

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

**Avaliação das Atividades Antiinflamatória, Antitumoral e
Citotóxica de Extratos Brutos de *Turnera ulmifolia* L.**

Mestrando: Jailson Oliveira da Silva

Orientador: Prof^a Dr^a Silene Carneiro do Nascimento

Co-orientador: Prof^a Dr^a Maria Tereza Jansen de Almeida Catanho

Recife, Março de 2010

Jailson Oliveira da Silva

**Avaliação das Atividades Antiinflamatória, Antitumoral e
Citotóxica de Extratos Brutos de *Turnera ulmifolia* L.**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Pernambuco, para obtenção
do título Mestre em Ciências
Biológicas, Área de concentração:
Biologia Química para a Saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Silene Carneiro do Nascimento

Co-orientador: Prof^a Dr^a Maria Tereza Jansen de Almeida Catanho

Recife, Março de 2010

Silva, Jailson Oliveira da

Avaliação das atividades antiinflamatória, antitumoral e citotóxica de extratos brutos de *Turnera ulmifolia* L. / Jailson Oliveira da Silva. – Recife: O Autor, 2010.

65 folhas : Il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Plantas medicinais 2. Câncer 3. Tumores 4. Carcinoma 5. Quimioterapia I. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 112

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

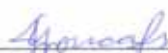
**Avaliação das Atividades Antiinflamatória, Antitumoral e
Citotóxica de Extratos de *Turnera ulmifolia* L.**

Jailson Oliveira da Silva

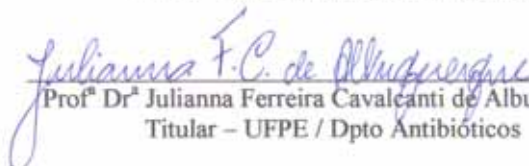
Banca examinadora



Profª Drª. Silene Carneiro do Nascimento
Orientadora - UFPE / Dpto Antibióticos



Profª Drª Teresinha Gonçalves da Silva
Titular – UFPE / Dpto de Antibióticos



Profª Drª Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque
Titular – UFPE / Dpto Antibióticos

Profª Drª Paloma Lys Medeiros-
Suplente – UFPE / Dpto de Citologia e Histologia

Profº Drº. José Sebastião de Melo
Suplente- UFPE / Dpto de Antibióticos.

Recife, Março de 2010

Dedico este trabalho, àquela que me deu a vida e nela, forças para lutar e conquistar, e esperança para nunca desistir antes de encontrar a vitória, àquela que por muitas vezes sofreu quando me via triste, àquela que por muito lutou para que aqui eu chegasse. Pois bem, com todo esse valor, posso facilmente classificá-la como a razão maior da minha existência!

Minha Querida e Amada Mãe (*in memoriam*)

*O conhecimento é orgulhoso por ter
aprendido tanto; a sabedoria é humilde por
não saber mais*

“William Cowper”

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a graça da vida.

À minha mãe Vanda (*in memorian*) que me ensinou a viver com dignidade e respeito, me ensinou o caminho das pedras e me ajudou a traçar metas para vida, que sempre cuidou de toda família e nos fez torna-se pessoas de bem.

Ao meu pai Josildo que com sua impetuosa força contribuiu para eu ser o homem que hoje sou.

Às minhas irmãs Josenice e Josileide, pelo carinho e companheirismo nas horas de dificuldades.

Aos meus lindos sobrinhos Isabelle e Matheus pelo amor puro e angelical.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que me acolheram.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de estudos.

À minha orientadora Professora Silene Carneiro que me aceitou como seu pupilo e me ajudou em mais essa etapa.

À minha querida professora Teresa Jansem que desde o início da minha vida acadêmica me orientou contribuindo para minha formação.

À professora Terezinha que mesmo não sendo seu orientando me ajudou com as metodologias.

Aos membros da banca examinadora, por suas contribuições para o enriquecimento da pesquisa.

À professora Elba e os alunos do LAPRONAT pela ajuda nos testes fitoquímicos

Ao Departamento de análises ambientais do CRCN, em especial ao Alex que sempre entregou no prazo meus extratos

A professora Ivone por me ajudar com os extratos orgânicos.

Ao meu amigo irmão Marcelo que sempre esteve presente nas horas de alegrias e principalmente nas horas difíceis.

Ao meu amigo Sílvia, pelo estímulo ao crescimento e nos últimos meses por ser um grande companheiro quando precisei.

À minha amiga Zélia que sempre me colocou pra frente

A todos os meus amigos e companheiros da pós-graduação nos momentos de ralação nas disciplinas e fora delas também.

Aos companheiros de atividades do LBPF que me acolheram com carinho e me ajudaram nas experimentações, em especial a Jaciana, Thyago, André e Maria.

Aos funcionários Silvânia e Sidcley pela ajuda na produção das Lâminas histológicas.

À secretária Adenilda pelos lembretes e informações de nossas obrigações

Ao senhor Fredson que nunca esteve de mau humor e sempre que precisasse estava quebrando nosso galho no LBCM.

A todos os funcionários que prestaram seus serviços com competência.

Obrigado a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SILVA, JAILSON OLIVEIRA DA; Avaliação das Atividades Antiinflamatória, Antitumoral e Citotóxica de Extratos de *Turnera Ulmifolia* L. 2010. Orientador: Silene Carneiro do Nascimento. Co-orientador: Teresa Jansem de Almeida Catanho.

