



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AIAPINA
EM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

DANIELE HIDEMI OKABE

BELÉM - PA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AIAPINA EM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Autora: Daniele Hidemi Okabe

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcieni Ataíde de Andrade

Co-orientador: Anderson Bentes Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

BELÉM - PA

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniele Hidemi Okabe

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AIAPINA EM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marcieni Ataíde de Andrade (Orientadora)

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica/UFPA

Prof. Dr. Flávio Vasconcelos

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica/UFPA

Profa. Dra. Ana Cristina Baetas Gonçalves

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFPA

BELÉM-PA

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e dar forças para superar todos desafios,

A minha família, que sempre estiveram ao meu lado, apoiaram as minhas decisões e incentivaram os meus estudos,

A minha orientadora, Prof.^a Marcieni Andrade, pela oportunidade, por todo o conhecimento transmitido e por ter me guiado com muita sabedoria e dedicação durante esses anos de graduação,

Ao co-orientador Prof.^o Anderson Lima, pela paciência, pela dedicação e por toda a sua contribuição neste trabalho.

A Prof^a Alaíde Braga, Ana Cristina e Wagner Barbosa pela enorme contribuição intelectual prestada e disposição para o desenvolvimento do trabalho,

Ao Giovane Silva pela dedicação e por dividir a condução deste trabalho,

Ao Thiago Paixão, pela cumplicidade, pelos grandes ensinamentos e por todo o esforço e disposição para a condução deste trabalho,

Aos amigos, Lucas Villar, Matheus Bezerra, Renata Cunha, Cleiane Moraes e Surianne Trindade pela dedicação e inúmeras contribuições neste trabalho,

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia/UFPA: Ana Carla e João Paulo por compartilharem suas enormes virtudes e por todo o companheirismo,

A todos os colegas do biotério Luiz Carlos de Lima Silveira/UEPA

A todos os colegas do Laboratório do Laboratório de Morfofisiologia/UEPA,

A todos os colegas do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia/UFPA,

As colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia/UFPA,

E a todos que indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

OKABE, D. H. **Isolamento e avaliação antitumoral de aiapina em tumor ascítico de Ehrlich**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

Ayapana triplinervis é uma espécie vegetal amazônica, conhecida popularmente como japana, que possui as cumarinas como importantes constituintes químicos, tendo sua presença, relação com seus efeitos farmacológicos. Os extratos brutos da espécie têm demonstrado importantes efeito antitumoral. Por isso, esse estudo objetivou o isolamento de uma cumarina de *A. triplinervis* para avaliar o seu efeito antitumoral em tumor ascítico de ehrlich. Para isso, extratos de diferentes polaridades foram obtidos a partir de partes aéreas da planta e realizou-se a prospecção fitoquímica na droga vegetal e nos extratos obtidos. O extrato com melhor perfil para cumarinas foi selecionado para fracionamento por Cromatografia em Coluna. A fração cumarinica foi submetida a refracionamento e a substancia isolada foi identificada através de métodos cromatográficos e espectrais. A avaliação da toxicidade aguda e do efeito antitumoral da cumarina foi realizada em camundongos, através da avaliação do peso corporal e viabilidade celular nos animais tratados por via intraperitoneal com 10, 20 e 40 mg/kg de aiapina. Os ensaios fitoquímicos apontaram a presença de saponinas, esteroides e triterpenos, antraquinonas, polifenóis e cumarinas. O extrato de acetato de etila foi selecionado para fracionamento, no qual obteve-se 28 frações. As frações que obtiveram o melhor perfil de separação para cumarinas, foram as Fr 12 a 20. As frações foram reunidas e refracionadas para o isolamento da cumarina. Através das análises foi possível confirmar o isolamento da cumarina e identificá-la como 6,7-(metilenodioxo)cumarina, conhecida como aiapina. A cumarina foi considerada com baixo potencial tóxico aguda. A aiapina apresentou efeito antitumoral com tratamento intraperitoneal em camundongos com tumor ascítico de ehrlich nas doses de 10, 20 e 40mg/kg, através da redução do peso dos animais e diminuição de células tumorais no liquido ascítico. Desta forma, o presente estudo demonstrou pela primeira vez o potencial efeito antitumoral da aiapina.

Palavras-Chave: Aiapina; *Ayapana triplinervis*; cumarinas; tumor ascítico de ehrlich.

ABSTRACT

OKABE, D. H. **Isolation and antitumor evaluation of ayapina in Ehrlich ascites tumor.** Dissertation (Master), Pos-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2019

Ayapana triplinervis is an Amazonian plant species, popularly known as japa, which has coumarins as important chemical components, having its presence in relation to their pharmacological effects. Raw extracts of species have shown important antitumor effect. Therefore, this study aimed to isolate an *A. triplinervis* coumarin to evaluate its antitumor effect on Ehrlich ascites tumor. For this, extracts of different polarities were captured from aerial parts of the plant and performed in phytochemical prospecting of plant medicines and extracts used. The best profile extract for coumarins was selected for the relationship by Column Chromatography. The coumarin fraction was subjected to a relationship and an isolated substance was identified by chromatographic methods and spectral. The acute toxicity and antitumor effects of coumarin were evaluated in mice, attracting the evaluation of body weight and cell viability in animals, intraperitoneally with 10, 20 and 40 mg / kg of ayapina. Phytochemical assays showed the presence of saponins, steroids and triterpenes, anthraquinones, polyphenols and coumarins. The ethyl acetate extract was selected for the relationship, without qualifying 28 fractions. As fractions obtaining or better selection profile for coumarins, they were from Fr 12 to 20. As fractions were pooled and refracted for coumarin isolation. Through the analysis it was possible to confirm the isolation of coumarin and identify it as 6,7- (methylenedioxy) coumarin, known as ayapina. Coumarin was considered to have low potential in Mexico. Ayapine showed antitumor effect with intraperitoneal treatment in mice with ascending tumor at doses of 10, 20 and 40mg / kg, by reducing the weight of animals and cancer cells without ascites fluid. Thus, the present study demonstrates for the first time the potential antitumor effect of ayapina.

Keywords: *Ayapina*; *Ayapana triplinervis*; coumarins; Ehrlich ascites tumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Fases do Ciclo celular.....	17
Figura 2:	Ilustração de <i>A. triplinervis</i>	22
Figura 3:	Classificação dos tipos de cumarinas.....	27
Figura 4:	. CCD realizada com a droga vegetal de <i>A. triplinervis</i>	43
Figura 5:	Análise por cromatografia de camada delgada das frações do extrato de acetato de etila de <i>A. triplinervis</i> obtidas em coluna cromatográfica. Análise sob luz UV 365 nm	44
Figura 6:	Análise por cromatografia de camada delgada das frações do extrato de acetato de etila de <i>A. triplinervis</i> obtidas em coluna cromatográfica.....	46
Figura 7:	Cromatograma do extrato de acetato de etila de <i>A. triplinervis</i>	47
Figura 8	Cromatograma da Fr 12 a 20 do extrato de acetato de etila de <i>A. triplinervis</i>	47
Figura 9	Análise por cromatografia de camada delgada das subfrações obtidas em coluna cromatográfica.....	48
Figura 10	Análise por Cromatografia de Camada Delgada.	48
Figura 11	Cromatograma da subfração 13-25 de <i>A. triplinervis</i>	49
Figura 12	Cromatograma da Subfração Cumarínica de <i>A. triplinervis</i>	50
Figura 13	Espectro de massas obtido por EM-ESI [M+1] referente ao pico majoritário formado em TR3,56 min.....	50
Figura 14	Espectro de Infravermelho da Subfração cumarínica de <i>A. triplinervis</i>	51
Figura 15	. Espectro de RMN de 1 H da Subfração Cumarínica de <i>A. triplinervis</i> (CDCl ₃ , 400 MHz).....	52
Figura 16	Espectro de RMN de 13C da Subfração Cumarínica de <i>A. triplinervis</i> (CDCl ₃ , 400 MHz).....	53
Figura 17	Espectro de RMN de 13C-DEPT135 da Subfração Cumarínica de <i>A. triplinervis</i> (CDCl ₃ , 400 MHz).....	54
Figura 18	. Estrutura química da aiapina.....	54
Figura 19	Efeito da aiapina por via intraperitoneal em camundongos portadores de tumor ascético de ehrlich.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro: 1	Dados etnofarmacológicos de <i>Ayapana triplinervis</i>	23
Quadro: 2	Principais compostos de <i>Ayapana triplinervis</i> , obtidos em diferentes localizações geográficas no mundo.....	26
Quadro: 3	Parâmetros utilizados na prospecção fitoquímica da droga vegetal.....	32
Quadro: 4	Parâmetros utilizados para fracionamento do extrato de acetato de etila por CC.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	<i>Prospecção fitoquímica realizada com a droga vegetal de A. triplinervis.....</i>	41
Tabela 2:	Prospecção fitoquímica realizada com extratos obtidos de <i>A. triplinervis</i>	45
Tabela 3:	Rendimento as frações obtidas por cromatografia em coluna do extrato de acetato de etila de <i>A. triplinervis</i>	46
Tabela 4:	Comparação entre os dados de RMN de ¹ H e ¹³ C registrados na literatura para a molécula aiapina e os resultados obtidos da aiapina isolada.....	52
Tabela 5:	. Efeito da inibição tumoral da aiapina sobre a variação de peso dos animais.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CCl ₄	Tetracloroeto de Carbono
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EAE	Extrato de Acetato de Etila
EM	Espectrometria de Massa
GPS	<i>Global Positioning System</i>
MDA	Malondialdeído
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SCAT	Subfração Cumarinica de <i>A. triplinervis</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEORICO.....	15
2.1. Câncer.....	15
2.1.1. Aspectos gerais do Câncer	15
2.1.2. Ciclo celular e o câncer	16
2.1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich.....	17
2.1.4. Tratamento do câncer	18
2.2. Plantas medicinais e o tratamento do câncer	19
2.3. <i>Ayapana triplinervis</i>	20
2.3.1. Família Asteraceae.....	20
2.3.2. Gênero <i>Ayapana</i>	21
2.3.3. Espécie <i>Ayapana triplinervis</i>	21
2.3.3.1. Aspectos botânicos	21
2.3.3.2. Etnofarmacologia.....	22
2.3.3.3. Constituintes químicos	24
2.4. Cumarinas.....	26
2.4.1. Aspectos gerais	26
2.4.2. Atividade biológica.....	28
3.OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 Coleta do Material Vegetal	30
4.2. Identificação Botânica.....	30
4.3. Solventes utilizados	30
4.4. Obtenção da Droga Vegetal	30
4.5. Prospecção Fitoquímica da Droga Vegetal.....	30
4.6. Obtenção dos extratos.....	33
4.7. Análise fitoquímica dos extratos.....	33
4.8. Obtenção de frações	33
4.9. Seleção da fração rica em cumarinas	34
4.10. Fracionamento da fração cumarinica	34
4.11. Purificação da subfração.....	35
4.12. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)	35

4.13.	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrometria de Massas (CLAE-EM)	36
4.14.	Obtenção do Espectro de Infravermelho (IV)	36
4.15.	Obtenção do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	36
4.16.	Ponto de Fusão	37
4.17.	Avaliação do Efeito Farmacológico	37
4.16.1	Aspectos Éticos	37
4.16.2.	Animais de experimentação	37
4.16.3.	Avaliação da toxicidade aguda.....	37
4.16.4.	Manutenção e Implantação do tumor de Ehrlich	38
4.16.5.	Distribuição dos grupos experimentais	38
4.16.6.	Avaliação da atividade antitumoral	39
4.16.7.	Avaliação da inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal.....	39
4.16.8.	Viabilidade celular.....	40
4.18.	Análise estatística	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1.	Prospecção fitoquímica da droga vegetal	41
5.2.	Prospecção fitoquímica dos extratos	44
5.3.	Frações Obtidas por Cromatografia em Coluna	45
5.4.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD).....	46
5.5.	Fracionamento da fração cumarinica	47
5.6.	Purificação da cumarina majoritária	48
5.7.	Perfil Cromatográfico por CLAE-DAD	49
5.8.	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrometro de Massa ..	49
5.9.	Espectro de Infravermelho (IV).....	50
5.10.	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear.....	51
5.11.	Ponto de fusão	54
5.12.	Avaliação da toxicidade aguda	55
5.13.	Efeito antitumoral	55
5.13.1.	Variação do peso corporal	55
5.13.2.	Viabilidade celular	56
6.	CONCLUSÃO.....	58
7.	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXO	70

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública mundial, sendo considerado um conjunto de doenças caracterizada pelo crescimento anormal, desordenado e sem controle de células (INCA, 2012; INCA 2017).

Os principais métodos convencionais de tratamento para o câncer são: a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, entretanto a resistência de alguns tipos de câncer e a toxicidade para as células normais é apontada como as principais causas de falha terapêutica. Assim, a pesquisa de substâncias ativas com baixa toxicidade e com alto potencial terapêutico é uma das principais estratégias na tentativa de aumentar a sobrevivência dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento. Neste aspecto, os produtos de origem natural são uma considerável fonte para a pesquisa e desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer.

O uso de plantas medicinais para curar doenças e sintomas remonta ao início da civilização. A utilização de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local até as formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial (SANTOS-LIMA et al. 2016; SOUZA e LORENZI, 2008).

As plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, sendo considerada uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos (DIAS et al. 2005; VON POSER e MENTZ, 2004; SOUSA et al. 2008).

A maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO e BOLZANI, 2009). O isolamento e a identificação de substâncias, muitas vezes associada a ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos têm contribuído expressivamente para a área de produtos naturais (PUPO et al. 2007).

O Brasil, com destaque a região amazônica, possui uma variada biodiversidade que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional em relação ao uso de plantas medicinais, que ainda é pouco explorada cientificamente. Este rico arsenal a ser investigado, evidencia a necessidade de investimento na pesquisa voltada a elucidar as propriedades dos recursos naturais do país, para valorização e validação do conhecimento tradicional e para inovação terapêutica.

Neste sentido, *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M. King & H. Robinson é uma espécie vegetal nativa da região amazônica, pertencente à família Asteraceae, conhecida popularmente como Japana. *Eupatorium triplinerve* e *Eupatorium ayapana* são sinônimas da espécie, que pode ser encontrada em todo Brasil e em outros países da América Latina, Caribe e países asiáticos. Na medicina popular diversas são as alegações de uso medicinal, destacando-se as seguintes: o tratamento de tumores (AGAPITO e SUNG et al. 2003; BECKSTRONG-STERNBERG, 1994), de dores (DI STASI, 2000), de inflamações (AGAPITO e SUNG et al. 2003), de febre (SANTOS et al. 2012) e para cicatrização de feridas (NUNKOO E MAHOMOODALLY, 2012). Um estudo recente demonstrou que o tratamento com o extrato bruto de folhas de *A. triplinervis* (via intraperitoneal) foi eficaz contra a proliferação de células tumorais em camundongos submetidos à indução ao Tumor Ascítico de Ehrlich (MAITY et al. 2015).

Os constituintes químicos de *A. triplinervis* pertencem majoritariamente à classe das cumarinas, sendo correlacionadas a ações terapêuticas apontadas no uso etnofarmacológico da planta (PAIXÃO, 2016). No entanto, não existem estudos relacionando os compostos químicos da espécie com os efeitos farmacológicos. Neste sentido, torna-se importante a obtenção de derivados isoladas para avaliar os efeitos farmacológicos. Deste modo, este estudo propõe ampliar o conhecimento a cerca desta espécie e investigar a relação entre a cumarina isolada de *A. triplinervis* e o efeito antitumoral da espécie.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1. Câncer

2.1.1. Aspectos gerais do Câncer

O câncer é um problema de saúde mundial. No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano, apresentando relevância pelo perfil epidemiológico que a doença vem apresentando (INCA, 2012; INCA 2017)

Os termos “câncer”, “tumor maligno” ou “neoplasia” são utilizados para o conjunto de mais de cem doenças complexas caracterizada pelo crescimento anormal, desordenado e sem controle de células (INCA, 2016; WHO, 2015).

A etiologia da doença é considerada multifatorial, podendo ser causada por fatores internos (genotípicos) e externos (físicos, químicos e biológicos) ao organismo (SILVA, 2018).

