



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MÉDICO-CIRÚRGICAS**

ERALDO SALUSTIANO DE MOURA

POTENCIAL ANTITUMORAL DA *Calotroipis procera* Ait.
in vivo E *in vitro*

**FORTALEZA
2005**

ERALDO SALUSTIANO DE MOURA

POTENCIAL ANTITUMORAL DA *Calotropis procera* Ait.
in vivo E *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

FORTALEZA
2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M885p Moura, Eraldo Salustiano.
Potencial Antitumoral da Calotropis ProceraAIT. IN VIVO E IN VITRO / Eraldo Salustiano Moura. –
2017.
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

1. Calotropis procera Ait. . 2. Extrato hidroalcoólico e etanólico . 3. Potencial antitumoral . 4. Anticâncer..
I. Título.

CDD 615.1

ERALDO SALUSTIANO DE MOURA

POTENCIAL ANTITUMORAL DA *Calotroipis procera* Ait.
in vivo E *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Banca Examinadora

Prof Dr. Manoel Odorico de Moraes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof Dr. Paulo Ferdinando Melo Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof Dr. Lucio Flavio Gonzaga Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA
2005

A Deus, por não deixar fraquejar nos momentos mais difíceis

Ao meus pai (*in memória*)
A minha mãe pelo o esforço, trabalho,
dedicação e exemplo.

A minha esposa Lílian, pela
compreensão dedicação, amor e
inestimável ajuda durante este trabalho.

Aos meus filhos, Lucas e Luana, pelo o
amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. MANOEL ODORICO DE MORAES Professor titular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade concedida, por sua orientação, pelo incentivo e competência com que exerce a vida acadêmica.

A Profa. Dra. CLAUDIA DO Ó PESSOA, que muito contribuiu para elaboração do trabalho, orientando e sempre disponível.

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Professor titular do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, sempre disponível e apoiando com incentivo para elaboração deste manuscrito.

Ao Prof. Dr. LUSMAR VERAS RODRIGUES, Chefe do Departamento de Cirurgia, pela amizade e contribuição científica.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES, pela amizade e contribuição neste trabalho.

A Profa Dra. LETÍCIA VERAS COSTA LATUFO, pela dedicação e ajuda á esta dissertação.

Ao Prof. HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES, pela inestimável ajuda, colaboração, disponibilidade durante a execução deste trabalho.

A Profa. Dra ANA PAULA NEGREIROS, pela ajuda e colaboração deste manuscrito.

A Profa DRA OTILIA DEUSDENIA Loiola, pela ajuda, colaboração deste dissertação.

Ao Prof. Dr. ADRIANO CUNHA, pela contribuição científica na realização deste trabalho

A MARCELLE NOGUEIRA, acadêmica de medicina, por toda ajuda e dedicação nos experimentos.

Á MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA, pela amizade, ajuda, atenção e carinho dedicado durante todo este período.

Á MAGDA FONTENELE DE SOUSA, pela amizade, atenção e ajuda dedicado durante todo este período.

Ao grupo de estudantes, funcionários e professores que compõe o Laboratório de Cirurgia Experimental o meu eterno agradecimento e gratidão.

RESUMO

POTENCIAL ANTITUMORAL DA *Calotropis procera* Ait. *in vitro* E *in vivo* .
Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas. Universidade Federal do Ceará. Orientador; Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Este trabalho avaliou inicialmente a citotoxicidade dos extratos hidroalcoólico de partes aéreas da *Calotropis procera* Ait.f., com as frações hexano, diclorometano e N-butanol, testadas em cinco linhagens de células tumorais (HL-60, CEM, MCF-7, HCT-8 e B-16) através do método MTT e a ação antimitótica em ovos do ouriço do mar com controle positivo da doxorubicina. Também foi estudada a ação do extrato etanólico do caule com as frações: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, usando o método MTT em quatro linhagens de células (HL-60, CEM, HCT-8 e B-16). A ação antimitótica foi avaliada com ovos do ouriço do mar usando três extratos: acetato de etila, acetato e metanol com controle positivo da doxorubicina. O teste hemolítico foi realizado com as cinco frações, usando hemácias de camundongo. A avaliação *in vivo* foi feita com as frações hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, por via intra-peritoneal no sarcoma 180 e a fração metanol foi usada por via oral no tumor de Ehrlich. As frações do extrato hidroalcoólico e etanólico demonstraram atividade citotóxica. A fração hexano apresentou atividade menor que 1,8 µg/mL. O N-butanol teve resultado menor que 1,0 µg/mL, exceto para linhagem B-16, que não apresentou ação. No extrato etanólico o acetato de etila apresentou a ação menor que 2,5 µg/mL e a acetona menor que 4,4 µg/mL e o metanol menor que 10,5 e não apresentou ação na linhagem B-16. A inibição do desenvolvimento embrionário em ovos do ouriço do mar no extrato hidroalcoólico na 1ª divisão o diclorometano apresentou a melhor ação, com 42,80 µg/mL, na 3ª divisão e blástula o N-butanol 23,40 e 24,0 µg/mL respectivamente. O extrato etanólico apresentou importante ação antimitótica, mostrando inibição em todas as fases do desenvolvimento embrionário com ação menor que 4,8 µg/mL, e o acetato de etila foi o extrato mais ativo em todas as fases da divisão. No teste hemolítico as frações acetato de etila 80,51 µg/mL, acetona 133,4 µg/mL e o metanol 132,1 µg/mL apresentaram ação na membrana dos eritrócitos. No estudo *in vivo* do sarcoma 180 foi avaliado a inibição tumoral com grupo controle positivo e negativo, pesagem e estudo histológico dos órgãos: fígado, baço e rim e tumor. A fração orgânica acetato de etila apresentou inibição do crescimento tumoral de 64,3%. Em quanto à fração metanólica 500 mg/kg (via oral) apresentou inibição de 43,18%.

Palavra chave: *Calotropis procera* Ait.f., extrato hidroalcoólico e etanólico, potencial antitumoral, anticâncer.

ABSTRACT

POTENCIAL ANTITUMORAL DA *Calotropis procera* Ait. *in vitro* E *in vivo* E ASPECTOS HISTOPATÓLOGICOS Dissertation (Master Degree). Post-Graduate Program (*Stricto Sensu*) in Medical and Surgical Sciences. Federal University of Ceará. Advisor: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

This study initially evaluated the cytotoxicity of hydroalcoholic extracts from the aerial sections of *Calotropis procera* Ait f., with hexane fractions, dichloromethane and N-butanol, tested in five lineages of tumor cells (HL-60, CEM, MCF-7, HCT-8 and B-16) via the MTT method and the antimetabolic action in sea urchin eggs with positive control of doxorubicina. The action of the ethanolic extract on the stalk was also studied with the fractions, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone and methanol, using the MTT method in four lineages of cells (HL-60, CEM, HCT-8 and B-16). The antimetabolic action was evaluated with sea urchin eggs using three extracts, ethyl acetate, acetate and methanol with positive control of doxorubicina. The hemolytic test was carried out with five fractions, using mice red blood cells. The *in vivo* evaluation was performed with hexane fractions, dichloromethane, ethyl acetate, acetone and methanol, by intraperitoneal means in the 180 sarcoma and the methanol fraction was used via oral means on Ehrlich's tumor. Hydroalcoholic and ethanolic fractions showed cytotoxic activity. The hexane fraction presented less activity than 1.8 µg/mL. N-butanol had a result lower than 1.0 µg/mL, except for the B-16 lineage, which did not present any action. In the ethanolic extract the ethyl acetate presented action lower than 2.5 µg/mL and acetone lower than 4.4 µg/mL and methanol lower 10.5 and did not present any action in the B-16 lineage. Inhibition of embryonic development in sea urchin eggs in the hydroalcoholic extract in the first division of dichloromethane presented the best action, with 42.80 µg/mL, in the third division and blastula N-butanol 23.40 and 24.0 µg/mL respectively. The ethanolic extract presented an important antimetabolic action, showing inhibition in all phases of embryonic development with action lower than 4.8 µg/mL, and the ethyl acetate was the most active in all phases of division. In the hemolytic test the ethyl acetate fractions 80.51 µg/mL, acetone 133.4 µg/mL and methanol 132.1 µg/mL presented action in erythrocytic membrane. In the *in vivo* study of the 180 sarcoma tumoral inhibition was evaluated with the positive and negative control group, weighing and histological study of the organs: liver, spleen and kidney and tumor. The organic fraction ethyl acetate presented inhibition in tumoral growth by 64.3%. As for the methanolic fraction 500 mg/kg (orally) presented inhibition by 43.18%.

Key words: *Calotropis procera* Ait.f., hydroalcoholic and ethanolic extract, antitumoral potencial, anti-cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas do paclitaxel (1) e do docetaxel (2)	6
Figura 2	Estrutura química da podofilotoxina (3), etoposido (4) e tenoposido (5)	7
Figura 3	Estrutura química da captotecina (6), topotecam (7) e irinotecam (8)	9
Figura 4	Estrutura química da vincristina (9), vimblastina (10) e vinorelbina (11)	10
Figura 5	Biossíntese das diferentes classes dos flavonóides e isoflavonóides	11
Figura 6	Foto <i>Calotropis procera</i> Ait.	12
Figura 7	Constituintes químicos isolados da <i>C. procera</i> Ait.	15
Figura 8	Leucemia promielocítica (HL-60), Carcinoma de mama (MCF-7), Melanoma muirino (B-16).	17
Figura 9	Avaliação do potencial citotóxico de substâncias pelo método do MTT.	30
Figura 10	Esquema de execução da metodologia para visualização do potencial antimitótico de substâncias em ovos de ouriço do mar <i>Littechinus variegatus</i>	33
Figura 11	Fases do desenvolvimento embrionário do ouriço <i>Lytechinus variegatus</i> . A - óvulo; B - ovo com membrana de fecundação; C - 1 ^a . divisão; D - 2 ^a . divisão; E - 3 ^a . divisão; F – blástula.	34
Figura 12	A – Esquema de execução da metodologia para avaliação do potencial hemolítico de substâncias em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss. B – Divisão esquemática da placa de 96 poços utilizada no teste de hemólise.	36
Figura 13	Esquema de implantação dos tumores sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich em camundongos Swiss para posterior tratamento com os extratos orgânicos: acetato de etila, acetona e metanol de partes aéreas da <i>C. procera</i> .	38
Figura 14	Determinação do volume tumoral nos animais inoculados com o tumor Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento por via intraperitoneal.	49
Figura 15	Inibição do crescimento tumoral após 7 dias de tratamento consecutivos via oral com solução salina (controle negativo) e extrato metanólico (500 mg/kg) de <i>Calotropis procera</i> Ait.	50
Figura 16	Histopatologia dos fígados de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.	52
Figura 17	Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.	53
Figura 18	Histopatologia dos baços de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.	54
Figura 19	Histopatologia de células tumorais – Sarcoma 180 – removidas após o 10 ^o dia de inoculação, de animais tratados por via intraperitoneal.	55
Figura 20	Histopatologia de células do fígado de animais transplantados com Carcinoma de Ehrlich e tratados por via oral.	57
Figura 21	Histopatologia de células tumorais – Carcinoma de Ehrlich – removidas após o 10 ^o dia de inoculação, de animais tratados por via oral.	58

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u>	CI ₅₀ em µg/ mL das frações do extrato hidroalcoólico de <i>Calotropis procera</i> em diversas linhagens de células neoplásicas e seus respectivos intervalos de confiança.	43
Tabela 2	Ação citotóxica dos extratos orgânicos: acetato e acetona (25 mg/mL) de <i>Calotropis procera</i> Ait.. Porcentagem da inibição proliferativa em diferentes linhagens de células tumorais humana. Cada ponto representa a média do desvio padrão de triplicatas em dois diferentes experimentos.	43
Tabela 3	Avaliação da ação dos extratos hidroalcoólicos de <i>Calotropis procera</i> Ait. sobre o desenvolvimento de ovos do ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> . Os extratos foram adicionados 2 min após a fecundação.	44
Tabela 4	Avaliação da ação dos extratos orgânicos de <i>Calotropis procera</i> Ait. sobre o desenvolvimento de ovos do ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> . Os extratos foram adicionados 2 min após a fecundação.	46
Tabela 5	Atividade hemolítica dos extratos orgânicos de <i>Calotropis procera</i> Ait em eritrócitos de camundongos (2%).	47
Tabela 6	Determinação dos pesos dos órgãos (fígado, rins e baço) e do percentual de inibição tumoral dos animais tratados com o 5-Fluoruracil (50 mg/Kg) e com os extratos: diclorometano (CH ₂ Cl ₂), acetato de etila, acetona (250 mg/kg) e metanol (500 mg/kg), durante 7 dias consecutivos (n = 10).	48
Tabela 7	Determinação dos pesos dos órgãos (fígado, rins, baço e tumor) e do percentual de inibição tumoral do carcinoma de Ehrlich inoculados em animais e tratados com o extrato orgânico metanólico (500 mg/kg), e controle negativo (solução salina) via oral, durante 7 dias consecutivos (n = 10).	50

LISTA DE FLUXOGRAMAS

<u>Fluxograma 1</u>	Obtenção do extrato hidroalcoólico a partir de estruturas oriundas da <i>Calotropis procera</i> Ait.	24
<u>Fluxograma 2</u>	Obtenção dos extratos orgânicos a partir de partes aéreas (caule e folhas) da <i>Calotropis procera</i> Ait.	26

LISTA DE QUADROS

<u>Quadro 1</u>	Classificação taxonômica da <i>Calotropis procera</i> (Ait.) f.	13
<u>Quadro 2</u>	Extratos hidroalcoólicos submetidos a bioensaios no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE).	23
<u>Quadro 3</u>	Extratos orgânicos submetidos a bioensaios no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE).	25
<u>Quadro 4</u>	Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .	27

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
χ^2	Teste do qui-quadrado
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de variância)
BE/AL	Brometo de Etídeo/Acridina Laranja
BrdU	Bromodeoxiuridina
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia de camada delgada preparativa
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DAB	Diaminobenzidina
DCM	Diclorometano
DE ₅₀	Dose efetiva média
DL ₅₀	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Epithelial growth factor (Fator de crescimento epitelial)
EHA	Extrato hidroalcoólico bruto
HEPES	Ácido hidroximetil piperazina etanossulfônico
EtOH	Álcool etílico
g	Gramas
h	Hora
H/E	Hematoxilina/Eosina

H ₂ O	Água destilada
IC	Intervalo de confiança
km	Quilômetro
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa/Volume
MDR	Multi-drug resistance (Resistência a múltiplas drogas)
MeOH	Álcool metílico
mg	Miligrama
min	Minuto
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
n ^o	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína-quinase C
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM ¹ H	Ressonância Nuclear Magnética de Prótons
rpm	Rotações por minuto
SE	Solução de Eritrócitos
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes

INDICE

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Fluxogramas	
Lista de Quadros	
Lista de Símbolos e Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O Câncer.....	02
1.2. Processo divisão celular	03
1.3. Arsenal terapêutico.....	04
1.4. Produtos Naturais.....	05
1.5. <i>Calotropis procera</i>	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Geral	15
2.2. Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Materiais Utilizados na Pesquisa.....	16
3.1.1. Equipamentos	16
3.1.2. Soluções	16
3.1.3. Reagentes	17
3.1.4. Fármacos	17
3.1.5. Modelos Biológicos Experimentais	17
3.2. Metodologia Experimental	17
3.2.1. Obtenção dos Extratos hidroalcoólicos e orgânico de <i>C. procera</i> Ait...	17
3.2.2. Teste de Citotoxicidade <i>in vitro</i> – ensaio MTT.....	21
3.2.2.1. Linhagens de Células utilizadas.....	21
3.2.2.2. Manutenção de Células.....	23
3.2.2.3. Ensaio do MTT.....	23
3.2.2.4. Procedimento Experimental.....	23
3.2.2.5. Análise dos dados.....	24
3.2.3. Potencial antimetabólico em ovos de ouriço do mar.....	25
3.2.3.1. Procedimento Experimental	25
3.2.3.2. Análise dos Dados	27

3.2.4. Potencial antimitótico em ovos de ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	27
3.2.4.1. Procedimento Experimental	28
3.2.4.2. Análise dos Dados	30
3.2.5. Obtenção e manutenção dos animais.....	31
3.2.6. Atividade Antitumoral <i>in vivo</i> (via intraperitoneal).....	31
3.2.7. Atividade Antitumoral <i>in vivo</i> (via oral).....	32
3.2.8. Análise dos resultados.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i>	34
4.2. Avaliação da atividade antimitótica nos ovos de ouriço-do-mar.....	34
4.3. Atividade hemolítica.....	38
4.4. Avaliação antitumoral <i>in vivo</i> (intra-peritoneal).....	38
4.5. Avaliação anti-tumoral <i>in vivo</i> (via oral).....	40
4.6. Avaliação histopatológica de órgãos e tumores (intra-peritoneal).....	41
4.7. Avaliação histopatológica de órgãos e tumores (via oral).....	46
5. DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer

O câncer é a segunda causa de óbito no mundo e apesar do desenvolvimento da farmacologia molecular e de novas terapias, os resultados de amplos ensaios clínicos e metanálise, ainda não se encontrou o tratamento ideal, e convivemos com um cenário dramático nesta área. O progresso no tratamento do câncer dependerá de uma relação íntima entre a pesquisa clínica e a laboratorial, fundamentalmente o processo está ligado à expansão do conhecimento do câncer a nível molecular (TABAK; MORAES, 1996).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2005 apontam para o surgimento de 467.440 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma tendência observada no mundo. Em relação a distribuição por sexo, são esperados 229.610 novos casos para o sexo masculino e 237.830 para sexo feminino. Estima-se que no ano de 2005, o câncer de pele não melanoma (113 mil novos casos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), pulmão (26 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (21 mil), próstata (46 mil), cólon e reto (26 mil). (Instituto Nacional do Câncer, 2005).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer) em 2006 deverão ocorrer mais de 472 mil casos novos de câncer, 234 mil entre os homens e 238 mil entre as mulheres. Os tumores mais incidentes na população brasileira serão os de pele não melanoma (116 mil), mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil) e cólon e reto (25 mil).

À exceção do câncer de pele não melanoma, os cinco tipos de tumores que mais acometerão os homens brasileiros estarão localizados na próstata (47 mil), no pulmão (18 mil), no estômago (15 mil) e no cólon e reto (11 mil). Para o sexo feminino, estima-se a ocorrência de 49 mil casos novos de câncer de mama, 19 mil de colo do útero, 14 mil de cólon e reto e nove mil de pulmão (INCA, 2005)

O câncer é considerado uma doença multifatorial, sendo observadas alterações no controle da replicação celular, podendo ser decorrente de eventos diversos, os quais podem ser oriundos da matriz extra-celular por eventos bioquímicos de metilação, acetilação e fosforilação (controles epigenéticos), enquanto outros controles devem-se à ação de enzimas sintetizadas na própria célula (controles genéticos) (LOURO, 2002).

O processo básico da carcinogênese tem a seguinte seqüência: iniciação, promoção e progressão, sendo que fatores de crescimento, insensibilidade, fatores inibitórios, perda da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase são alterações essenciais na biologia celular para o processo tumoral maligno, sendo os fatores desencadeantes: a mutação, as radiações ionizantes, algumas substâncias químicas, alguns vírus e bactérias (PRIMO, 2004).

As mutações genéticas podem ser herdadas (retinoblastoma e certos tumores de mama e cólon) ou adquiridas, ocorrendo em células somáticas como resultados de fatores ambientais, favorecendo a expressão ou repressão de genes vinculados à malignização (TAJARA, 2002).