RESUMO

Apesar das investigações e estudos científicos sobre plantas com o uso medicinal, não se conhece muito sobre os princípios ativos e as extraordinárias qualidades curativas de muitas espécies vegetais. A *Turnera ulmifolia* L. é uma planta encontrada em diversas partes do mundo, com aplicação na medicina popular. No Brasil, conhecida como chanana ou albina esta planta é popularmente usada no combate a úlceras gástricas e duodenais. Este trabalho teve como objetivo o estudo da atividade antiinflamatória, antitumoral e citotóxica de extratos de *Turnera ulmifolia* L. Foram realizados testes fitoquímicos para as classes de compostos: flavonóides, cumarinas, alcalóides, saponinas e taninos. A atividade antiinflamatória foi avaliada pelo teste de peritonite induzida por carragenina, para o estudo da atividade antitumoral utilizou-se células de tumor carcinoma de Ehrlich as quais foram retiradas de animais doadores e implantadas na região axilar de camundongos albinos swis *mus musculus*, após 24 horas da implantação se deu início ao tratamento quimioterápico que teve duração de sete dias consecutivos, em seguida os animais foram sacrificados, retirados tumor, fígado, rim e baço para análise histopatológica e na atividade citotóxica foram utilizadas células de linhagem K562 (Eritroleucemia), Hep-2 (carcinoma epidermoide de laringe) e NCI H292 (carcinoma de pulmão) frente a diferentes concentrações dos extratos da planta. Através da análise dos resultados o teste de peritonite demonstrou que o extrato aquoso não apresenta significativa atividade antiinflamatória. Os cálculos de porcentagem de inibição tumoral, mostraram que a *Turnera ulmifolia* L. nas concentrações de 3 e 10mg/kg do extrato aquoso apresentam respectivamente, 67,16% e 52,97%. Para os extratos orgânicos a atividade inibitória foi de 68,59% para n-hexano e 31,7% para o Acetato de etila sobre o crescimento tumoral quando comparada ao grupo controle com $p < 0,05$ de significância estatística. Os extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol não promoveram citotoxicidade nas linhagens celulares testadas.

Palavras chave: Antitumoral, *Turnera ulmifolia*, Carcinoma de Ehrlich, camundongos

SILVA, JAILSON OLIVEIRA DA; Evaluation of Anti-Inflammatory Activities, Antitumor and Cytotoxic Extract *Turnera ulmifolia* L. 2010. Orientadora: Silene Carneiro do Nascimento. Co-orientadora: Teresa Jansem de Almeida Catanho.

ABSTRACT

Despite the investigations and scientific studies on plants with medicinal use, not much is known about the active and the extraordinary healing qualities of many plant species. The *Turnera ulmifolia* L. is a plant found in various parts of the world, with application in folk medicine. In Brazil, known as albino or chanana this plant is popularly used to combat gastric and duodenal ulcers. This work aimed to study the anti-inflammatory, antitumor and cytotoxic activities of extracts of *Turnera ulmifolia* L. Phytochemical tests were conducted for the classes of compounds: flavonoids, coumarins, alkaloids, saponins and tannins. The antiinflammatory activity was evaluated by carrageenan-induced peritonitis, to study the antitumor activity, we used tumor cells of Ehrlich carcinoma which were removed from donor animals and implanted in the axillary region of albino mice swis mus musculus, after 24 hours deployment is initiated the chemotherapy treatment that lasted for seven consecutive days, then the animals were euthanized, removed the tumor, liver, kidney and spleen for histopathological analysis and cytotoxic activity were used cell line K562 (erythroleukemia), Hep- 2 (larynx epidermoid carcinoma) and NCI H292 (lung carcinoma) to different concentrations of plant extracts. By analyzing the test results of peritonitis demonstrated that the aqueous extract has no significant anti-inflammatory activity. The calculations of percentage of tumor inhibition, showed that the *Turnera ulmifolia* L. concentrations of 3 and 10 mg / kg of aqueous extract present respectively 67.16% and 52.97%. For organic extracts inhibitory activity was 68.59% for n-hexane and 31.7% for ethyl acetate on tumor growth when compared to the control group with $p < 0.05$ statistical significance. The aqueous, n-hexane, ethyl acetate and n-butanol did not cause cytotoxicity in cell lines tested.

Key words: Antitumor, *Turnera ulmifolia*, Carcinoma de Ehrlich, Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representantes da família Turneraceae.....	6
Figura 2: Relação da massa tumoral/grupos teste e o percentual de inibição tumoral. Os grupos tratados receberam dose de 3 e 10mg/kg de extrato aquoso, o controle apenas solução salina 0,9% e o grupo padrão 2,5mg/Kg de metotrexato para $p < 0,05$	32
Figura 3: Fotos de tumores de Ehrlich no pós-tratamento. “A” massas tumorais dos animais do grupo tratado 10mg/kg do extrato aquoso de <i>Turnera ulmifolia</i> , “B” massas tumorais dos animais do grupo tratado 3mg/kg do mesmo extrato e “C” massas tumorais dos animais do grupo controle (salina 0,9%).....	33
Figura 4. Relação da massa tumoral/grupos testes e o percentual de inibição tumoral. Os grupos tratados com os extratos n-hexano, Acto Etila e n-butanol de <i>T. ulmifolia</i> receberam dose de 100mg/Kg, o grupo controle recebeu solução salina 0,9% e o grupo padrão 2,5mg/Kg de metotrexato para $p < 0,05$	34
Figura 5: Fotos de tumores de Ehrlich no pós-tratamento. Da esquerda para direita massas tumorais dos animais do grupo controle, tumores dos animais tratados com extrato n-hexano de <i>Turnera ulmifolia</i> , massas tumorais dos animais do grupo tratado com extrato de Acetato de etila e tumores dos animais tratados com extrato n-butanol de <i>T. ulmifolia</i>	34
Figura 6: Fotomicrografias do grupo controle (salina 0,9%).....	45
Figura 7: Fotomicrografias do grupo tratado 3mg/Kg de extrato aquoso de <i>Turnera ulmifolia</i>	46
Figura 8: Fotomicrografias do grupo tratado 10mg/Kg de extrato aquoso de <i>Turnera ulmifolia</i>	47
Figura 9: Fotomicrografias grupo 100mg/Kg estrato n-xenano de <i>Turnera ulmifolia</i>	48