O processo de carcinogênese surge de uma série de alterações genéticas e epigenéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos, representados por mutações, translocações, recombinações e anormalidades, que resultam em alterações inadequadas da proliferação, morfologia e funcionamento das células (LASSANCE et al., 2012; BRASILEIRO et al. 2013). Esse processo ocorre lentamente e passa por várias etapas até chegar ao tumor, sendo elas: iniciação, promoção e progressão (ALMEIDA et al. 2005)

O primeiro estágio é a iniciação e nessa etapa as células sofrem o efeito de um agente oncoiniciador que provoca alterações na sequência de DNA (mutação), dando origem a células pré-iniciadas (ALMEIDA et al. 2005).

A promoção é a segunda etapa para o desenvolvimento de um câncer, nessa fase as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes oncopromotores, que alteram a expressão de genes (ALMEIDA et al. 2005; JONES, 2012)

A terceira fase é a progressão tumoral que se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível, como resultado das alterações celulares sofridas nas fases anteriores (ALMEIDA et al. 2005)

O câncer pode ser considerado uma doença genética cujo desenvolvimento se deve a mutações em determinados genes que podem modular a proliferação ou a diferenciação da célula desencadeando a transformação do fenótipo celular. Por isso os genes com mutação são denominados como oncogenes (WESTPHAL et. al., 2003).

As alterações genéticas envolvidas na carcinogênese leva a ativação de diferentes tipos de oncogeneses e inativação de genes supressores de tumores, que estimulam a divisão celular desregulada, aumento da taxa mitótica e resistência a apoptose. (SHANMUNGAM et al. 2018). O acúmulo de danos genéticos e a replicação sem controle dão origem as células tumorais.

2.1.2. Ciclo celular e o câncer

A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células filhas durante a mitose (MALUMBRES e BARBACID, 2009).

O ciclo celular é um processo coordenado dividido em quatro fases: a fase de síntese, ou fase S; duas fases de intervalo (“gaps”) denominadas fases G1 e G2; e a mitose, também chamada de fase M (NOBURY E NURSE, 1992). E quando as células não proliferam, elas entram em estado de quiescência, conhecido como G0.

Na fase G1 ocorre a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA (ALMEIDA et al. 2005). A fase S é precedida pela etapa G1 e durante essa fase ocorre a duplicação de conteúdo genético da célula.

Na fase G2 ocorre a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específico da espécie) como a produção do fuso mitótico (ALMEIDA et al. 2005).

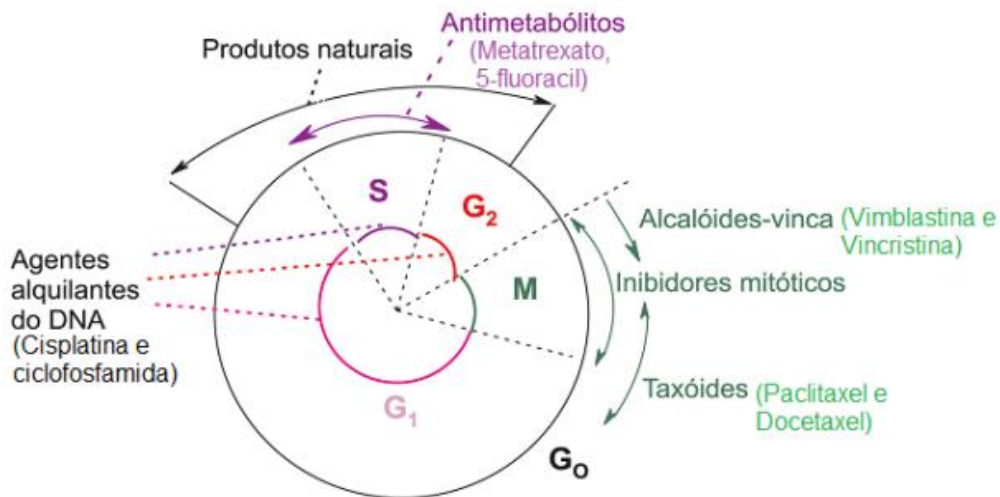


Figura 1. Fases do Ciclo celular (Almeida et al. 2005).

O ciclo celular é regulado por mecanismos denominados checkpoints, esses são responsáveis por proteger a transição entre as fases do ciclo celular, garantindo que o estágio precedente tenha sido completado sem erros e permitindo os defeitos sejam reparados, impedindo a sua transmissão para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (KHODJAKOV & RIEDER, 2009; MALUMBRES & BARBACID, 2009).

As células tumorais apresentam perda de controle na proliferação celular, no qual os checkpoints são ignorados, resultando em instabilidade genéticas e fazendo com que acumule uma série de mutações, não obedecendo o controle biológico do organismo (FISCHER et al. 2004; HANAHAN & WEINBERG, 2000).

2.1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich

Modelos experimentais de câncer em animais oferecem oportunidades de avaliação da atividade de compostos bioativos que oferecem perspectivas de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (HANSEN et al. 2004).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específico que corresponde ao adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea, mas que se desenvolve na forma sólida quando inoculado no tecido subcutâneo e na forma ascítica quando inoculado via intraperitoneal (SILVA et al. 2006; DAGLI, 1992).

O tumor ascítico de Ehrlich é um modelo tumoral que possui como característica o aumento da circunferência abdominal devido a formação de líquido ascítico tumoral, sendo utilizado para a investigação de novas modalidades terapêuticas na oncologia experimental (DAGLI, 1992).

O líquido ascítico possui como características a cor clara e as células tumorais são pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada e núcleo com cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes (PORTUGAL, 2012).

O tumor ascítico gera discreta resposta inflamatória e apresenta homogeneidade de distribuição celular possibilitando a contagem de células e assim uma precisão quantitativa nos transplantes, apresentando então vantagem devido o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (PALERMO-NETO et al., 2003; LIMA et al. 2017).

2.1.4. Tratamento do câncer

Os principais métodos de tratamento para o câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A indicação dos diferentes tipos de tratamento depende do tipo de tumor e do estadiamento clínico do paciente.

A quimioterapia é a terapia mais convencional, podendo ser utilizada de forma paliativa ou curativa, no qual o objetivo primário é destruir as células neoplásicas, preservando as normais (ALMEIDA et al. 2005).

Os medicamentos quimioterápicos mais utilizados são classificados de acordo com sua estrutura e função em: agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, alcalóides da vinca e agentes hormonais.

Os agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas, etileniminas, alquilsulfonatos, nitrosuréias e trizenos) são fármacos antineoplásicos que interagem quimicamente com o DNA, interferindo na replicação e transcrição do DNA, pois alquilam moléculas orgânicas levando a apoptose (SIKIC, 1994; CHU & SARTORELLI, 2006),

Os agentes antimetabólicos (análogos das purinas, análogos das pirimidinas e análogos do ácido fólico) incluem um grupo variado de compostos que exercem seus efeitos por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular (ALMEIDA et al. 2005).

Os antibióticos antitumorais (antraciclina, mitoxantrona, dactinomicina, bleomicina e mitomicina C) se ligam fortemente entre bases específicas do DNA, interrompendo o prolongamento da cadeia de DNA, o que ocasiona graves distorções cromossômicas, impedindo a duplicação e separação das cadeias de DNA, RNA ou ambas impedindo a proliferação celular (CHU & SARTORELLI, 2006).

Os alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina) consiste em uma classe de quimioterápicos antineoplásicos derivados de produtos naturais que possuem ação pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase (ALMEIDA et al. 2005).

Os agentes hormonais formam uma classe de quimioterápicos que não são citotóxicos, mas que são empregados para inibir o crescimento tumoral, pois algumas neoplasias possuem relação com os níveis hormonais (ALMEIDA et al. 2005).

Apesar da quantidade de medicamentos quimioterápicos já existentes para o tratamento do câncer, estes são relacionados a índices de recidivas, redução da sobrevida e muitas reações adversas, como náuseas, alopecia e mielossupressão (WORDING, PERISSINOTTI E MARINI, 2016; JUNQUEIRA e CHAMMAS, 2018).

As substâncias ativas com baixa toxicidade e com alto potencial terapêutico é uma das principais estratégias na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento e nesse aspecto os produtos de origem natural são uma considerável fonte para a pesquisa e desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer.

2.2. Plantas medicinais e o tratamento do câncer

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998).

Muitos medicamentos utilizados na quimioterapia para o tratamento do câncer foram descobertos a partir de plantas medicinais, através do isolamento de determinadas espécies ou derivadas de uma molécula natural, como exemplo a vimblastina, vincristina, irinotecan e taxanos (MORAES et al. 2011).

Devido ao enorme número substâncias naturais oriundas de plantas com aplicações farmacológicas, diferentes trabalhos têm investigado os potenciais efeitos antitumorais dos produtos naturais (ALVES et al., 2004)

Neste sentido, a família asteraceae é uma grande fontes de espécies vegetais de interesse terapêutico, devido ao grande número de plantas que apresentam atividade farmacológica (DI STASI, 2006; FERREIRA et al. 2013). A literatura apresenta diversos resultados com espécies da família que apresentaram efeito antitumoral.

O Brasil é uma rica fonte de plantas medicinais, a literatura demonstra que parte dos pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico faz uso de plantas medicinais ou fitoterápicos como forma complementar de tratamento (DAL MOLIN et al. 2012). No entanto, o uso de plantas medicinais e/ou produtos à base de plantas medicinais como tratamento complementar, em concomitância ao tratamento oncológico convencional, pode apresentar consequências indesejáveis

Assim, faz-se necessária a pesquisa das plantas medicinais tanto para descoberta de novos medicamentos antitumorais como para orientação refere ao uso de espécies vegetais e a terapêutica do câncer.

2.3. *Ayapana triplinervis*

2.3.1. Família Asteraceae

A família Asteraceae (Dicotiledonea) inicialmente foi descrita por Paul Dietrich Giseke como Compositae (DI STASI, 2000). Essa família possui aproximadamente cerca de 24.000 espécies distribuídas em torno de 1.700 gêneros, sendo apontada como uma das maiores família botânicas dentre as angiospermas (FUNK et al. 2009).

As espécies dessa família são monofiléticas e variam entre lianas, pequenas árvores, arbustos, subarbustos e ervas, com folhas alternas ou opostas, raramente verticiladas, simples, margem inteira ou serrada, e são frequentemente encontradas em diferentes ambientes, desde regiões semiáridas a ambientes aquáticos, sendo

considerada uma família de plantas cosmopolita (SILVA e ANDRADE, 2013; HIND, 2010. FUNK et al. 2009).

No Brasil, Asteraceae possui aproximadamente 2.000 espécies e 250 gêneros que estão distribuídas em todos os biomas, porém com maior diversidade nas formações campestres, como cerrado, campos rupestres e campos sulinos, e menos frequentes em áreas de mata atlântica, restinga, caatinga, brejos e florestas de altitude (ROQUE et al. 2016; FERNANDES e RITTER, 2009).

A família é considerada uma das como uma das maiores fontes de espécies vegetais de interesse terapêutico, devido ao grande número de plantas pertencentes a ela que são utilizadas popularmente com fins medicinais e que apresentam grande potencial químico com atividade farmacológica (DI STASI, 2006; FERREIRA et al. 2013).

2.3.2. Gênero Ayapana

Ayapana é um gênero de 18 espécies de plantas perenes, herbáceas e tropicais da América descrito pela primeira vez por Édouard Spach. A área do gênero se estende do norte ao sul, da Guatemala e da Índia Ocidental para a Bolívia, Paraguai, Guianas e o Brasil, sendo o norte dos Andes a região mais rica em espécies do gênero (DEL VITTO e PETENATTI, 2015).

Os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos com espécies de Ayapana tem demonstrado um grande número de propriedades terapêutica. No entanto o gênero ainda é pouco conhecido.

2.3.3. Espécie *Ayapana triplinervis*

2.3.3.1. Aspectos botânicos

Ayapana triplinervis (Vahl) R.M. King & H. Robinson (Figura 1) é uma erva pertencente à família Asteraceae, que possui como sinonímias científicas *Eupatorium triplinerve* Vahl e *Eupatorium ayapana* Veuten (ou Vent.). A espécie é uma erva de 20 a 30 cm, bastante delicada, perene, com caule ereto semilenhoso na base,

ferrugíneo e glabro. As folhas são aromáticas, simples, opostas, longas, lisas, lanceoladas, acuminadas, triplinervadas com 5 a 10 centímetros; as hastes possuem coloração marrom-avermelhada; inflorescência em forma de capítulos brancos com 6 a 12 mm de diâmetro e 20 a 30 flores reunidas em capítulos dispostos terminalmente; fruto do tipo aquênio, alongado, anguloso, estriado e diminuto com papilho do mesmo tamanho (GAUVIN-BIALECKI e MARODON, 2009; TAYLOR, 2006; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2000).

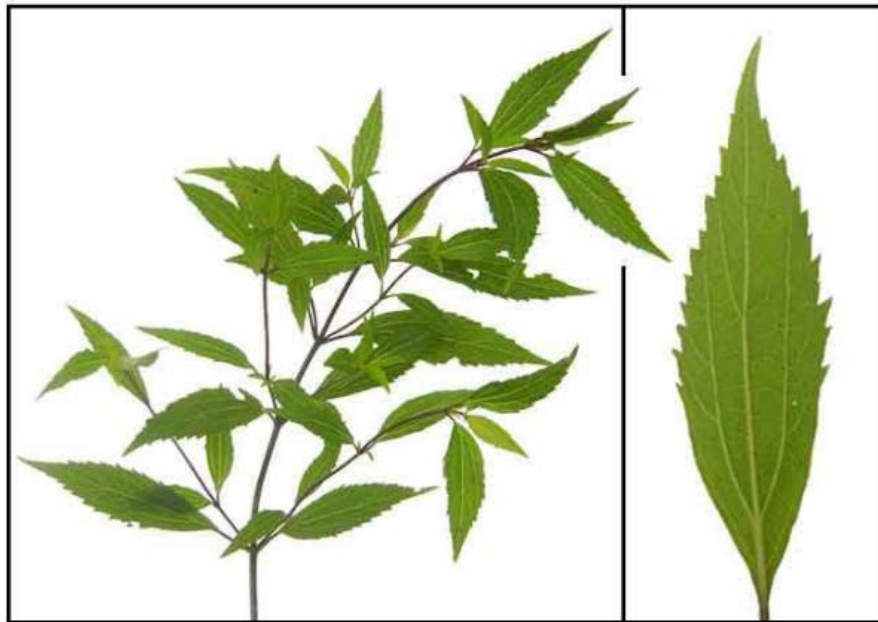


Figura 2. Ilustração de *Ayapana triplinervis* V. . (Fonte: GULBENKIAN, 2001)

Na região amazônica, *A. triplinervis* é conhecida principalmente pelo nome de Japana, no entanto possui outras denominações no Brasil, como: Japana Branca, Japana Roxa, Erva-de-cobra, Erva-santa, Iapana e Aiapana.

2.3.3.2. Etnofarmacologia

A. triplinervis é amplamente utilizada na medicina popular e sua finalidade varia conforme as regiões (Quadro 1). As formas de preparo da espécie são diversas, tais como: infusões, decocções, sumo, suco, extrato, emplasto e na forma de pó das partes aéreas, folhas secas ou frescas ou da planta inteira. No entanto, prevalece o uso interno de infusões e decocções.

