.; TENG, T.; LI, X.; XU, S.; YE, Y. Proanthocyanidins from the bark of *Metasequoia glyptostroboides* ameliorate allergic contact dermatitis through directly inhibiting T cells activation and Th1/Th17 responses. **Phytomedicine**, v. 22, p. 510-515, 2015.

CHEN, X. X.; LAM, K. H.; CHEN, Q. X.; LEUNG, G. P.; TANG, S. C. W.; SZE, S. C., XIAO, J. B.; FENG, F.; WANG, Y.; ZHANG, K. Y.; ZHANG, Z. J. Ficus virens proanthocyanidins induced apoptosis in breast cancer cells concomitantly ameliorated 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p.49-61, 2017.

CHU, C.; DEND, J.; MAN, Y.; QU, Y. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. **BioMed Research International**, v. 2017, 9 pages, 2017.

CARVALHO, L. V. N.; CORDEIRO, M. F.; LINS E LINS, T. U.; SAMPAIO, M. C. P. D.; MELLO, G. S. V.; COSTA, V. C. M.; MARQUES, L. L. M.; KLEIN, T.; MELLO, J. C. P.; CAVALCANTI, I. M. F.; PITTA, I. R.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Evaluation of Antibacterial, Antineoplastic, and Immunomodulatory Activity of *Paullinia cupana* Seeds Crude Extract and Ethyl-Acetate Fraction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 7 pages, 2016.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C. Geographical distribution and associated environments characterisation of catuba (*Trichilia catigua* A. Juss.-Meliaceae) in Paraná State-Brazil. In: International Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant 576. 2001. p. 25-28.

CORSON, T. W.; CREWS, C. M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 769-774, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CREEMERS, G. J.; BOLIS, G.; GORE, M.; SCARFONE, G.; LACAVE, A. J.; GUASTALLA, J. P.; DESPAX, R.; FAVALLI, G.; KREINBERG, R.; VAN BELLE, S.; HUDSON, I.; VERWEIJ, J.; TEN BOKKEL HUININK, W. W. Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: results of a large European phase II study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 12, p. 3056-3061, 1996.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**. v. 26, p. 343–356, 2005.

DA FONSECA, C. A. S. LEAL, J.; COSTA, S. S.; LEITÃO, A. C. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 321, n. 3, p. 165-173, 1994.

DALONSO, N.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. Guarana powder polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1804-1812, 2012.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2014.

DE AZEVEDO CALLOU, M. J.; MENDONÇA, R. C.; FEITOSA, T. R.; ARRUDA, F. V. F.; NASCIMENTO, M. S.; GUSMÃO, N. B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca da Mimosa caesalpinifolia Benth (Sabiá). **Scientia plena**, v. 8, n. 1, 2012.

DE JESUS, N. Z.; DE SOUZA FALCÃO, H.; GOMES, I. F.; DE ALMEIDA LEITE, T. J.; DE MORAIS LIMA, G. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; DE ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, P. 3203-3228, 2012.

DEL GIGLIO, A.; DEL GIGLIO, A. Using *Paullinia cupana* (Guaraná) to Treat Fatigue and Other Symptoms of Cancer and Cancer Treatment. **Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease**. Chapter 6, 2015.

DE LIMA PORTELLA, R.; BARCELOS, R. P.; DA ROSA, E. J.; RIBEIRO, E. E.; DA CRUZ, I. B.; SULEIMAN, L.; SOARES, F. A. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2013.

DING, G.; ZHANG, D.; YU, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, L. Genetic identification and relationship analysis of medicinal Limonium by rDNA ITS sequence, single nucleotide polymorphism (SNP) and amplification refractory mutation system (ARMS). **Journal Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 4535-4539, 2012.

DU, G.J.; ZHANG, Z. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. **Nutrients**. v. 4, p. 1679–1691, 2012.

DUKE, J. A. Handbook of Phytochemical Constituent Grass, Herbs and other Economic Plants. CRC press, 1992.

DUTRA, M. G. Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás. **Centro Universitário de Anápolis Unievangélica**, 2009.

EL-SEEDI, H.R.; NORIKO, S.; TORSSELL, K. B. G.; NISHIYAMA, S. New labdene diterpenes from Eupatorium glutinosum. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 728–729, 2002.

ETHUR, L. Z. JOBIM, J. C.; RITTER, J. G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B. S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui–RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 121-8, 2011.

FANTINI, M.; BENVENUTO, M.; MASUELLI, L.; FRAJESE, G. V.; TRESOLDI, I.; MODESTI, A.; BEI, R. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 9236-9282, 2015.

FARTHING, M. J. G. Novel targets for the pharmacotherapy of diarrhoea: a view for the millennium. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.15, p. 38-45, 2000.

FENNER, R.; BETTII, A. H.; MENTZII, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FERNANDES, I.; PÉREZ-GREGORIO, R.; SOARES, S.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. **Molecules**, v. 22. n. 292, 60 pages, 2017.