Figura 10: Fotomicrografias grupo 100mg/kg extrato Acetato de etila de <i>Turnera ulmifolia</i>	49
Figura 11: Fotomicrografias grupo 100mg/Kg de extrato n-butanol de <i>Turnera ulmifolia</i>	50
Figura 12: Fluxograma de aquisição do material vegetal para produção dos extratos de <i>Turnera ulmifolia</i> L.....	51
Figura 13: Fluxograma preparação do extrato aquoso.....	52
Figura 14: Fluxograma extração em metanol e particionamento em n-hexano, acetato de etila e n-butanol.....	53
Figura 15: Fluxograma de manutenção dos animais experimentais.....	53
Figura 16: Fluxograma de Obtenção de células tumorais, implante e iniciação ao tratamento quimioterápico.....	54
Figura 17: Fluxograma: Procedimento para Atividade Antiinflamatória.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antitumoral do extrato aquoso de <i>Turnera ulmifolia</i> L. Os valores da massa tumoral representam a média por grupo (n=6 animais), $p<0,05$	32
Tabela 2: Atividade antitumoral dos extratos n-hexano, Acetato etila e n-butanol de <i>T. ulmifolia</i> L. Os valores da massa tumoral representam a média por grupo (n=6 animais) para $p<0,05$	33
Tabela 3: Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de <i>Turnera ulmifolia</i> L. em ensaio de peritonite induzida por carragenina. Os valores de PMN representam a média por grupo (n=6 animais).....	36
Tabela 4: Resultado dos testes de citotoxicidade de diferentes extratos de <i>T. ulmifolia</i> frente às linhagens celulares NCI – H292 , HEp – 2 e K562, a dose é expressa em $\mu\text{m/mL}$	37
Tabela 5: Resultados da triagem fitoquímica realizada com extratos de <i>T. ulmifolia</i> . Os sinais (+) e (-) indicam presença e ausência respectivamente.....	41
Tabela 6: Sistema de análise fitoquímica.....	42
Tabela 7: Análise histológica por grupo teste.....	43

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1. GERAL.....	3
3.2. ESPECÍFICOS	3
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
4.1. <i>TURNERA ULMIFOLIA L.</i>	4
4.2. CÂNCER.....	7
4.3. CARCINOMA DE EHRLICH	7
4.4. INFLAMAÇÃO	9
4.5. PERITONITE EM CAMUNDONGOS	10
5. BIBLIOGRAFIAS.....	12
6. CAPÍTULO 1.....	22
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA, ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE <i>TURNERA ULMIFOLIA L.</i>	22
RESUMO	23
6.1 INTRODUÇÃO	24
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
7.1. PROCEDIMENTOS ÉTICOS	25
7.2. MATERIAL BOTÂNICO	25
7.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	26
7.4. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	26
7.5. PREPARAÇÃO DAS DOSES	26
7.6. TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS APÓS DOSE ÚNICA	27
7.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL	27
7.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	28
7.9. ATIVIDADE CITOTÓXICA	29
7.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
8.1. TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS.....	31

8.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL	31
8.3. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	35
8.4. ATIVIDADE CITOTÓXICA	37
9. CONCLUSÕES	37
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
11. ANEXOS	41
11.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>TURNERA ULMIFOLIA</i>	41
11.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	43
JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	57

1. INTRODUÇÃO

O Brasil compreende a maior biodiversidade do mundo e é considerado uma rica fonte de plantas medicinais (MIGUEL *et al.*, 2000). Um grande número de extratos obtidos de espécies de plantas são usados contra varias doenças na medicina popular e o uso dos produtos naturais tem crescido nas ultimas décadas, isso porque, vem ganhando grande credibilidade em decorrência das importantes pesquisas farmacêuticas (STEEP, 2004; SOUZA *et al.*, 2005). Entretanto, apesar das investigações e estudos científicos sobre plantas com o uso medicinal, não se conhece muito sobre os princípios ativos e as extraordinárias qualidades curativas de muitas espécies vegetais. Substâncias derivados de plantas, como flavonóides, terpenos, alcalóides, entre outros têm recebido importante atenção nos últimos anos devido às suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antitumoral, atividade anti-câncer, efeitos citotóxicos e ainda como quimiopreventivos (DI CARLO *et al.*, 1999). Segundo Newman e Cragg (2000), em torno de 50% ou mais de drogas utilizadas em ensaios clínicos de atividade antitumoral foram isoladas de fontes naturais ou estão relacionados a estas. O estudo de produtos naturais originados de plantas já proporcionou a descoberta de mais de duas centenas de compostos com atividade antitumoral, dentre estes se destacam a vimblastina, extraída da *Catharanthus roseus*, o paclitaxel mais conhecido como taxol, extraído da *Taxus brevifolia*, disponíveis e utilizados atualmente como substancias com atividade considerável no tratamento de alguns tipos de câncer. A riqueza e diversidade de recursos vegetais de regiões brasileiras indicam que uma das melhores formas de encontrar agentes com atividades biológicas são estudos com abordagem etnomedicinal e testar a eficácia das plantas selecionadas com segurança através de métodos científicos (FRANCO e FONTANA, 2004). Dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial de cura, número que cai para 10% no Brasil, quando deveria ser mais alto, uma vez que o país representa a maior diversidade genética vegetal do planeta (MIGUEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 1999; SOEJARTO *et al.*, 1996).