País	Alegação de uso	Referências
Argentina	Promover menstruação; tratamento de tumores.	(MANFRED,1977; BECKSTRONG STERNBERG, 1994)
Brasil	Adstringente; aftas; angina; cicatrização; cólera; depurativo; diarreia; digestivo; disenteria; dor de cabeça; emoliente; escorbuto; estimulante; expectorante; febre; gengivite; gripe; hemorroida; dor urinária; inflamação na garganta; insônia; malária; náuseas; picadas de cobra; problemas nos olhos; problemas no ouvido; resfriados; sudorífico; tétano; tônico; tosse; tuberculose; irritações bucais; úlcera gástrica; verminose; vômito.	(AGAPITO E SUNG et al. 2003; BALBACH, 1995; LE COINT, 1947; MOREIRA, 1996; LE COINT, 1947; DI STASI, 1989; PIO CORREA, 1984; LE COINT 1947; RICARDO et al. 2017; MOREIRA, 1996; DI STASI E HIRUMA-LIMA, 2000; VIEIRA, 1992; VÁSQUEZ et al. 2014; DEFILIPPS et al. 2006; MORS et al. 2000; DI STASI E HIRUMA-LIMA, 2002; VAN DE BERG et al. 1984; PIO CORREA, 1984; JARDIM, 2009; ELISABETHSKY et al. 1990; JOINVILLE et al. 2008; PALHETA, 2017; VIEIRA, 1992; BRACK EGG, 1999)
Bangladesh	Febre.	(UDDIN et al. 2013; JAMILA E RAHMAN, 2016)
Estados Unidos	Cólera; indigestão; complicações respiratórias.	(TAYLOR, 2006)
Guianas	Digestivo; dor de cabeça; febre; gripe; hipertensão arterial, náuseas; resfriado; sudorífico; irritações bucais; vômito.	(TAREAU et al. 2017; DEFILLIPS et al. 2004; LE COINT 1947; AGAPITO E SUNG et al. 2003)
Ilha da Reunião	Malária.	(JOINVILLE et al. 2008)
Ilhas Maurício	Cicatrização; colite; diarreia; digestivo; dor estomacal; dor de cabeça; inflamação; resfriado; verminose; vômito.	(SAMOISY E MAHOMOODALLY, 2015; NUNKOO E MAHOMOODALLY, 2012; MAHOMOODALLY E SREEKEESON, 2014; SAMOISY

		E MAHOMOODALLY, 2016; MAHOMOODALLY E MUTHOORAH, 2014; SREEKEESON E MAHOMOODALLY; 2014)
Índia	Acne; Anemia; Antisséptico; cicatrização; constipação intestinal; digestivo; dor nas articulações; estimulante; estimulante cardíaco; hemorragia; hemostática; hipertensão arterial; sudorífico; tônico.	(GOSH, 2008; DAS BONDYA, 2015; DEEPHY et al. 2014; SHARMA E CHETRI, 2017; BOSE E ROY, 1936; SINGH,2012; PATTANAYAK et al. 2016; SINGH, 2012; BRACK EGG, 1999; AGAPITO E SUNG et al. 2003)
Filipinas	Febre; Sudorífico; Tônico	(TAYLOR, 2006)
Paquistão	Adstringente; antisséptico; depurativo; digestivo; dor de cabeça; escorbuto; febre; gripe; problemas nos ouvidos; problemas nos olhos; resfriado; tosse; úlceras.	(AHMAD et al. 2014)
Peru	Adstringente; cicatrização; cólica; depurativo; diarreia; dor estomacal; edema estimulante hemorragia; dor urinária; picada de cobra; sudorífico; tétano; tumor.	(MORS et al. 2000; AGAPITO E SUNG et al. 2003; BALBACH, 1995; BRACK EGG, 1999; ARÉVALO, 1994; DEFILIPPS et al. 2006; BOSE E ROY, 1936; PASTOR et al. 1996)
Trindade e Tobago	Promover menstruação; Verminose; gripe; constipação; pneumonia; febre amarela.	(LANS, 2007a; LANS 2007b; TAYLOR, 2006)

Quadro 1. Dados etnofarmacológicos de *A. triplinervis*.

2.3.3.3. Constituintes químicos

As análises fitoquímicas realizadas com *A. triplinervis* apontaram a presença de diferentes classes de metabólitos secundários na espécie.

Na triagem fitoquímica do extrato éter de petróleo obtido das folhas de *A. triplinervis* realizada por Parimala e colaboradores (2012) na Índia foi detectada a presença esteroides, carboidratos, taninos, glicosídeos e alcaloides.

A prospecção fitoquímica realizada no Brasil por Paixão (2016) com os extratos de hexano, acetato de etila e metanol obtidos através do processo de maceração, detectou a presença de cumarinas, esteroides e triterpenos para todos os extratos e polifenóis para o extrato metanólico. Além disso, foi realizada extração direcionada na droga vegetal de acordo com a classe a ser testada e observou a presença de heterosídeos antraquinônicos, polifenóis, cumarinas, esteroides e triterpenos na espécie.

No entanto, dentre os constituintes químicos já identificados na espécie destaca-se a classe das cumarinas e os derivados terpênicos e oxigenados (Quadro 2).

País	Parte utilizada	Extrato	Composto majoritário	Referência
Bangladesh	Partes aéreas	Óleo Essencial	2-terc-butil-1,4-metoxibenzeno	(BEGUM et al. 2010),
Brasil	Folhas e caules	Óleo Essencial	Éter dimetílico da timol hidroquinona	(MAIA et al. 1999)
Brasil	Partes aéreas	Extrato de acetato de etila	Ayapina	(PAIXÃO, 2016)
Ilha da Reunião	Folhas	Óleo Essencial	Éter dimetílico da timol hidroquinona	(GAUVINBIALECKI E MARODON 2009)
Índia	Folhas	Extrato etanólico	Ayapanina	(CHERIYAN et al. 2017)
Índia	Folha	Óleo Essencial	Selina-4(15),7(11)-dien-8-one	(GUPTA et al. 2004)
Índia	Planta	Extrato metanólico	ácido hexadecanoico	(SELVAMANGAI e BHASKAR, 2012)

Índia	Folhas	Óleo Essencial	Éter dimetílico da timol hidroquinona	(GARG e NIGAM,1970; (KUMAR et al. 2014)
Índia	Flores	Óleo Essencial	Éter dimetílico da timol hidroquinona	(GARG e NAKHARE, 1993)
Índia	Caule	Óleo Essencial	Éter dimetílico da timol hidroquinona	(KUMAR et al. 2014)
Vietnan	Partes aéreas	Extrato aquoso	Timoquinona	(TRANG et al. 1993).

Quadro 2. Principais compostos majoritários isolados de *A. triplinervis*.

Trang et al. (1993) conseguiu identificar e isolar após recristalização do extrato bruto de partes aéreas *A. triplinervis*, as cumarinas ayapina e ayapanina e após realização de técnicas cromatográficas no resíduo identificou e isolou éter dimetílico timol hidroquinona, éter metílico do timol e timoquinona.

Cheriyen et al. (2017) identificou e isolou a ayapanina na fração de acetato de etila do extrato etanólico obtidos de folhas de *A. triplinervis*. e Paixão (2016) identificou a ayapanina como constituinte majoritário da fração de acetato de etila, do extrato de acetato de etila, obtidos de partes aéreas da mesma espécie.

Além de ayapina e ayapanina, foram isoladas na espécie as cumarinas: umbeliferona, dafnetina, éter dimetílico da dafnetina, éter 7-metílico da dafnetina e hidragentina (CHATURVEDI e MULCHANDANI, 1989).

2.4. Cumarinas

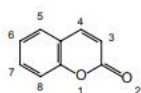
2.4.1. Aspectos gerais

As cumarinas naturais possuem papel importante na bioquímica e fisiologia vegetal (ZAVRŠNIK et al., 2011). Os compostos cumarínicos constituem uma classe química de metabólitos secundários presentes em diferentes partes das plantas, como nas raízes folhas, flores e frutos de algumas famílias de Angiospermae como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Graminae e Orquidaceae (monocotiledônias) bem

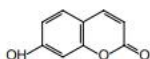
como em Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae, entre outras. (RIBEIRO e KAPLAN, 2002).

O núcleo básico de todas as cumarinas é resultante da fusão dos anéis benzeno e 1,2- pirona (COSTA, 1994). A cumarina (1,2-benzopirona) é o representante mais simples da classe e o padrão de substituições na estrutura química básica influencia as propriedades farmacológicas e bioquímicas da cumarina, incluindo as aplicações terapêuticas e toxicidade (MUSA et al. 2008). Assim, as cumarinas podem ser classificadas como: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas (Figura 2).

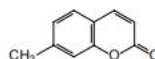
CUMARINAS SIMPLES



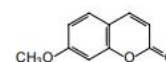
Cumarina per se



7-hidroxicumarina

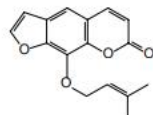


7-metilcumarina

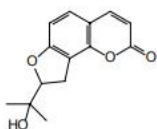


7-metóxicumarina

FURANOCUMARINAS

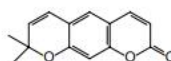


Furanocumarina linear

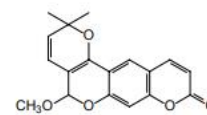


furanocumarina angular

PIRANOCUMARINAS

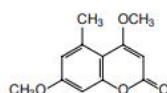


Piranocumarina linear



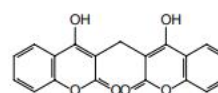
piranocumarina angular

CUMARINAS COM SUBSTITUINTES NO ANEL PIRONA

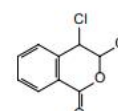


C₃ substituída

CUMARINAS MISCELÂNEAS



cumarina dimérica



isocumarina

Figura 3. Classificação dos tipos de Cumarinas. (Fonte: GULBENKIAN, 2001).

As cumarinas simples são compostos derivados da cumarina que contêm substituintes como: hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquil, entre outros (BRUNETON, 1995). As furanocumarinas possuem um anel furano condensado ao núcleo cumarínico e as piranocumarinas apresentam um anel pirano (MURRAY, 1989). As cumarinas com substituintes no anel pirona possuem substituintes na posição C3 e C4 (BRUNETON, 1995). E as cumarinas miscelâneas são cumarinas diméricas (MURRAY, 1989).

2.4.2. Atividade biológica

Os derivados cumarínicos têm inúmeras aplicações terapêuticas, incluindo fotoquimioterapia, terapia antitumoral e anti-HIV, estimulantes do sistema nervoso central, antibacteriano, anti-inflamatório e anticoagulante (MUSA et al. 2008).

Alguns derivados cumarínicos têm sido utilizados em tratamentos de doenças vasculares periféricas (KUMAR et al., 2011). A varfarina é um importante exemplo de derivado cumarínico obtido por rotas sintéticas utilizado como anticoagulante oral e prevenção do tromboembolismo venoso (MUELLER, 2004).

A 7-hidroxicumarina apresentou efeito antibacteriano atividade sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (RAHMAN; GRAY, 2002).

A 6-nitro-7-hidroxicumarina apresentou efeito como agente seletivo e anti-proliferativo em células de carcinoma renal (A-498) a, capaz de induzir alterações no ciclo celular e possibilitar a morte da célula por apoptose (FINN et al., 2004).

A cumarina e seu metabólito ativo, 7-hidroxicumarina, demonstraram atividade citostática inibitória do crescimento em linhas celulares de câncer humano, como A549 (pulmão), ACHN (renal), H727 (pulmão), MCF-7 (mama) e HL -60 (leucemia), e também foram relatados atividade contra o câncer de próstata, melanoma maligno e carcinoma de células renais metastático em ensaios clínicos (MUSA et al. 2008).

Estudo realizado por LOPEZ-GONZALEZ et al. (2004) demonstraram que a cumarina e a 7-hidroxicumarina inibiram o crescimento celular em todas as linhas celulares de carcinoma do pulmão.

Diante de vários exemplos de de cumarinas com efeito antitumoral, a classe de metabólitos secundário representa um grande potencial para a descoberta de novos agentes antitumorais.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolar, identificar e avaliar o efeito antitumoral de aiapina em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar aiapina por cromatografia de coluna de extrato de *A. triplinervis*.
- Identificar a aiapina através de métodos cromatográficos e espectrais.
- Avaliar toxicidade aguda via intraperitoneal de aiapina.
- Avaliar o potencial efeito antitumoral de aiapina em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta do Material Vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no mês de maio de 2016 no município de Acará, estado do Pará, na região localizada a 01°32.684' de latitude sul e a 048°23.984' de longitude leste, coordenadas geográficas obtidas por um aparelho de GPS (Global Positioning System).

4.2. Identificação Botânica

A identificação botânica da espécie foi realizada por especialista do Herbário João da Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi onde uma exsicata foi registrada pelo número MG123913.

4.3. Solventes utilizados

Foram utilizados: Acetato de etila P.A. (Neon®), Acetonitrila grau CLAE (Tedia Company®), Acido acético glacial P.A. (Dinâmica®), Acido fórmico (Dinâmica®), Clorofórmio P.A. (Sinthy®), DMSO-D6 (Sigma Aldrich®), Etanol P.A. (Neon®), Hexano P.A. (Neon®), Metanol P.A. (Neon®), Metanol grau CLAE (Tedia Company®) e Tolueno P.A. (Sinthy®)

4.4. Obtenção da Droga Vegetal

As partes aéreas do material vegetal foram selecionadas, lavadas em água corrente e posteriormente lavada com etanol a 10%. Após o procedimento, o material foi submetido à secagem em temperatura ambiente por 24 horas e em estufa com fluxo de ar forçado (40°C). O material seco foi pulverizado em moinho de facas, pesados e armazenado adequadamente.

4.5. Prospecção Fitoquímica da Droga Vegetal

A prospecção fitoquímica da droga vegetal foi realizada através de CCD (cromatografia de camada delgada) (WAGNER e BLADT, 2001) e dos testes de

coloração, precipitação e outros (COSTA, 1994); para isso a droga vegetal foi submetida a um processo de extração direcionada a classes de metabólitos secundários testada: saponinas, alcaloides, flavonoides, esteroides e triterpenos, antraquinonas, compostos fenólicos e cumarinas. Em todos os testes foi utilizado uma droga vegetal padrão para cada classe de metabólitos como controle positivo.

Na análise por CCD, utilizou-se cromatoplaça de alumínio recoberta por sílica gel 60G F254 Merck®. A CCD para cumarinas, alcaloides e flavonóides foram utilizados como padrão a 1,2-benzopirano, pilocarpina e a quercetina, respectivamente, e para esteroides e triterpenos, antraquinonas e polifenóis foi utilizado uma droga vegetal padrão como controle positivo (PAIXÃO,2016). Os parâmetros utilizados para as análises estão apresentados no Quadro 3.

Classe química	Droga vegetal padrão	Reação de identificação	CCD	
		Indicador/ Reação	Fase móvel	Revelador
Saponinas	<i>C. Officinalis</i>	Espuma	-	-
Alcalóides	<i>C. Calisaya</i>	<u>Dragendorf</u> <u>Bouchadart</u> <u>Mayer</u> Complexação com ácido tânico	Tolueno: acetato de etila: dietanolamina (70:20:10)	Reativo de Dragendorff
Flavonóides	<i>C. Sinensis</i>	<u>Shinoda</u> <u>Hidróxido de sódio</u> <u>Cloreto de alumínio</u> <u>Oxalo bórica</u>	Tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico (75:25:10:6)	Solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl ₃) 2% (UV365nm)
Esteróides e Triterpenos	<i>P. Ginseng</i>	Lieberman-Bouchardat	Tolueno: clorofórmio: metanol (40:40:10)	Reativo de Liebermann-Burchard (UV365nm)
Antraquinonas	<i>R. Purshiana</i>	Identificação de antraquinonas livres <u>Identificação de O-heterosídeos</u> <u>Identificação de C-heterosídeos</u>	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Solução etanólica de KOH 10% (UV365nm)
Compostos fenólicos	<i>S. adstrigens</i>	<u>Cloreto férrico</u> <u>Acetato de cobre</u> <u>Acetato de chumbo</u> Complexação com gelatina	Tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico (40:30:30:10)	Solução metanólica de cloreto férrico (FeCl ₃) 1% (VIS)
Cumarinas	<i>C. Limon</i>	Hidróxido de potássio	Tolueno: éter (1:1), saturado com ácido acético glacial 10%	Solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH) 10% (UV-365nm)

Quadro 3. Parâmetros utilizados na prospecção fitoquímica da droga vegetal.

4.6. Obtenção dos extratos

O material vegetal foi submetida a extração consecutiva com solventes de polaridades crescentes (n-hexano, acetato de etila e metanol), sendo que cada solvente permaneceu em contato com 1000g da droga vegetal durante 2 dias e, em seguida, realizou-se a filtração e a torta residual foi submetido à remaceração com o respectivo solvente por 48 horas.

As soluções extrativas obtidas do mesmo solvente foram reunidas, concentradas em evaporador rotativo Buchi Rotavapor modelo R-210, e levados à estufa para completar a evaporação do solvente, a 45 °C. Os extratos foram pesados e o rendimento foi calculado.

4.7. Análise fitoquímica dos extratos

A prospecção fitoquímica dos extratos foi realizada adotando os mesmos parâmetros dos testes de coloração, precipitação e outros (COSTA, 1994) e conforme o resultado da prospecção realizada para a droga vegetal, sendo realizado apenas para a classe de metabólitos que foram positivas para a droga vegetal.

4.8. Obtenção de frações

O extrato que apresentou melhor perfil cromatográfico para cumarinas foi o extrato de acetato de etila e por isso foi selecionado e submetido a fracionamento por Cromatografia de Coluna (CC), para isso utilizou-se uma coluna de vidro de 80 cm e como fase estacionaria foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) e o sistema de eluição foi realizada com diferentes proporções dos solventes hexano, acetato de etila e metanol Os parâmetros utilizados no fracionamento estão detalhados no quadro 4, as frações obtidas foram concentradas e evaporador rotativo e secas a estufa a 50°C.