FERNANDES, T. G.; FERNANDES, T. G.; DE MESQUITA, A. R. C.; RANDAU, K. P.; FRANCHITTI, A. A.; XIMENES, E. A. In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

FERNANDO, W.; RUPASINGHE, H. P. V. Anticancer properties of phytochemicals present in medicinal plants of North America. Using Old Solutions to New Problems—Natural Drug Discovery in the 21st Century, Kulka M (ed). InTech: Croatia, 2013.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 591, n. 1, p. 8-15, 2005.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis (Rio J.)**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FILOCHE, G.; PINTON, F. Who owns Guaraná? Legal strategies, development policies and agricultural practices in Brazilian Amazonia. **Journal of Agrarian Change**, v. 14, n. 3, p. 380-399, 2014.

FIOR, C. S.; BERTOGLIO, D. D.; MACIEL, V. S.; GLOVACKI, B. G. Aspectos reprodutivos e caracterização ambiental de populações de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. pg. 768-770, 2008.

FOWLER, M. W.; SCRAGG, A. H. The Wolfson Institute of Biotechnology, University of Sheffield. **Plant Cell Biotechnology**, v. 18, p. 165, 2013.

FREEDMAN, L. P.; COCKBURN, I. M.; SIMCOE, T. S. The economics of reproducibility in preclinical research. **PLoS Biology**, v. 13, n. 6, p. e1002165, 2015.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro. 2008. 300f. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guarana, increases survival of ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.

FUZER, A.M. Effects of limonoid cedrelone on MDA-MB-231 breast tumor cells in vitro. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. v.13, p. 1645-53, 2013.

GALVÃO, S. M. P.; MARQUES, L. C.; OLIVEIRA, M. G.; CARLINI, E.A. Heteropterys aphrodisiaca (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 305-311, 2002.

GODINHO, J.; DE OLIVEIRA, R. M. W.; DE SA-NAKANISHI, A. B.; BACARIN, C. C.; HUZITA, C. H.; LONGHINI R., MELLO, J. C. P. NAKAMURA, C. V.; PREVIDELLI, I. S.; DAL MOLIN RIBEIRO, M. H.; MILANI H. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation

after global cerebral ischemia in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 337, p. 173-182, 2017.

GU, G.; BARONE, I.; GELSOMINO, L.; GIORDANO, C.; BONOFILIO, D.; STATTI, G.; MENICHINI, F.; CATALANO, S.; ANDÒ, S. *Oldenlandia diffusa* extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ERa/Sp1-mediated p53 activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, p. 3363-3372, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAMERSKI, L.; SOMNER, G. V.; TAMAIO, N. *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae): a review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 2221-2229, 2013.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. **Elsevier Health Sciences**, 2012.

HERTZ, E.; CADONÁ, F. C.; MACHADO A. K.; AZZOLIN, V.; HOLMRICH, S.; ASSMANN, C.; LEDUR, P.; RIBEIRO, E. E.; DE SOUZA FILHO, O. C.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; DA CRUZ I. B. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Clinical Oncology**. v. 3, p. 37-43, 2015.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.97, p. 1027–1031, 2002.

IKIGAI, H.; NAKAE, T.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1147, p.132-136, 1993.

INTHUWANARUD, K.; SANGVANICH, P.; PUTHONG, S.; KARNCHANATAT, A. Antioxidant and antiproliferative activities of protein hydrolysate from the rhizomes of Zingiberaceae plants. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 29, n.6, p. 1893-1900, 2016.

ITO, H. KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y., LI, S. H.; HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; KUSAMA, K.; SATOH, K.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; ITOH, Y.; YOSHIDA, T. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 48, p. 687-93, 2000.

ITOKAWA, H.; WANG, X.; LEE, K.-H. Homoharringtonine and related compounds. **Anticancer Agents from Natural Products**. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor ; Francis Group, Boca Raton, FL, p. 47-70, 2005.

JABRI, M.A. Antidiarrhoeal, antimicrobial and antioxidant effects of myrtle berries (*Myrtus communis* L.) seeds extract. **J Pharm Pharmacol**. v. 68, n. 2, p. 264-74, 2016.

JAHNS, R. T.; CRESCENTE, A. S. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluído de *Limonium statice* brasiliense Boiss, e N-acetil-p-aminofenol em musculatura lisa. **Trib. Farm. Curitiba**, v. 44, n. 1-2, p. 105-111, 1976.

JIPPO, T.; KOBAYASHI, Y.; SATO, H.; HATTORI, A.; TAKEUCHI, H.; SUGIMOTO, K.; SHIGEKAWA, M. Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous anaphylaxis and mast cell degranulation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 9, p. 2110-2112, 2009.

JONES, W.P.; KINGHORN, D.A. Em: *Natural products isolation* (Methods in Biotechnology); Sarker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I., Eds.; **Humana Press: Totowa, New Jersey**. v. 20, p. 323-351, 2005.

JUNIOR, V.F. V.; PINTO, A.o C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KAISER, H. [From the plant to chemistry--the early history of" rheumatic medication"]. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 67, n. 3, p. 252-262, 2008.

KAMDEM, J. P.; STEFANELLO, S. T.; BOLIGON, A. A.; WAGNER, C.; KADE, I. J.; PEREIRA, R. P.; PRESTE ADE, S.; ROOS, D. H.; WACZUK, E. P.; APPEL, A. S.; ATHAYDE, M. L.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 3, p. 371-382, 2012.