2. JUSTIFICATIVA

Durante muito tempo, o uso dos remédios naturais e as plantas medicinais baseadas no conhecimento popular foram os principais e únicos recursos disponíveis aos médicos. Isto produziu um grande conhecimento, ainda que empírico, sobre as espécies vegetais que possuem propriedades medicinais e ampliou experiências no uso de produtos extraídos destas espécies. Atualmente a Fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente ao ponto que o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. A validação científica das propriedades características das plantas, torna-se necessária para evitar o mau uso destas e combater o charlatanismo que cerca tais produtos. Após a comprovação da eficácia ou mesmo a descoberta de novas atividades medicinais das plantas já usadas popularmente, pode-se informar à comunidade a maneira correta de utilização de tais plantas. As pesquisas direcionadas à atividade antitumoral de plantas, tem aumentado nos últimos anos devido à descoberta de produtos naturais com ação anti-proliferativa, proporcionando novos campos de investigação nesta área. Dentro desta perspectiva, esperava-se que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e biodiversidade vegetal, detendo aproximadamente um terço da flora mundial. Além disso, existe no país um grande número de grupos de pesquisa que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, a quimiotaxonomia, a farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. Devido a esta situação preocupante, procura-se mostrar através do desenvolvimento deste projeto a viabilidade de investimento na elaboração de fitoterápicos, considerando o avanço da Química Medicinal Clássica em nível mundial (Clark, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Determinar a atividade antiinflamatória, antitumoral e citotóxica de extratos aquoso, n-hexano, n-butanol e acetato de etila de *Turnera ulmifolia* L. produzidos a partir de folhas secas da planta.

3.2. Específicos

- Realizar extração de compostos da *Turnera ulmifolia* pelo método de infusão para o extrato aquoso e por maceração exaustiva para extrato em metanol;
- particionamento do extrato metanólico em n-hexano, acetato de etila e n-butanol;
- Realizar teste fitoquímico para os extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol de *Turnera ulmifolia* L.
- Avaliar a taxa de inibição tumoral dos extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol de *Turnera. ulmifolia* L. em tumor Carcinoma de Ehrlich em sua forma sólida na região axilar de camundongos albinos swiss sadios *Mus musculus*;
- Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *T. ulmifolia* L. através de teste de peritonite em camundongos albinos swiss sadios *Mus musculus*;
- Determinar a atividade citotóxica “in vitro” dos extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol, frente a células de linhagem eritroleucêmica (K562). carcinoma de laringe (Hep-2) e carcinoma de pulmão (NCI H292).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Turnera ulmifolia* L.

Segundo Arbo (2004) a família Turneraceae contém 10 gêneros e cerca de 190 espécies. Estas possuem uma alta distribuição em regiões tropicais e subtropicais do mundo, prevalecendo sua diversidade principalmente na América tropical. A família Turneraceae, meleshebiaceae e passifloraceae possuem fortes associações entre si, destacando-se características, como: presença de coleteres, glândulas foliares, endosperma persistente e arilo, formando então um grupo de vegetais parafiléticos em Malpighiales (STEVENS, 2001). Entre todos os gêneros que compõem a família Turneraceae, o gênero *Turnera* L. apresenta maior representatividade, estimando cerca de 120 espécies, distribuídas entre a África e as Américas (ARBO, 2005). O trabalho mais abrangente para a família foi realizado por Urban (1883) que foi o primeiro a propor uma divisão infragenérica para *Turnera* L., posicionando 54 espécies para nove famílias: *Salicifoliae*, *Stenodictyae*, *Anomala*, *Leiocarpaceae*, *Annulares*, *Papilliferae*, *Microphyllae*, *Capitatae* e *Canaligeriae*. Segundo Arbo (2005) Atualmente, nos sistemas de classificação, ainda são empregadas as séries propostas por Urban (1883) para o gênero *Turnera*, entretanto, a mudança mais evidente foi da série *Canaligeriae*, que corresponde ao conceito atual da série *Turnera*, cuja mudança segue o Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Espécies de *Turnera* L. são reconhecidas pelo tipo herbáceo a arbustivo, folhas simples, com ou sem estípulas, margem serrada e muito raramente margem inteira, possuem tricomas e a presença de glândulas nectaríferas é freqüente. As inflorescências são em racemos, cimeiras ou com flores solitárias, com pedicelo total ou parcialmente unido ao pecíolo. As flores apresentam corola com pétalas brancas, amarelas ou alaranjadas, manchadas na base ou simplesmente limpas, os filetes estaminais apresentam-se presos à base do cálice. Quanto ao fruto, este apresenta cápsula loculicida, esférica, sementes curvas, e arilo constante (Arbo, 2000, 2005; González; 2005). No Brasil, especialmente na região Nordeste as espécies de *Turnera* são conhecidas popularmente como “chanana”. Em feiras livres é comum encontrar raízes da planta sendo comercializadas para o emprego no tratamento de amenorréias, dismenorreias segundo a medicina popular. Outras espécies, como *Turnera diffusa* Willd. ex. Schult. e *Turnera ulmifolia* L., são utilizadas principalmente como afrodisíaco (Elisabetsky et al., 1992; Dominguez;