Quadro 4. Parâmetros utilizados para fracionamento do extrato de acetato de etila por CC.

Parâmetros	Especificações
Altura da coluna	80 cm
Diâmetro da coluna	5,5 cm
Massa de sílica gel	200g
Amostra do extrato	10g
Fase Móvel	1. Hexano 2. Hexano: acetato de etila (9:1) 3. Hexano: acetato de etila (7:3) 4. Hexano: acetato de etila (1:1) 5. Acetato de etila (100%) 6. Acetato de etila: metanol (1:1) 7. Metanol: acetato de etila (7,5:2,5) 8. Metanol
Volume da fase móvel	500mL

4.9. Seleção da fração rica em cumarinas

Para a seleção da fração rica em cumarinas o perfil cromatográfico de cada fração foi analisado. Para isso foi feita CCD em cromatoplasmas de alumínio recobertas por sílica gel 60G F254 Merck, tendo como sistema de eluente Hexano: Acetato de Etila 8:2 e as cromatoplasmas foram visualizado em câmara escura sob luz UV de 365 nm a fim de observar cumarinas, que é evidenciada pela formação de mancha verde-fluorescente e/ou a azul-fluorescente. Além disso, foi feito CCD em cromatoplasmas, com o sistema de eluente tolueno-éter e revelado com solução de anisaldeído (PAIXÃO, 2016).

As frações que apresentaram semelhanças no perfil cromatográficos foram reunidas, em uma fração rica em cumarinas. Os métodos utilizados para o isolamento da substancia majoritária presente no extrato de acetato de etila de *A. triplinervis* foram realizados no laboratório de fitoquímica da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.10. Fracionamento da fração cumarinica

A fração cumarínica foi submetida a um novo fracionamento para a obtenção de subfrações mais puras, para isso foi utilizado coluna 40 cm x 3 cm, e eluição isocrática de hexano e acetato de etila. As subfrações coletadas foram concentradas

em evaporador rotativo e o perfil cromatográfico foi acompanhado por CCD, com eluição hexano: acetato de etila 1:1 em cromatoplasmas de alumínio recobertas por sílica gel 60G F254 Merck.

4.11. Purificação da subfração

A recristalização foi realizada para a purificação da cumarina. Para isso, 100 mg da subfração foi dissolvida em solução metanol:hexano 1:1 e submetidos a banho maria em chapa aquecedora em 100°C até dissolução total. Após resfriamento em temperatura ambiente, o sobrenadante foi retirado da amostra.

4.12. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

As amostras (2 mg) foram solubilizadas em 1 mL de metanol (grau CLAE) em banho ultrassônico por 20 min., posteriormente centrifugadas a 10.000 rotações por min. (RPM) por 10 min.

A cumarina isolada foi analisada no Cromatógrafo Acquity UPLC HClass® com detector PDA Waters®, realizado no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), utilizando coluna de fase reversa (12,5 x 4,5 cm, LiChroCART® RP 18-5 µm) no qual as condições cromatográficas foram estabelecidas de acordo com a metodologia de perfil exploratório, com tempo de varredura de 18 min (PAIXÃO, 2016).

As amostras (2 mg) foram solubilizadas em 1 mL de metanol (grau CLAE) em banho ultrassônico por 20 min., posteriormente centrifugadas a 10.000 rotações por min. (RPM) por 10 min.

A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C, sendo utilizada como fase móvel o gradiente linear de 5 a 95% de água deionizada (H₂O) contendo 0,1 % de ácido fosfórico (eluente A) e acetonitrila (ACN) contendo 0,1 % de ácido fosfórico (eluente B), com fluxo de 0,3 mL/min., injetando-se 4,0 µL da solução de cada amostra.

As leituras foram realizadas na região do UV (220 a 400 nm) e os cromatogramas foram registrados em 280 nm.

4.13. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

O espectro de massas da cumarina isolada foi obtido em equipamento UPLC-PDAMS/ESIWATERS ACQUITY® H-Class Core System, do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram preparadas dissolvendo-se 2,5 mg de cada uma em 1 mL de metanol grau CLAE, sob sonicação em aparelho de ultrassom por 20 minutos, sendo então centrifugadas por 10 minutos a 10.000 RPM e filtradas em filtro de nylon de seringa (4mm x 22 µm).

4.14. Obtenção do Espectro de Infravermelho (IV)

A aiapina foi submetido à análise por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IR Prestige 21 Shimadzu®), para isso 1 mg da fração foi compactada em pastilhas com brometo de potássio (KBr), sendo o espectro obtido em transmitância na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com 32 varreduras e resolução de 1 cm^{-1} .

4.15. Obtenção do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A cumarina foi submetida a análises por RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT 135 em espectrômetro Bruker Avance DPX200® no Laboratório de RMN de Alta Resolução – LAREMAR, Departamento de Química da UFMG.

A amostra foi solubilizada em clorofórmio deuterado (CDCl_3), os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS).

4.16. Ponto de Fusão

Os pontos de fusão da aiapina foi determinada através do aparelho de ponto de fusão Microquímica, modelo MQAPF-301.

4.17. Avaliação do Efeito Farmacológico

4.16.1 Aspectos Éticos

Os animais utilizados na presente investigação foram cuidados segundo a legislação nacional para Procedimentos para o Uso Científico de Animais em vigor (Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram obtidos após aprovação do presente projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA), sob o número de protocolo 12-2017 (Anexo I).

4.16.2. Animais de experimentação

Nessa pesquisa, foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos, adultos (aproximadamente 60 dias de idade), pesando entre 30 e 40 g, mantidos no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada a Saúde da UEPA/CCBS. Os animais foram acondicionados em gaiolas de acrílico apropriadas com fundo contendo maravalha, mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 25 °C, recebendo água e comida *ad libitum* e ciclo diário de luz/escuro de 12 horas, durante o período do experimento. A limpeza e a troca das palhas, da água e da comida foram realizadas em dias alternados.

4.16.3. Avaliação da toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda da cumarina isolada foi realizada baseada no “guidelines for Testing of Chemicals” nº 423 da Organisation for Economic Co-operation and Development com adaptações (OECD, 2008). Camundongos (n= 3) foram tratados com única dose de 2000 mg/kg da cumarina isolada, dissolvida em DMSO 2%, por via intraperitoneal. Ao grupo controle foi administrado somente o veículo. A seguir foram acomodados em gaiolas e observados por um período de 4 horas para avaliação de possíveis alterações comportamentais ou morte.

Após este período, foram avaliados de 24/24h por um período total de 14 dias com o intuito de verificar a possível ocorrência de óbito e alteração no peso corporal (OECD, 2008). Durante todo o período de observação foram disponibilizados ração e água ad libitum.

4.16.4. Manutenção e Implantação do tumor de Ehrlich

As células tumorais de Ehrlich foram cedidas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) e mantidas em congelamento (-80 °c) no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (Belém, PA, Brasil).

. As células foram descongeladas e injetadas via intraperitoneal em um animal doador (n=2), que proliferou células do tumor de Ehrlich *in vivo*, para aplicação de células do modelo experimental nos animais a serem estudados.

Para realização do trabalho, o carcinoma de Ehrlich foi obtido do líquido intraperitoneal do camundongo doador contendo as células tumorais após 10 dias da indução. O líquido intraperitoneal foi aspirado com auxílio de uma seringa estéril e posteriormente colocado em uma placa de Petri.

As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de trypan e a suspensão celular foi preparada em 0,9% de Cloreto de Sódio (NaCl) para uma concentração de $1,6 \times 10^6$ células/mL e 1 mL da suspensão de células resultante foi inoculada por via intraperitoneal nos animais.

4.16.5. Distribuição dos grupos experimentais

Após inoculação com células do carcinoma de Ehrlich, os animais foram distribuídos de forma randomizada em grupos de 5 animais. Para o experimento, foram considerados os seguintes grupos:

1. Grupo controle tumoral (GT) (n=5): composto por camundongos que receberão apenas o veículo (DMSO 2%) por via intraperitoneal no volume de 0,50 mL/Kg/dia.

2. Grupo tratamento I (Aiapina 10 mg/kg) (n=5): composto por camundongos que receberam a Aiapina na dose de 10 mg/kg de peso corporal, solubilizada em solução DMSO 2% por via intraperitoneal.

3. Grupo tratamento II (Aiapina 20 mg/kg) (n=5): composto por camundongos que receberam a Aiapina na dose de 30 mg/kg de peso corporal, solubilizada em solução DMSO 2% por via intraperitoneal.

4. Grupo tratamento III (Aiapina 40 mg/kg) (n=5): composto por camundongos que receberam a Aiapina na dose de 60 mg/kg de peso corporal, solubilizada em solução DMSO 2% por via intraperitoneal.

5. Grupo controle positivo (Ciclofosfamida) (n=5): composto por camundongos que receberam ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg de peso corporal, diluído em solução salina fisiológica 0,9%, por via intraperitoneal.

4.16.6. Avaliação da atividade antitumoral

A atividade antitumoral foi determinada com base no percentual de inibição do crescimento tumoral. Dois métodos distintos de avaliação foram utilizados para obtenção dos valores percentuais de inibição do crescimento tumoral: percentual da inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal e contagem de células tumorais.

4.16.7. Avaliação da inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal

A evolução do peso corporal foi registrada diariamente pesando os camundongos em balança eletrônica de precisão no período de 10 dias.

A variação do peso corporal foi obtida pela diferença entre a medida final (após o décimo dia de tratamento ou utilizado o dado de um dia anterior a confirmação do óbito) e a medida inicial (antes de iniciar qualquer tratamento).

A partir destes dados foi determinado o percentual de inibição do crescimento tumoral como proposto por Sunil e colaboradores (2013), de acordo com a expressão descrita:

$$\% \text{ Inibição do Crescimento Tumoral} = \frac{\Delta \text{BW grupo tumor} - \Delta \text{BW grupo tratado}}{\Delta \text{BW grupo tumor}} \times 100$$

Onde ΔBW corresponde a variação do peso corporal.

4.16.8. Viabilidade celular

No décimo dia de tratamento os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia. Em cada animal, foi realizada uma incisão longitudinal na cavidade abdominal para coleta do líquido ascítico.

O líquido intraperitoneal foi aspirado com auxílio de uma seringa estéril e posteriormente colocado em uma placa de Petri.

As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de trypan, para isso as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% (p/v) e ressuspendida, de modo a se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. 20 μ l das células foram misturadas a 20 μ l de azul de Trypan e contabilizadas em câmara de Neubauer.

4.18. Análise estatística

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste Test-t, considerando-se um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Prospecção fitoquímica da droga vegetal

A droga vegetal foi submetida a uma série de reações de caracterização fitoquímica e apontou a presença de saponinas, esteroides e triterpenos, antraquinonas nas formas O-heterosídeo e C-heterosídeo, polifenóis e cumarinas (Tabela 1).

Tabela 1. Prospecção fitoquímica realizada com a droga vegetal de *A. triplinervis*.

Classe química	Droga vegetal	Droga vegetal Padrão
Saponinas	++	+++
Alcaloides	-	+++
Flavonoides	-	+++
Esteroides e triterpenos	+	+++
Antraquinonas Livres	-	+++
Identificação de O-heterosídeos	++	+++
Identificação de C-heterosídeos	+	+++
Polifenóis	++	+++
Cumarinas	+++	+++

Negativo (-); fracamente positivo (+); positivo (++); fortemente positivo (+++).

A análise por CCD (Figura 4) apresentou resultados semelhante a prospecção por testes colorimétricos, precipitação e outros, com exceção de C-heterosídeos antraquinônicos, pois no teste colorimétrico o resultado foi positivo e na CCD o resultado foi negativo.

A CCD direcionada para verificar a presença de cumarinas apresentou uma banda azul fluorescente para a droga vegetal quando observadas sob luz UV-365 nm (Figura 4.I.). Segundo Wagner e Bladt (2001), as cumarinas apresentam-se na cor azul-verde brilhante sob luz UV 365 nm, permitindo sugerir a presença de cumarinas na droga vegetal.

Para avaliar a presença de alcaloide na droga vegetal foi utilizado revelador de dragendorff. Segundo Wagner e Bladt (2001), a presença de bandas laranja-marrom em luz visível indica a presença de alcaloides, quando empregado o reativo de dragendorff como revelador. Observou-se que a droga vegetal não apresentou

bandas, enquanto o padrão (pilocarpina) apresentou uma banda laranja, sugerindo ausência de alcaloide na espécie (Figura 4.II.).

Os flavonoides apresentam manchas verde-fluorescentes quando revelados com solução de cloreto de alumínio e visualizados sob UV 365 nm (COSTA, 1994). Observou-se na placa cromatográfica que o a quercetina (padrão para flavonoides) apresentou bandas verde-fluorescentes após revelação com solução de cloreto de alumínio, no entanto a droga vegetal não apresentou mancha com essa característica, inferindo a ausência de flavonoides em *A. triplinervis* (Figura 4.III.).

No perfil cromatográfico para esteroides e triterpenos (Figura 4.IV) observou-se a formação de bandas vermelho-fluorescentes sob UV-365 nm com o mesmo fator de retenção das bandas formadas pela droga vegetal padrão. O fator de retenção é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel, segundo Braz *et al.* 2011, as identificações por CCD são baseadas no fator de retenção e na comparação da cor das manchas entre amostra e um padrão, quando a placa é borrifada com um revelador específico. Sendo assim, as bandas detectadas permitem sugerir a presença de esteroides e triterpenos na espécie.

Segundo Wagner e Bladt (2001), utilizando Solução etanólica de KOH 10% como revelador as antraquinonas aparecem em bandas vermelhas ou marrons na luz visível. Observou-se que na cromatoplaça direcionada para verificação da presença de antraquinonas livres (Figura 4.V.) e C-heterosídeos (Figura 4.VI.) que a droga vegetal não apresentou bandas e na cromatoplaça direcionada para análise da presença de O-heterosídeos (Figura 4. VII.), a droga vegetal apresentou uma banda marrom-avermelhada semelhante a droga vegetal padrão. Permitindo sugerir a presença de compostos antraquinônicos O-heterosídeos na droga vegetal.

Na CCD direcionada para polifenóis (Figura 4.VIII.) constatou-se que a solução aquosa da *A. triplinervis* apresentou perfil cromatográfico muito semelhante ao da droga vegetal padrão, com bandas marrons em luz visível e com o mesmo fator de retenção, permitindo assim sugerir a presença de polifenóis.

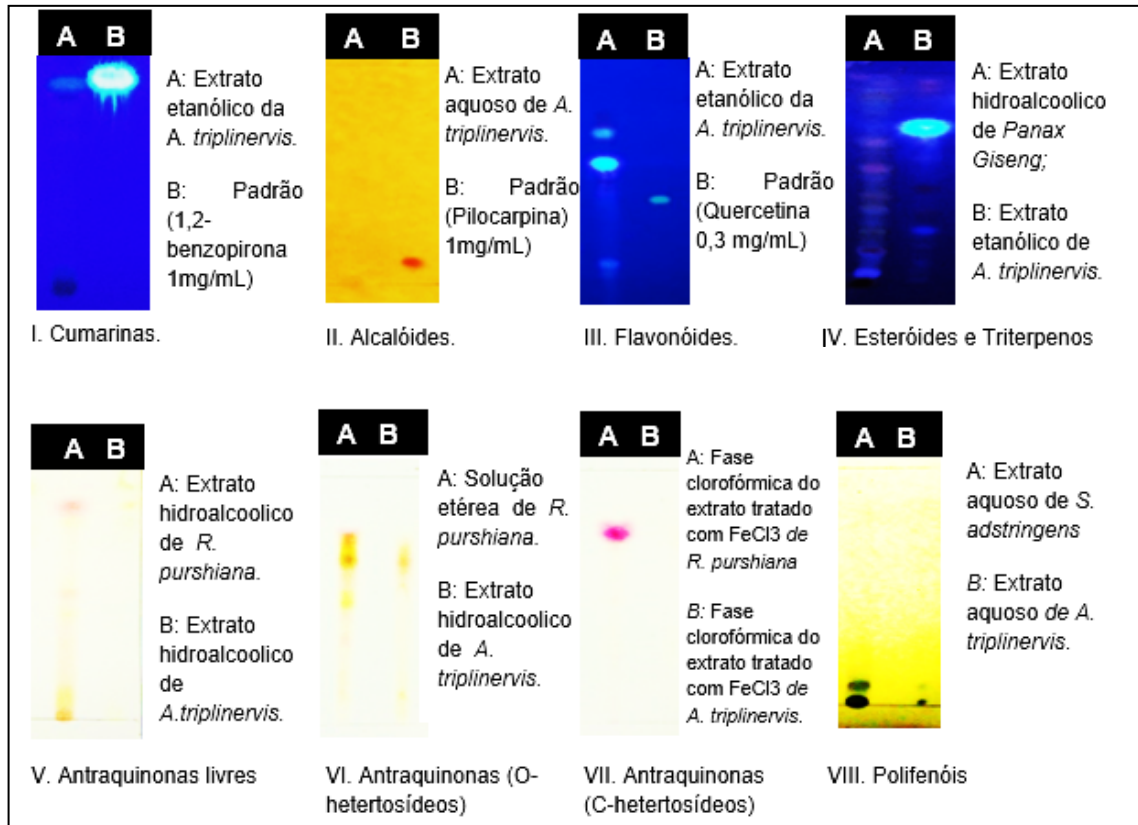


Figura 4. CCD realizada com a droga vegetal de *A. triplinervis*.