Referências históricas sobre associação de agentes externos implicados na etiologia do câncer, iniciaram em 1761 com JOHN HILL, que chamou atenção para a relação entre o tabaco e o câncer nasal. Também relacionando o câncer com o fumo (cachimbo) SAMUEL VON SOEMMERING em 1795, observou esta possível associação. Em 1775, PERCIVAL POTT, descreve câncer de escroto em limpadores de chaminés. Em 1875, VOLKMAN e BELL, associam o câncer de pele com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O câncer de bexiga relacionado com anilinas foi observado por REHN em 1895. Já em 1911, ROUS demonstrou a etiologia viral, introduzindo extrato isolado de sarcoma de galinhas, em aves normais, obtendo produção de tumor. IAMAGIWA e ICHIKAWA, em 1915, observaram o desenvolvimento do câncer de pele induzido pela aplicação repetida de alcatrão, KENNAWAY e HIGHER, em 1930, estudaram a ação carcinogênica do dibenzatraceno. COOK, HEWITT e HIEGER, em 1932, identificaram o benzopireno (potente carcinógeno) no alcatrão. SASAKI e YOSHIDA, em 1935, desencadearam hepatomas em ratos com dimetil-aminoazobenzeno (KUMMAR et. al., 2004).

1.2 O processo de divisão celular

O estudo do ciclo celular apresenta duas etapas principais: meiose e mitose. Basicamente, o ciclo celular é o programa para o crescimento e a divisão (proliferação) celular. Existem 4 fases no ciclo celular: G1, S, G2 e M. A fase G1 é caracterizada por expressão de genes e síntese de proteínas. Isto permite à célula crescer e produzir todas as proteínas necessárias para a síntese de DNA. Durante a próxima etapa, a fase S, a célula replica seu DNA possuindo, então, 2 fitas completas de DNA, entrando na terceira fase do ciclo celular: G2. Durante a fase G2, a célula novamente cresce e sintetiza proteínas necessárias ao processo de divisão celular. Completada esta fase, a célula finalmente entra na quarta fase do ciclo celular: M. Durante a fase M, a célula passa por um processo denominado citocinese, originando 2 células filhas, estando o ciclo celular completo. No ciclo de divisão celular, o alvo dos fármacos capazes de atuarem na estabilização dos microtúbulos e metáfase, impedem a fase G2-M na anáfase, podendo ocorrer a morte celular ou a resistência das células aos fármacos utilizados, sobrevivendo e continuando a se multiplicar (SOUZA, 2004).

1.3. Arsenal Terapêutico

Atualmente, o arsenal terapêutico usado no combate ao câncer compreende: tratamento cirúrgico, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. A pesquisa de novas opções de tratamento tem por objetivo encontrar terapias que melhorem os resultados, minimizem os efeitos colaterais seja seletiva atingido apenas as células doentes e não cause resistência. Apesar de avanços nesta área ainda precisamos encontrar estas drogas. Os vários tipos de quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer podem ser convenientemente classificados em agentes alquilantes, antimetabólitos, produtos naturais, miscelâneas e hormônios e antagonistas (CALABRESI, 2001).

Os agentes alquilantes são as mostardas nitrogenadas, etilaminas e metilaminas, alquil sulfonatos, nitrosuréia e triazenas. No grupo dos agentes antimetabólitos estão os análogos do ácido fólico, análogos da pirimidina, análogos da purina e inibidores correlatos. Drogas como Platinum, Antracenediona, substitutos da uréia, derivados da metilhidrazina, supressores adrenocorticais e inibidores da tirosinaquinase, compõem o grupo de miscelânea. Os hormônios e antagonistas que fazem parte dos agentes quimioterápicos são os esteróides adrenocorticais, progesteronas, estrogêneos, anti-estrogêneos, androgêneos, anti-androgêneos, análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (CALABRESI, 2001).

1.4. Produtos Naturais

A utilização de plantas para o tratamento do câncer já foi citada no Papiro de Ebers (KINGSTON, 1996). Os produtos naturais representam 60% do tratamento dos pacientes com câncer (NEWMAN et. al., 2003). De 500 novas substâncias ativas aprovadas por agências reguladoras, ao redor do mundo, na década passada, cerca de 50% são oriundas de fontes naturais. (CRAGG et. al., 1997).

No início da industrialização do país, as empresas brasileiras recém-criadas começaram a produzir fitomedicamentos baseadas nas informações e formulações tradicionais, o que persistiu até a década de quarenta, quando as grandes indústrias multinacionais de medicamentos começaram a se estabelecer. A partir daí, as drogas sintéticas produzidas por esses laboratórios passaram a dominar o mercado (PETROVICK, 1996). No Brasil, apesar de sua rica flora, que representa mais de 20% das espécies de plantas conhecidas no mundo (TOMLINSON; AKERELE, 1993), pouco tem sido feito para estudar seu potencial como fonte de novos medicamentos (FERREIRA, 1998).

A natureza produz um manancial de compostos com grande diversidade química, substâncias encontradas em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microorganismos (ROCHA et. al., 2001). Os produtos naturais podem servir de protótipo para desenho e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, buscando aumento de eficácia e estabilidade, melhoria de propriedades farmacocinéticas e diminuição de efeitos colaterais (ORTHOLAND et. al., 2004).

A medicina herbácea constitui a origem da medicina tradicional moderna, sendo as plantas verdadeiros laboratórios capazes de produzir compostos biosintéticos como: glicosídeos, alcalóides, dentre outros. Contudo os compostos responsáveis pela propriedade medicinal das drogas são geralmente os metabólitos secundários (SINGH, 2000). Os análogos são obtidos a partir dos produtos naturais quando da tentativa para descobrir grupamentos essenciais à atividade biológica. Como exemplo o Paclitaxel (Taxol®) agente citotóxico, aprovado para tratamento do câncer de ovário resistente e mama, mas que para sua produção é necessário o sacrifício de grande quantidade de árvores (KINGSTON, 2000; MANN, 2002). A modificação da estrutura do paclitaxel (1), originou o docetaxel (2), com maior potência citolítica (CHABNER et. al., 2001).

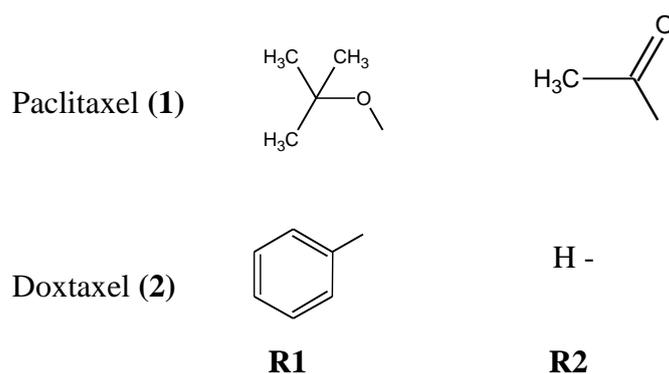
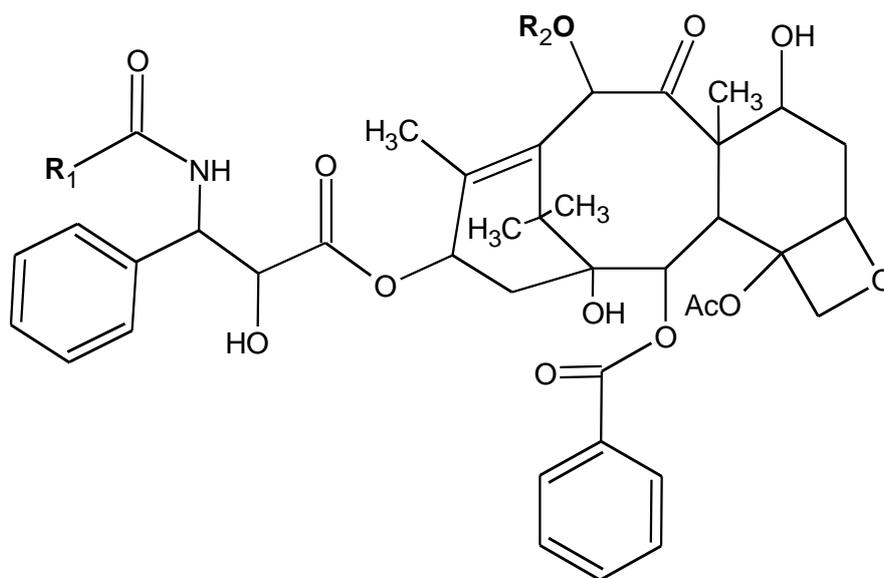


Figura 1 – Estruturas químicas do paclitaxel (1) e do docetaxel (2).

A podofiloxina (3), substância encontrada no rizoma da planta *Podophyllum peltatum*, foi bastante utilizada no tratamento de câncer de pele e verrugas, por índios americanos (MANN, 2002); Posteriormente, a partir deste composto foram obtidos análogos semi-sintéticos como: o etoposido (4) e o tenoposido (5). Fig. 2 (KOROLKOVAS, 1998)

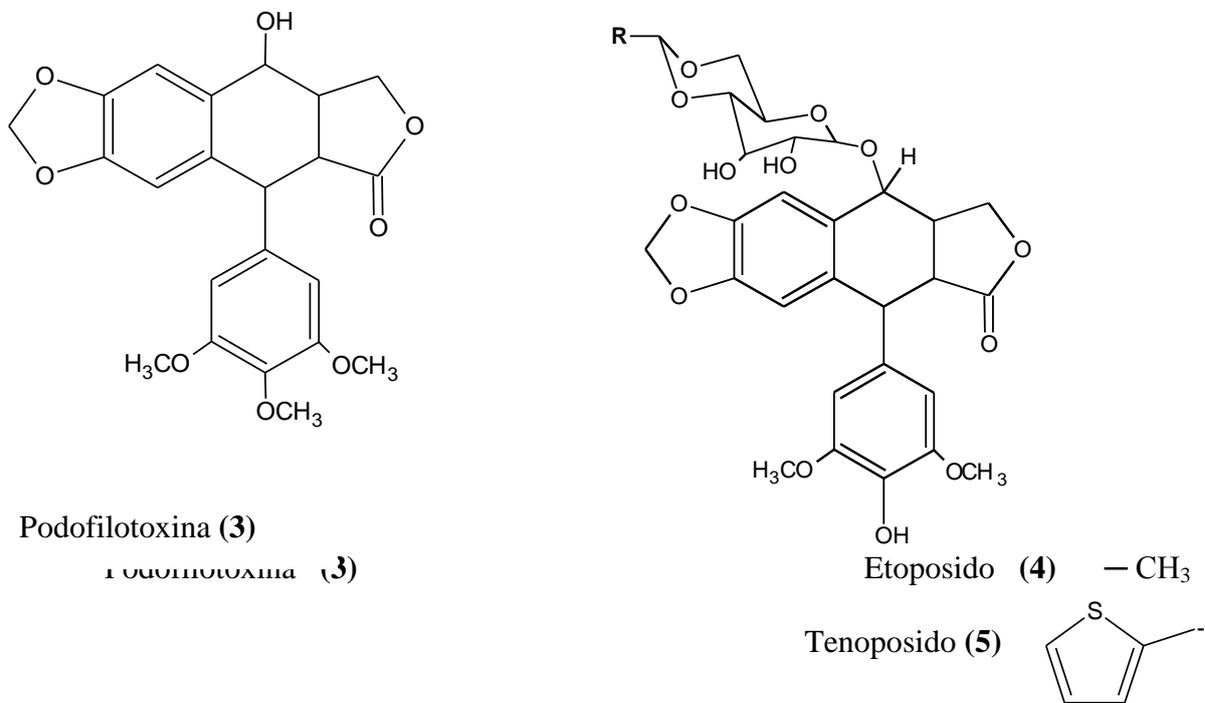
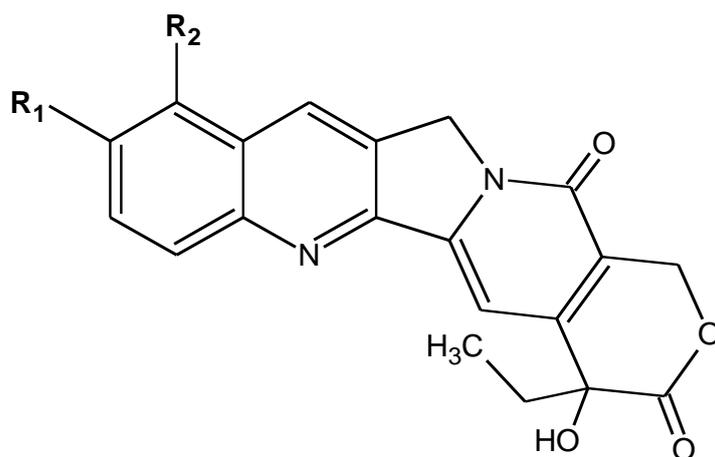


Figura 2 – Estruturas químicas da podofilotoxina (3), etoposido (4) e tenoposido (5).

A camptotecina (6) é um alcalóide pentacíclico presente na árvore chinesa *Camptotheca acuminada*, a qual possui atividade contra células leucêmicas, e também contra grande quantidade de tumores sólidos, porém apresenta baixa solubilidade. Seus derivados, na forma de sal sódico têm efeitos tóxicos. Por outro lado, derivados como tenotecan (7) e irinotecan (8) (Figura 3) foram aprovados para uso clínico (KOROLKOVAS, 1998).



	R_1	R_2
Camptotecina (6)	H—	H—
Topotecan (7)	H—	

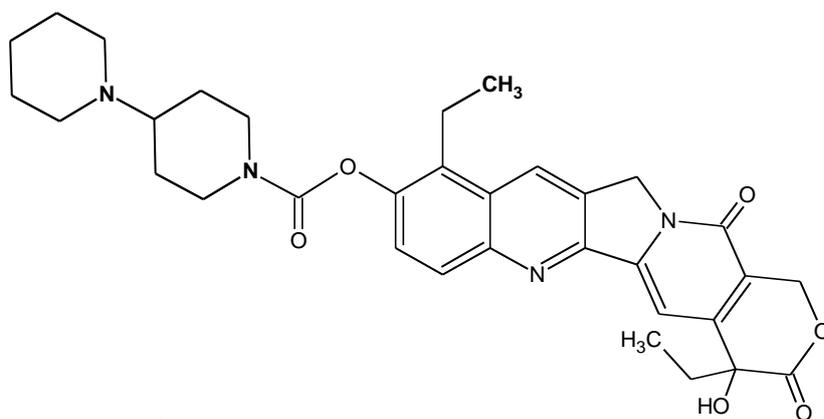
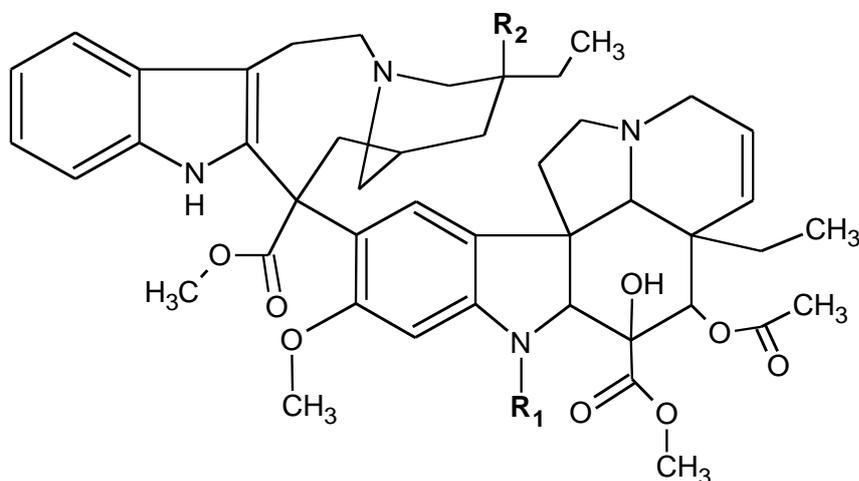


Figura 3- Estruturas químicas da camptotecina (6), do topotecan (7) e do irinotecan (8).

A vincristina (9) e vinblastina (10), alcalóides da vinca, extraídos da planta *Catharanthus róseo*, apresentam estrutura química e mecanismo de ação semelhante, porém com efeitos adversos diferentes (O' MARCAIGH; BETCHER, 1995). Devido às características próprias procurou-se pesquisar novos análogos, que pudessem apresentar maior atividade citotóxica, com menor toxicidade (KRUCZYNSKI; HILL, 2001).

O composto semi-sintético (Figura 4) derivado da vinblastina, a vinorelbina (11), apresenta um espectro de ação semelhante, com menor neurotoxicidade que a vincristina. (REENTS, 1996).



	R₁	R₂
Vincristina (9)	—COH	OH
Vinblastina (10)	—CH ₃	OH
Vinorelbina (11)	—CH ₃	—H

Figura 4 – Estruturas químicas da vincristina (9), da vinblastina (10) e da vinorelbina (11).

Os flavonóides, grupo de produtos naturais, encontrados em frutas, vegetais, sementes, ervas, condimentos, caule e flores, assim como em chás e no vinho tinto, possuem importância farmacológica, com propriedade anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-viral e antitumoral. A atividade citotóxica foi demonstrada em trabalhos, com diversos flavonóides, em diferentes células tumorais. Este grupo de substâncias, os flavonóides, que podem ser obtidos da flora brasileira, trouxe perspectivas na busca de novas drogas para o tratamento do câncer (Figura 5).

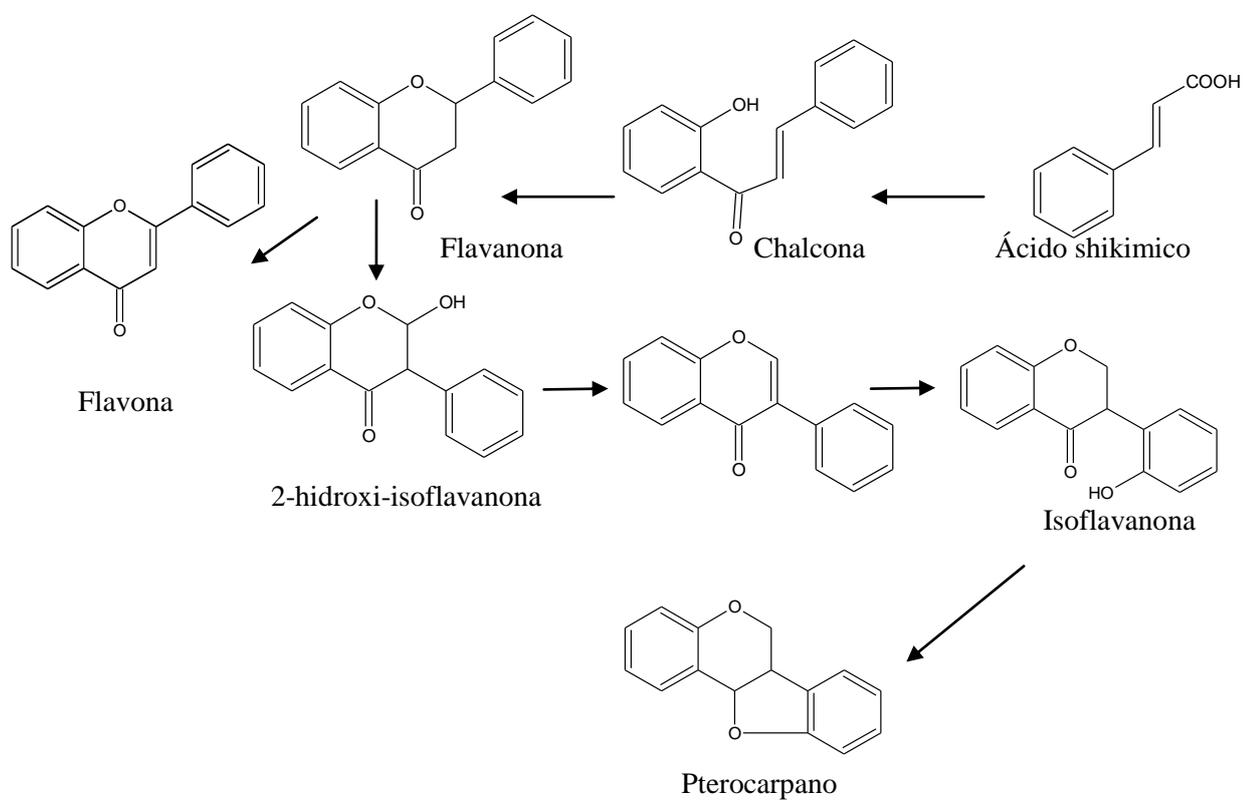


Figura 5 - Biossíntese de algumas classes de flavonóides e isoflavonoides (TAHARA; IBRAHIM, 1995).