KATERERE, D.R., GRAY, A.I., NASH, R.J., WAIGH, R.D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from *African Combretaceae*. **Phytochemistry**. v. 63, p. 81-88, 2003.

KELLY, G. S.; Nutritional and Botanical Interventions to Assist with the Adaptation to Stress. **Alternative Medicine Review**, v. 4, n. 4, p. 249-265, 1999.

KHAN, M.A.; HUSSAIN, A.; SUNDARAM, M. K.; ALALAMI, U.; GUNASEKERA. D.; RAMESH, L.; HAMZA, A.; QURAISHI, U. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. **Oncology Reports** v. 33, n. 4, p. 1976-84, 2015.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KIM, I.B.; KIM, D.Y.; LEE ET AL, S.J. "Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and A549 epithelial cells," **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.29, n. 6, p.1120–1125, 2006.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KLAUSMEYER, P. et al. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products** v.67, p.1732–1735, 2004.

KLAYMAN, Daniel L. et al. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 715-717, 1984.

KLEIN, T.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502-506, 2012.

KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 3-4, p. 569-577, 2007.

KOH, Y. W.; CHOI, E. C.; KANG, S. U.; HWANG, H. S.; LEE, M. H.; PYUN, J.; PARK, R.; LEE, Y.; KIM, CH. Green tea (–)epigallocatechin-3-gallate inhibits HGF-induced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/c-Met. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 11, p. 1074-1083, 2011.

KUSHIMA, Y.; LIDA, K.; NAGAOKA, KAWARATANI, Y., SHIRAHAMA, T.; SAKAGUCHI, M.; BABA, K.; HARA, Y.; UESATO, S. Inhibitory effect of (–)epigallocatechin and (–)epigallocatechin gallate against heregulin  $\beta$ 1-induced migration/invasion of the MCF-7 breast carcinoma cell line. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n.5, p. 899-904, 2009.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A. A.; TRONCOSO, G. A. M. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v. 12, n. 2, p. 45-52, 2005.

KWAK, I.-H.; SHIN, Y.-H.; KIM, M.; CHA, H.Y.; NAM, H.-J.; LEE, B.-S.; CHAUDHARY, S. C.; PAI, K.-S.; LEE, J.-H. Epigallocatechin-3gallate inhibits paracrine and autocrine hepatocyte growth factor/scatter factor-induced tumor cell migration and invasion. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 43, n. 2, p. 111-120, 2011.

LAGOS, J. B.; MIGUEL, O. G.; DUARTE, M. R. Caracteres anatómicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 185, 2007.

LAI, H. Y.; LIM, Y. Y.; KIM, K.. H. Isolation and Characterisation of a Proanthocyanidin With Antioxidative, Antibacterial and Anti-Cancer Properties from *Fern Blechnum orientale*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 49, p. 31-37, 2017.

LANDIS-PIWOWAR, K.; CHEN, D.; FOLDES, R.; CHAN, T. H.; DOU, Q. P. Novel epigallocatechin gallate analogs as potential anticancer agents: a patent review (2009 – present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 2, 2013.

LATHA, P. G.; EVANS, D. A.; PANIKKAR, K. R.; JAYAVARDHANAN, K. K. Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds. **Fitoterapia**, v. 71, n. 3, p. 223-231, 2000.

LEITE, R. P.; WADA, R. S.; MONTEIRO, J. C.; PREDES, F. S.; DOLDER, H. Protective effect of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological trace element research**, v. 141, n. 1-3, p. 262-274, 2011.

LI, Y.; FU, X.; DUAN, D.; LIU, X.; XU, J.; GAO, X. Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. **Mar Drugs**. v. 21. p. 1-15, 2015.

LIN, L.C.; KUO, Y.C.; CHOU, C.J. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and a new flavanone from the root of *Limonium sinense*. **Planta Medica**. v. 66, n. 4, p. 333-6, 2000.

LIN, F., HASEGAWA, M., KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** v.67, p. 2154–2159, 2003.

LIPINSKA, L.; KLEWICHA, E.; SÓJKA, M. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. **Acta Scientiarum Polorum Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 289-299, 2014.

LONGHINI, R.; KLEIN, T.; BRUSCHI, M. L.; DA SILVA, W. V. JR.; RODRIGUES, J.; LOPES, N. P.; DE MELLO, J. C. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of separation science**, v. 36, n. 7, p. 1247-1254, 2013.

LONGHINI, R.; LONNI, A. A. S. G.; SEREIA, A. L.; KRZYZANIAK, L. M.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, 254-271, 2017.

LÜ, S.; WANG, J. Homoharringtonine and omacetaxine for myeloid hematological malignancies. **Journal of hematology ; oncology**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.

LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E.; WILLIAMSON, M. P.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry**, v. 37, p. 357-371, 1994.

MACHADO, K. N.; DE FREITAS, A. A.; CUNHA, L. H.; FARACO, A. A. G. F.; DE PÁDUA, R. M.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; CASTILHO, R. O. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food Chemistry**, Accepted Manuscript, 2018.

MACHADO, T.B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C.; LEAL, I. C.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOSSANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 279–284, 2003.