Hinojosa, 1976), abortivo (Winkelman, 1989; Krag, 1976), expectorante (Fryer, 1965), em tratamento de úlceras gástricas (Sousa et al., 2002) e do diabetes (Winkelman, 1989; Barbosa-Filho et al., 2005). Espécie de *Turnera subulata* é muito utilizada contra amenorréia na forma de chá (Agra et al., 2007; Moraes et al., 2005). Segundo Moraes et al (1994) estudos químicos revelaram que o gênero *Turnera* caracteriza-se por apresentar terpenóides do grupo dos sesquiterpenos e monoterpenos. Este gênero ainda apresenta como constituintes principais o grupo de flavonóides (Piacente et al., 2002), benzenóides (Fryer, 1965), alcalóides (Diaz, 1977) e lipídios (Hosamani, 1993). Outros estudos realizados com algumas espécies de *Turnera* têm apresentado diversas atividades biológicas, dentre as quais ocupam destaque as atividades: antiulcerativa (Gracioso et al., 2000), hipotensiva (Vieira et al., 1968), antimutagênica (Wall et al., 1988), antihiperglicêmica (Alarcon-Aguilara et al., 1998), afrodisíaca (Arletti et al., 1999), antiinflamatória (Antonio; Souza 1998), larvicida (Kalyanasudaram; Diaz 1985), antimalárica (Antoun et al., 2001), espasmogênica e vasodilatadora (Feng et al., 1962).

Classificação taxonômica da *Turnera ulmifolia* L.

REINO	Plantae
DIVISÃO	<u>Magnoliophyta</u>
CLASSE	<u>Magnoliopsida</u>
ORDEM	<u>Malpighiales</u>
FAMÍLIA	Turneraceae
GÊNERO	Turnera
ESPÉCIE	Turnera ulmifolia L.

Figura 1: Representantes da família Turneraceae



Turnera diffusa



Turnera longiflora



Turnera sp.



Erblichia bernieriana



Turnera scabra



Turnera calyptrocarpa



Turnera ulmifolia



Periqueta duarteana

4.2. Câncer

Segundo Adam et al (2003) tumor ou simplesmente neoplasma, é a designação para um crescimento anormal de tecidos, no qual as células com um distúrbio genético passam a se reproduzir mais rapidamente e sem controle em relação as células normais. O tumor é dito maligno quando seu crescimento é muito acelerado e as células deste encontram-se de forma desorganizada e com tendências invasivas aos tecidos vizinhos, caracterizando metástases (SARASIN, 2003).

A palavra câncer tem origem no latim e significa caranguejo. Este nome dado a doença surgiu da idéia com que o tumor se adere ao local do corpo onde o mesmo se desenvolve, tal qual o caranguejo se adere aos lugares por onde anda (BOLD et al., 1997). O câncer ocorre quando alterações genéticas interferem nos mecanismos normais do controle do crescimento celular. Estas alterações podem ser adquiridas ou mesmo herdadas e, por isso, entende-se que a carcinogênese é um processo que compreende múltiplos estágios, deste o nível de genótipo e ou fenótipo, que envolvem alterações cumulativas (ALTIERI, 2001; bunz, 2001; ADAM et al., 2003). Dados mostraram que a incidência de morbidade, estimados através de pesquisas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), alcançam números expressivos, ocupando o terceiro lugar nas causas de morte, depois de acidentes de carro e doenças cardíacas. O câncer representa um dos maiores problemas de doença no mundo (JEMAL & WARD, 2003).

4.3. Carcinoma de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi descoberto em 1896 por Paul ehrlich e descrito em 1906 como um carcinoma de glândulas mamárias de camundongos fêmeas. A virulência da linhagem do TAE deveu-se às transferências seriadas daquela massa neoplásica que crescia rapidamente entre 80 e 100% entre os camundongos receptores. Inicialmente, o tumor de Ehrlich foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Anos depois, por volta de 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (DAGLI, 1989; MATSUZAK et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

A indução experimental dessa neoplasia em camundongos é feita por intermédio do transplante das células tumorais retiradas de um animal já com a neoplasia desenvolvida. Assim, são retirados cerca de 0,3mL (para a indução da forma ascítica) a 0,5mL (para indução da forma sólida) de líquido ascítico de camundongos Swiss e inoculados diretamente no camundongo receptor. Essa inoculação poderá ser feita diretamente no peritônio do receptor, levando ao desenvolvimento da forma ascítica ou ainda, pode ser inoculado diretamente no tecido subcutâneo ou no coxim plantar. Nestes casos, o desenvolvimento do tumor será na forma sólida. A partir do sétimo dia é possível observar um expressivo crescimento da massa tumoral, a qual continua crescendo e invade os tecidos adjacentes até o décimo terceiro dia. Logo após a inoculação, observa-se a migração das células para os linfonodos regionais (GENTILE, 2001; BELO et al., 2004).

Histologicamente, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose. Estas são oriundas da morte das células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-inoculação. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são comumente vistas por toda a lâmina. O tumor possui poucas células inflamatórias e estroma escasso. Alto índice mitótico e células invasivas caracterizam essa neoplasia, o que é um comportamento muito comum dos tumores malignos (GABAI et al., 1995; DAGLI, 1989). Devido a suas características e a facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado na oncologia experimental, um ramo da Oncologia Comparada dedicado ao desenvolvimento de tumores transplantáveis. Segundo Dawe 1982, a oncologia comparada, procura melhorar o conhecimento das neoplasias do homem e de animais. Dos inúmeros tumores experimentais utilizados para o estudo “in vivo” em animais, o uso de tumores transplantáveis na forma ascítica tem sido bastante útil, uma vez que possuem fácil padronização para o número de células que devem ser inoculadas; facilidade na quantificação e medição da regressão da massa tumoral e também por apresentarem características comuns aos tratamentos que são realizados para células da corrente sanguínea e demais fluidos corporais (DAGLI et al., 1989; SAAD-HOOSNE et al., 2004)

Em exame clínico a suspeita de tecido tumoral é induzida pela presença de atipia celular e de células inflamatórias, classificando o tumor em cinco classes (I, II, III, IV e V). Na classe I, está ausente a atipia celular e praticamente inexistem células inflamatórias. Em contra partida, na classe V a atipia celular é bem caracterizada e encontram-se muitas células inflamatórias o que torna típica uma neoplasia maligna (GENTILE, 2001). No líquido retirado da cavidade

peritoneal em camundongo, percebe-se um grande número de células com características epiteliais exibindo intenso pleomorfismo, hipercromatismo nuclear e alteração da relação núcleo-citoplasma, indicando tratar-se de classe V (PAL et al., 2001; DAGLI et al., 2002).