1.5 *Calotropis procera* Ait

Calotropis procera (Ait.) planta da família Asclepiadaceae, conhecida vulgarmente como Algodão da seda, Flor de seda' Janaúba, Paininha de seda, Leiteiro, Queimadeira e Ciúme.(HANDA, 1984).

Quadro 1 – Temos abaixo a classificação taxonômica da *Calotropis procera* (Ait.) f.

Classificação Taxonômica	
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sub-classe	Asteridae
Ordem	Gentianales
Família	Asclepiadaceae
Gênero	<i>Calotropis</i>
Espécie	<i>Calotropis procera</i> (Ait.) Ait. f.

A distribuição mundial da *Calotropis procera* Ait. predomina na Ásia e África, regiões tropicais e subtropicais, com baixo índice pluviométrico e solo pobre. O arbusto pode chegar a 3 metros, possuindo ramos (caule), folhas, frutos, sementes. A planta dissemina sua semente através do vento, invadindo facilmente pastagens, servindo muitas vezes como alimento para ruminantes, cresce comumente em várias partes da Arábia Saudita sendo conhecida como USHAR (MAHMOUD, 2001).

Segundo MELO, 2001 a planta foi introduzida no Brasil, primeiramente em Recife como uma espécie ornamental no ano de 1900. É encontrada nos estados da região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, especialmente em Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal (FERREIRA, 1973; GOMES 1974).

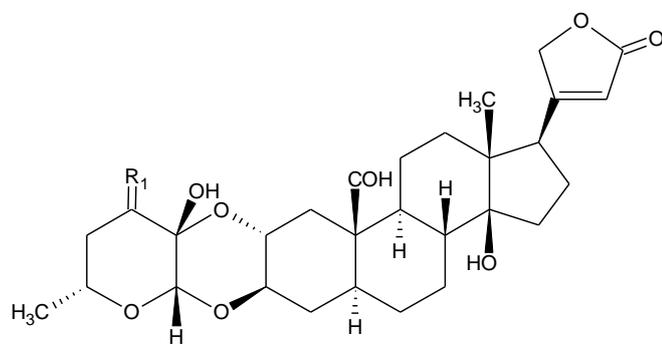


Diferentes partes de *Calotropis procera* Ait. f. têm sido usadas como fitoterápicos em diversas enfermidades na tradicional medicina Indiana, incluindo lepra, úlcera, tumor e hemorróidas. Ainda como purgativo e anti-helmíntico (DEWAN et. al., 2000), anti-microbianos, larvicidas, nematocidas, anti-cancerígeno, no tratamento de úlcera gástrica, nas doenças hepáticas e como antídoto de envenenamento por serpente (KHAN;MALIK 1989; AKTAR et. al., 1992; BASU et. al., 1992. HUSSEIN et. al., 1994; TANIRA et. al.,1994). Porém, SHARMA e colaboradores em 2001, relatam que o látex da planta tem

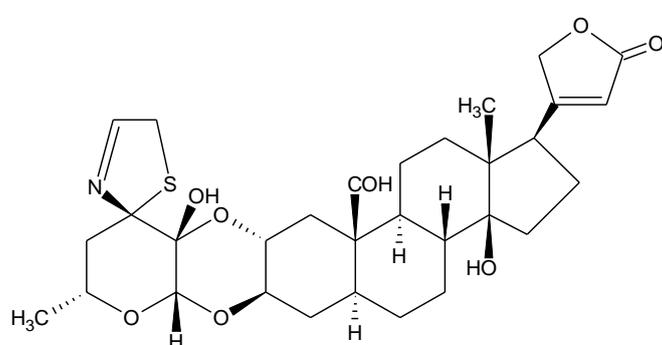
propriedades irritativa e corrosiva, usado com fins criminais (abortivo e infanticida) e HUSSEIN et. al.,1994 descrevem o poder moluscicida que a planta apresenta.

Considerando as crenças de povos antigos sobre os efeitos da *Calotropis. procera* Ait. f., pesquisas foram realizadas, utilizando métodos modernos, com objetivo de comprovar suas propriedades. Em 2001, MELO e colaboradores realizaram o estudo fitoquímico clássico de galhos e folhas (parte aérea) evidenciando a presença de glicosídeos flavônicos, esteróides, polifenóis, glicosídeos cardiotônicos em ambas as estruturas, enquanto que em folhas foram identificados ainda a presença de triterpenos.

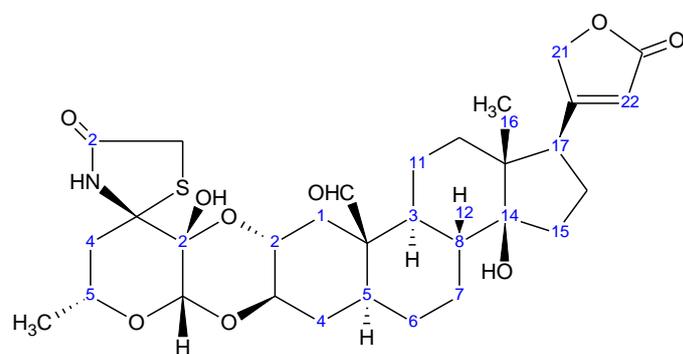
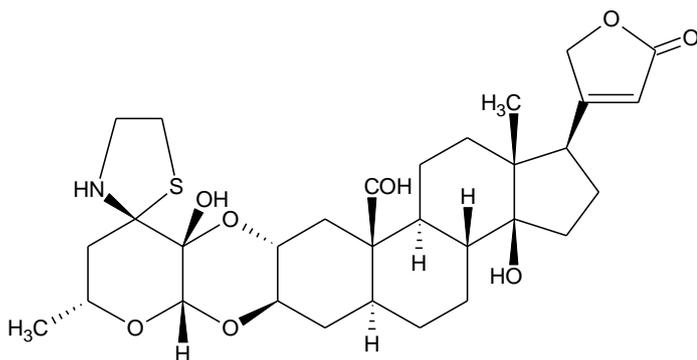
A análise do extrato metanólico de casca de raiz de *Calotropis. procera* Ait. f. levou a identificação de um novo cardenolide o 2'-oxovoruscharin (Figura 8), de onde foram retirados 27 hemi-compostos, sendo que a oxovoruscharin apresentou efeito antitumoral *in vitro*, quando testada em 57 linhagens de células de câncer humano, com resultado similar ao taxol e maior que o SN-38 (metabólito ativo do irinotecan) (QUAQUEBEKE, 2005).



1 R1= α - OH β -H



3



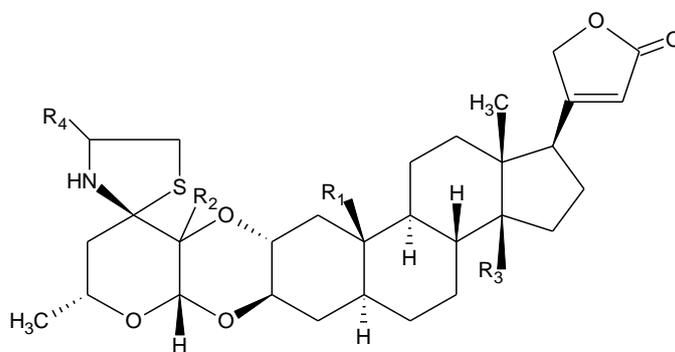
1 R1= α -H β -OH

45

Calotropina 2 – Calactina 3 – Uscharina 4 – Voruscharina 5 – 2'' – oxovoruscharina

Fonte: QUAQUEBECK et. al., 2005

Figura 7 – Constituintes químicos isolados da *Calotropis procera* Ait.



2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial antitumoral de extratos oriundos das diversas partes aéreas da *Calotropis procera* Ait. f., planta encontrada em grande quantidade no Ceará, procurando determinar de suas atividades citotóxicas em modelos *in vitro* e da avaliação antitumoral *in vivo*.

2.2. Específicos

Determinar e comparar as atividades citotóxicas *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos: hexânico, diclorometano, N-butanol; obtidos de partes aéreas de *Calotropis procera* Ait. f. bem como avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos orgânicos: hexano, diclorometano, acetato, acetona, e metanólico obtidos do caule em células tumorais e no desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

Determinar a capacidade hemolítica dos extratos orgânicos: hexano, diclorometano, acetato, acetona, e metanólico obtidos do caule de *Calotropis procera* Ait. f..

Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* no Sarcoma 180 dos extratos orgânicos: diclorometano, acetato, acetona, e metanólico (via intraperitoneal) obtidos do caule de *Calotropis procera* Ait. f., utilizando salina como controle negativo e 5 fluorouracil como controle positivo, bem como analisar o peso de órgãos (rins, fígado e baço) e dos tumores obtidos ao final do 10º dia de inoculação do tumor, avaliando ainda o percentual de inibição do crescimento tumoral dos animais tratados com os extratos acetato, acetona, e metanólico obtidos do caule. Realizando ainda análise histopatológica de órgãos e tecido tumoral.

Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* no carcinoma de Ehrlich do extrato metanólico, obtido do caule de *Calotropis procera* Ait. f, bem como realizar análises histopatológicas dos tecidos tumorais, rim, fígado e baço de animais tratados por via oral.

3. MATERIAIS

3.1. Materiais utilizados na pesquisa

3.1.1. Equipamentos

Agitador de placa MLW Thys 2

Aquário marinho

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Deionizador de água Milli-Q

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Fluxo laminar VECO

Frascos para cultura de células Corning

Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

3.1.2 Soluções

Água do mar filtrada

Álcool Etílico Vetec

Azul de tripan 10% - 10 mg de azul de tripan – Sigma

Formalina neutra 10% - 100 mL de Formaldeído 37% - Vetec

KCl 0,5M - 37,3 g de Cloreto de potássio – Labsynth

Meio de cultura de células RPMI 1640 (Meio de cultura de células) – Cultilab

MTT - 20 mg de MTT – Sigma

Penicilina – estreptomicina - Penicilina 10.000 U.I./mL – Cultilab

Soro fetal bovino - Cultilab

Tampão fosfato (PBS) - Cloreto de sódio (8,766 g) – Labsynth

Tripsina 0,25% - 50 mL de Tripsina 2,5% - Cultilab

Triton X -100 1% - 1 mL de Triton X-100 – Isofar

3.1.3. Reagentes

Ácido Acético Vetec

Ácido Clorídrico Vetec

DMSO Vetec

3.1.4. Fármacos

5 – FU (5 fluoruracil) 250 mg/ML, ICN Farmacêutica

Doxorrubicina Zodiac (fornecida pela farmácia do Instituto do Câncer do Ceará – ICC).

3.1.5. Modelos biológicos experimentais

- Linhagens celulares tumorais cultivadas (tabela 1)
- Ovos do ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*)
- Camundongos *Mus musculus*, Swiss (fêmeas).

3.2. Métodos

3.2.1 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos e orgânicos de *Calotropis procera* Ait.

O material botânico (*Calotropis. procera* Ait. f.) foi coletado no município de Sobral-CE, em janeiro de 2003. Sua identificação do material botânico foi realizada pelo Prof. Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob a inscrição 34.706 sendo o estudo fitoquímico realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da

Universidade Federal do Ceará, pela professora Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa e o Dr. Adriano Cunha

Após coleta e identificação do material, realizou-se a extração em etanol/água a 70%, por meio de rotaevaporador das frações hidroalcoólicas das folhas, flores, sementes e frutos. O processo de extração do material hidroalcoólico foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Em seguida, partindo-se das frações hidroalcoólicas das respectivas estruturas da planta citadas anteriormente, realizou-se o processo de extração sucessiva (4 X) com hexano, diclorometano e n-butanol de cada estrutura (Fluxograma 1) e a partir das três frações foram realizados os bioensaios de viabilidade celular pelo MTT e atividade antimetabólica em ovos de ouriço-do-mar, no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) (Quadro 2).

Quadro 2 - Extratos hidroalcoólicos submetidos a bioensaios no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE)

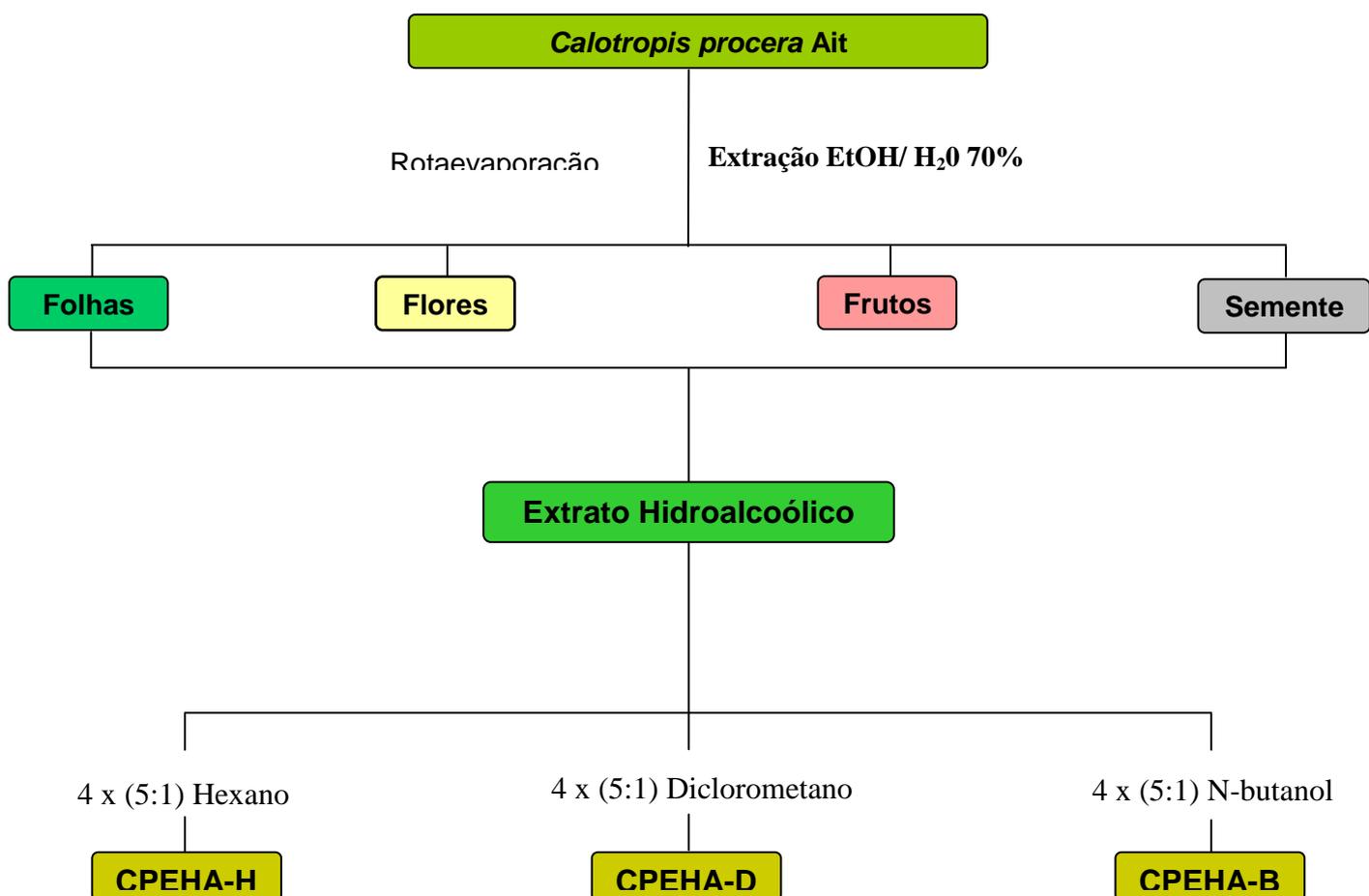
Frações obtidas do Extrato Hidroalcoólico da *Calotropis procera* Ait. f.

Hexano

Diclorometano

N-Butanol

Fluxograma 1 – Obtenção do extrato hidroalcoólico a partir de estruturas oriundas da *Calotropis procera* Ait.



Posteriormente, no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, realizou-se a obtenção dos extratos orgânicos da *Calotropis procera* Ait. f., onde a partir do caule foi originado inicialmente o extrato etanólico (EECP), como extração em álcool etílico 100%. Em seguida o EECP foi submetido a extrações sucessivas (4 x) com 5 solventes orgânicos em polaridades crescentes (Fluxograma 2), onde foram obtidos os extratos orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, os quais foram submetidos a bioensaios, (viabilidade celular pelo MTT, atividade antimitótica em ovos de ouriço-do-mar, atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos e atividade antitumoral em Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich), no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) localizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC (Quadro 3).

Quadro 3 - Extratos orgânicos submetidos a bioensaios no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE)

Frações obtidas do Extrato Etanólico da *Calotropis procera* Ait. f.