Os polifenóis, as cumarinas, as saponinas e esteroides e triterpenos já foram detectados em diferentes extratos obtidos de *A. triplinervis* (FACKNATH e LALLJEE, 2008; PARAMILA et al. 2012; LOPES et al. 2014). No entanto, alguns resultados são divergentes aos encontrados na literatura.

Os flavonoides foram encontrados nos extratos de hexano, e clorofórmio:metanol (FACKNATH e LALLJEE 2008). Entretanto, não foi detectado a presença de flavonoides no extrato de éter de petróleo (PARAMILA et al. 2012), de hexano, acetato de etila e metanol (LOPES et al. 2014; PAIXÃO, 2016).

Os alcalóides já foram detectados em diferentes extratos obtidos de *A. triplinervis*, dentre eles os extratos hexânico, de éter de petróleo e de clorofórmio:metanol obtidos das folhas através de Soxhlet (FACKNATH e LALLJEE 2008), o extrato de éter de petróleo obtido de folhas por maceração (PARAMILA et al. 2012) e nos extratos hexânico, de acetato de etila e metanólico obtidos por maceração (LOPES et al. 2014).

A divergência dos resultados com a literatura pode estar relacionada a diferentes fatores, como os métodos extrativos escolhidos, aos tipos de reações utilizada para a prospecção fitoquímica, pois algumas reações são mais específicas do que outras e a fatores intrínsecos relacionados ao local de coleta, como a temperatura, disponibilidade hídrica e sazonalidade, que influenciam na constituição química da planta (HENRIQUES et al. 2010; GOBBO-NETO e LOPES, 2006)

5.2. Prospecção fitoquímica dos extratos

A prospecção fitoquímica realizada com os extratos detectou-se a presença de saponinas, esteroides e triterpenos, polifenóis e cumarinas em todos os extratos (Tabela 2).

Observou-se algumas diferenças no perfil fitoquímico quando comparado aos testes realizados com a droga vegetal. Na prospecção fitoquímica não foi detectada a presença de heterosídeos antraquinônicos em nenhum dos extratos testados, demonstrando a influência do processo extrativo na presença de metabólitos secundários. Pois as técnicas de extração e a natureza do solvente extrator afetam diretamente nos rendimentos extrativos e no teor de metabólitos presentes, podendo interferir em atividades biológicas e farmacológicas (OLIVEIRA et al. 2016).

As cumarinas foram detectadas em todos os extratos, no entanto o extrato de acetato de etila apresentou melhor perfil cromatográfico, pois a banda azul fluorescente é mais intensa nesse extrato e por isso foi selecionado para a obtenção de frações cumarínicas.

Tabela 2. Prospecção fitoquímica realizada com extratos obtidos de *A. triplinervis*.

Classe química	Extratos			Droga vegetal Padrão
	Hexano	Acetato de etila	Metanol	
Saponinas (<i>C. Officinalis</i>)	++	++	++	+++
Esteroides e triterpenos (<i>P. ginseng</i>)	++	++	+	+++
Identificação de O-heterosídeos	NR	NR	-	+++
Identificação de C-heterosídeos (<i>R. Purshiana</i>)	NR	NR	-	+++
Polifenóis (<i>S. adstringens</i>)	NR	NR	+	+++
Cumarinas (<i>C. limon</i>)	+++	+++	+++	+++

Negativo (-); fracamente positivo (+); positivo (++); fortemente positivo (+++).

5.3. Frações Obtidas por Cromatografia em Coluna

No fracionamento realizado para o extrato acetato de etila obteve-se um total de 28 frações. As frações de 12 a 20 apresentaram duas manchas sugestivas de cumarinas, uma verde-fluorescente de menor intensidade e outra azul-fluorescente de maior intensidade, sugerindo a presença de diferentes tipos de compostos cumarínicos nessas frações (Figura 5).

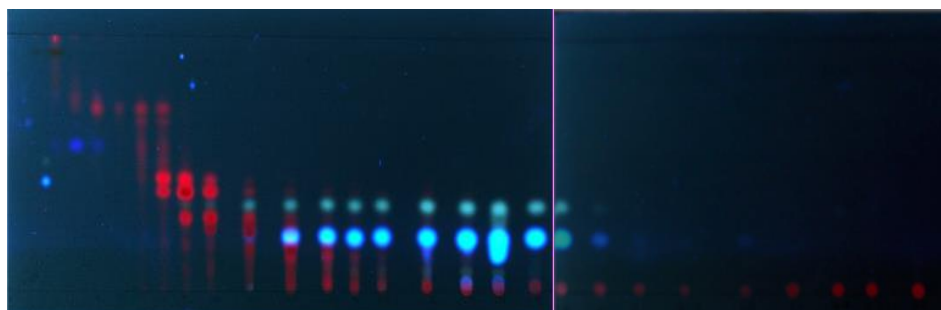


Figura 5. Análise por cromatografia de camada delgada das frações do extrato de acetato de etila de *A. triplinervis* obtidas em coluna cromatográfica. Análise sob luz UV 365 nm

No perfil cromatográfico das frações revelados com anisaldeído (Figura 6), observa-se que as frações de 7 a 11 apresentam bandas de coloração roxa, sugerindo a presença de esteroides e triterpenos nessas frações.

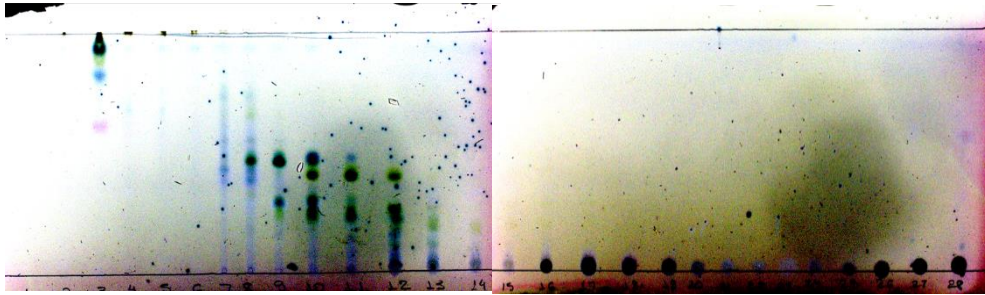


Figura 6: Análise por cromatografia de camada delgada das frações do extrato de acetato de etila de *A. triplinervis* obtidas em coluna cromatográfica. Revelador: anisaldeído.

As frações foram reunidas conforme o perfil cromatográfico e a pigmentação a luz visível, e o rendimento das frações foram calculados. A fração 12 a 20 apresentaram duas manchas sugestivas de cumarinas e foram submetidas a novas técnicas separação, para identificação e isolamento das cumarinas.

Tabela 3. Rendimento as frações obtidas por cromatografia em coluna do extrato de acetato de etila de *A. triplinervis*.

Frações	Rendimento
Fr 1 a 3	0,991
Fr 4 a 6	0,112
Fr 7 e 8	0,161
Fr 9 a 11	1,240
Fr 12 a 20	3,098
Fr 21	0,037
Fr 22 a 24	0,042
Fr 25 a 28	3,481

5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

O perfil cromatográfico exploratório dos extratos, obtido por CLAE-DAD, apresentaram a formação de um pico majoritário, com tempo de retenção (T_R) em 7,435 min (percentual de área = 63,39%) para o extrato de acetato de etila, sendo compatíveis com derivados cumarínicos (Fig. 7).

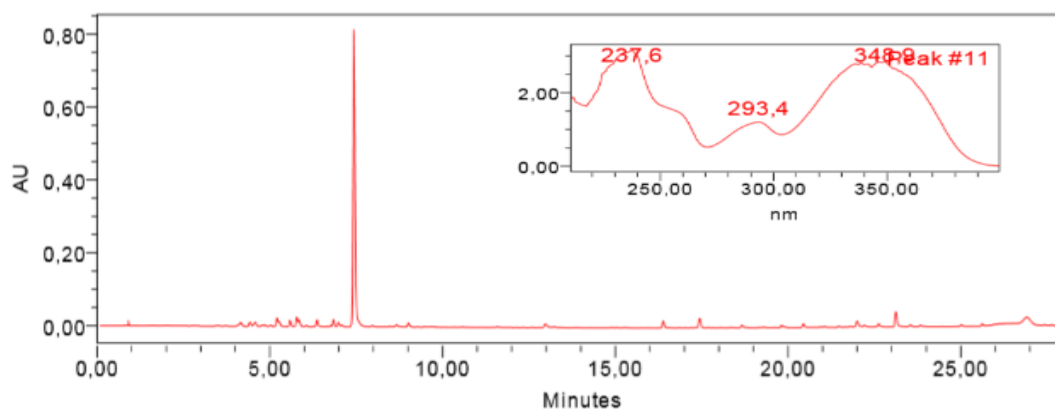


Figura 7. Cromatograma do extrato de acetato de etila de *A. triplinervis*.

A Fr 12 a 20 do extrato de acetato de etila, apresentou o melhor perfil de separação para cumarinas com T_R em 7,446 min (percentual de área = 77,26%). Observa-se a formação de um pico de menor intensidade com T_R em 5,779 (percentual de área = 4,96%) demonstrando a presença de diferentes composto na fração (Figura 8).

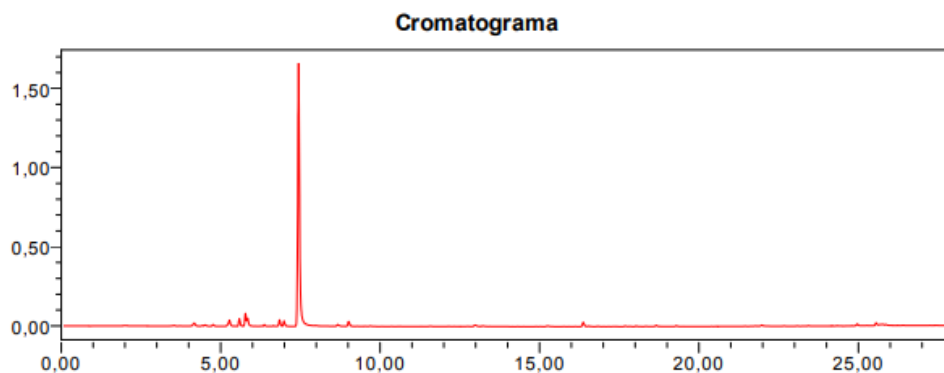


Figura 8. Cromatograma da Fr 12 a 20 do extrato de acetato de etila de *A. triplinervis*.

Devido à complexidade do extrato, o fracionamento foi considerado como um tratamento filtrante, e por isso as Fr 12 a 20 foi submetidas a um novo fracionamento.

5.5. Fracionamento da fração cumarinica

No refracionamento realizado com a Fr 12 a 20 obteve-se um total de 27 subfrações que foram analisadas por CCD, onde observou-se a presença de cumarinas em 23 subfrações (Figura 9). As subfrações 13 a 25 foram reunidas e

considerada a Subfração Cumarínica de *A. triplinervis* (SCAt), pois apresentaram perfil cromatográfico semelhantes.

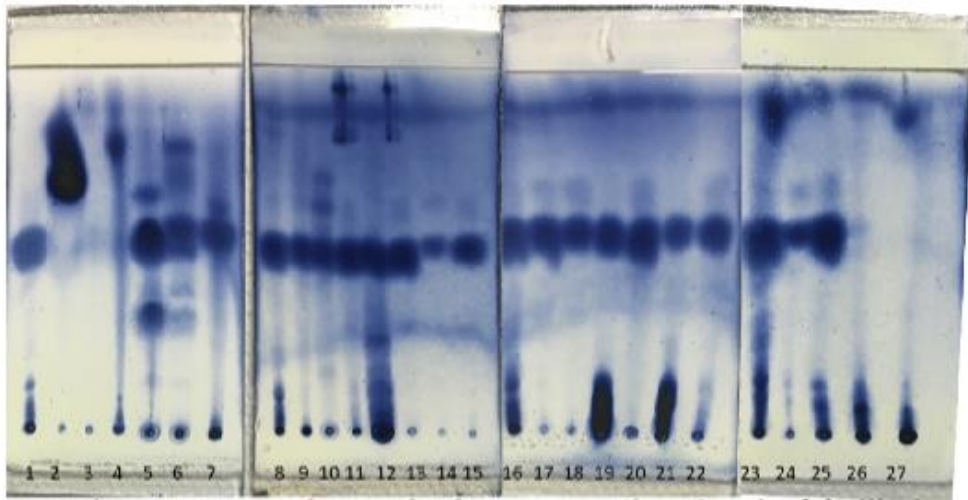


Figura 9: Análise por cromatografia de camada delgada das subfrações obtidas em coluna cromatográfica. Revelador:

5.6. Purificação da cumarina majoritária

A SCAt foi submetida à purificação por recristalização para a retirada de impurezas da cumarina majoritária e analisada por CCD (figura 10). Observou-se que o processo de recristalização foi eficaz para a retirada de impurezas.

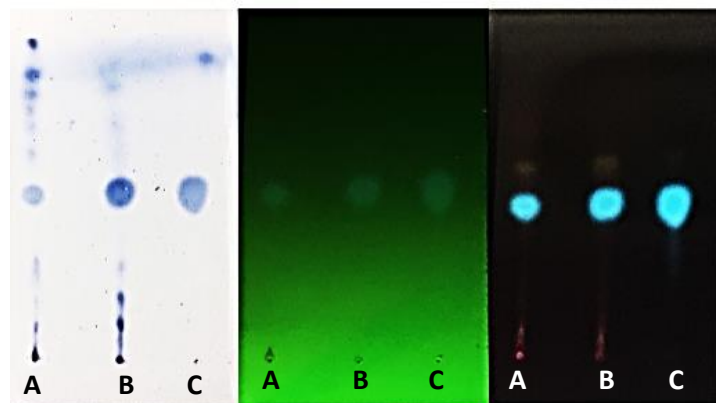


Figura 10. Análise por Cromatografia de Camada Delgada. A: Extrato de Acetato de etila de *A. triplinervis*; B: da Fr 12 a 20 do extrato de acetato de etila de *A. triplinervis*; C: Subfração cumarínica de *A. triplinervis*.

5.7. Perfil Cromatográfico por CLAE-DAD

O perfil cromatográfico por CLAE-DAD da SCA_t (Figura 9) apresentou 1 pico majoritário com TR 7,45min e com área 90,39 % compatível com derivados cumarinicos. Observa-se que o cromatograma da subfração não apresentou o pico de menor intensidade com T_R em 5,779 que aparece na Fr 12 a 20 (Figura 8). Deste modo é possível afirmar que o processo de isolamento do composto majoritário presente no extrato de acetato de etila de *A. triplinervis* foi eficiente.

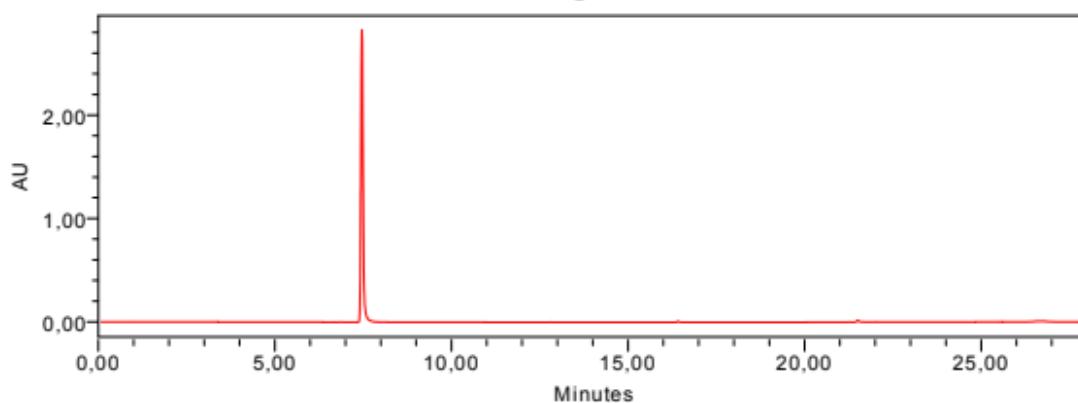


Figura 11. Cromatograma da subfração 13-25 de *A. triplinervis*.