Segundo Dagli (1989), as células do tumor de Ehrlich são de origem epitelial da glândula mamária, portanto são especializadas na produção de lipídeos. O exame histoquímico de uma gota de líquido ascítico do tumor, revela células pleomórficas, com diâmetros 2 a 3 vezes maiores aos de hemácias do camundongo, dentro dessas células são vistas inúmeras gotículas de tamanho variável. Essas gotículas são os lipídeos, os quais estão presentes devido a processo degenerativo que leva ao acúmulo de lipídeos no interior da célula (DAGLI, 2002). O tecido tumoral em exame macroscópico apresenta-se com superfície lisa, uma massa de consistência emborrachada e formato irregular.

Através de incisão na massa tumoral é possível identificar áreas de necrose (região esbranquiçada) e áreas hemorrágicas (pontos vermelhos). Ainda é possível perceber uma pseudo-cápsula o que facilita a visualização dos seus limites durante a cirurgia (DAGLI, 1989).

Oliveira et al., (2003) relatam que em observação ao microscópio óptico é evidenciada uma área de necrose coagulativa caracterizada pelo arranjo concêntrico de células epiteliais neoplásicas. Observa-se também células multinucleadas com núcleos gigantes, mostrando intensa atipia nuclear e citoplasma bastante amplo, enquanto que o estroma apresenta-se escasso e sem vascularização.

4.4. Inflamação

A inflamação ocorre como uma resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, como físico, químico ou biológico. Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (MONTENEGRO, 2004; BECKER, 1983). O processo inflamatório é classicamente dividido em agudo e crônico. A inflamação aguda é a resposta inicial a lesão celular e tecidual, predominando fenômenos de aumento de permeabilidade vascular e migração de leucócitos, particularmente neutrófilos (MONTENEGRO & FECCHIO, 1999). Localmente

caracteriza-se pelos sinais cardinais da inflamação e o exemplo mais claro é o abscesso. Se a reação for intensa, pode haver envolvimento regional dos linfonodos e resposta sistêmica na forma de neutrofilia e febre, caracterizando a reação da fase aguda da inflamação. Todas estas respostas são mediadas por substâncias oriundas do plasma, das células do conjuntivo, do endotélio, dos leucócitos e plaquetas, que regulam a inflamação e chamadas genericamente de mediadores químicos da inflamação. A inflamação deve, portanto ser entendida como uma série de interações moleculares, como ocorre em outros processos biológicos. A inflamação aguda tem como objetivo principal a eliminação do agente agressor, ocorrendo frequentemente destruição tecidual. Os fenômenos agudos, como o próprio nome diz, são transitórios, havendo posteriormente a regeneração ou cicatrização da área envolvida, ou cronicidade do processo se o agente agressor não for eliminado.

Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares recrutados pelos sítios de lesão celular desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório mediante a liberação de fatores solúveis de regulação da fase aguda denominados de citocinas, destacando-se inicialmente a liberação de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (MONTENEGRO, 2004; AKIRA, 1990; ADAMS, 1996). A migração dos leucócitos envolve um rígido mecanismo de regulação de adesão destas células ao endotélio e subsequente migração transendotelial (FABRIS, 2004; ALBELDA, 1990; DRAY, 1995). Além disso, os macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas criando um estresse oxidativo.

4.5. Peritonite em Camundongos

A inflamação do peritônio, pode ser devida tanto à invasão bacteriana quanto à irritação química. Para o tratamento das peritonites podem ser empregadas drogas de ação sistêmica (antibióticos e antiinflamatórios) e de ação local. Entre as diferentes substâncias utilizadas para tal fim, encontram-se a solução fisiológica (com NaCl a 0,9%) e as soluções anti-sépticas. Em numerosos serviços de cirurgia, ficou demonstrado que a limpeza mecânica e a lavagem com aspiração da cavidade abdominal, utilizando-se da solução salina isotônica, é o método eficiente e inócuo para a limpeza local em peritonites bacterianas ou químicas (WALKER & CONDON,

1991), apesar de sua capacidade anti-séptica permanecer controversa. É ainda controversa a utilização da lavagem peritoneal com solução fisiológica 0,9% de NaCl, quando em contraposição ao emprego de agentes anti-sépticos ou ainda o uso de antibióticos, como componentes das soluções de irrigação, em peritonites infecciosas (BIROLINI et al., 1990).

5. BIBLIOGRAFIAS

ABOOTT. **Cancer Chemother.** Rep. 2: 121-35, 1972.

ADAM, J.K., ODHAV, B., BHOOLA, K.D., immuni responses in câncer. **Pharmacology and therapeutics**, v.1, p. 1-20, 2003.

ADAMS DH, NASH GB. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as fators in circulatory pathology. **Br J Anaesth**, 77: 17-31, 1996.

AGRAWAL, P. K.. editor, carbon-13 NMR of flavonoids. **New York: Elsevier**, 564pp. 1989.

AKIRA S, HIRANO T, TAGA T ET AL. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J**, 4: 2860-2867, 1990.

ALBELDA SM, BUCK CA. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J**, 4:2868-2880, 1990.