Hexano

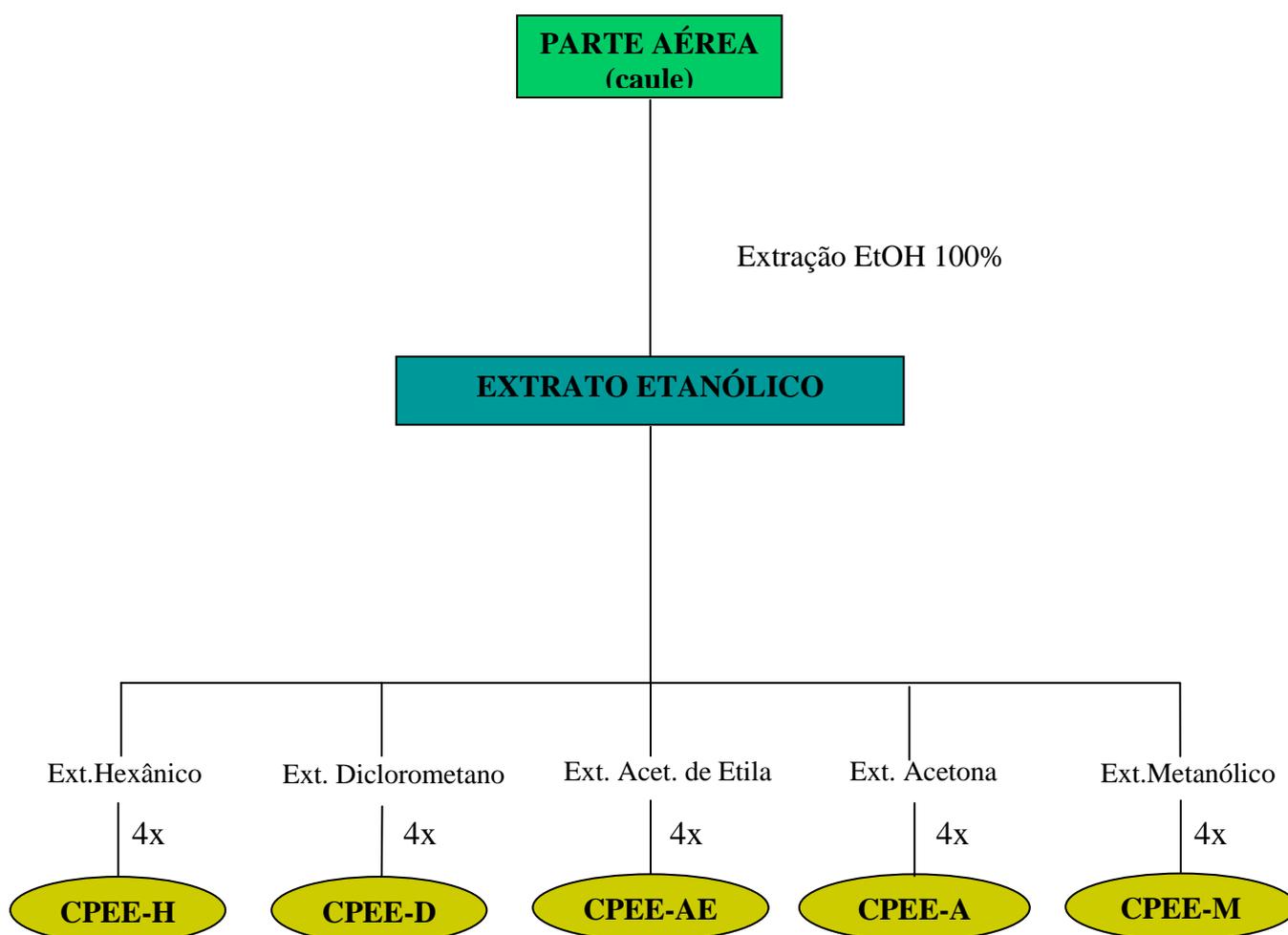
Diclorometano

Acetato de etila

Acetona

Metanol

Fluxograma 2 - Obtenção dos extratos orgânicos a partir de partes aéreas (caule e folhas) da *Calotropis procera* Ait. f.



3.2.2. Teste de Citotoxicidade *in vitro* - Ensaio do MTT

3.2.2.1. Linhagens Celulares Utilizadas

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade citotóxica foram obtidas por doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). e estão listadas quanto à origem e tipo histológico no quadro 4.

Quadro 4: Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
CEM	Leucemia linfocítica	Humano
HL-60	Leucemia promielocítica	Humano
MCF-7	Carcinoma de mama	Humano
HCT-8	Carcinoma de cólon	Humano
B16	Melanoma	Murino

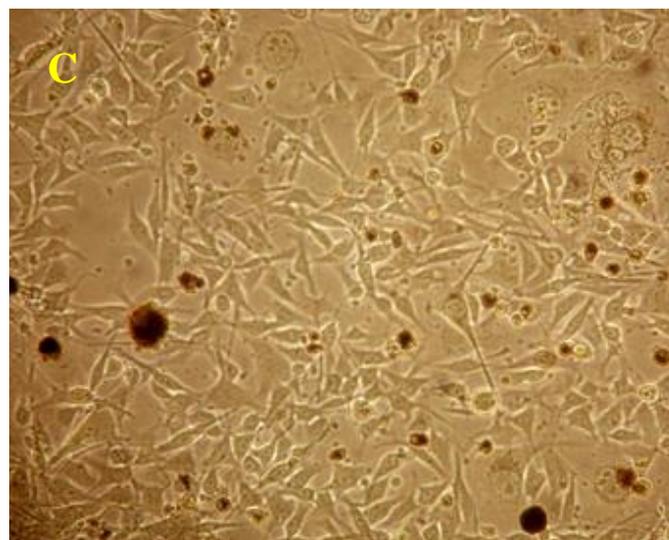
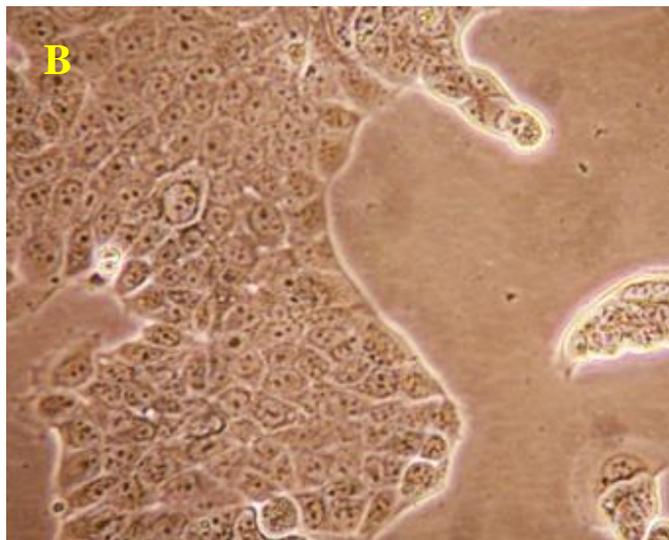
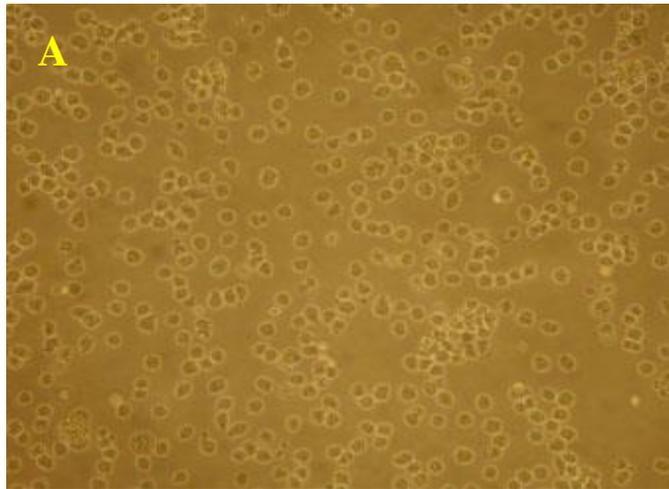


Figura 8 – A - Leucemia promielocítica (HL-60), B - Carcinoma de mama (MCF-7) e C - Melanoma Murino (B-16).

Fonte: www.iclc.ip/listanuova.html

3.2.2.2. Manutenção das Células

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75cm², volume de 250mL); foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células eram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/ mL (BUTLER; DAWSON, 1992).

3.2.2.3 Ensaio do MTT

Este ensaio pode ser utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), um composto de cor amarela, à formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983). No presente trabalho, este ensaio foi utilizado para monitoramento da atividade das frações e seleção das mais ativas assim como para quantificar suas atividades em diferentes linhagens celulares.

3.2.2.4. Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 0,3 x 10⁶ células/mL, para células suspensas e 1 x 10⁵ células/mL para células aderidas. As substâncias testes (extrato hidroalcoólico: hexano, diclorometano e N-butanol; e extratos orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanólico) foram incubadas durante 72 horas juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/10 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL, tendo sido reincubada por mais 3 horas, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/5min), o sobrenadante foi desprezado e o

precipitado foi resuspenso em 150 μ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550nm (Figura 10).

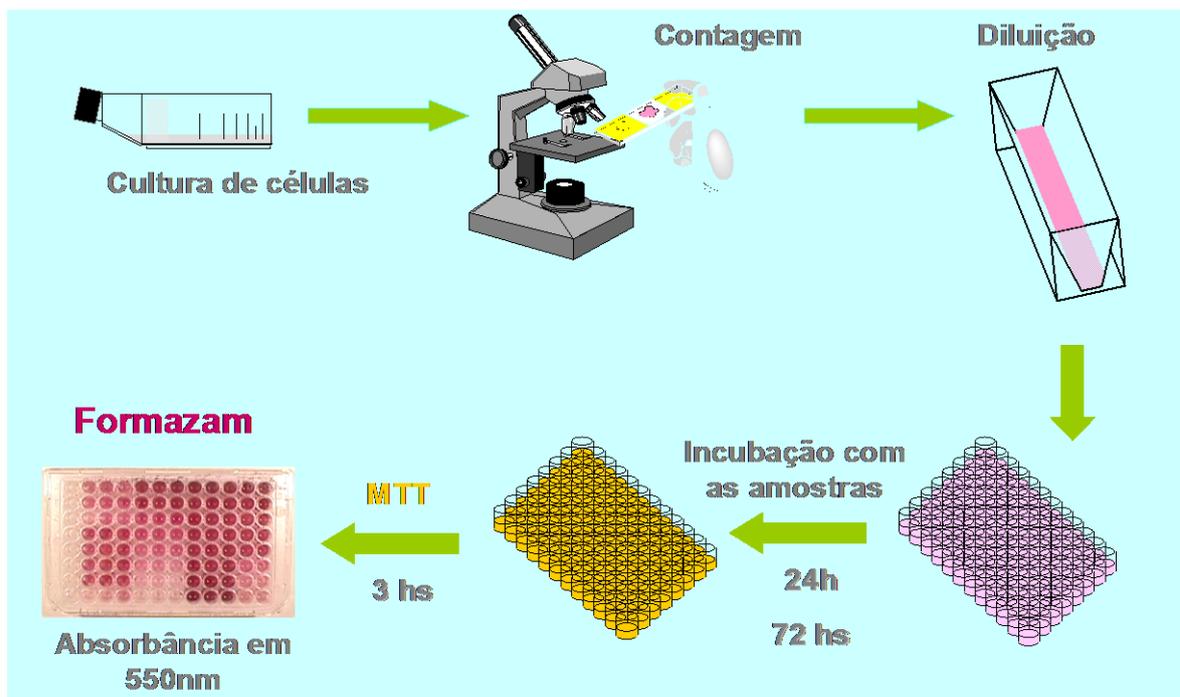


Figura 9 – Avaliação do potencial citotóxico de substâncias em células tumorais pelo método do MTT.

3.2.2.5. Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. No caso das frações ensaiadas em triplicatas de dose única (25 mg/mL), o valor da absorbância encontrado foi transformado em porcentagem, relativo ao controle. No caso das frações testadas em diluições em série, foi plotado o gráfico absorbância x concentração e determinado as suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (CI 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism versão 4.0.

3.2.3. Potencial antimetabólico em ovos de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

O teste avalia os efeitos sub-letais da substância teste sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar, como retardamento no crescimento ou aparecimento de deformidades nos ovos. Consiste em um teste de toxicidade bastante sensível e de metodologia já padronizada e amplamente empregada .

O ouriço-do-mar pertence ao Filo Echinodermata, Classe Echinoidea, Subclasse Euechinoidea, por Barnes, 1984. A espécie *Litochinus variegatus* é facilmente mantida em laboratório e foi selecionada para a utilização em testes de toxicidade por apresentar-se fértil o ano todo e possuir ovos não muito pigmentados, viabilizando, assim, a execução de ensaios com seus gametas. Os óvulos apresentam uma coloração alaranjada enquanto que os espermatozoides apresentam-se esbranquiçados. A membrana de fecundação dos ovos é facilmente visualizada assim como as várias fases da embriogênese. O uso deste modelo permite avaliar o efeito inibitório em diferentes níveis do processo mitótico, dando indícios para a elucidação do mecanismo de ação das substâncias (COSTA-LOTUFO, 2003).

Após o processo de fecundação, a célula ovo ou zigoto entra em processo de mitose; Em ovos de ouriço-do-mar, temos a segmentação total e igual, onde após cada segmentação observa-se a formação dos blastômeros, ou células filhas, de tamanho semelhante. Tem-se também a participação de RNA mensageiro e ribossomos na formação de proteínas, bem como atuação do DNA. A partir de então são visualizados a 1ª divisão mitótica (surgimento de dois blastômeros, com segmento pólo a pólo), 2ª divisão (quatro blastômeros, também com segmento pólo a pólo), 3ª divisão (oito blastômeros, onde se tem divisão por segmentos pólo a pólo e transversal). Na fase de mórula tem-se o surgimento de trinta e dois blastômeros. A partir da mórula, ocorre a formação de uma cavidade dentro da esfera, separando assim as células, aqui é o último estágio observado (WOLF, 1993).

3.2.3.1. Procedimento Experimental

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de 3ml de KCl 0,5 M na cavidade celômica (perivisceral) dos animais. Após o término da eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada, por três vezes, para remoção da camada gelatinosa que os envolve. Os espermatozoides concentrados foram coletados e mantidos em baixa temperatura até o momento do uso.

Após a última lavagem, os óvulos foram resuspensos em 50 mL de água do mar filtrada. A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozoides preparada, como descrito anteriormente, à suspensão de óvulos (50 mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação, através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. Retirou-se então por meio de micropipeta automática uma alíquota contendo 1 mL dos ovos fecundados onde foram distribuídos em multiplaca com 24 cavidades de acordo com o estágio de divisão, sendo uma placa para cada divisão celular. Vale salientar que em cada placa tínhamos as substâncias teste, extrato hidroalcoólico com as frações hexano diclorometano e n-butanol (25 mg/mL), bem como as frações obtidas do extrato etanólico: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol (25 mg/mL). Os ovos foram incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação constante. Foram fixadas alíquotas de 0,5ml em formalina 10%, aproximadamente 1 hora e 3h30min após a fecundação, intervalos correspondentes às fases da primeira divisão e blástula, respectivamente. Cem células foram contadas em cada amostra para obtenção da porcentagem de células normais (Figuras 11 e 12). A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) um potente antibiótico antineoplásico e conhecido inibidor da síntese do DNA e também do RNA, na divisão celular, foi utilizada como controle positivo.

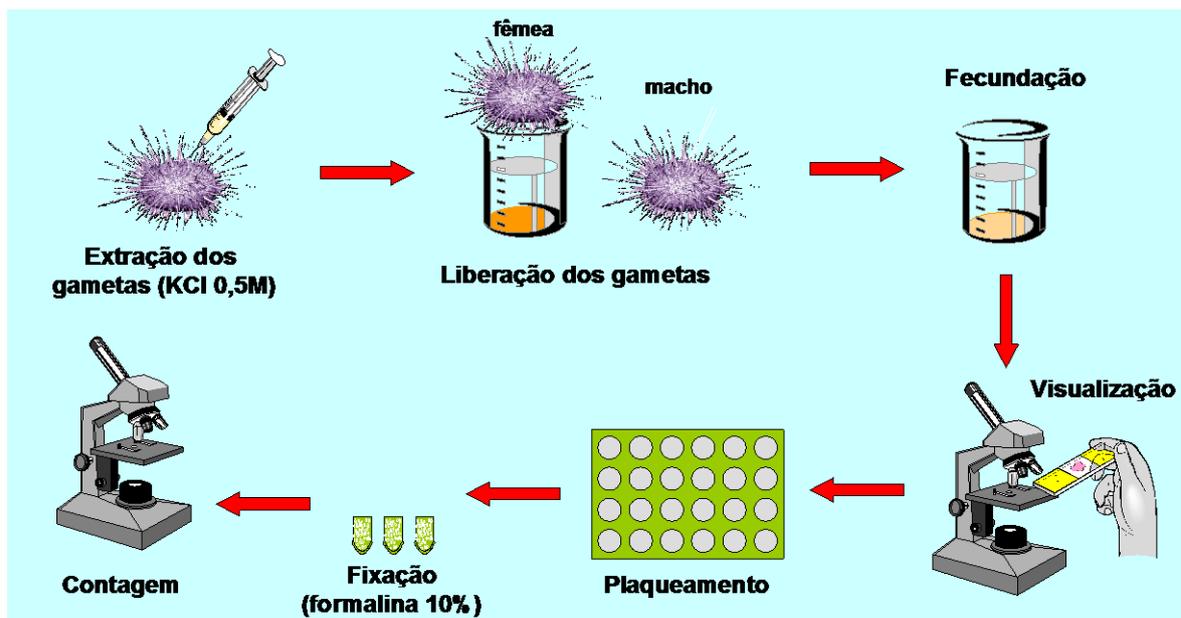


Figura 10 – Esquema de execução da metodologia para visualização do potencial antimicrobiano de substâncias em ovos de ouriço do mar *Lithechinus variegatus*.

3.2.3.2. Análise dos Dados

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. O cálculo da CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC) 95% foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Graph Prism versão 4.0 (GraphPad Software).

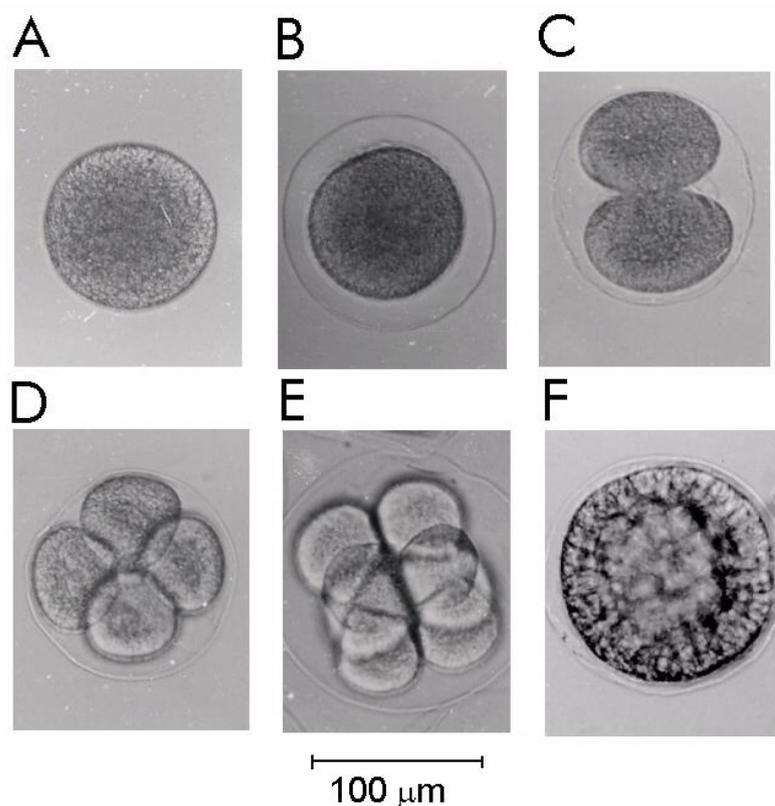


Figura 11 - Fases do desenvolvimento embrionário do ouriço *Lytechinus variegatus*. A - óvulo; B - ovo com membrana de fecundação; C - 1^a. divisão; D - 2^a. divisão; E - 3^a. divisão; F - blástula.