MACHANA, S. Synergistic anticancer effect of the extracts from *Polyalthia evecata* caused apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, p. 589-596, 2012.

MADHURI, S.; PANDEY, G. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. **Current science**, v. 96, n. 6, p. 779-783, 2009.

MAJHENIČ, LUCIJA; ŠKERGET, MOJCA; KNEZ, ŽELJKO. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature (Review). **Biomedical Reports**, v. 6, p. 612-614, 2017.

MANTENA, S. K.; ROY, A. M.; KATYAR, S. K.; Epigallocatechin3-gallate inhibits photocarcinogenesis through inhibition of angiogenic factors and activation of CD8+ T cells in tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 5, p. 1174–1179, 2005.

MARÍN, L.; MIGUÉLEZ, EM.; VILLAR, C.J.; LOMBÓ, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. **BioMed Research International**. 2015: 905215, 2015.

MARQUES, L. L.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A.; SIMIONATO, A. S.; CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, A. G.; GUEDES, T. A.; MELLO, J. C. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. **Food Chemistry**. v. 212, p. 703-711, 2016.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-116, 1998.

MEDINI, F.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ABDELLY, C.; KSOURI, R. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 65-72, 2014.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; SINGH, V. K. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 7, p. 987-996, 2002.

MELLO, J.; KLEIN, T.; LOPES, G. Application of an HPLC method for analysis of the extract from *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Planta Medica**, v. 76, n. 12, p. P266, 2010.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos, em: Farmacognosia do produto natural ao medicamento. Simões, C.M.O. et al. (Eds). **Artmed**, Porto Alegre. p. 235-248, 2017.

MENA, P.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; GIRONÉS-VILAPLANA, A.; BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VILLAÑO, D. Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation. **IUBMB Life**. v. 66, p. 745–758, 2014.

MENDES, F. R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 754-763, 2011.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007.

MICALI, S.; ISGRO, G.; BIANCHI, G.; MICELI, N.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M. Cranberry and recurrent cystitis: more than marketing? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 1063-1075, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA, 2014. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rdc0026_13_05_2014.pdf?MOD=AJPERES)> Acessado em 10 de dezembro de 2015.

MIRANDA, M. V.; METZNER, B. S. *Paullinia cupana*: revisão da matéria médica. **Revista de Homeopatia**, v. 73, n. 1/2, p. 1-17, 2010.

MOBOT, 2015. Angiosperm Phylogeny Website, Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acessado em 13 de dezembro de 2015

MOLLER, C.; HANSEN, S. H.; CORNETT C. Characterisation of tannins- containing herbal drugs by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 3, p.231-239, 2009.

MONTEIRO, Mário Ypiranga. **Antropogeografia do guaraná**. Presidência da República, Conselho Nacional de Pesquisas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1965.

MOURA, T. F. A. L. SCHENKEL, E. P.; SIMOES, C. M. O.; SANTOS, R. I.; SCHAPOVAL, E. E. S. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (baicuru). **Caderno de farmácia. Porto Alegre, RS**, 1985.

MOURA, T. F. A. L. Sobre o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, o baicuru (in portuguese). M.S. Thesis, Federal University of Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Brazil, 1984.

MURRAY, A. P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M. A.; TOMAS, M. A.; MULET, M. C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 7-8, p. 477-480, 2004.

MURUGESAN, D.; DEVIPONNUSWAMY, R. Potential anti-inflammatory medicinal plants – a review. **Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2014.

MUKHERJEE, P. K.; NEMA, N. K.; BHADRA, S.; MUKHERJEE, D.; BRAGA, F. C.; MATSABISA, M. G. Immunomodulatory leads from medicinal plants. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 13, n. 2, p. 235-256, 2014.

NAGAI, K.; JIANG, M. H.; HADA, J.; NAGATA, T.; YAJIMA, Y.; YAMAMOTO, S.; NISHIZAKI, T. (-)-Epigallocatechin gallate protects against NO stress-induced neuronal damage after ischemia by acting as an anti-oxidant. **Brain Research**, v. 956, n. 2, p. 319-322, 2002.

NAGLEA, D.G.; FERREIRAA, D.; ZHOUA, Y-D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. **Phytochemistry**. v. 67, n. 17, p. 1849–1855, 2006.

NATH, O.; ARCHANA, S.; INDRAKANT, K. S. In-Silico Drug Discovery Approach Targeting Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 1 for Cancer Treatment. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1029, 2017.

NAVARRO, M.; ZAMORA, W.; QUESADA, S.; AZOFEIFA, G.; ALVARADO, D.; MONAGAS, M. Fractioning of Proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa*. Composition and Structure-Bioactivity Relationship. **Antioxidants**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.60-76, 28 jul. 2017

NAYAK, S.; CHAPHEKAR, M.; VAIDHUN, B. Ethnobotanical review of *Trichilia catigua* A. Juss. **Annals of Plant Sciences**, v. 2, n. 11, p. 497-502, 2013.

NETEA, M. G.; VAN DE VEERDONK, F. L.; VAN DER MEER, J. W.; DINARELLO, C. A.; JOOSTEN, L. A. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 49-77, 2015.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NOORMANDI, A.; DABAGHZADEH, F. Effects of green tea on *Escherichia coli* as a uropathogen. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.5, p. 15-20, 2015.

OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; ADENIJI, A. J. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 494, p. 1-10, 2017.

OLIVEIRA, E. R. N. Características morfofisiológicas e bioquímicas de clones de guaraná *Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke cultivados sob plantio comercial na Amazônia. Manaus: **Tese de Doutorado** (Ciências Biológicas (Botânica)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2010.

OLIVEIRA, C. H.; MORAES, M. E.; MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama®) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 1, p. 54-57, 2005.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R.; MARTINS, J. V.; SELA, V. R.; DE MELLO, J. C.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 531-535, 2007.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—

Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules**. v. 16, p. 2191–2217, 2011.

PARK, J. P.; KIM, J. H.; PARK, M. K.; YUN, J. W. Potential agents for cancer and obesity treatment with herbal medicines from the Green Garden. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 1065-1076, 2011.

PAN, L.; CHAI, H.-B.; KINGHORN, A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 4, p. 142, 2012.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 50-52, 2005.

PESCA, M.S.; DAL PIAZ, F.; SANOGO, R. et al. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antiangiogenetic activities. **Journal of Natural Products** v. 76, p. 29–35, 2013.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. B.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMÂNIA, A. JR.; SMÂNIA EDE, F.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 5-6, p. 483-488, 2002.

POMPILHO, W. M. BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE: AS FLORESTAS BRASILEIRAS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS COM PROPRIEDADES ANTITUMORAIS. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 1, n. 1, 2013

POTMESIL, M.; PINEDO, H. M. **Camptothecins new anticancer agents**. CRC Press, 1994.

RACHH, Punit. et al. Immunomodulatory Medicinal Plants: A Review, 2014.

RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIĆ, P. D.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. Z.; STOJANOVIĆ, N. M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 7, p. 932-952, 2013.

RAMJAK, D.; ROMANCZYK, L. J.; METHENY-BARLOW, L. J.; THOMPSON, N.; KNEZEVIC, V.; GALPERIN, M.; RAMESH, A.; DICKSO, R. B. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, p. 537-546, 2005.

RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREITD, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2087-2093, 2011.

RODRIGUES, M. J.; SOSZYNSKI, A.; MARTINS, A.; RAUTER, A. P.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 315-322, 2015.

RONCON, C. M.; BIESDORF DE ALMEIDA, C.; KLEIN, T.; DE MELLO, J. C.; AUDI, E. A. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. **Planta medica**, v. 77, n. 3, p. 236, 2011.

ROWINSKY, E. K.; CAZENAVE, L. A.; DONEHOWER, R. C. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 15, p. 1247-1259, 1990.

SAITO, A. Challenges and complexity of functionality evaluation of flavan-3-ol derivatives. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 81, n. 6, p.1055-1060, 2017.

SALINAS-SÁNCHEZ, D.O.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, V.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; TORTORIELLO, J.; HERRERA-RUIZ, M. Anti-Inflammatory Activity of a Polymeric Proanthocyanidin from *Serjania schiedeana*. **Molecules**, v.22, n.6, p. 863, 2017.

SANO, T.; NAGAYASU, S.; SUZUKI, S.; IWASHITA, M.; YAMASHITA, A.; SHINJO, T.; SANUI, T.; KUSHIYAMA, A.; KANEMATSU, T.; ASANO, T.; NISHIMURA F. Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 27, n. 3, p. 249-259, 2017.

SANCHEZ-TENA, S.; FERNANDES-CACHÓN, M. L.; CARRERAS, A.; MATEOS-MARTÍN, M. L.; COSTOYA, N.; MOYER, M. P.; NUÑEZ, M. J.; TORRES, J. L.; CASCANTE, M. Hamamelitannin from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) displays

specific cytotoxic activity against colon cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 75, n.1, p.26-33, 2012.

SARAIVA, R. M. C. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, 2012.

SCHOLEY, A.; HASKELL, C. Neurocognitive effects of guaraná plant extract. **Drugs of the Future**, v. 33, n. 10, p. 869, 2008.

SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.

SEBASTIAN, M.; NINAN, N.; ELIAS, E. **Nanomedicine and Cancer therapies**. CRC Press, 2012.

SEQUEIRA, E. B. Plantas com ação adaptogénica usadas no combate ao stress: *Panax ginseng* e *Rhodiola rosea*. 2013. 42 f. **Monografia** (Especialização) - Curso de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A.M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition ; Food Research**. v. 2, p. 310-29, 2009.

SERTÜRNER, F. W. Über das Morphem, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandteile des Opiums. **Annals of Physics**, v. 25, o. 56-90. 1817.

SHAFI, T.; BANERJEE, S. THE SCREENING OF HERBALS AS IMMUNOMODULATORS IN THERAPEUTICS: A REVIEW. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 6, p. 2265-2269, 2015.

SHANKAR, S.; MARSH, L.; SRIVASTAVA, R. K. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHL1/ FOXO3a and neuropilin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 372, n. 1, p. 83-94, 2013.

SHERIF, A. A.; ABDELHALIM, S. Z.; SALIM, E. I. Immunohistochemical and biochemical alterations following administration of proanthocyanidin extract in rats

hepatocellular carcinoma. **Biomedicine ; Pharmacotherapy**, v.93, p. 1310-1319, 2017.

DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.

SILVA, C. K. M. Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

SILVA, N. M. A fitoterapia na história do Brasil. **Informativo Herbarium Saúde**, n. 29, 2004.

SLAVIERO, L. B. Habitat fragmentation decreased the genetic variability of *Trichilia elegans* A. Juss.(Meliaceae) in southern Brazil. **Silvae Genetica**, v. 63, n. 4, p. 133, 2014.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **Brasilian Journal of Pharmacology**. v. 174, n.11, p.1244-1262, 2017.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guarana's Journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 7, n. 3, p. 279-282, 2010.

SNEADER, W. E. **Drug Discovery (The History)**. John Wiley ; Sons, Inc., 2005.

SOHN, H.Y.; SON, K. H.; KWON, C. S.; KWON, G. S.; KANG, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**. v.11, p. 666–672, 2004.

STOCKFLETH, E.; KERL, H.; ZWINGERS, T.; WILLERS, C. Low-dose 5-fluorouracil in combination with salicylic acid as a new lesion-directed option to treat topically actinic keratoses: histological and clinical study results. **Brasilian Journal of Dermatology**. v. 165, n.5, p.1101-8, 2011.

SURGET, G.; ROBERTO, V. P.; LANN, K. L.; MIRA, S.; GUÉRARD, F.; VINCENT LAIZÉ, V.; POUPART, N.; CANCELA, M. L.; STIGER-POUVREAU, V. Marine green

macroalgae: A source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. **J. Appl. Phycol.** 2016.

TABANCA, N.; PAWAR, R.S.; FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.; KHAN, S.I.; JOSHI, V.; WEDGE, D.E.; KHAN, I.A. Flavan-3-ol-phenylpropanoid conjugates from *Anemopaegma arvense* and their antioxidant activities. **Planta Medica**. v. 73, n. 10, p. 1107-11, 2007.

TACHIBANA, K.; KOGA, K.; FUJIMARA, Y. A receptor for green tea polyphenol EGCG. **Nature Structural ; Molecular Biology**, v. 11, p. 380-381, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Auxina: o hormônio de crescimento. **Fisiologia vegetal**, v. 3, p. 449-484, 2009.

TANAKA, S.; FURUYA, K.; YAMAMOTO, K.; YAMADA, K.; ICHIKAWA, M.; SUDA, M.; MAKABE H. Procyanidin B2 gallates inhibit IFN- $\gamma$  and IL-17 production in T cells by suppressing T-bet and ROR $\gamma$ t expression. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 87-96, 2017.

TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 12, p. 2010-2013, 2007.

TANNIOU, A.; SERRANO LEON, E.; LAURENT, V.; ELENA, I.; MENDIOLA, J. A.; STÉPHANE, C.; NELLY, K.; STÉPHANE, L. B.; LUC, M.; VALÉRIE, S. P. Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. **Talanta**. v. 104, p. 44–52, 2013.

TEDESCHI, E.; MENEGAZZI, M.; YAO, Y.; SUZUKI, H.; FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Green tea inhibits human inducible nitricoxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 $\alpha$  activation. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 111-120, 2004.

THAKUR, V. S.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Green tea polyphenols causes cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells by suppressing class I histone deacetylases. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 377–384, 2012.

THE PLANT LIST, 2015. Disponível em:  
<<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-25400511>>  
Acessado em 24 de novembro de 2015.

TOYN, Y. M.; KHADIJAT, O. F.; SAOBAN, S. S.; OLAKUNLE, A. T.; ABRAHAM, B. F.; LUQMAN Q. A. Antidiarrheal activity of aqueous leaf extract of *Ceratotheca sesamoides* in rats. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 14-20, 2012.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm**, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, 2004.

USHIROBIRA, T.M.A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farm Bonaerense**, v. 26, p. 5–9, 2007.

USHIROBIRA, T. M. A.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. Acute and sub chronic toxicological evaluation of the semi purified extract of seeds of guarana (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food Chemistry Toxicology**, v. 48, p.1817-1820, 2010.

<sup>a</sup>USHIROBIRA, T. M. A.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H. G.; MOURA-COSTA, G. F.; COSTA, M. A.; CAMPOS-SHIMADA, L. B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L.; KANESHIMA, E. N.; BECKER, T. C.; LEITE-MELLO, E. V.; MELLO, J. C. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 293-298, 2015.

<sup>b</sup>USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; GANCEDO, N. C.; GABURO, F.; CARDOSO, K. A. K.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 320-327, 2015.

VENKATESH, S.; DEECARAMAN, M.; KUMAR, R.; SHAMSI, M. B.; DADA, R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 2, p. 127-37, 2009.

VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M.; HAMMAN, J. H. Natural products in anti-obesity therapy. **Natural product reports**, v. 28, n. 9, p. 1493-1533, 2011.

VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

VIUDA-MARTOS, M.; CIRO-GÓMEZ, G. L.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; ZAPATA-MONTOYA, J. E.; SENDRA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. In vitro antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 4, p. 399-406, 2012.