ALLEY, M.C. **Cancer Res.** v. 48, p. 589-601, 1988.

ALMEIDA, J.R.C.. **Farmacêuticos em oncologia – Uma nova Realidade**. Editora Atheneu, São Paulo. p. 111-275, 2004.

ALTIERI, D.C. tha molecular basis and potencial role of survival in câncer diagnosis and therapy. **Molecular Medicine**, V. 7,N. 12, P. 1-6, 2001.

ANTONIO, M.A., SOUZA BRITO A.R. M.. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic Activities of a hydroalcoholic extract and particioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) **journal of ethnopharmacology**, 61:215-228, 1998.

ARBO, MM. Turneraceae (*Turnera* Family). In: N. Smith *et al.* (Eds.) Flowering Plants of Neotropics. **The New York Botanical Garden**. Princeton University Press, 2004.

ARBO, MM. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III Series *Anomaliae y Turnera*. *Bonplandia* 14: 115-318, 2005.

BECKER EL. Chemotactic factors of inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, 4(5):223-225, 1983.

BELO, A.V., BARCELO, L.S., FERREIRA, M.A.N., ENNAMANY, R., LEE, W.N.P., BOROS, L.G. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor mice. **Life Science**, v. 74, p. 2827-2837, 2004.

BOLD, R.J., TERMULEN, P.M., MACCONEY, D.J. apoptosis, câncer and cancer therapy. **Surgical Oncology**, v.6, n.3, p. 133-142, 1997.

BRASILEIRO, G., GUIMARAES, R.C. BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In BRASILEIRO, G. **Patologia Geral**. 2 ed, Guanabara Koogan, p. 148-192. 1998.

BURGESS GM, PERKINS MN, RANG HP, CAMPBELL EA, BROWN MC, MCINTYRE P, URBAN L, DZIADULEWICZ EK, RITCHIE TJ, HALLETT A, SNELL CR, WRIGGLESWORTH R, LEE W, DAVIS C, PHAGOO SB, DAVIS AJ, PHILLIPS E, DRAKE GS, HUGHES GA, DUNSTAN A, BLOOMFIELD GC. Bradyzide, a potent non-peptide B-2 bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 77-86, 2000.

CLARK, A .M.; **Pharmaceut. Res.** 13, 1133, 1996.

CODY, V., MIDDLETON E., HARBONE J.B. (eds.), "Plant Flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships," **Alan Liss, New York**, 1986.

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

CRUZ, T., GÁLVEZ, J., OCETE, M.E., CRESPO, M.E., SANCHEZ DE MEDINA, L.H. and ZARZUELO, A.Z.. oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. **Life Science**, 62 (7) 687-695, 1998.

DANTAS, A.L.A.; VALENTE, L.M.M.; MORAIS, L.A.S.; FELICIANO, G. and BERNARDO-FILHO, M.. In vitro study of vellozi pusilla Pohl (Veloziaceae), a Brazilian plant species: antitumoral activity and labeling of Blood elements. **Braz arch of boil and tech**, Curitiba. V.48, p.57-61, 2005.

DC. **J Essent Oil Res** 6: 429-431, 1994.

DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A. and CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, 65: 337-353, 1999.

DIAZ JL. Ethnopharmacology of sacred psychoactive plants used by the Indians of Mexico. **Ann Rev Pharmacol Toxicol** 17: 647, 1977.

DOMINGUEZ X.A., HINOJOSA M. Mexican medicinal plants. XXVIII. isolation of 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone from *Turnera diffusa*. *Planta Med* 30: 68. DRAY A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, 1995; 75:125-131, 1976.

ELISABETSKY E, FIGUEIREDO W, OLIVERIA G. Traditional Amazonian nerve tonics as antidepressant agents: *Chaunochiton Kappleri*: a case study. **J Herbs Spices Med Plants** 1: 125-162, 1992.

FABRIS, V. E.. **Patologia: processos gerais. In Lesões celulares.** São Paulo: Atheneu, p.63-65, 2004.

FALCÃO, E.P.S. Novas pirimidinas: síntese e avaliação de suas propriedades farmacológicas. 120 f. **Tese (doutorado em ciências biológicas)** – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

FENG PC, HAYNES LJ, MAGNUS KE, PLIMMER JR, SHERRAT HAS. Pharmacological screening of some west Indian medicinal plants. **J. Pharm Pharmacol** 14:556-561, 1962.

FINGERT, HJ; PU, AT; CHEN, ZY. Invivo and Invitro Enhanced Antitumor Effects by Pentoxifylline in Human Cancer-Cells Treated with Thiotepa. **Cancer Research**, V.48 (15), p. 4375-4381, 1988.

FORMAN L, BRIDSON, D. The Herbarium handbook, **Great Britanic: Royal Botanic Gardens**, Kew, 1989.

FRYER FA. A Chemical investigation of damiana (*Turnera diffusa*). **Specialities** 1: 21, 1965.

FUNAYMA, S. and KUMAIYAMA. Antitumor agents, in: Search of bioactive compounds from microorganisms. **Satoshi Omura(edt)**, spriger-verla, New York, v.5, p.79-97, 1993.

GABAI, V.L., ZAMULAEVA, I.V., MOSIN, A., YULIA, M.M., BUDAGOVA, Y.V., GERAN, R.I., N.H. GREENBER, M.M. MACDONAL, R.I. SCHUMACH & B.J. ABOOTT. **Cancer Chemother.** Rep. 2: 121-35, 1972.

GONZALEZ AM, ARBO MM. Anatomy of some species of Turneraceae. **Acta Bot Venez** 28: 369-394, 2005.

GONZALEZ AM, ARBO MM. Trichome complement of *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). **Bot J Linn Soc** 144: 85-97, 2004.