3.2.4. - Avaliação do Potencial Hemolítico

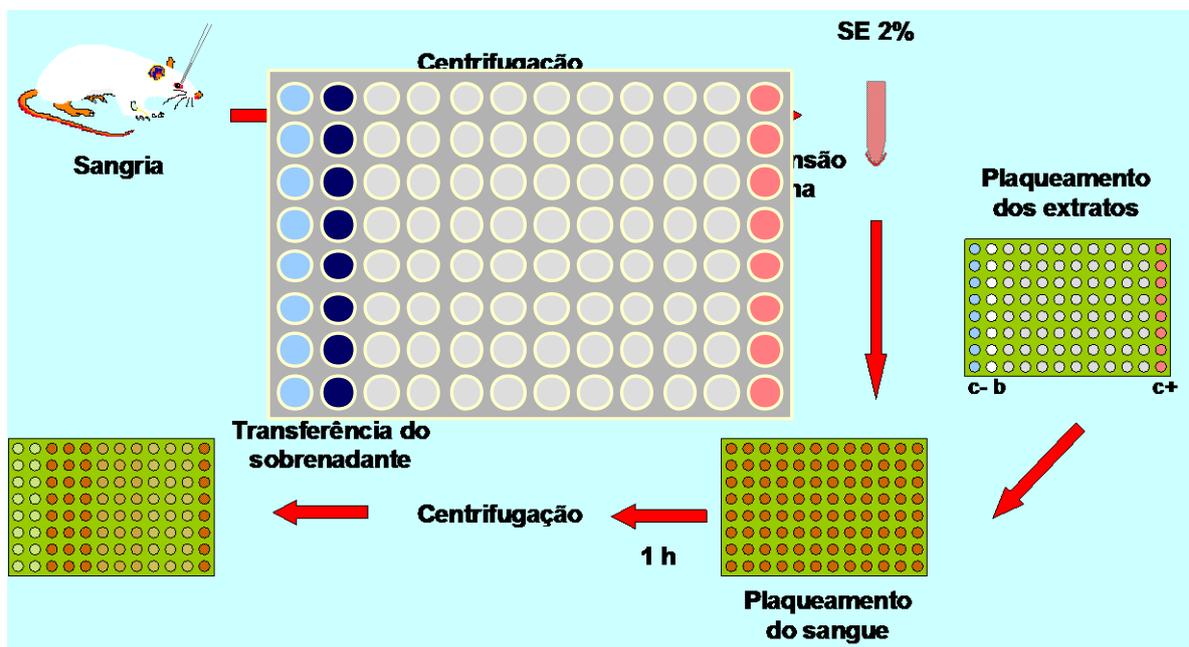
Esta metodologia permite avaliar o potencial da substância teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. Este teste utiliza hemácias de camundongos que guardam grande semelhança às hemácias humanas, principalmente em relação à sensibilidade.

3.2.4.1. Procedimento Experimental

O sangue utilizado foi coletado de camundongos (*Mus musculus*, Swiss) pela via orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/ 3 min) para redução da contaminação plasmática e resuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esses experimentos foram realizados em multiplaca com

96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50µl da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste (dimetilsulfóxido – DMSO), neste caso, água destilada. Aos poços da 3ª fileira, foi adicionado 50µl de solução salina e 100 µL da substância teste em solução. E 50 µL da suspensão de eritrócitos. Da 3ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que recebeu 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100µl da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações fossem sempre diluídas pela metade. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos 2% foi plaqueado em todos os poços. Após incubação de 1 hora sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a medida da absorbância no espectrofotômetro a 540nm. A atividade da substância foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo (Figura 12)

A



B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1ª fileira: 100 µL de solução salina + 100 µL suspensão de eritrócitos (controle negativo)

2ª fileira: 50 µL de solução salina + 50 µL de DMSO + 100 µL suspensão de eritrócitos

3ª à 11ª fileira: 50 µL de solução salina + 100 µL da substância teste + 50 µL da suspensão de eritrócitos.

12ª fileira: 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X-100 1% + 100 µL de suspensão de eritrócitos

Figura 12 A – Esquema de execução da metodologia para avaliação do potencial hemolítico de substâncias em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss. **B** – Divisão esquemática da placa de 96 poços utilizada no teste de hemólise.

3.2.4.2. Análise dos Dados

O cálculo da EC₅₀ (concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (CI) 95% foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software).

3.2.5. Obtenção e manutenção dos animais

Os testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas pesando entre 20-25g oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mantidos com água e alimento *ad libitum*. Foram seguidos todos os princípios éticos para manuseio dos animais, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento. Os tumores sólidos do tipo Sarcoma 180, com 10 dias de implante na região axilar direita foram utilizados para determinar a atividade antitumoral dos extratos diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol por via intraperitoneal, obtidos da *Calotropis procera* Ait. f. A obtenção do Carcinoma de Ehrlich para determinação da atividade antitumoral por via oral do extrato metanólico, foi realizada de forma semelhante ao descrito para o Sarcoma 180.

O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e em seguida coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 4,0 mL de Ringer lactato, 0,5 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores ou utilizados para o experimento de atividade antitumoral, foram injetadas 2 x 10⁶ células/0,2 mL na região axilar dos camundongos *Mus musculus* Swiss (Figura 14).

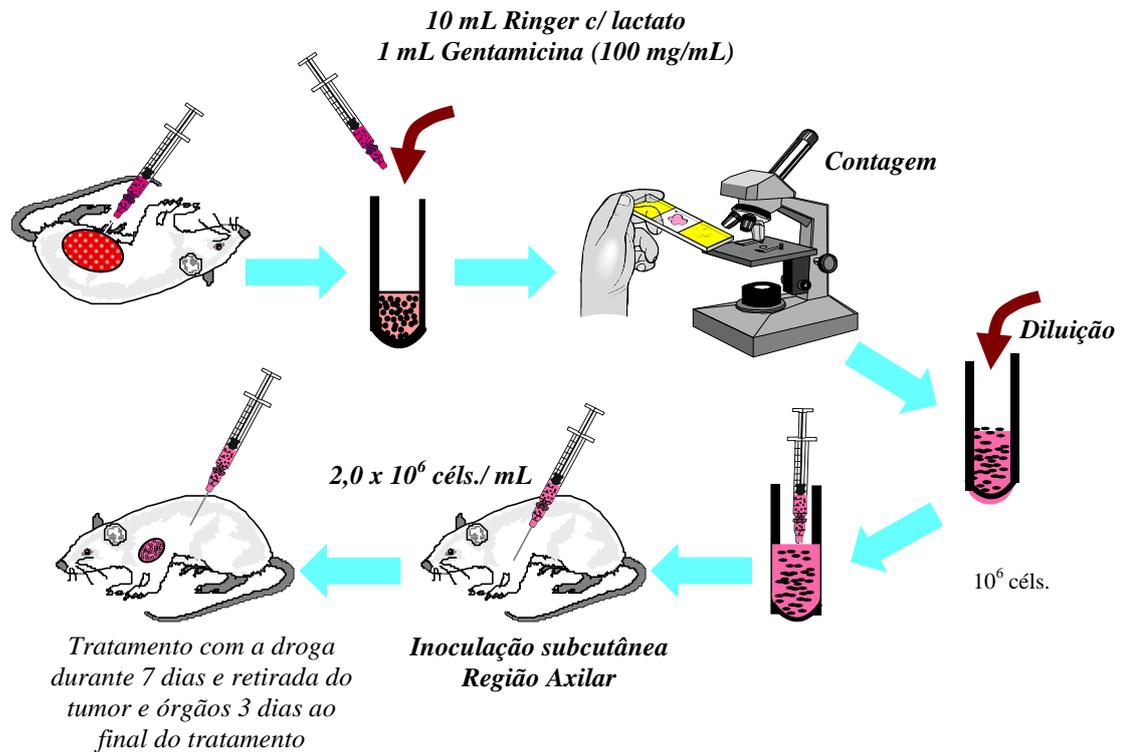


Figura 13 - Esquema de implantação dos tumores sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich em camundongos Swiss para posterior tratamento com os extratos orgânicos: acetato de etila, acetona e metanol de partes aéreas da *Calotropis. procera* Ait. f..

3.2.6 - Atividade antitumoral *in vivo* (via intraperitoneal)

O tumor utilizado foi o Sarcoma 180 foi descoberto em 1914 no Crocker Laboratory (Columbia University, New York). É originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar dos camundongos, e foi inicialmente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa, por volta de 1919, e manteve-se sem alterações até os dias de hoje.

O tratamento dos animais inoculados com Sarcoma 180 ocorreu 24 horas após o implante dos tumores e foi realizado durante 7 dias consecutivos, com os extratos diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol nas doses de 250 mg/kg para os extratos acetato de etila e acetona, 200, 400 e 500 mg/kg para o extrato metanólico, 200 mg/kg para o extrato diclorometano, 50 mg/kg para o 5-Fluorouracil (controle positivo) e solução salina (controle negativo), via intraperitoneal. No 10º dia após o implante dos tumores os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por meio de deslocamento cervical, em seguida fez-se a pesagem de órgãos (rins, fígado, baço) e também da massa tumoral. Cada grupo foi composto de dez animais e um controle positivo e outro negativo também com dez animais.

3.2.7 - Atividade antitumoral *in vivo* (via oral)

Para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* via oral, foram utilizadas fêmeas de camundongos (*Mus musculus* Swiss) pesando entre 20-25g oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mantidos com água e alimento (*ad libitum*).

Utilizou-se o tumor sólido do tipo Carcinoma de Ehrlich, com 10 dias de implantação na região axilar direita. Nesse experimento, fêmeas com peso variando entre 25-30 g foram inoculadas com tumores Carcinoma de Ehrlich. Em seguida, 24 h após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento por 7 dias consecutivos, utilizando para este experimento apenas o extrato metanólico (500 mg/kg), devido ser o único material com quantidade suficiente para a realização de um ensaio *in vivo* e o grupo controle negativo (salina).

Cada grupo contém dez animais que receberam por intermédio de micropipetas 200 µL, tanto do extrato metanólico (500 mg/Kg) como solução salina, via oral. No décimo dia após o implante do tumor os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os tumores, rins, estômago, fígado e baço para pesagem e posterior análise histopatológica.

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

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

Onde:

A = média dos pesos do tumor no grupo controle;

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

3.2.8 Análise dos resultados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O cálculo das CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism 4.0. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos em diferentes tratamentos, utilizamos o teste t-Student (comparação entre duas médias) e análise de variância seguida de Student Newman Keuls (comparações múltiplas) com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*

A citotoxicidade foi obtida através do método do MTT (MOSMANN, 1983) utilizando as seguintes linhagens celulares: CEM, HL-60, HCT-8, MCF-7 e B-16 melanoma – murino (Quadro 4) obtidas por doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD).

A atividade antiproliferativa foi avaliada inicialmente para os extratos hidroalcoólicos da *Calotropis. procera* Ait. f. pelo método do MTT e estão representados na Tabela 3. Merecem destaque as frações hexano e diclorometano, que apresentaram elevada citotoxicidade com CI_{50} menor que 2,00 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens HL-60, CEM, MCF-7, Melanoma-B-16 (murino) e HCT-8, respectivamente. As frações do extrato hidroalcoólico n-butanol só não mostrou atividade para a linhagem do Melanoma-B-16 (murino), cujas CI_{50} foram maior que 25 $\mu\text{g/mL}$. Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, é preconizado como extrato potencialmente citotóxico aquele que apresenta CI_{50} menor que 20 $\mu\text{g/mL}$ e para substância pura CI_{50} menor que 4 $\mu\text{g/mL}$.

O estudo das frações orgânicas: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol oriundas do extrato etanólico do caule de *Calotropis. procera* Ait. f. (EECP), apresentou uma maior atividade citotóxica da fração acetato de etila com CI_{50} menor que 2,5 $\mu\text{g/mL}$, seguida da fração acetona cuja CI_{50} foi menor que 5 $\mu\text{g/mL}$, para as 4 linhagens celulares testadas: HL-60, CEM, Melanoma-B-16 (murino) e HCT-8. Contudo as frações hexano e diclorometano não demonstraram citotoxicidade para HL-60, CEM, Melanoma B-16 (murino) e HCT-8, com CI_{50} maior que 25 $\mu\text{g/mL}$. Já o extrato metanólico mostrou atividade para as linhagens HL-60, CEM, e HCT-8 com CI_{50} menor que 10,2 $\mu\text{g/mL}$, não foi observada atividade citotóxica do extrato metanólico para a linhagem Melanoma B-16 (murino) CI_{50} maior que 25 $\mu\text{g/mL}$. (Tabela 4).

Tabela 1 - CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ das frações do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Calotropis procera* em diversas linhagens de células neoplásicas e seus respectivos intervalos de confiança.

Linhagem celular/Extratos	Hexano CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Diclorometano CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	N- butanol CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HL-60	1,40 1,32 - 1,50	< 2,00 -	0,99 0,90 - 1,00
CEM	1,44 1,33 - 1,54	< 2,00 -	0,95 0,86 - 1,00
MCF-7	1,59 1,49 - 1,68	< 2,00 -	0,94 0,88 - 0,99
B-16	1,7 0,08 - 3,30	1,467 0,48 - 2,44	> 25,00 -
HCT-8	1,75 1,66 - 1,83	< 2,00 -	0,90 0,80 - 1,00

Cada amostra foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em duas determinações. CI_{50} corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular (média – Intervalo de confiança) CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$, Intervalo de confiança)

Tabela 2 - Ação citotóxica dos extratos orgânicos: acetato e acetona (25 mg/mL) obtidos do caule de *Calotropis procera* Ait.. Porcentagem da inibição proliferativa em diferentes linhagens de células tumorais humana. Cada ponto representa a média do desvio padrão de triplicatas em dois diferentes experimentos.

Linhagem celular/ Extratos	Hexano CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Diclorometano CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Acetato CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Acetona CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Metanol CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HL-60	> 25	> 25	1,63 1,40 – 1,89	2,13 2,08 - 2,18	8,22 5,44 – 12,42
CEM	> 25	> 25	1,39 1,13 – 3,79	1,42 0,29 - 6,78	2,87 2,01 – 4,10
B-16	> 25	> 25	1,99 1,02 – 3,88	4,38 2,13 – 8,99	> 25
HCT-8	> 25	> 25	2,48 2,32 - 2,64	0,79 0,62 – 1,02	10,16 7,26 – 14,21

Cada amostra foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em duas determinações. CI_{50} corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular (média – Intervalo de confiança)

CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$, Intervalo de confiança)

4.2. Avaliação da atividade antimitótica nos ovos do ouriço-do-mar.

A partir do ensaio com ovos de ouriço do mar para determinação do potencial antimitótico, foram avaliados os extratos hidroalcoólicos (hexano, diclorometano e n-butanol) obtidos a partir de partes aéreas (folha, fores, frutos, sementes) de *Calotropis procera* Ait. f..

A avaliação dos três extratos hidroalcoólicos mostrou uma melhor atividade em 1ª divisão da fração diclorometano, que apresentou uma CI_{50} de 42,80 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto a fração N-butanol demonstrou melhor efeito antimitótico na 3ª divisão e blástula onde mostrou CI_{50} correspondentes a 23,40 e 24,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. (tabela 5).

Tabela 3 - Avaliação da ação dos extratos hidroalcoólicos de partes aéreas *Calotropis procera* Ait. sobre o desenvolvimento de ovos do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Os extratos foram adicionados 2 min após a fecundação.

	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Ext. Hexano	1ª Divisão	49,70	33,48 - 73,66
	3ª Divisão	32,71	29,19 - 36,60
	Blástula	61,40	58,43 - 67,28
	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Ext. Diclorometano	1ª Divisão	42,80	40,77 - 44,15
	3ª Divisão	31,50	30,34 - 32,65
	Blástula	38,50	24,80 - 59,55
	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Ext. N-butanol	1ª Divisão	52,20	46,15 - 58,96
	3ª Divisão	23,40	21,59 - 25,26
	Blástula	24,00	20,70 - 27,84
	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Doxorrubicina (*)	1ª Divisão	6,28	4,34 - 9,09
	3ª Divisão	0,34	0,16 - 0,73
	Blástula	0,54	0,27 - 1,07

(*) Doxorrubicina – Utilizada como controle positivo

A avaliação dos extratos orgânicos: acetato de etila, acetona e metanol obtidos a partir do extrato etanólico do caule de *Calotropis procera* Ait. f. sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar, determinando o potencial antimitótico destas substâncias. Os três extratos orgânicos estudados inibiram o desenvolvimento embrionário em concentração menor que 5 $\mu\text{g/mL}$, mostrando melhor atividade que quando comparado ao controle doxorrubicina que na 1ª divisão mostrou CI_{50} de 6,28 $\mu\text{g/mL}$, porém o extrato acetato

de etila foi o que apresentou uma menor CI_{50} na 1^a, 3^a divisões e blástula correspondentes a 3,1, 1,9 e 1,1 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando elevado potencial antimitótico.

Vale salientar ainda que os extratos acetona e metanol demonstraram boa performance, com CI_{50} menor que 5 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 5). A ordem de atividade para os extratos sobre a 1^a divisão foi: acetato de etila maior que acetona, acetona maior que o metanol, metanol maior que doxorrubicina. Pode-se observar que as frações acetato de etila, acetona e metanol inibiram completamente as clivagens observadas na 1^a, 3^a divisão evoluindo para ocorrência de divisões anômalas na fase de blástula.

Já na 3^a divisão e blástula observamos a melhor atividade do controle doxorrubicina com CI_{50} de 0,34 e 0,54 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, seguido do extrato acetato de etila 1,99, 1,10 $\mu\text{g/mL}$, extrato acetona 2,68, 3,51 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato metanólico com 3,72, 4,73 $\mu\text{g/mL}$. (Tabela 6).

Tabela 4 - Avaliação da ação dos extratos orgânicos obtidos do caule de *Calotropis procera* Ait. sobre o desenvolvimento de ovos do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Os extratos foram adicionados 2 min após a fecundação.

	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Ext. Acetona	1 ^a Divisão	3,70	2,48 – 5,52
	3 ^a Divisão	2,68	0,75 – 9,57
	Blástula	3,51	1,54 – 8,01
	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Ext. Acetato	1 ^a Divisão	3,16	2,68 – 3,74
	3 ^a Divisão	1,99	1,47 – 2,70
	Blástula	1,10	1,05 – 1,15
	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Ext. Metanol	1 ^a Divisão	4,03	3,69 – 4,41
	3 ^a Divisão	3,72	3,31 – 4,18
	Blástula	4,73	4,11 – 5,45
	Fase da divisão	CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	IC 95%
Doxorrubicina	1 ^a Divisão	6,28	4,34 – 9,09
	3 ^a Divisão	0,34	0,16 – 0,73
	Blástula	0,54	0,27 – 1,07

(*) Doxorrubicina – Utilizada como controle positivo

4.3 Atividade hemolítica

Tratando-se de atividade hemolítica as cinco frações oriundas do extrato etanolico do caule de *Calotropis procera* testadas apenas três (acetona, acetato, metanol) mostraram capacidade hemolizante no intervalo de concentrações testadas (3,9 a 1000 µg/mL).

Os extratos hexano e diclorometano apresentaram os mais elevados potenciais hemolíticos com $EC_{50} > 1000$ µg/mL, enquanto o extrato acetato de etila foi a que mostrou-se com maior capacidade hemolizante com EC_{50} de 80,51 µg/mL seguido do metanol com 132,1µg/mL, eacetona 133,4µg/mL (Tabela 7).

Tabela 5 – Atividade hemolítica dos extratos orgânicos obtidos do caule de *Calotropis procera* Ait em eritrócitos de camundongos (2%).

Extratos	EC_{50} (µg/ml)	CI 95%
Hexano	> 1000	-
Diclorometano	> 1000	-
Acetona	133,4	101,1 – 176,0
Acetato	80,51	69,34 – 93,46
Metanol	132,1	118,9 – 146,8

A hemólise total foi obtida com 50 µl de Triton X-100 1% e 1h de incubação. A EC_{50} e intervalo de confiança de 95 % (CI 95%) foram obtidos por regressão não linear.