5.8. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrometro de Massa

Na análise por Cromatografia observa-se o pico de maior intensidade no TR 3,56 min (Figura 12). A análise por Espectrometria de Massa com sistema de Ionização por Spray de Elétrons (ESI – Electrospray Ionisation) do TR 3,56 min. demonstrou a formação de íon molecular m/z $[M+1]^+$ 190.95u, com o qual se determinou a massa molecular do composto majoritário (190 g/mol), sendo compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_6O_4$ (Figura 13).

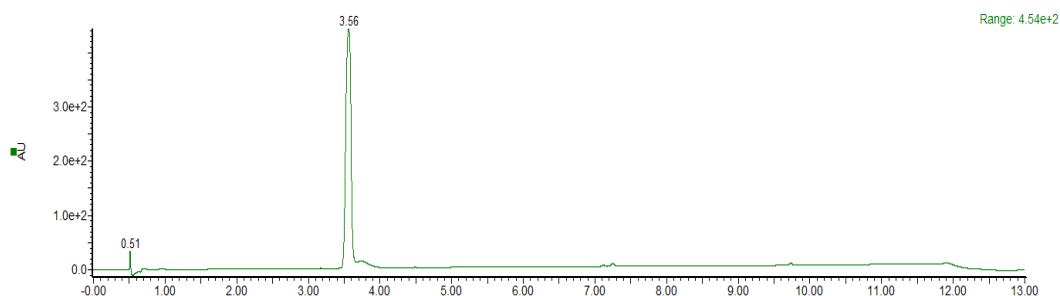


Figura 12. Cromatograma da Subfração Cumarínica de *A. triplinervis*.

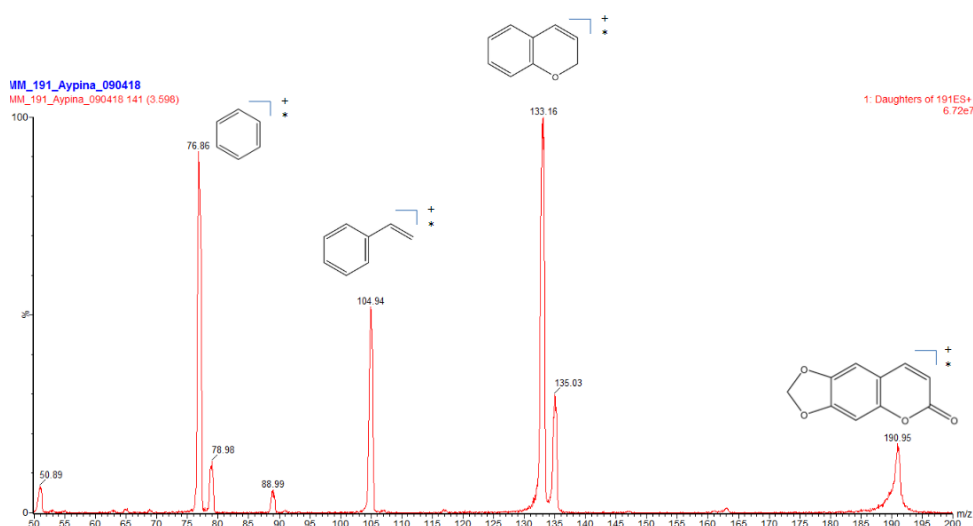


Figura 13. Espectro de massas obtido por EM-ESI [M+1] referente ao pico majoritário formado em TR3,56 min.

A fórmula molecular $C_{10}H_6O_4$ é referente a cumarina 6,7-(metilenodioxi)cumarina (aiapina), mas para complementar a elucidação estrutural foi realizado o espectro de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e ponto de fusão.

5.9. Espectro de Infravermelho (IV)

O espectro no IV apresentou bandas referentes as cumarinas (Figura 14). A banda 1703 cm^{-1} é relacionada a lactona α - β insaturada. As bandas 1578 cm^{-1} , 1488 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} são relacionados a deformações axiais de ligações $C=C$ presentes no anel aromático de cumarinas. As bandas em 939 cm^{-1} , 879 cm^{-1} , 835 cm^{-1} indicam a deformações angulares $C-H$, localizadas no anel aromático.

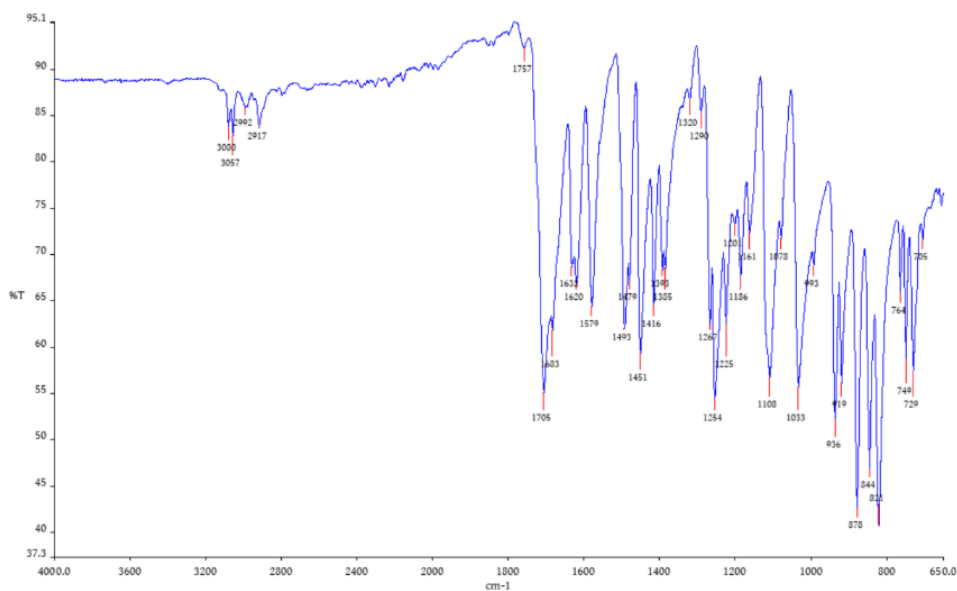


Figura 14. Espectro de Infravermelho da Subfração cumarinica de *A. triplinervis*.

5.10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear

A análise por RMN permitiu a confirmação do isolamento da aiapina (Tabela 4). O espectro de RMN ^1H 400 MHz (Figura 15) emitiu um sinal em δ 6,82 relativo a um singlete atribuído ao deslocamento de hidrogênios presentes nas posições 5 e 8 do anel benzênico da molécula. A presença de um par de dupletos em δ 6,26 e δ 7,57 e ($J = 9,5$ Hz) é associada a hidrogênios com configuração cis, ocupantes da dupla ligação na posição 3 e 4 do anel lactônico da molécula. A formação de um singlete em δ 6,07 corresponde a dois átomos de hidrogênio presentes no grupo metilenodioxi ligados à posição 6,7 do anel benzênico da molécula.

Tabela 4. Comparação entre os dados de RMN de ^1H e ^{13}C registrados na literatura para a molécula aiapina e os resultados obtidos da aiapina isolada.

Posição	δ ^1H (ppm)		δ ^{13}C (ppm)	
	Aiapina (CDCl_3) literatura*	Aiapina isolada (CDCl_3)	Aiapina (CDCl_3) literatura*	Aiapina isolada (CDCl_3)
2	-	-	161,2	161,2
3	6,28 d $J = 9,5$ Hz)	6,26 d	113,4	113,4
4	7,58 d $J = 9,5$ Hz)	7,57 d	143,4	143,4
9	-	-	112,7	112,7
5	6,82 s	6,82 s	105,0	105,0
6	-	-	143,4	144,9
7	-	-	151,3	151,3
8	6,82 s	6,82 s	98,4	98,4
10	-	-	144,9	151,2
6,7-OCH ₂ O	6,10 s	6,07 s	102,3	102,3

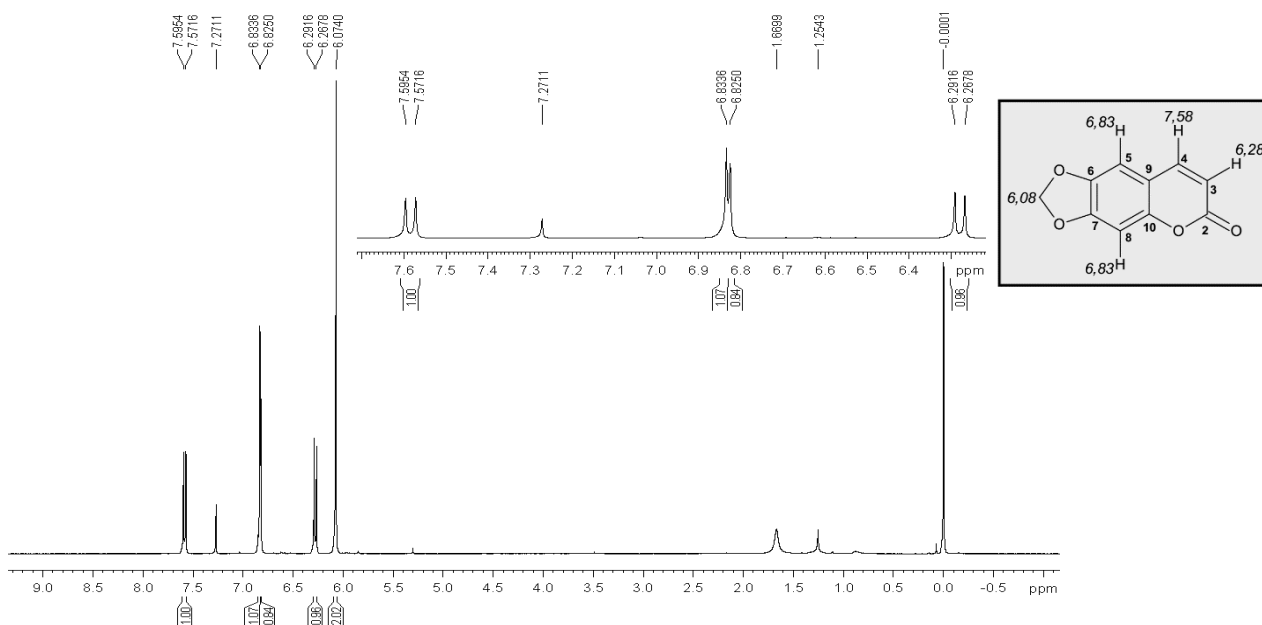


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da Subfração Cumarínica de *A. triplinervis* (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN ^{13}C 400 MHz foi possível observar a presença de 10 sinais referentes a 10 carbonos. O sinal em δ 144,9 é referente ao carbono ligado ao oxigênio na posição 6 do anel benzênico. Os sinais em δ 151,3 e δ 151,2 estão atribuídos a carbonos aromáticos presentes nas posições 7 e 10, respectivamente. Os deslocamentos δ 105,0 e δ 98,4 são relacionados a carbonos presente nas posições 5 e 8 do anel benzênico. Os sinais em δ 143,4 e δ 113,4 correspondem a

dupla ligação do carbono 4 e 3, presente no anel lactônico. O sinal em 161,2 corresponde a carbonila de lactona α,β -insaturada. O sinal em δ 102,3 é referente ao carbono metilênico dioxigenado 6,7-OCH₂O. O sinal em δ 112,7 é atribuído ao carbono aromática não hydrogenado na posição 9. (Figura 16).

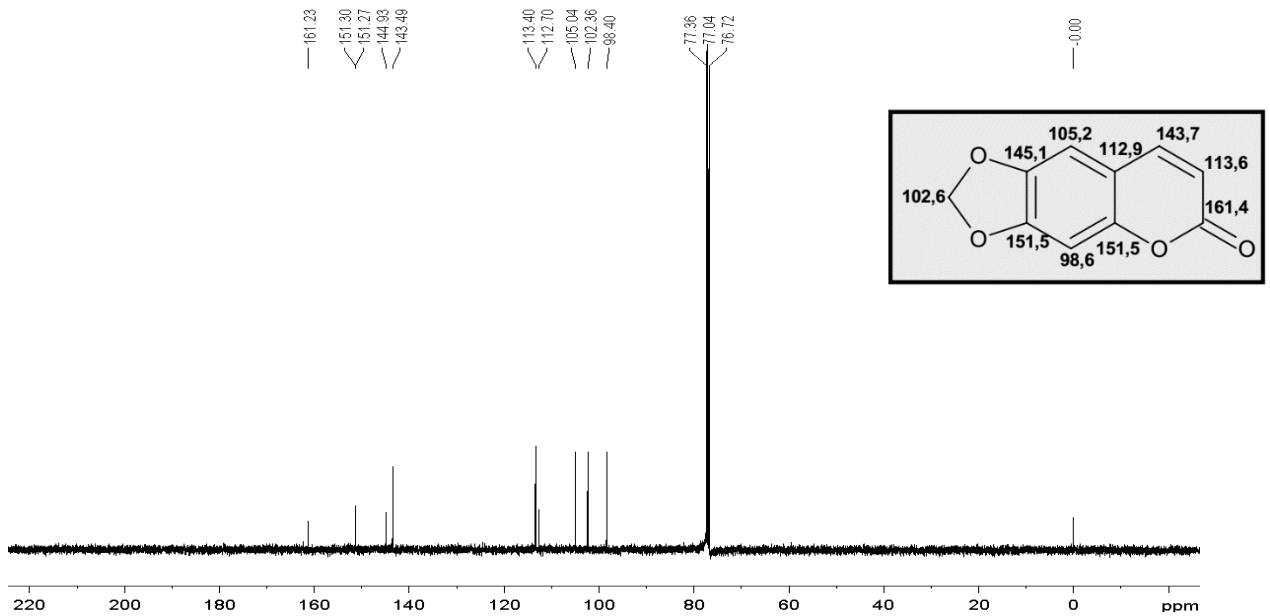


Figura 16. Espectro de RMN de ¹³C da Subfração Cumarínica de *A. triplinervis* (CDCl₃, 400 MHz).

No espectro de RMN ¹³C-DEPT135 foi possível identificar a presença de 5 ligações C-H na molécula, sendo que o sinal em δ 102,36 apresentou amplitude negativa indicando a presença de um carbono metileno (Figura 17).

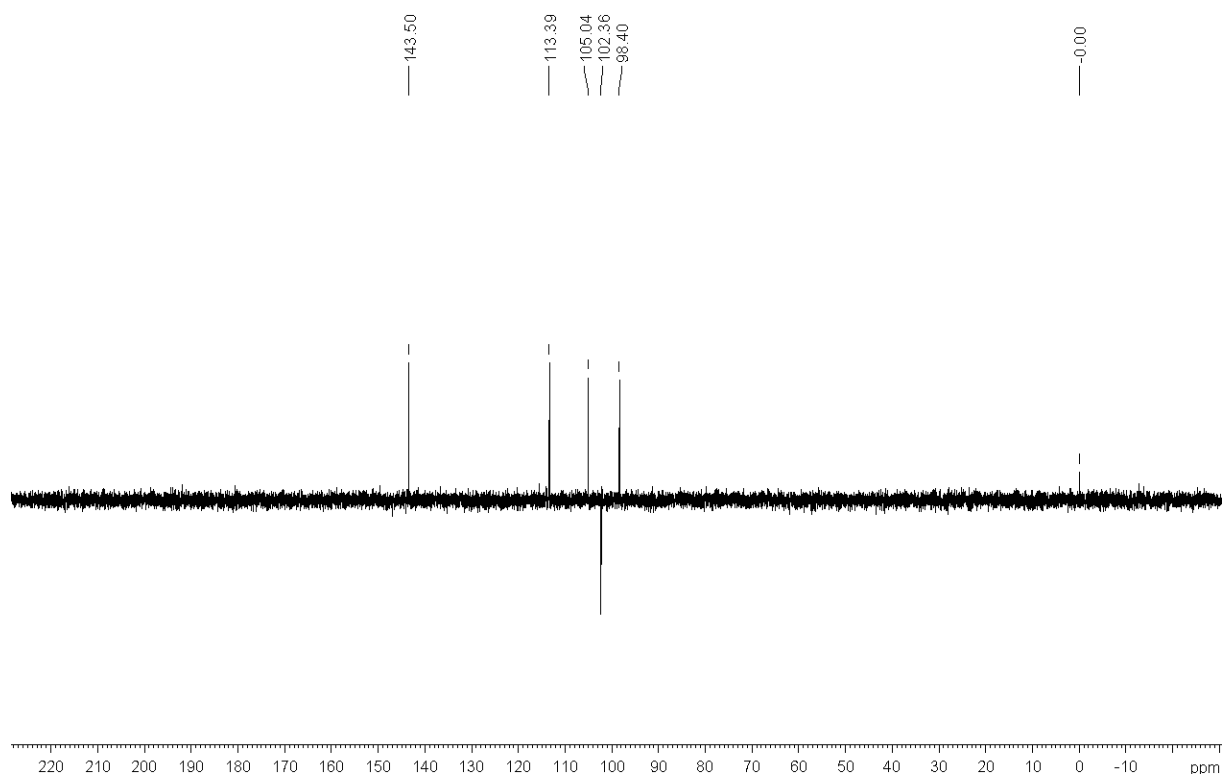


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT135 da Subfração Cumarínica de *A. triplinervis* (CDCl_3 , 400 MHz).