WAISSE, S.; TARCITANO FILHO, C. M. Opium before morphine: the elusive quest for the active principle of drugs. **Circumscribere: International Journal for the History of Science**, v. 16, p. 93-102, 2015.

WALKER, T. H.; CHAAR, J. M.; MEHR, C. B.; COLLINS, J. L. The chemistry of Guaraná: Guaraná, Brazil's Super-Fruit for the Caffeinated Beverages Industry. **ACS Symposium Series**. p. 305-314, 2000.

WANG, C.; LI, J.; SONG, G. L.; NIU, Q.; XU, S. Z.; FENG, G. L.; WANG, H. X.; LI, Y.; LI, S.G.; LI, F. Grape Seed Procyanidin Extract Reduces Arsenic-Induced Renal Inflammatory Injury in Male Mice. **Biomedical and Environmental Sciences**. v. 30, n. 7, p. 535-539, 2017.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

WOODS, D. J. Guarana: *Paullinia cupana*, *P. sorbilis*; also known as Brazilian cocoa and 'zoom'. **Journal of primary health care**, v. 4, n. 2, p. 163-164, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report for Research on Infectious Diseases of Poverty. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**. World Health Organization, 2013.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C.; USHIROBIRA, T. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; DE MELLO, J. C. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1950-1963, 2007.

YOTSU-YAMASHITA, M.; KONDO, S.; SEGAWA, S.; LIN, Y-C.; TOYOHARA, H.; ITO, H.; KONOKI, K.; CHO, Y.; UCHIDA, T. Isolation and structural determination of two novel phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura, and their radical scavenging activities. **Marine Drugs**. v. 11, p. 165–183, 2013.

YUE-ZHONG, S. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

ZHAO, Y.; JIANG, F.; LIU, P. CHEN, W.; YI, K. Catechins containing a galloyl moiety as potential anti-HIV-1 compounds. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 630-635, 2012.

## **ANEXOS**

**Compê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



## **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA, ANTINEOPLÁSICA E ANTIBACTERIANA DE PLANTAS BRASILEIRAS

**Pesquisador:** Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 46976315.9.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.285.288

#### **Apresentação do Projeto:**

A pesquisa "Avaliação da Atividade Imunomoduladora, Antineoplásica e Antibacteriana de Plantas Brasileiras" está sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, professor do Departamento de Bioquímica da UFPE e pesquisador do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT/UFPE) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE), além de mais cinco pesquisadores como membros. O potencial das plantas como fonte de novas drogas ainda oferece grande campo para investigação científica. Mesmo entre as plantas com uso medicinal tradicional ainda há um grande percentual que não foi objeto de estudo visando à comprovação da eficácia e dos mecanismos de ação de seu uso. Neste estudo os pesquisadores se propõem a avaliar as possíveis atividades imunomoduladora, antibacteriana e antineoplásica de plantas brasileiras para compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos. Os extratos das folhas de *Symphytum officinale*, *Plectranthus barbatus*, *Paulinia cupana*, *Limonium brasiliense* e *Trichilia catigua* serão cedidos pelo Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, da Universidade Estadual de Maringá. Serão utilizados nos ensaios o extrato bruto e as frações aquosa e acetato. O projeto tem apoio financeiro do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT\_if) - Processo: 573663/2008-4.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.285.288

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Avaliar possíveis mecanismos de ação associados aos saberes tradicionais de plantas medicinais.

##### **Objetivos Secundários:**

- Avaliar a citotoxicidade de extratos obtidos de plantas brasileiras;
- Investigar a possível modulação de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias por extratos obtidos de plantas brasileiras;
- Analisar efeito antineoplásico por extratos obtidos de plantas brasileiras;
- Avaliar eventual atividade antibacteriana de extratos obtidos de plantas brasileiras.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

A pesquisa oferece risco ao indivíduo durante a punção venosa, para coleta de material biológico, podendo o voluntário adquirir infecções, locais ou sistêmicas, além de hematoma local decorrente da coleta inadequada ou da ausência dos devidos cuidados antes e durante o procedimento. Para minimizar os riscos o local de coleta no braço do voluntário será limpo com álcool e todo material usado na coleta será descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes, orientados para reduzir os riscos.

##### **Benefícios:**

Os benefícios incluem o melhor entendimento da ação das citocinas envolvidas nas doenças inflamatórias, na avaliação do efeito antitumoral e nas infecções bacterianas podendo auxiliar na descoberta de uma nova alternativa para o tratamento destas doenças. Os achados poderão contribuir significativamente com a observação de novas formas terapêuticas naturais, além de minimizar os efeitos colaterais presentes nos fármacos atualmente utilizados melhorando a qualidade de vida de indivíduos acometidos por estas enfermidades.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo está bem fundamentado teoricamente e apresenta referências bibliográficas pertinentes. Serão coletados dois tubos de sangue (2 tubos com heparina como anticoagulante), contendo um total de 18 mL, de 30 voluntários saudáveis para a realização da cultura de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC). Serão incluídos na pesquisa indivíduos voluntários sadios e serão