4.4 - Avaliação antitumoral *in vivo* (via intraperitoneal)

A atividade antitumoral *in vivo* dos extratos orgânicos diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol foi avaliada em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 (com tratamento por via intraperitoneal). As frações obtidas em diferentes solventes do extrato do caule de *Calotropis. procera* Ait. f. mostraram inibição dos tumores quando comparados ao controle. Observou-se que a fração acetato de etila (250 mg/kg) apresentou percentual de inibição de 64,3 %. O extrato acetona (250 mg/kg) mostrou um percentual de inibição de 53,1 %, enquanto para o extrato metanol (500 mg/kg ; 400 mg/kg e 200 mg/kg) apresentaram percentual de inibição de 49,7 %, 47,1, e 3,22 respectivamente. Já o diclorometano a inibição foi 16,6mg/kg. o controle positivo 5-FU (50 mg/kg) apresentou um percentual de inibição em torno de 96,5% (Tabela 8 e Figura 15).

Tabela 6. Determinação dos pesos dos órgãos (fígado, rins e baço) e do percentual de inibição tumoral dos animais tratados com o 5-Fluoruracil (50 mg/Kg) e com os extratos: diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila, acetona (250 mg/kg) e metanol (500 mg/kg), durante 7 dias consecutivos (n = 10). (^a representa p < 0,05).

Grupo/ Dose (mg/kg)	Fígado (g) (X ± S)	Rins (g) (X ± S)	Baço (g) (X ± S)	Tumor (g) (X ± S)	Inibição Tumoral (%)
Controle	2,00 1,82 ± 2,19	0,39 0,37 ± 0,55	0,32 0,27 ± 0,37	3,25 2,72 ± 3,78	0,00
5-FU (50)	1,34 1,13 ± 1,55	0,46 0,31 ± 0,53	0,05 0,04 ± 0,07	0,11 0,06 ± 0,15 ^a	96,5
Acetato (250)	1,67 0,97 ± 2,36	0,43 0,30 ± 0,49	0,20 0,07 ± 0,33	1,40 0,13 ± 4,16 ^a	64,3
Acetona (250)	1,90 0,88 ± 2,92	0,41 0,36 ± 0,47	0,28 0,12 ± 0,44	1,34 0,09 ± 2,60 ^a	53,1
Diclorometano (200)	2,25 2,14 ± 2,36	0,43 0,34 ± 0,49	0,43 0,37 ± 0,48	2,80 2,32 ± 3,28	16,6
Metanol (200)	2,23 1,94 ± 2,53	0,40 0,30 ± 0,50	0,24 0,20 ± 0,27	3,26 2,93 ± 3,58	3,22
Metanol (400)	2,06 1,86 ± 2,25	0,41 0,36 ± 0,45	0,29 0,24 ± 0,33	1,84 1,27 ± 2,41 ^a	47,1
Metanol (500)	1,70 1,48 ± 2,04	0,42 0,38 ± 0,46	0,27 0,19 ± 0,34	1,54 1,00 ± 2,08 ^a	49,7

Os dados estão apresentados como a média ± erro padrão da media S.E.M.. Diferenças significantes em relação ao grupo controle foram avaliadas por ANOVA seguido por Student Newman Keuls: um, p < 0.05.

As frações orgânicas não mostraram interferência nos pesos dos órgãos (baço, fígado e rins) dos animais tratados por via intraperitoneal quando comparados com o controle negativo - salina (Tabela 8). As frações acetato de etila e acetona foram responsáveis pela morte de 3 animais em cada grupo durante o tratamento.

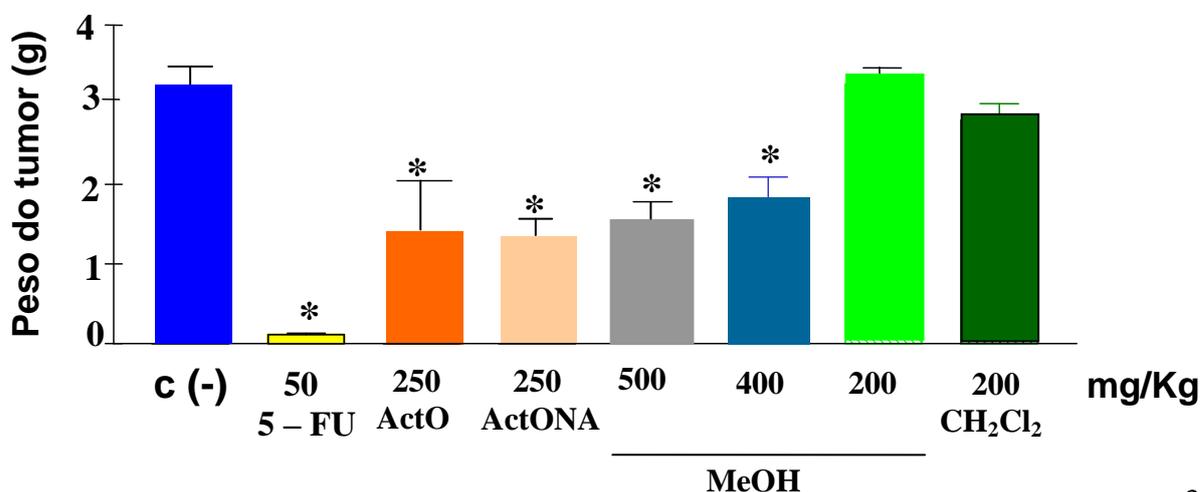


Figura 14 - Determinação do volume tumoral nos animais inoculados com o tumor Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento com C(-), controle negativo salina, (5-FU), 5-fluoruracil 50 mg/Kg), (ActO) extrato. acetato de etila e (ActONA) extrato acetona (250 mg/kg) , (MeOH) extrato metanólico (500, 400 e 200 mg/Kg).e (CH₂Cl₂) extrato diclorometano (200 mg/Kg). (* p<0,05).

4.5 - Avaliação antitumoral in vivo (via oral)

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* via oral, do extrato metanólico (500 mg/kg) em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Carcinoma de Ehrlich, mostrou percentual de inibição do crescimento tumoral em torno de 43,1% quando comparado ao controle negativo (salina) (Tabela 9 e Figura 16).

Tabela 7 Determinação dos pesos dos órgãos (fígado, rins, baço e tumor) e do percentual de inibição tumoral do carcinoma de Ehrlich inoculados em animais e tratados com o extrato orgânico metanólico (500 mg/kg), e controle negativo (solução salina) via oral, durante 7 dias consecutivos (n = 10). (^a representa p < 0,05).

Grupo/ Dose (mg/kg)	Fígado (g) (X ± S)	Baço (g) (X ± S)	Rins (g) (X ± S)	Tumor (g) (X ± S)	Inibição Tumoral (%)
Controle/ Salina (-)	2,29 2,18 ± 2,40	2,29 2,18 ± 2,40	0,64 0,63 ± 0,65	2,76 2,41 ± 3,11	0,01
Metanol (500)	1,97 1,86 ± 2,07	0,26 0,25 ± 0,27	0,56 0,54 ± 0,58	1,56 1,24 ± 1,88 ^a	43,18

Os dados estão apresentados como a média ± erro padrão da media S.E.M.. Diferenças significantes para o grupo controle foram avaliadas por ANOVA seguido por Student Newman Keuls: um, p < 0.05.

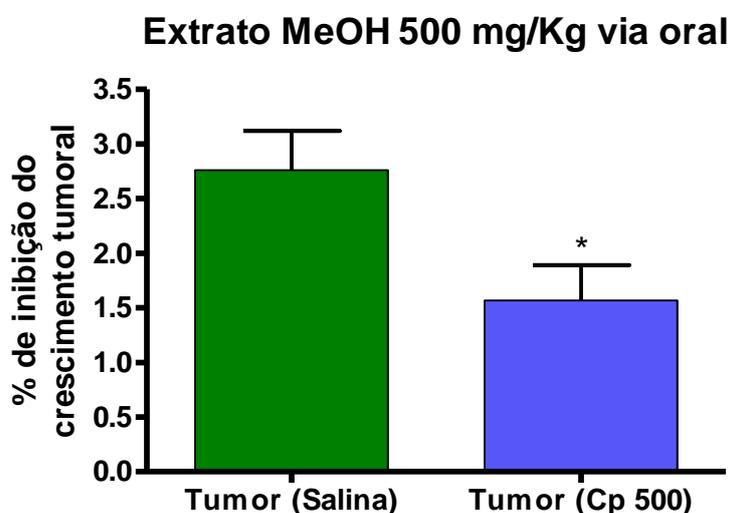
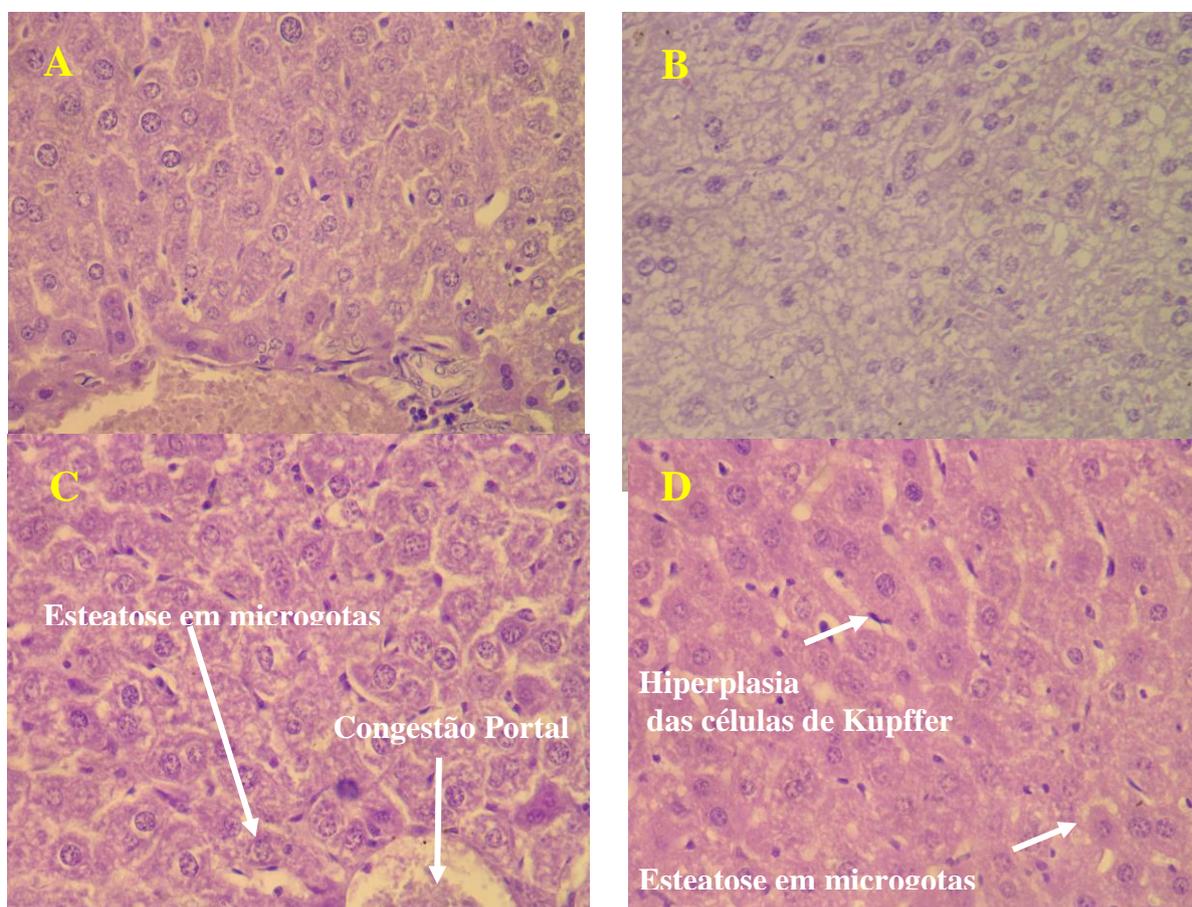
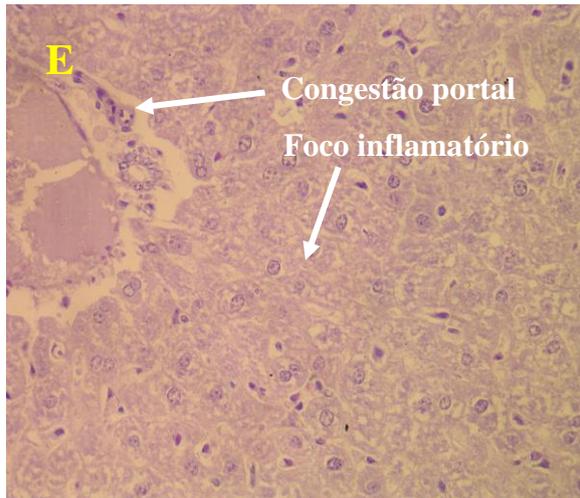


Figura 15 – Inibição do crescimento tumoral após 7 dias de tratamento consecutivo via oral com solução salina (controle negativo) e extrato metanólico (500 mg/kg) de *Calotropis procera* Ait. Diferenças significantes para o grupo controle foram avaliadas por ANOVA seguido por Student Newman Keuls: um, $p < 0.05$. (*) controle negativo.

4.6 - Avaliação histopatológica de órgãos e tumores (animais tratados por via intraperitoneal)

As análises histopatológicas do fígado de animais inoculados com Sarcoma 180 e tratados por via intraperitoneal com os extratos orgânicos de acetato de etila e acetona (250 mg/kg) mostraram áreas de congestão portal em veia centrolobular, tumefação turva dos hepatócitos, trechos focais de esteatose em microgotas, hiperplasia das células de Kupffer, porém tais alterações podem ser reversíveis. Já o extrato metanólico (500 mg/kg) de *Calotropis procera* Ait. f. além de causar as alterações hepáticas semelhantes ao dos extratos acetato de etila e acetona também contribuiu para o surgimento de focos inflamatórios (Figura 16).





de camundongos transplantados com células
(A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com 5-
extrato acetato de etila (250 mg/kg); (D) Grupo
g); (E) Grupo tratado com extrato metanólico
tal veia centrolobular, tumefação turva dos
e em microgotas, hiperplasia das células de

Por outro lado, a análise histopatológica dos rins demonstrou toxicidade dos extratos orgânicos acetato de etila e acetona (250 mg/kg) frente ao tecido renal (Figura 17), onde foram observadas áreas com hemorragia glomerular tubular e vacuolização do epitélio tubular, porém estas alterações são consideradas de natureza reversível. Quanto ao grupo de animais tratados com o extrato metanólico (500 mg/kg) não foram observadas alterações renais.

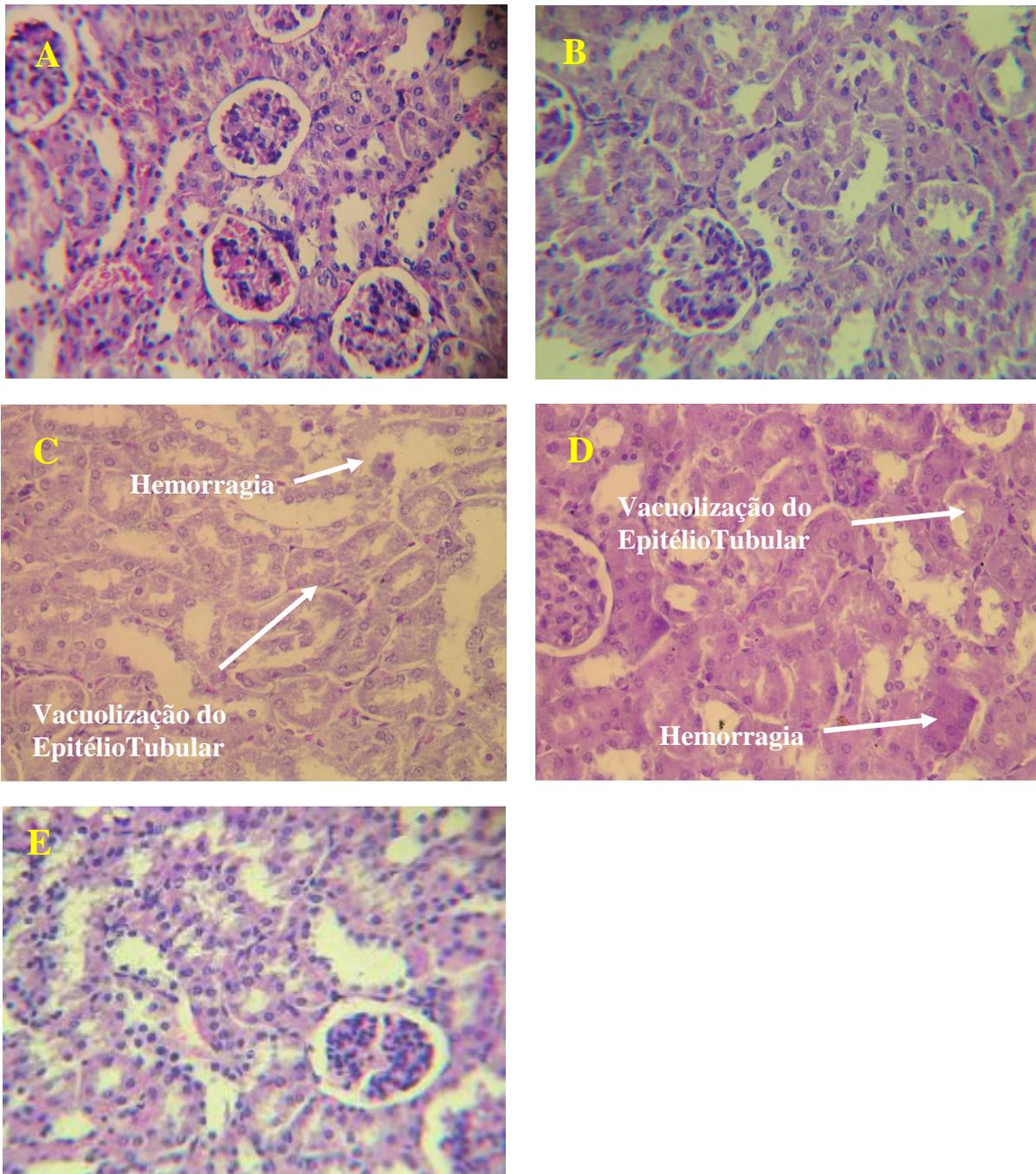


Figura 17 – Histopatologia dos rins de camundongos transplantedos de células tumorais de Sarcoma 180 após tratamento com (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com 5-FU (50 mg/kg); (C) Grupo tratado com extrato acetato de etila (250 mg/kg); (D) Grupo tratado com extrato acetona (250 mg/kg); (E) Grupo tratado com extrato metanólico (500 mg/kg). (Aumento de 400X).

Quanto ao baço dos animais tratados com os extratos orgânicos acetato de etila, acetona (250 mg/kg) e o extrato metanólico (500 mg/kg) foram avaliadas áreas com hiperplasia de polpa branca e ninhos de megacariócitos (Figura 18).