Assim, com os dados do espectro de RMN obtidos, determinou-se a molécula 6,7- (metilenodioxo)cumarina, conhecida por aiapina (Figura 18), como a cumarina isolada.

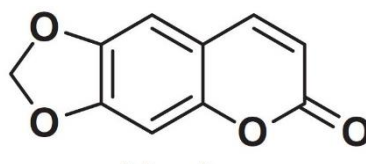


Figura 18. Estrutura química da aiapina.

5.11. Ponto de fusão

O ponto de fusão da cumarina foi 224,8-226,3 °C. A aiapina foi inicialmente isolada da *A. triplinervis*, mas pode ser encontrada em outras espécies da família Asteraceae (BOSE e ROY, 1936).

Na literatura, existem poucas informações sobre os efeitos biológicos dessa cumarina, mas sabe-se que é uma fitoalexina que tem sua produção aumentada em resposta a ataques de patógenos (VERA et al. 2006).

5.12. Avaliação da toxicidade aguda

Os animais tratados por via intraperitoneal com a aiapina na dose de 2000mg/kg não apresentaram alterações comportamentais após administração, não havendo nenhuma alteração ao final de 14 dias.

Os estudos toxicológicos são importantes para avaliar possíveis efeitos adversos inerentes a determinadas exposições, fornecendo informação adequada para a classificação toxicológica e escolha da dose para avaliações farmacológicas das substâncias estudadas (CAZARIN et al. 2004).

No teste de toxicidade oral aguda realizado por Paixão (2016) a fração cumarínica de *A. triplinervis* também demonstrou baixa toxicidade. Sendo assim, a aiapina apresentou baixo potencial tóxico por via intraperitoneal.

5.13. Efeito antitumoral

5.13.1. Variação do peso corporal

A análise de inibição do crescimento tumoral foi realizada pela variação do peso corporal (Tabela 4). Observa-se que houve inibição tumoral significativa e dose dependentes ($p < 0.05$) em todas as doses de aiapina administrada (10, 20 e 40mg/kg). A ciclofosfamida, agente alquilante antitumoral, que foi utilizado como controle positivo apresentou uma redução tumoral de aproximadamente 94,25%.

Tabela 5. Efeito da inibição tumoral da aiapina sobre a variação de peso dos animais. Os dados mostram média \pm erro padrão da média.

Grupo	Varição de peso	Inibição tumoral
Controle Negativo	17,4 \pm 0,24	-
Ciclofosfamida	1 \pm 0,44	94,25
Aiapina (10mg/kg)	16,6 \pm 0,6	4,60
Aiapina (20mg/kg)	13 \pm 0,54	33,85
Aiapina (40mg/kg)	9,4 \pm 0,67	45,98

.O tumor ascítico de Ehrlich é caracterizado pelo aumento de fluidos volume e células tumorais quando inoculadas no peritônio do animal e tem sido usado como um tumor transplantável para investigar os efeitos antitumorais de várias moléculas e compostos (ALEXANDRE SCHEFER et al. 2017; FERNANDES, 2015). O sinal clássico do desenvolvimento do tumor de Ehrlich é a ascite tumoral que ocasiona o aumento exagerado do peso do animal (MANGUEIRA et al., 2017).

A aiapina demonstrou potencial efeito antitumoral contra o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos Swiss ao apresentar inibição do peso dos camundongos.

Na literatura, o tratamento por via intraperitoneal com o extrato aquoso e extrato etanólico das folhas de *A. triplinervis* apresentou efeito antitumoral em camundongos através da redução do peso dos camundongos submetidos à indução ao Tumor Ascítico de Ehrlich (MAITY et al. 2015). E estudos já identificaram cumarinas com efeito antitumoral em outros modelos experimentais.

5.13.2. Viabilidade celular

No presente estudo, a aiapina foi capaz de reduzir o número de células totais e de células viáveis em todas as doses administradas. No entanto, não foram observadas diferença significativa entre as doses. Em comparação com o padrão (Ciclofosfamida 20mg/kg) a análise estatística também não apresentou diferenças significativas.

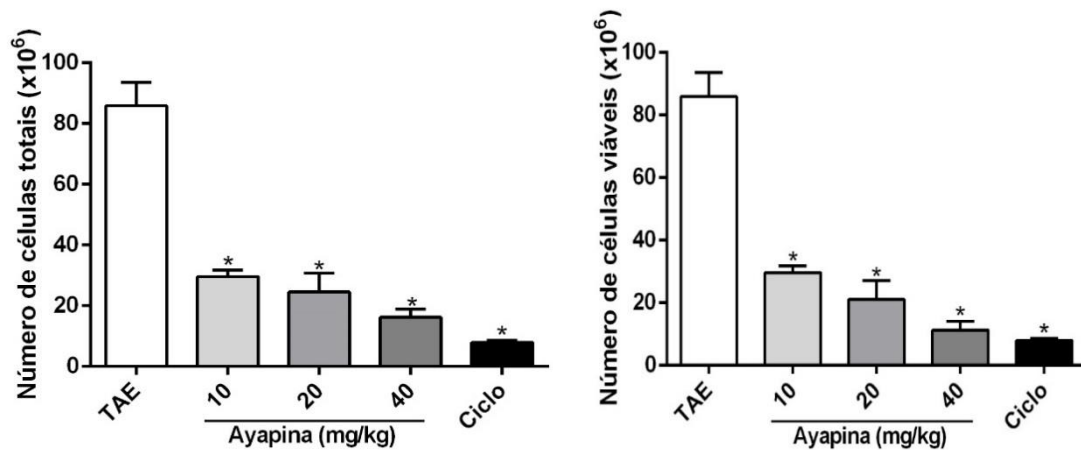


Figura 19. Efeito da aiapina por via intraperitoneal em camundongos portadores de tumor ascético de ehrlich (A) numero total de células (x10⁶), (B) números de células viáveis (x10⁶) em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. TAE: Controle negativo; Ciclo: Controle positivo tratado com ciclofosfamida. * p<0,01 comparado ao controle negativo (ANOVA, seguida pelo teste tukey).

A redução de células viáveis associada a diminuição do peso corporal dos camundongos confirmam o efeito antitumoral de aiapina no tumor ascítico de Ehrlich, sendo um possível candidato a um novo agente antitumoral.

As reações adversas e toxicidade observadas no tratamento do câncer tornam as alternativas de tratamento limitadas, diante desse contexto a pesquisa por novos tratamentos para o câncer é incessante. Assim, os metabólitos secundários de plantas têm servido como uma boa fonte para a pesquisa de novos fármacos.

Estudo realizado com os extratos aquoso e etanólico de *A. triplinervis*, administrados por via intraperitoneal foram capazes de induzir a morte celular por apoptose, pois análises microscópicas demonstraram a formação de vesículas apoptóticas na membrana celular e condensação da cromatina nas células coletadas, além disso demonstrou efeito antiproliferativo (MAITY et al. 2015).

Diferentes derivados cumarínicos vêm demonstrando potencial para a descoberta de novos agentes antitumorais. No entanto, pela primeira vez foi realizada avaliação do efeito antitumoral de aiapina.

O derivado cumarínico apontou uma importante atividade farmacológica, porém ainda são necessários estudos adicionais para elucidação dos possíveis mecanismos de ação.

6. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica realizada na espécie *A. triplinervis* permitiu um maior conhecimento sobre a espécie, no qual foi possível isolar e identificar a cumarina aiapina (6,7-[metilenodioxi]cumarina) a partir do extrato de acetato de etila.

A aiapina apresentou efeito antitumoral com tratamento intraperitoneal em camundongos com tumor ascítico de ehlich, através da redução do peso dos animais e diminuição de células tumorais no líquido ascítico. Além disso, não apresentou toxicidade aguda até a dose administrada.

Desta forma, o presente estudo demonstrou pela primeira vez o potencial efeito antitumoral da aiapina, corroborando com o uso tradicional da espécie no tratamento de cancer, no entanto ainda são necessário estudos adicionais para elucidação dos possíveis mecanismos de ação.

7. REFERÊNCIAS

- AGAPITO, T.; SUNG, I. **Fitomedicina, 1100 Plantas Medicinales**. Isabel, Lima, Peru, 2003
- AHMAD, S. S. et al. Exploring the medicinal plants wealth: a traditional medicobotanical knowledge of local communities in Changa Manga Forest, Pakistan. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 20, n. 12, p. 1772-1779, 2014.
- ALEXANDRE SCHEFER, F., RICARDO, S., ZOZULA BLIND, C. L., LUIS, P., DE OLIVEIRA SOUZA, B. L., BRANCO FILIPPIN, M. F., ... REGINA OROFINO, K. M. . Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylptocarphol in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 198, 262–267. 2017
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M.T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. 2005, 28(1), 118-129.
- ALVES, A.P.N.N.; GUEDES, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker. **Acta Cir. Bras**. v. 19, n. 4, p. 251-258, 2004.
- ANDENBERG, A.A., *et al.* Compositae. Pg. 61- 588. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (Eds.). **Flowering Plants Eudicots Asterales**, Vol. VIII. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (Ed.). Springer – Verlag. 2007.
- ANDRADE, E. C. B. de; ALVES, S. P.; TAKASASE, I. **Extração Seqüencial de Cobre, Ferro e Zinco em Ervas Medicinais**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas; v.25, n.(4), p. 844-848, out.-dez. 2005.
- ARÉVALO, G. Medicina Indígena. Las plantas medicinales y su beneficio en la salud Shipibo-Conibo. **Editorial AIDSEP, Lima, Perú**, 1994
- ASHOKARAJ, S.; MAHADEV, C. Study on larvicidal activity of weed extracts against *Spodoptera litura*. **Journal of Environmental Biology**, v. 34, p. 253-257, 2013.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. 2. ed. Vida Plena, São Paulo, Brasil, 2003
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 679- 688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 679- 688, 2009.
- BECKSTROM-STERNBERG, Stephen M.; DUKE, J. A.; WAIN, K. K. The ethnobotany database. **Genome Informatics Group, National Agricultural Library**. US Department of Agriculture, Beltsville, MD, 1994

BECKSTROM-STERBERG, Stephen M.; DUKE, J. A.; WAIN, K. K. The ethnobotany database. **Genome Informatics Group, National Agricultural Library**. US Department of Agriculture, Beltsville, MD, 1994.

BEGUM, J.; BHUIYAN, M.N.I.; TAZNIN, T. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Eupatorium triplinerve* Vahl. aerial parts. **Asian Journal of Microbiology Biotechnology Environmental Society**, v.12, n. 3, p. 543-547, 2010.

BEGUM, J.; BHUIYAN, M.N.I.; TAZNIN, T. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Eupatorium triplinerve* Vahl. aerial parts. **Asian Journal of Microbiology Biotechnology Environmental Society**, v.12, n. 3, p. 543-547, 2010.

BEPARI, M. et al. *Eupatorium ayapana* leaf extracts enhance anti-oxidant potential in Ehrlich's ascites carcinoma-bearing Swiss albino mice. **International Journal of Life Science & Pharma Research**, v. 4, n. 3, 2013.

BEPARI, M.; MAITY, P.; SINHA, B.; CHOUDHURY, A. S. M.; *Eupatorium ayapana* leaf extracts enhance antioxidant potential in ehrlich's ascites carcinoma - bearing swiss albino mice. **International Journal Of Life Sciences And Pharma Research**. India, 2013.

BHATT MEHUL, K.; DHOLWANI KISHOR, K.; SALUJA AJAY, K. Isolation and structure elucidation of Scopoletin from *Ipomoea reniformis* (Convolvulaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 05, p. 138-144, 2011.

BIALECKI, A. G.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Rev. Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 853-858, 2009.

BISWAS, A.; BHATTACHARYA, S.; MAHAPATRA, S. D.; DEBNATH, M.; BISWAS, M. The antioxidant effects of *Eupatorium triplinerve*, *Hygrophila triflora* and *Pterocarpus marsupium*-A comparative study. **European Journal of Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 136-139, 2012.

BOSE, P. et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Eupatorium ayapana* against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 27-33, 2007

BOSE, P.K.; ROY, A.C. The constitution of ayapanin. **Journal Indian Chemical Society**, v. 13, p. 586, 1936.

BRACK EGG, A. **Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú**. CBC; Centro de Estudios Regionales Andinos, Bartolomé de Las Casas, Cuzco, Peru, 1999.

BRACK EGG, A. **Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú**. CBC; Centro de Estudios Regionales Andinos, Bartolomé de Las Casas, Cuzco, Peru, 1999.

BRASILEIRO FILHO G; PEREIRA F.E.L; GUIMARÃES R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. In: Brasileiro Filho G, editor. **Bogliolo patologia geral**. 5a ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan; 2013. 243-253p

BRAZ, Renato, et al. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2011.

CASTELLO, C. M. **Ultrassonografia do tumor sólido de ehrlich inoculado em camundongos**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, Goiânia.

CAZARIN, K. C. C., CORRÊA, C. L., & ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 40(3), 289-299. 2004.

CHATURVEDI, R.; MULCHANDANI, N. B. Coumarins from Eupatorium ayapana. **Journal Indian Chemical Society**, v. 66, p. 286-287, 1989.

CHATURVEDI, R.; MULCHANDANI, N. B. Coumarins from Eupatorium ayapana. **Journal Indian Chemical Society**, v. 66, p. 286-287, 1989.

CHU, E. & SARTORELLI. A. C. Quimioterapia do Câncer. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2006. p. 751-777.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

DAL MOLIN, G. T. et al. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos à quimioterapia de um centro de oncologia de Ijuí/RS. **Revista Contexto & Saúde**, v. 12, n. 22, p. 50-51, 2012.

DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L.; SALDIVA, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.29, p.97-103, 1992

DAS, A.; BONDYA, S.L. Indigenous herbal healers of dumka district: repositories of ethno-medicines. **International Journal Indegenous for Exchange of Knowledge**, v. 2, n. 1, p. 25-33, 2015.

DEEPTHY, R. et al. Ethanobotanical studies on medicinal plants used for skin diseases in Malabar Region of Kerala. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 1, p. 92-99, 2014.

DEFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. **Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)**. Washington, DC: Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 2004.

DEL VITTO, LUIS A.; PETENATTI, ELISA M.. Asteráceas de importancia económica y ambiental: Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. **Multequina**, Mendoza , v. 24, n. 1, p. 47-74, jun. 2015 .

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**, 2 ed. UNESP, São Paulo, Brasil, 2000.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.R.; SANTOS, C.M.; HIRUMA-LIMA A.C. **Plantas Mediciniais da Amazônia**. UNESP, São Paulo, Brasil, 1989.

DIAS, A. K. C.; CARDOSO, M. G.; BARBIÉRI, R. S. Avaliação fitoquímica e análise de extratos de *Pelicourearigida* (douradinha) – Um estudo preliminar. **Revista Científica Faminas, Minas Gerais**, v.1, n.1, p. 14-19, 2005.

ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z.C. Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigation. **Pharmaceutical Biology**, v. 28, n. 4, p. 309-320, 1990.

FACKNATH, S.; LALLJEE, B. Study of various extracts of *Ayapana triplinervis* for their potential in controlling three insect pests of horticultural crops. **Tropicultura**, v. 26, n. 2, p. 119-124, 2008.