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

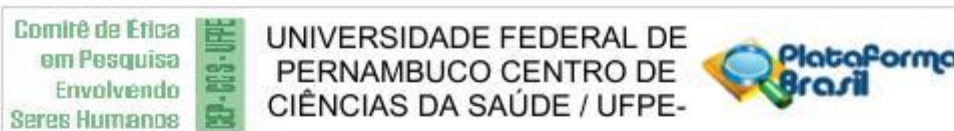
**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.285.288

excluídos voluntários que fazem utilização de medicamentos imunomoduladores e que apresentam doenças de base de cunho inflamatório, podendo estes interferir no resultado da pesquisa. Serão excluídos também indivíduos que apresentem algum sintoma agudo divergente da doença que possam afetar a obtenção de dados quanto às citocinas inflamatórias.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador responsável anexou folha de rosto com assinatura da Chefe do Departamento de Bioquímica da UFPE, projeto de pesquisa, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos ou emancipados, os currículos de todos os pesquisadores envolvidos no projeto e carta de anuência da Chefe do Departamento de Bioquímica, aceitando a pesquisadora para desenvolver o projeto na instituição e carta do responsável pelo financiamento do projeto.

**Recomendações:**

Nenhuma.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.285.288

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                                  | Postagem               | Autor                             | Situação |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_528251.pdf             | 07/10/2015<br>16:37:28 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Respostapendencias.pdf                                   | 07/10/2015<br>16:36:51 | Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | Folhad Rosto2.pdf                                        | 07/10/2015<br>16:31:47 | Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projetodetalhado.doc                                     | 28/09/2015<br>13:13:59 | Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo | Aceito   |
| Outros                                                    | Carta de Anuência Ivan Pitta INCT-if.pdf                 | 08/07/2015<br>15:45:25 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Carta de Anuência Marcia Vanusa.pdf                      | 03/07/2015<br>09:40:47 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Carta de Anuência Ivan Pitta.pdf                         | 03/07/2015<br>09:40:28 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Curriculo Lattes (Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo).pdf | 26/06/2015<br>15:07:26 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Curriculo Lattes (Michelly Cristiny Pereira).pdf         | 26/06/2015<br>15:07:10 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Curriculo Lattes (Marina Ferraz Cordeiro).pdf            | 26/06/2015<br>15:06:40 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Curriculo Lattes (Maira Galdino da Rocha Pitta).pdf      | 26/06/2015<br>10:17:03 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Curriculo Lattes (João Carlos Palazzo de Mello).pdf      | 26/06/2015<br>10:16:51 |                                   | Aceito   |
| Outros                                                    | Curriculo Lattes (Isabella Macário Ferro Cavalcanti).pdf | 26/06/2015<br>10:16:19 |                                   | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx                                                | 26/06/2015<br>09:57:39 |                                   | Aceito   |

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.285.288

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 19 de Outubro de 2015

Assinado por:  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 28 de outubro de 2015.

Ofício nº 109/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo**  
Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino – CCB  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.041556/2015-62

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Avaliação da atividade imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de plantas brasileiras”**.

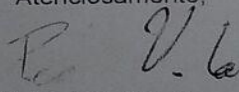
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do LIKA – UFPE;  
Animais: camundongos isogênicos BALB/c; Idade: 38  
a dias; Peso: 20-25g; Sexo: machos; Nº total de  
animais: 40.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Pedro V. Carelli  
Presidente da CEUA / CCB - UFPE  
SIAPE 1801584

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Avaliação da atividade imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de extratos de plantas brasileiras**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: moacyroraculo@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346. Também participam também desta pesquisa: Maira Galdino da Rocha Pitta, Michelly Cristiny Pereira, Marina Ferraz Cordeiro.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

A pesquisa tem como objetivo avaliar possíveis mecanismos de ação associados aos saberes tradicionais de plantas medicinais a fim de encontrar novas alternativas naturais para o tratamento de algumas doenças. A coleta será feita no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) em pessoas saudáveis como você e que serão incluídas no grupo controle da pesquisa. Serão coletados, no braço, 18 mL de sangue (equivalente a dois tubos de sangue contendo heparina como anticoagulante).

Durante a pesquisa será coletado seu sangue uma única vez onde serão aproveitados os elementos que fazem parte do seu sangue para completar os ensaios laboratoriais. A coleta de sangue pode ser desconfortável, o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Para minimizar os riscos, antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes, orientados para reduzir os riscos. O material coletado será processado para o isolamento das células polimorfonucleares sanguíneas que serão cultivadas e tratadas com os extratos das plantas para os ensaios posteriores. Em caso dano físico ao voluntário pela coleta inadequada, o mesmo será assessorado e devidamente assistido pelos membros da equipe de pesquisa.

Os benefícios incluem o melhor entendimento da ação das plantas nas doenças inflamatórias, no câncer e nas infecções bacterianas bem como a descoberta de mecanismos de ação das plantas em indivíduos saudáveis como você. Os resultados desta pesquisa poderão contribuir significativamente com uma nova forma natural de

tratamento minimizando efeitos colaterais e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com estas doenças.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (Nome, assinatura e CPF), ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

---

(Assinatura do Pesquisador)

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu,

\_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Avaliação da atividade imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de extratos de plantas brasileiras, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital  
(opcional)

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):**

|             |             |
|-------------|-------------|
| Nome:       | Nome:       |
| Assinatura: | Assinatura: |