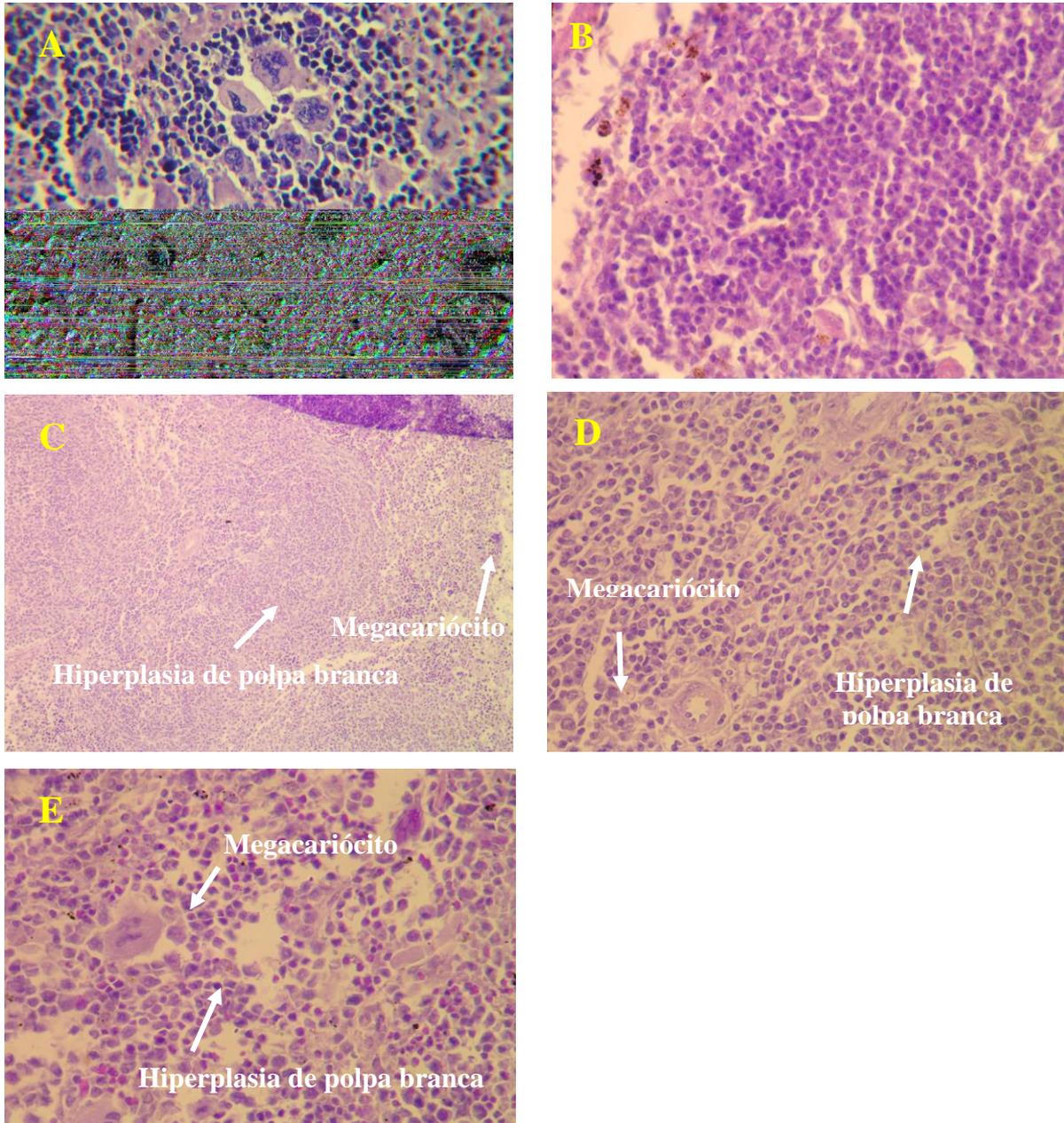


Figura 18 – Histopatologia dos baços de camundongos transplantados de células tumorais de Sarcoma 180 após tratamento com (A) Grupo controle negativo (salina); (B) Grupo tratado com 5-FU (50 mg/kg); (C) Grupo tratado com extrato acetato de etila (250 mg/kg); (D) Grupo tratado com extrato acetona (250 mg/kg); (E) Grupo tratado com extrato metanólico (500 mg/kg). (Aumento de 400X).

Foi observado ainda que os animais do grupo controle positivo, 5-FU (50 mg/kg), mostraram degeneração hidrópica dos hepatócitos, esteatose de micro e macro gotas em toda extensão da amostra. Indicando a hepatotoxicidade, enquanto a análise dos rins deste mesmo grupo de animais apresentou discreta tumefação turva do epitélio tubular. As observação realizadas no baço, ainda em animais do grupo controle positivo enfatizou a esplenotoxicidade do 5-FU com evidência da polpa branca bem circunscrita sem megacariócitos, área de necrose, e muitos pigmentos de hemossiderina.

Os animais do grupo controle (salina) apresentaram o rim com estrutura glomerular preservada e sem alterações; Em relação ao fígado foram observados focos inflamatórios, hiperplasia das células de Küpffer, tumefação turva dos hepatócitos, congestão portal e da veia centrolobular e trechos de esteatose em microgotas.

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos do grupo controle negativo (salina) mostraram dois tipos celulares, um pequeno e outro de grandes células, núcleos com anisocariose e vesiculosos, além de elevado índice mitótico. No grupo controle positivo (5-FU) foram visualizadas um menor número de células, poucas mitoses e extensas áreas de necrose de coagulação. Em relação ao tecido tumoral dos animais tratados com os extratos orgânicos de acetato de etila e acetona (250 mg/kg) foram vistas áreas de necrose de coagulação, contudo o extrato metanólico (500 mg/kg) mostrou extensas áreas de necrose de coagulação (Figura 19).

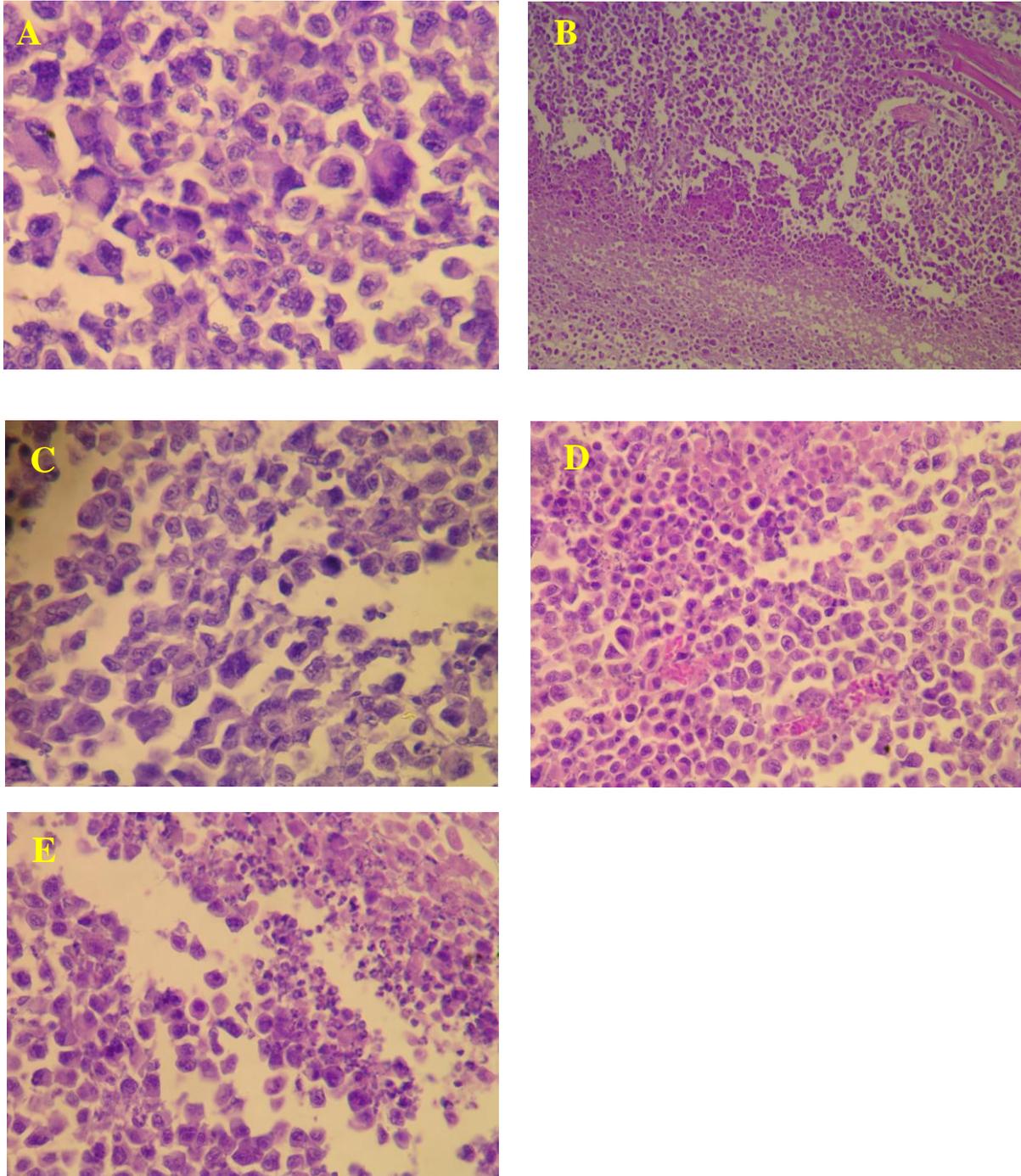
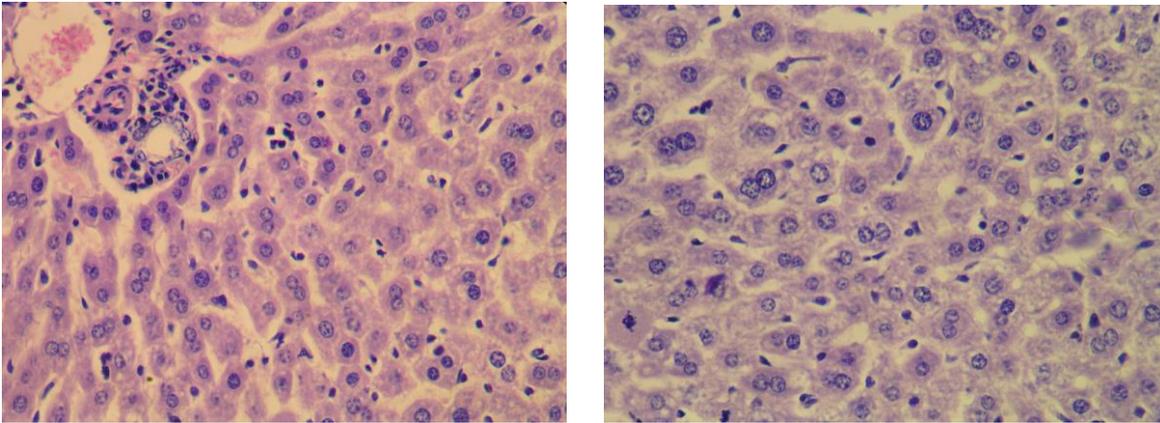


Figura 19 – Histopatologia de células tumorais de Sarcoma 180 removidas no 10° dia após tratamento com (A) Tumor não tratado, (B) tratamento com 5-FU (50 mg/kg/dia), (C) tratado com extrato acetato de etila (250 mg/kg/dia) e (D) camundongos tratados com extrato acetona (250 mg/kg/dia), (E) tratamento dos animais com extrato metanólico (500 mg/kg/dia). (Aumento de 400X).

4.7 - Avaliação histopatológica de órgãos e tumores (animais tratados por via oral)



As análises histopatológicas dos rins e baço de animais inoculados com Carcinoma de Ehrlich e tratados por via oral com o extrato metanólico (500 mg/kg) de *Calotropis procera* Ait. f. apresentaram aspectos morfológicos normais quando comparados ao controle negativo (salina). Já, quando observamos o fígado dos mesmos animais, constatamos a presença de focos inflamatórios, hiperplasia das células de Küpffer, tumefação turva dos hepatócitos, congestão portal e da veia centrolobular, esteatose de microgotas, presente em toda extensão da amostra. Padrão histológico semelhante foi observado para o grupo controle ^A negativo (salina), porém as alterações são reversíveis e talvez em resposta aos focos inflamatórios (Figura 20). ^B

Figura 20 – Histopatologia de células do fígado de animais transplantados com Carcinoma de Ehrlich após tratamento com (A) Grupo controle negativo (salina); (B) Grupo tratado com extrato metanólico via oral (500 mg/kg/dia). (Aumento de 400X).

Em relação a histologia dos tumores de animais tratados por via oral com solução salina foi observado neoplasia maligna constituída por células indiferenciadas, pleomórficas, com núcleos vesiculosos e nucléolos evidentes, exibindo hiper cromatismo. Apresentou elevado índice mitótico, cerca de uma mitose por campo microscópico (contados 10 campos). Invasão muscular e de adipócitos Com necrose de coagulação. Em relação aos animais tratados com o extrato metanólico 500 mg/kg por via oral, observamos extensas áreas de necrose, porém com a presença de mitoses (Figura 21).

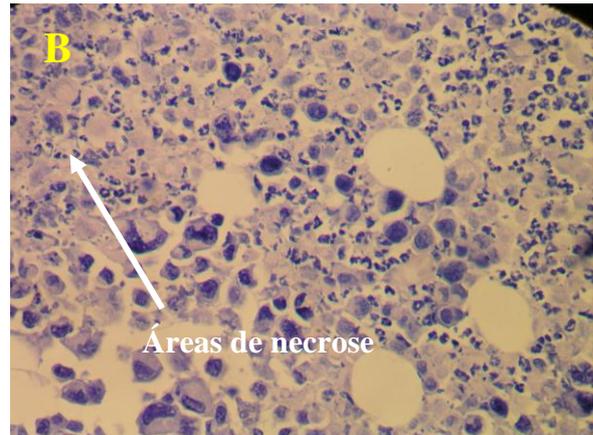
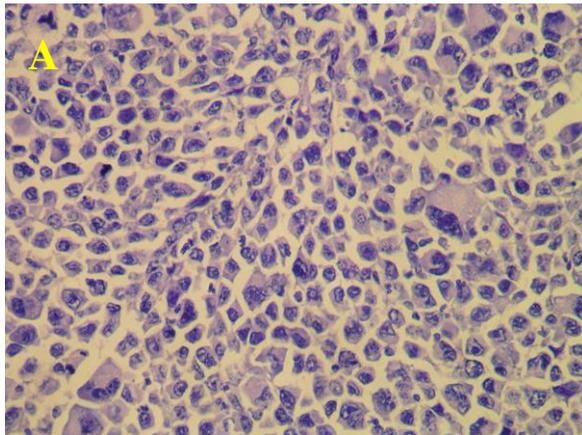


Figura 21 – Histopatologia de células tumorais de Carcinoma de Ehrlich removidas no 10º dia após tratamento com (A) Tumor não tratado, (B) tratamento dos animais com extrato metanólico (500 mg/kg/dia). (Aumento de 400X).

5. DISCUSSÃO

A pesquisa de produtos naturais vem despertando interesse nas últimas décadas buscando a obtenção de novas drogas com menos efeitos colaterais e maior efetividade. As alternativas utilizadas para este fim são: desenvolvimento racional de novos compostos, descoberta na natureza de novos produtos com ação anticâncer ou alteração da estrutura molecular das drogas já existentes. O uso de substâncias provenientes das plantas tem se mostrado nos últimos anos uma fonte efetiva no tratamento de várias doenças e principalmente o câncer. Estes produtos isolados servem muitas vezes como protótipos de novas drogas após alterações da estrutura química, o que pode torná-las mais potentes (CRAGG; NEWMAN, 2005).

A *Calotropis procera* Ait. f. tem sido usada ao longo dos anos com diversos fins, sendo conhecido o potencial terapêutico e tóxico de suas partes. Na Ayurveda, considerada a tradicional medicina indiana, ela está na lista das plantas, com efeito citotóxico (SMIT, 1995).

O presente trabalho avaliou a ação das várias partes aéreas (flor, fruto, folha, semente) da *Calotropis procera* Ait. f., *in vitro* (MTT e ouriço do mar) com as frações do extrato hidroalcoólico: hexano, diclorometano, e N-butanol, testados em 5 linhagens de células HL-60 (leucemia promielocítica), CEM (leucemia linfocítica), MCF-7 (carcinoma de mama), HCT-8 (carcinoma de cólon) e B-16 (melanoma murino).

Posteriormente, foi avaliada a ação do extrato etanólico do caule da *Calotropis procera* Ait. f., *in vitro* (MTT, ouriço do mar e teste hemolítico) com as frações hexânico, diclorometano, acetato de etila, acetona e extrato metanólico, sendo realizado em quatro linhagens de células: HL-60 (leucemia promielocítica), CEM (leucemia linfocítica), HCT-8 (carcinoma de cólon) e B-16 (melanoma murino). O estudo *in vivo* destas frações foi realizado em camundongos com tumor sarcoma 180 tratados via intra-peritoneal; Além disso, os camundongos com tumor de Ehrlich foram tratados com a fração metanólica por via oral.

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para estudar o potencial citotóxico de um composto, traduzido, inicialmente, por sua capacidade de induzir a morte celular. Foi observado que tanto as frações dos extratos hidroalcoólicos como os orgânicos de

Calotropis. procera Ait. f., apresentaram atividade citotóxica para o teste do MTT com CI_{50} menor que 11,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os achados de SMIT, 1995, que demonstrou que o estudo do extrato etanólico das flores de *Calotropis. procera* Ait. f. evidenciou importante efeito citotóxico, com uma CI_{50} de 1.4 $\mu\text{g/mL}$ em carcinoma de cólon 320 (humano) bem como o estudo realizado por QUAQUEBEKE em 2005, que avaliou 57 linhagens de células de câncer humano através do MTT, após isolamento de um composto, o 2''- oxovoruscharin, novo cardenolide identificado na raiz da *Calotropis procera* evidenciando potente efeito anticâncer, equivalente ao taxol e superior ao irinotecan.

Contudo as frações hexano e diclorometano não demonstraram citotoxicidade para HL-60, CEM, Melanoma B-16 (murino) e HCT-8, com $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$, sendo este resultado foi oriundo possivelmente da baixa solubilidade destes dois extratos na solução diluente (Dimetilsulfóxido). Já o extrato metanólico, mostrou baixa atividade citotóxica apenas para a linhagem Melanoma-B-16 (murino) com $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$, porém ALI, 2001 considerou o extrato etanólico das folhas da *C. procera* potencialmente citotóxico frente a linhagem de células FL (linhagem de células epiteliais amniótica humana) com CI_{50} foi de 31 $\mu\text{g/mL}$.

O teste do ouriço do mar tem como objetivo avaliar a citotoxicidade dos extratos, usando metodologia simplificada. O ensaio com ovos de ouriço do mar é um modelo alternativo que dispensa qualquer meio de cultura especial ou equipamentos sofisticados, sendo amplamente utilizado em estudos com drogas para avaliar efeito citotóxico, teratogênico e antitumoral (JACOBS et. al.,, 1986).

Como ocorre nas células tumorais, os ovos dividem-se rapidamente e apresentam uma sensibilidade seletiva a certos tipos de drogas com potencial antitumoral. A inibição da divisão celular pode estar relacionada a vários eventos, envolvidos no processo como: síntese de ácidos nucléicos, (DNA e RNA), síntese protéica e polimerização de microtúbulos. No bioensaio do ouriço do mar esses processos podem ser avaliados individualmente o que pode sugerir o mecanismo de ação da substância testada (FUSETANI, 1987).