FARIAS, M. R. et al. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 262-288, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. 2010. São Paulo: Atheneu.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

FERNANDES, P. D; GUERRA, F. S; SALES, N. M; SARDELLA, T. B. JANCAR, S; NEVES, J. S. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor developmen. **Journal of Pharmacology and Toxicological Methods**. 83-89, 2015.

FERREIRA, I. C. M.; SILVA, G. S.; NASCIMENTO, F. S.. Efeito de extratos aquosos de espécies de Asteraceae sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathol. Botucatu**, v. 39, n. 1, p. 40-44, Mar. 2013.

FINN, G.J.; CREAVENT, B.S.; EGAN, D.A. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, n. 67, p. 1779-1788, 2004.

FISCHER, P. M; GLOVER, D. M; LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 4, p. 417-423, 2004.

FUNK, V.A; SUSANNA, A; STUESSY, T.F; ROBINSON, H. Classification of Compositae. *In*: V.A. Funk *et al.* (eds.) Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. **International Association for Plant Taxonomy**, Vienna, pp.171-189, 2009.

GARG, S.C.; NAKHARE, S. Studies on the essential oil from the flowers of *Eupatorium triplinerve*. **Indian Perfumer**, v. 37, p. 318-323, 1993.

GARG, S.C.; NIGAM, S.S. Chemical examination of the essential oil from the leaves of *Eupatorium triplinerve* (Vahl). **Flavour Industry**, v. 1, p. 469-472, 1970.

GAUVIN-BIALECKI, A.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 853-858, 2009.

GAUVIN-BIALECKI, A.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 853-858, 2009.

GHOSH, A. Herbal folk remedies of Bankura and Medinipur districts, West Bengal, **Indian Journal Traditional Knowledge**, v. 2, p. 393-396, 2003.

GUPTA, D.; CHARLES, R.; GARG, S.N. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Eupatorium triplinerve* Vahl. **Journal Essential Oil Research**, v. 16, p. 473-475, 2004.

GUPTA, M. et al. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 168-170, 2002.

GUPTAA, M.; MAZUMDERA, U. K.; CHAUDHURIB, I. L. A.; CHAUDHURIB, R. K.; BOSEB, P.; BHATTACHARYA A.; MANIKANDANA L.; PATRAA, S. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. **Revista de Fitoterapia**, n. 73, p. 168-170, 2002.

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

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. (Orgs.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre (RS): UFRGS, 2010. p. 765-791.

HIND, D. J. N. Neotropical compositae (Asteraceae). **Royal Botanic Gardens**, 2010. Disponível em: [http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Compositae_\(Asteraceae\).htm](http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Compositae_(Asteraceae).htm)>. Acesso em: 03 jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, INCA, 2015.

JARDIM, M.A.G. (org). **Diversidade biológica das áreas de proteção ambiental: Ilhas do Combu e Algodual-Maiandeuá**. MPEG/MCT/CNPq. Belém, Pará, Brasil, 2009.

JONVILLE, M.C. *et al.* Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 382-386, 2008.

JUNQUEIRA M. Z; CHAMMAS, R. Cancer chemotherapy failure: a synthetic view. **Revista de Medicina (São Paulo)**. v. 97, n. 2, p. 141-53. March-Apr 2018.

KHODJAKOV, A; RIEDER C.L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **J Biol**, 2009, 8 (10):88.

KRAUTER, C. M. *et al.* Ultrafast branching in the excited state of coumarin and umbelliferone. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 41, p. 17846-17861, 2013.

KRISHNAN, M. *et al.* Antioxidant mediated antiulcer effect of Eupatorium triplinerve Vahl against acetic acid induced ulcerative colitis in mice. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-160, 2014.

LANS, C. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v. 3, p. 3, 2007a.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 13, 2007b.

LASSANCE, F. A. C; LASSANCE, P. M. S; GARICOCHEA, B; COTTI, G. C; CUTAIT, R. Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Rev Med Saúde Brasília** 2012; 1(1): 34-50

LE COINT, P. **Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimatadas)**. 2 ed. Companhia Editora Nacional, Pará, Brasil, 1947.

LOPEZ -GONZALEZ, J.S.; PRADO-GARCIA, H.; AGUILAR-CAZARES, D.; MOLINAGUARNEROS, J.A.; MORALES-FUENTES, J.; MANDOCKI, J.J. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxicoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 43, p. 275-283, 2004.

MAHOMOODALLY M.F; SREEKEESON D.P. A Quantitative Ethnopharmacological Documentation of Natural Pharmacological Agents Used by Pediatric Patients in Mauritius. **BioMed Research International**, 2014.

MAHOMOODALLY, M. F; MUTHOORAH, L. D. An ethnopharmacological survey of natural remedies used by the Chinese community in Mauritius. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, p. S387-S399, 2014.

MAIA, J. G.S.; ZOGHBI, M. G.B.; SILVA, M. H.L.; ANDRADE, E.H.A. Essential oils of *Eupatorium triplinerve* and *Eupatorium paniculatum*. **Journal Essential Oil Research**, v. 11, p. 541-544, 1999.

MAITY, P.; CHOUDHURY, S.M.; BEPARI. Madhubanti. Antimitotic, apoptotic and antineoplastic potential of leaf extract of *Eupatorium ayapana*. **International Journal of Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 69-77, 2015.

MALUMBRES, M; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer** 2001, (3):222-31.

MANFRED, L. **Siete mil recetas botánicas a base de mil trescientas plantas medicinales**. Kier, 1977.

MELO, A.S. et al. Antinociceptive, neurobehavioral and antioxidant effects of *Eupatorium triplinerve* Vahl on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 293 – 301, 2013.

MORAES, L.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

MOREIRA, F. **Plantas que curam - cuide de sua saúde através da natureza**. 5 ed. Hemus, São Paulo, Brasil, 1985.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. In: DEFILIPPS, N.A. (Eds.). **Medicinal Plants of Brazil Algonac**. Ethnobotany in the Neotropics, New York Botanical Garden, Bronx, New York, p. 140–149, 2000.

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

MUSA, M. A., COOPERWOOD, J. S., & KHAN, M. O. F. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. **Current medicinal chemistry**, 2008, 15(26), 2664-2679.

NOBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annu. Rev. Biochem.** 1992, 61:441-470

NUNKOO, H.; MAHOMOODALLY, M. F. Ethnopharmacological survey of native remedies commonly used against infectious diseases in the tropical island of Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 548-564, 2012.

NUNKOO, H.; MAHOMOODALLY, M. F. Ethnopharmacological survey of native remedies commonly used against infectious diseases in the tropical island of Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 548-564, 2012.

OECD – Organization of Economic Cooperation and development. In: The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. **NIH Publication**. Nº 02-4501, p. I-4CD-ROM 1-2, 2008.

OLIVEIRA, V.B., ZUCHETTO, M., OLIVEIRA, C.F., PAULA, C.S., DUARTE, A.F.S., MIGUEL, M.D., & MIGUEL, O.G.. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 18(1), 230-239.

PAIXÃO, T.P. **Estudo fitoquímico e avaliação do efeito antinociceptivo de uma fração rica em cumarina de *Ayapana triplinervis* (Asteraceae)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

PALERMO-NETO, J; MASSOCO, CO; SOUZA, WR Efeitos de estressores físicos e psicológicos no comportamento, atividade de macrófagos e crescimento tumoral de Ehrlich. **Brain Behav. Immun.** v.17, p. 43-54, 2003.

PALHETA, I. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of Abaetetuba, Pará state, Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 3, p. 206-262, 2017.

PARIMALA, K., CHERIYAN, B.V., VISWANATHAN., S. Antinociceptive and antiinflammatory activity of petroleum-ether extract of *Eupatorium triplinerve* Vahl. **International Journal of Life Science and Pharma Research**, v.2, n. 3, p. 12-18, 2012.

PASTOR, S. *et al.* Perú: Informe Nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la FAO sobre los Recursos Fitogenéticos (Leipzig, 1996).**Informe interno**, 1995.

PATTANAYAK S. MANDAL T. K.; BANDYOPADHYAY S. K. Ethno-gynecological study on the medicinal plants traditionally used insouthern districts of West Bengal, India. **Ind J Traditional Knowl** 15(3): 482- 486, 2016.

PÉRSIA, F. A.; RINALDINI.; E. CARRIÓN, A.; HAPON, M. B.; E GAMARRA-LUQUES, C. Avaliação das propriedades citotóxicas e antitumorais de *Tessaria absinthioides* (Hook & Arn) DC, "pájaro bobo", extrato aquoso. **Medicina (B. Aires)** , Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 77, n. 4, p. 283-290, 2017

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Cultura: Rio de Janeiro, 1984.

PORTUGAL, L. M. **Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. 2012. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte.

PUPO, M. T; GALLO, M. B. C; VIEIRA, P. C.. *Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*.**Quím. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 6, p. 1446-1455, Dec. 2007 .

RAHMAN, M.S.; JUNAID, M. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Eupatorium triplinerve* Vahl. against some human pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 89-92, 2008.

RAJASEKARAN, A.; KALIVANI, M.; ARIHARASIVAKUMAR, G. Haemostatic Effect of fresh juice and methanolic extract of *Eupatorium ayapana* leaves in rat model. 2010. **International Journal Biological Medicine Research**, v. 1, n. 3, p. 85-87, 2010.

RIBEIRO, C. V. C., & KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, 2002, 25(4), 533-538.

RICARDO, L. M. et al. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

ROQUE, N.; OLIVEIRA, E. C.; MOURA, L.; QUARESMA, A. S.; OGASAWARA, H. A.; ALVES, M.; SANTANA, F. A.; HEIDEN, G.; CAIRES, T. A.; BASTOS, N. G.; LIMA, G. M.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae no Município de Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, 67(1), 125-202, 2016.

SAMOISY, A.K.; MAHOMOODALLY, M.F. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants used against non-communicable diseases in Rodrigues Island, Indian Ocean. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 20-38, 2015.

SAMOISY, A.K.; MAHOMOODALLY, M.F. Ethnopharmacological appraisal of culturally important medicinal plants and polyherbal formulas used against communicable diseases in Rodrigues Island. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 803-818, 2016.

SANTOS-LIMA, T.M., SANTOS, D.R.V., SOUZA, R.M., BASTOS, N.G., VANNIER-SANTOS, M.A., NUNES, E.S., & DIAS-LIMA, A.G.. Medicinal plants with antiparasitic action: traditional knowledge of the Kantaruré ethnic group, Baixa das Pedras village, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 240-247. 2016.

SANTOS-LIMA, T.M., SANTOS, D.R.V., SOUZA, R.M., BASTOS, N.G., VANNIER-SANTOS, M.A., NUNES, E.S., & DIAS-LIMA, A.G.. (2016). Medicinal plants with antiparasitic action: traditional knowledge of the Kantaruré ethnic group, Baixa das Pedras village, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18(1, Suppl. 1), 240-247

SANTOS-LIMA, T.M., SANTOS, D.R.V., SOUZA, R.M., BASTOS, N.G., VANNIER-SANTOS, M.A., NUNES, E.S., & DIAS-LIMA, A.G.. (2016). Medicinal plants with antiparasitic action: traditional knowledge of the Kantaruré ethnic group, Baixa das Pedras village, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18(1, Suppl. 1), 240-247

SATHISHA, M.P.; REVANKAR, V.K.; PAI, K.S.R. Synthesis, structure, electrochemistry and spectral characterization of bis-isatin thiocarbohydrazone metal complexes and their antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Metal based Drugs**, p. 1-11. 2008

SELVAMANGAI, C.; BHASKAR, A. GC-MS analysis of phytochemicals in the methanolic extract of *Eupatorium triplinerve*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, n. 3, p. 1329-1332, 2012.

SHARMA, C; CHETRI, A. Documentation of traditional medicinal plants used by garo tribe in dimoria tribal belt of assam. **International Journal of Innovative in Science and Engineering**. v.3, n.3, p. 299-306, 2017.

SIKIC, B.I., BARTLETT, N.L., LUM, B.L., FISHER, G.A., BROPHY, N.A., EHSAN, M.N., HALSEY, J., 1994. Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. **J. Clin. Oncol.** 12, 835–842.

SILVA, A. A.; ANDRADE, L. H. C. Utilização de espécies de Asteraceae por comunidades rurais do Nordeste do Brasil: relatos em Camocim de São Félix, Pernambuco. **Biotemas**, 26, 2: 93- 104, 2013.

SILVA, A. D. S. **Síntese, caracterização, avaliação citotóxica e antitumoral de complexos organometálicos derivados de núcleos nicotínicos**. 2018. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia. Instituto e Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas

SILVA, A.E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D.. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 58, n. 4, p. 658-661, Aug. 2006 .

SINGH, A. Phytomedicinal investigation for antimicrobials based on chemical and biological properties of herbal medicines: An overview. **Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science**. v. 1, n. 7, p. 405-424, 2012.

SOUSA, F. C. F; MELO, C. T. V; CITÓ, M. C. O; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M; FONTELES, M. M. F; BARBOSA FILHO, J. M; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 4, 2008

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed. **Nova Odessa: Plantarum**. 2008

SREEKEESON, D.P.; MAHOMOODALLY, M.F. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 181-200, 2014.

SUBASH, K. R. et al. The anthelmintic activity of *Eupatorium triplinerve* and *Alpinia galanga* in *Pheritima posthuma* and *Ascaridia galli*: a comparative study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 6, p. 947-950, 2012.

SUNIL, D.; ISLOOR, A.M.; SHETTY, P.; NAYAK, P.G.; PAI, K.S.R. *In vivo* anticancer and histopathology studies of Schiff bases on Ehrlich ascitic carcinoma cells. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 6, p. 25–33, 2013.

TAREAU, M. A. et al. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 200-213, 2017.

TAYLOR, L. Technical Data Report for Ayapana (*Ayapana triplinervis*). Disponível em: rain tree, 2006.

UDDIN, S. B.; RATNA, R.S; FARUQUE, M.O. Ethnobotanical study on medicinal plants of rakhaing indigenous community of Cox's Bazar District of Bangladesh. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 4, 2013.

UNNIKRISHNAN, P. K. Study on Eupatorium triplinerve Vahl from South India, A Rich Source for Thymohydroquinone dimethylether and its Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. v. 17, p. 652-657, 2014.

VAN DEN BERG, M. A. Ver-o-peso: the ethnobotany of an Amazonian market. **Advances in Economic Botany Ethnobotany in the Neotropics GT France and JA Kallunki (eds.), New York Botanical Garden Bronx**, v. 1, p. 140-149, 1984.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia, manual de plantas medicinais, a farmácia de Deus**. 2 ed. Agronômica Ceres, São Paulo, Brasil, 1992.

VON POSER, G. L; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. In: SIMÕES, C.M.O. (Orgs.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre (RS): UFRGS, p. 75-89, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Springer, 2001.

WANGKANUSA, D. et al. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun prasman (*Eupatorium triplinerve vahl.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. **Pharmacon**, v. 5, n. 4, 2016.

WORDING, F. .; PERISSINOTTI, A. J; MARINI, B. L. Cancer Pharmacology and Pharmacotherapy Review. **New York: Demos Medical**, 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer. Fact sheet N°297, Update February 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 06 jan. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNICEF. Primary health care: report of the International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, URSS, 1978. Geneva, 1978. p. 61.

ANEXO


 UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
 CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
 COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo nº 12/2017

Título do Projeto de Pesquisa: Avaliação da atividade angiogênica e antitumoral de fração rica em cumatinas de *Ayupana triplinervis* VAHL. (Asteraceae)
 Pesquisador Responsável: Anderson Bentes de Lima
 Instituição: Universidade do Estado do Pará

Data do Parecer: 04/08/2017

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitadas os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. O referido projeto utiliza 71 camundongos *Mus musculus*, com 40 dias e peso de 30g a 40g para fins de pesquisa, tratando-se de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata, do sexo masculino, originários da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório (SACPA) do Instituto Evandro Chagas. Desse modo, após as avaliações o CEUA-UEPA, manifesta-se pela sua aprovação.

O projeto será desenvolvido no período de 01/2018 a 12/2018.

Parecer: APROVADO

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatória a entrega neste CEUA do relatório semestral e a conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 04 de agosto de 2017


 Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima
 Coord. do CEUA/CCBS/UEPA

Universidade do Estado do Pará - UEPA - Campus II / CCBS
 Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA, End.: Trav. Peribóia nº 2623 - Marco - CEP: 66087-970
 Belém/Pará, Fone: (91) 3276-3387, e-mail: comiteetico02@gmail.com