Os extratos hidroalcoólicos e orgânicos testados apresentaram inibição desde a primeira divisão, porém as frações oriundas dos extratos orgânicos apresentaram maior efeito inibitório em todas as fases de divisão com CI_{50} menor que 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Compostos que inibem a síntese de DNA podem mostrar efeito desde a primeira clivagem, quando há um pico na produção de DNA (HAMMEL et. al.,, 1995). Outra alteração da síntese de DNA está relacionada ao retardo do desenvolvimento e surgimento dos blastômeros (FUSETANI, 1987).

A síntese de RNA, por sua vez não ocorre nas primeiras divisões celulares, sendo todo o RNA utilizado na síntese protéica proveniente do gameta feminino (BRANDHORST, 1985). Medicamentos como actinomicina D, que bloqueiam este processo, inibem o desenvolvimento embrionário do ouriço, a partir do estágio de mórula, quando o RNA é sintetizado (FUSETANI, 1987). A ação da actinomicina D, liga-se ao radical guanina do DNA o que bloqueia a ação da RNA polimerase impedindo a transcrição do DNA (CALABRESSI et. al., 2001).

Compostos que atuam no fuso mitótico inibem a partir da primeira clivagem. Substâncias como a citocalasina B afetam a polimerização dos microfilamentos e induz ao aparecimento de embriões unicelulares polinucleados o que sugere que houve duplicação do núcleo sem divisão do citoplasma (FUSETANI, 1987).

Pelos dados obtidos deste trabalho é provável que o possível mecanismo de ação dos extratos: hidroalcoólico e orgânico da *Calotropis. procera* Ait. f. esteja envolvido em alguma das etapas de duplicação celular.

Para verificar se a citotoxicidade sobre as células tumorais está envolvida com a lise da membrana plasmática um ensaio de atividade hemolítica foi realizado usando eritrócitos de camundongos que guardam semelhança com os eritrócitos humanos principalmente quanto à sensibilidade (COSTA-LATUFO et. al., 2002).

A estabilidade mecânica da membrana do eritrócito é um bom indicador dos efeitos de vários graus de lesão *in vitro* por vários compostos para demonstração de citotoxicidade e é dependente de propriedades físicas e estruturais da membrana (SHARMA, 2001).

Neste Trabalho avaliou-se a atividade hemolítica dos 5 extratos orgânicos (acetato , acetona, metanólico, hexânico e diclorometano) testados em eritrócitos de camundongos que mostraram capacidade hemolizante no intervalo de concentrações testadas: de 3,9 a 1000 µg/mL (Tabela 7).

Os resultados deste estudo evidenciaram que as frações: acetato de etila apresentou maior lesão eritrocitária, seguido do metanol e acetona, já o hexano e o diclorometano não apresentarão ação hemolítica. A ação das três primeiras frações sugerem um possível mecanismo de ação por dano a membrana celular, o que corrobora com os achados de SHARMA 2001, que apresentou um estudo com extrato etanólico (flor, raiz, botão, galho, folha) e acetato (folha e flor) onde avaliou a ação hemolítica da *Calotropis. procera Ait. f.* evidenciando ação com 0,5mg/mL (SHARMA, 2001).

O trabalho avaliou atividade antitumoral *in vivo* das frações dos extratos orgânicos: diclorometano (200 mg/kg), acetato de etila,(250 mg/kg) acetona (250 mg/kg), metanol (200 mg/kg, 400 mg/kg e 500 mg/kg) e 5-FU como controle positivo (50 mg/kg). A avaliação foi feita em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 (tratamento por via intraperitoneal). As frações obtidas, em diferentes solventes, do extrato do caule de *Calotropis. procera Ait. f.*, mostraram inibição dos tumores quando comparados ao controle. Observou-se que a fração diclorometano apresentou percentual de inibição de 16,6%. O extrato acetato de etila mostrou um percentual de inibição em torno de 64,3% enquanto para o extrato acetona o percentual foi em torno de 53,1%, o extrato metanólico nas doses de 400 mg/kg e 500 mg/kg, apresentou percentual de inibição de 47,1%; metanol 500 mg/kg apresentou percentual de inibição de 49,7% e metanólico 200 mg/kg não apresentou inibição significativa. O controle positivo 5-FU apresentou percentual de inibição de 96,5% (Tabela 8).

Os resultados acima sugerem que todas as frações apresentaram inibição tumoral, sendo que os extratos acetato de etila, acetona (250 mg/kg) e metanol (400 e 500 mg/kg) apresentaram uma redução significativamente estatística com $p < 0.05$ (Tabela 8, Figura 15).

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* via oral, do extrato metanólico (500 mg/kg) em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com carcinoma de Ehrlich, mostrou inibição do crescimento tumoral de 43,18% quando comparado ao controle negativo, salina, (Tabela 9, Figura 16) .

AKINLOYE, 2002 em estudo histopatológico de órgãos reprodutores masculinos de ratos tratados com extratos de folhas frescas de *Calotropis. procera* Ait. f. (20 mg/g) observou alterações na estrutura celular testicular, principalmente em animais tratados por períodos mais prolongados. Já em 1979 GARG estudando ratos expostos ao extrato de flores da *Calotropis. procera* Ait. f. por um período de 30 dias, observou alterações degenerativas graves das células de Sertoli. Esses dados corroboram com nossos achados, sugerindo que extratos de partes aéreas de *Calotropis. procera* Ait. f. demonstram atividade citotóxica, principalmente em células que apresentam elevado índice mitótico.

As análises histopatológicas dos órgãos removidos dos animais tratados sugerem que o fígado pode ser considerado como alvo potencial da toxicidade dos extratos orgânicos: acetato de etila, acetona (250 mg/kg - via intraperitoneal) e metanol (500 mg/kg - via intraperitoneal e oral). O extrato acetato de etila afetou o fígado, porém de forma menos intensa. As drogas podem ser consideradas causadoras de lesões em estruturas celulares quando administradas em pessoas ou animais, sendo estes achados, comprovados em biópsias. Muitas drogas com atividade antitumoral *in vivo* podem dar origem à lesões importantes em um determinado órgão alvo, assim como também, pode ocorrer com substâncias que apresentam estruturas químicas variadas e que diferem ocasionalmente e amplamente de suas ações farmacológicas (SCHEUER et. al., 2000).

Tumefação turva dos hepatócitos acompanhada por esteatose microvesicular em algumas áreas foram observadas nos animais tratados com os extratos acetato de etila, acetona (250 mg/kg - via intraperitoneal) e extrato metanólico (500 mg/kg - via intraperitoneal e oral), sugerindo hepatotoxicidade intrínseca., foi encontrado áreas de foco inflamatório tais Porém alterações são consideradas de caráter reversível, exceto quando ocorre um grande dano na estrutura do hepatócito (SCHEUER, 2000; KUMMAR, 2004; MCGEE et. al.,, 1992).

Nos animais do grupo controle, também foram visualizadas tumefação turva dos hepatócitos, áreas de congestão portal e da veia centrolobular e hiperplasia das células de Kupffer, sugerindo que estes efeitos estão relacionados ao metabolismo dos hepatócitos. Além disso, os animais tratados com 5-FU (via intraperitoneal) também apresentaram hiperplasia das células de Kupffer, o que sugere a toxicidade da droga (KUMMAR et. al., 2004).

Os extratos acetato de etila e acetona, administrados por via intraperitoneal mostraram ação nefrotóxica com áreas de hemorragia glomerular e tubular, onde o rim parece ser o maior alvo de toxicidade para estes dois extratos. No entanto, as alterações observadas nos animais tratados podem ser consideradas reversíveis (TISHER; BRENNER, 1994). Valendo salientar que o extrato metanólico não demonstrou ação nefrotóxica seja por via oral ou intraperitoneal.

Quanto à análise do tecido tumoral, os animais do grupo controle negativo apresentaram áreas de necrose de coagulação, sendo, provavelmente devido a hipóxia tecidual. Nos grupos tratados com os extratos orgânicos: acetato de etila, acetona (250 mg/kg - via intraperitoneal) e extrato metanólico (500 mg/kg - via intraperitoneal e oral), e 5-FU (50 mg/kg - via intraperitoneal) essas áreas devem-se provavelmente a atividade antitumoral (KUMMAR et. al.,, 2004).

Sendo assim, os dados obtidos nos ensaios *in vivo* confirmam o potencial anticâncer dos extratos orgânicos: acetato de etila, acetona e metanol obtidos da *Calotropis. procera* Ait. f., sugerindo que estes extratos apresentam potencial atividade antineoplásica. Entretanto os extratos testados parecem atuar de maneira direta, inibindo a síntese de DNA da célula tumoral, levando-a a morte, bem como sobre a lise da membrana plasmática, o que pôde ser observado pelo teste de atividade hemolítica.

Tanto a toxicidade *in vitro*, quanto *in vivo* demonstram um potente efeito dos extratos estudados, porém são necessários estudos mais detalhados para elucidar as substâncias responsáveis pelos efeitos tóxicos, pois a avaliação deu-se apenas em extratos, e não, em substâncias isoladas da *Calotropis. procera* Ait. f., devido a dificuldade de isolamento dos compostos bioativos.

6. CONCLUSÃO

A avaliação de frações oriundas dos extratos hidroalcoólico de partes aéreas (hexano, diclorometano e N-butanol) e etanólico do caule (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol), de *Calotropis. procera* Ait. f. apresentou elevado potencial citotóxico frente as linhagens de células tumorais testadas, bem como ambos os extratos inibiram de forma significativa a divisão celular em ovos de ouriço do mar, como também, foi demonstrado a ação hemolítica das frações obtidas do extrato etanólico. Quanto aos testes de atividade antitumoral *in vivo*, por via intraperitoneal em sarcoma 180, com as frações orgânicas acetato de etila, acetona e metanol como também por via oral em carcinoma de Ehrlich, com a fração metanólica, observou-se uma potente ação inibidora do crescimento tumoral para as frações estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINLOYE AK, ABATAN MO, ALAKA OO, OKE BO Histomorphometric and Histopathological studies on the effect of *Calotropis procera* (Giant Milkweed) on the male reproductive organs of wistar rats. **African Journal of Biomedical Research**. v.5: p.57-61, 2002.

ALI AN, JÜLICH W.-D., KUSNICK C, LINDEQUIST U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology** v..74, p.173-179, 2001.

BRANDHORST, B.P. Informational content of the echinoderm egg. **Dev. Biol.**, 1, 525 – 576, 1985.

BUTLER; DAWSON, Cell culture. Blackwell, Scientific Publications,1992.

CALABRESSI P, CHABNER B.A. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Ed. By Goodman LS. Mcgraw-Hill. Pp. 1381-1460, 2001.

CRAGG G.M, NEWMAN D.J, SNADER K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products** v.60: p.52-60, 1997.

CRAGG, M.G. & NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmac.**, 100, 72-79, 2005.

COSTA-LOTUFO L.V, JIMENEZ P.C, WILKE D.V, LEAL LKAM, CUNHA G.M.A, SILVEIRA E.R, CANUTO K.M, VIANNA G.S.B, MORAES M.O E PESSOA C Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Zeitschrift für Naturforschung** 58: 1-5, 2003.

CHABNER B.A., RYAN D.P., PAZ-ARES L., GARCIA-CHABONERO R., CALABRESI P. Antineoplastic agents. In: J.G. Hardman and L.E. Limbird (Ed.) Goodman ; Gilman`s The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, 1389-1459, 2001.

DAHANUKAR S. A, KULKARNI R. A, REGE N. N Pharmacology of Medical Plants and Natural Products. **Indian Journal of Pharmacology** v.32: p.S81-S118., 2000.

DEWAN S., SANGRAULA H., KUMAR V.L.Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology** v.73 p.307-311, 2000.

DEWAN S, SANGRAULA H, KUMAR V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology** 73: 307-311, 2000.

FERREIRA S.H, EDITOR. Medicamento a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.1998.

FERREIRA, M.B. Distrito Federal e Goiás sob ameaça de invasoras *Calotropis procera* (Ait). **R.Br.Rev Cerrado**, Brasília, n.21, p. 20-22, 1973.

FERREIRA, M.B.; GOMES V. *Calotropis procera* (Ait) **R.BR Oréades UFV.**, v.5, p. 20-22, 1973.

FUSETANI, N. Marine metabolites wich inhibit development of echinoderm embryos. In: Biorganic Marine Chemistry. Ed. P. J. Scheur. **Springer-Verlartg Berlin Heidelberg**, 175, 1987.

GARG, A. Effect of Ak *Calotropis procera* (Ait.) R.Br Flower Extract on Testicular Function of the Indian Desert Male Gerbil *Meriones hurrianae* Jerdon: A Biochemical & Histological Study.**Indian Jornal of experimental Biology**. v. 17, p. 859-862, 1979.

HAMMEL, E., Antimitotic natural products and their interactions with tubulin . **Medicinal Research Reviews**, 16, 207-31, 1996.

HANDA F. SEDANA JK, SHARMA P.K. Allergic contact dermatitis due to plant of *Calotropis procera* (vern: AK) A case Report. **Indian Journal Dermatology** v. 29, n.3 p. 27-29, 1984.

INCA. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, Brasil, 2004

INCA. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, Brasil, 2005.

JACOBS, R.S. & WILSON, L. Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: Modern analysis of antibiotics. **Ed. By A. Aszalar and Marcel Dekker, Inc.**, 481 - 493, 1986.

QUAQUEBEKE E, SIMON G, ANDRÉ A, DEWELLE J, YAZIDI ME, BRUYNEEL F, TUTI J, NACOULMA O, GUISSOU P, DECAESTECKER C, BRAEKMAN JC, KISS R, DARRO, F. Identification of a novel cardenolide (2'' – oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. **Journal of Medicine Chemistry**; 48: p.849-56, (2005).

KALITA D, SAIKIA C.N. Chemical constituents and energy content of some latex bearing plants. **Bioresource Technology** v.92 p.219-227, 2004.

KAMATH J. V, RANA A. C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia** v.73 p.111-115, 2002.

KHRISTOVA P., TISSOT M. Soda- anthraquinone pulping of hibiscus sabdariffa (karkadeh) and *calotropis procera* from Sudan.p.67-72, 1995.

KINGSTON D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: The Practice of Medicinal Chemistry. Ed. By Wermuth CG. Academic Press Limited, p.102-114, 1996.

KINGSTON D.G.I. Recent advances in chemistry of taxol. **Journal of Natural Products**, v.63: p.726-734, 2000.

KRUCZYNSKI A; HILL B.T. Vinflunine, the latest vinca alkaloid in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties. Clinical Review in **Oncology/Hematology** v.40: p.159-173, 2001.

KOROLKOVAS A Dicionário Terapêutico Guanabara. Editora Guanabara, cap. 12, Rio de Janeiro. (1998).

KUMAR S, DEWAN S, SANGRAULA H, KUMAR V L Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology** v.76 p.115-118. 2001.

KUMAR Y.L, SHIVKAR Y. M. In vivo and in vitro effect of latex of *Calotropis procera* on gastrointestinal smooth muscles. **Journal of Ethnopharmacology** v.93 p.377-379, 2004.

KUMMAR V, ABBAS A, FAUSTO N. Pathology Basis of Disease, 7th ed. China: WB Saunders: 1552, 2004.

LOURO I.D. Pronto-oncogênes e Genes Supressores de Tumor. Em Genética Molecular do Cancer. MSG Produção Editorial. São Paulo – SP.p. 63-79, 2002.

MAHMOUD O. M., HAROUN E. M., OMER O. H., ADAM S. E. I. Comparative efficacy of *Calotropis procera* latex and sulfaimine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidalis* infection in Najdi lambs. Small Ruminant. **Research** v.42 p.135-140 2001.

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

MARKOUK, M. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extrats for larvicidal activity. **Journal of Ethnopharmacology** v.73 p.293-297, 2000.

MCGEE, J.O.D., ISAACSON, P.A. & WRIGHT, N.A. Oxford Textbook of Pathology: Pathology of Systems. New York: **Oxford University Press**, 1708, 1992.

MELO M M, VAZ F. A, GONÇALVES L. C, SATURNINO H. M. Estudo fitoquímico da Calotropis rocera AIT, sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Ver.Bras.Saúde Prod.An.**:p.15-20, 2001.

MUNRO, M. H. G., LUIBRAND, R. T., BLUNT, J. W. The search for antiviral and anticancer compouds from marine organisms. In: **Biorganic Marine Chemistry**. Ed. P. J. Scheur. Springer. Springer-Verlarg Berlin Heidelberg, 1987.

NEWMAN J.D., CRAGG G.M., SNADER K.M Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA A. B., BRAGA F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**. v.1 n. 1 p. 49-58. 2003.

O'MARCAIGH A.S.; BETCHER D.L. The vinca alkaloids. **Journal of Pediatric Oncology Nursing** v.12(3): p.140-142, 1995.

ORTHOLAND J.Y.; GANESAN A. Natural products and combinatorial chemistry: back to future. **Current Opinion in Chemical Biology**. **B**: p.271-280, 2004.

PETROVIK P.R.; GONZÁLES ORTEGA G.; BASSANI V.L. From a medicinal plant to pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. *Ciência e Cultura*. v.49: p.364-369, 1997.

PRIMO G.R.P. Princípios da Oncogênese. Em Manual de Ginecologia Oncológica. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro – RJ. p. 11-28, 2004.

RASKIN I, RIBNICKY D.M., KOMARNYTSKY S. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology** v. 20 n.12, 522-531, 2002

REENTS, S Clinical Pharmacology: An Eletronic Reference and Teaching Guide. Gold Standart Multimedia Inc(1996).

ROCHA A.B., LOPES R.M., SCHWARTSMANN G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Phamacology** v.1: p. 364-369, 2001.

SCHEUER, P.J. & LEFKOWITCH, J.H. Drugs and Toxins. In: Scheuer PJ, Lefkowitz, JH, eds. *Liver Biopsy Interpretation*, 6th ed. London: **WB Saunders**, 134 - 150, 2000.

SHARMA P, SHARMA J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytos – by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Pharmacology** v.74: p.239-243. 2001

SHIVKAR M. Y, KUMAR V. L. Effect of anti-inflammatory drugs on pleurisy induced by latex of *Colotropis procera* in rats. **Pharmacological Research.** v.50 p.335-340, 2004.

SINGH H., KUMAR S., DEWAN S., KUMAR V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** v.43,p.219-224, 2000.

SINGH A. P., SANDHY A.S., Distribution of Steroids Like Compounds in Plant Flora. <http://www.siu.edu/~ebl/leaflets/steroids.htm>. Capturado em 20 de junho de 2005.

SMIT H. F.; WOERDENBAG H. J.; MEULENBELD G. J.; LABADIE R. P.; ZWAVING J. H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. **Journal Ethnopharmacology**; v.47 p. 75-84, 1995.

SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova.** v. 27 (2) p. 308-312, 2004

TABAK, D.G, MORAES, M.F. Biologia Molecular e a cirurgia oncológica. Em **Princípios da Cirurgia Oncológica**. Ed. Atheneu. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte v.I, p. 11-27, 1996.

TAHARA, S; IBRAHIM, R.K. Prenylated isoflavonoids-an update. *Phytochemistry* 38 (5): 1073-1094, 1995.

TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. Renal Pathology: with clinical and functional correlations, 2nd edition. Philadelphia: **J. B. hippincott Company**, 769, 1994.

TOMLINSON T.R.; AKERELE, O. Editors. Medicinal plants: their role in health & biodiversity. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1993.

WOLFE, S.L. Molecular and Cellular Biology. Wadsworth, 1993.

WWW.ICLC.IP/LISTANUOVA.HTML (Acesso em 10/08/2005).