GRACIOSO J.S, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA C.A, SOUZA BRITO A.R. apr. Effects of tes from *turnera ulmifolia* L. On mouse gastric mucosa support the turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Boil pharm bull.**; 25 (4); 487-91. Pmid: 11995930 [pubmed – indexed for medline], 2002.

HOSAMANI KM. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry** 34: 1363-1365, 1993.

<http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>, acessado em maio de 2006.

JEMAL, L.B. CAREY, J.C., BAMSHAD, M.L., WHITTE, R.L. genética do **cancer**. In **genetic Médica**. Guanabara/Koogan, cap, 11, pag. 197-212, 2000.

KABAKOV, A.E. resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due accumulation of heat shock proteins. *Cancer Letters*, v. 375, p. 21-26, 1995.

KALYANASUNDARAM M, DAS PK. Larvicidal & synergistic activity of plant extracts for mosquito control. **Indian J Med Res** 82: 19-23, 1985.

KING, F. D.; In **Medicinal Chemistry: Principles and Practice**; The Royal Society of Chemistry, Inglaterra, 1994.

KRAG KJ. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. **Thesis-Bs-Harvard University**, 1976.

LICHFIELD, J. T. AND WILCOXON, F.. A simple method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharm. Exper. Therap.**, 95:99-113, 1949.

LITWACK, G.; IN: **Textboob of Biochemistry: with ClinicalCorrelations**; 3th Ed.; Wley-Liss Publ.; New York, p.901, 1992.

LOEWENTHAL, H. & JAHN, G. Ubertragungversuche mit carcinomatoser Mause-Ascitesflussigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. **Ztschr F Krebsforsch**, 37:439, 1932.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamação: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, M. R; FRANCO M. **Patologia: processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. p.109-128, 1999.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M.; **Patologia: processos gerais**, São Paulo:4. Atheneu, p.111-125, 2004

MORAIS SM, DANTAS JDP, SILVA ARA, MAGALHÃES EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Rev Bras Farmacogn** 15: 169-177, 2005.

MORENO SR, DIRÉ GF, FREITAS R, MATTOS D, GOMES M, FARAH, M. Bioavailability of the sodium pertechnetate and morphometry of organs isolated from rats: study of possible pharmacokinetic interactions of a Ginkgo biloba extract. **Braz Arch Biol Technol**;48:71-6. 2, 2005.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, S.C. “Recherche de Pactivitéantitumorale de produits de synthese ou d’origine naturelle. Utilisation du SAMBA pour l’analyse de modifications cellulaires induites”. Tese Doutorado, **Université Joseph Fourier**, UFR de Pharmacie, Grenoble, France, págs. 1-173, 1993.

OLIVEIRA, S.I., FECCHIO, D., BRUMATTIG, G., LANDRAF, R.G., AMARANTE, MG.P., JANCAR, S. EFEITO ANTAGONISTA DE PAF no numero de células, apoptose, produção de PGE2 e no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Instituto de ciências biomédicas, USP, **pôster 236**, 2003.

PAL, S., CHOUDHURI, T., CAHTTOPADHYAYS, S., BHATTACHAYA, A., DATTA, G.K., DAS, T., SA, G. Mechanisms of ancumin-induced apoptosis of ehrlich’s ascites carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 288, p. 658-665, 2001.

PALASKA, E., G. SAHIN, P. KELICEN, N.T. DURLU & G. ALTINOK. **Il Farmaco** 57:101-7, 2002.

PIACENTE S, CAMARGO EES, ZAMPELLI A, GRACIOSO JS, BRITO ARS, PIZZA C, VILEGAS W. Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. **Z Naturforsch C** 57:983-985, 2002.

PIO CORRÊA, M.. In: **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, third Ed., Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pp. 49–50, 1984.

PIZZOLATTI, M.G., CUNHA JR,A., SZPOGANICZ, B., SOUSA, E. Flavonóides Glicosilados das Folhas e Flores Dde *Bauhinia Forficata* (Leguminosae). **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

RAO TS, CURRIE JL, SHAFFER AF, ISAKSON PC. **Mediators Inflamm.** 2(5):357-62, 1993.

SAAD-HOSSNE, R., SAAD-HOSSNE, W., PRADO, R.G., Efeito da Solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de ehrlich. Estudo experimental in vitro. **Acta cirúrgica Bras.**, v. 19, n. 1, 2004.

SARASIN, M. An avorview of the machanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Review in Mutation research**, v. 544, p. 99-106, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao Medicamento**. Florianópolis: UFSC & UFRS, 1999.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing : perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol. (Limerick)**, v.51, 1996.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry - the principles and practice of statistics**. New York: W.H. Freemann, 2. ed., p.859, 1981.

SOUSA GRACIOSO J, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA CA, SOUZA BRITO ARM. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biol Pharm Bull** 25: 487-491, 2002.

SOUZA BRITO A. R. M., “**Manual de ensaios toxicológicos in vivo,**” Campinas, editora UNICAMP, p122, 1994.

SOUZA, G.M.L.. Estudo dos Efeitos biológicos do *Phyllanthus niruri* (qubra-pedra), “in vitro’ e “in vivo’. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2001.

SOUZA, V.C., LORENZI H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

STEPP, J.R.. The role of weeds sources of pharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, V.92, p. 163-166, 2004.

STEVENS P.F. (2001 onwards) **Angiosperm phylogeny website**. Version 6 May 2005.

STOCK, K.. Tumor transplantation. Methods of animal experimentation. **Academic press**, New York and London, v. 2, cap. 3, p. 171-221, 1965.

SUTHERLAND, I. W.. Biotechnology of microbial exopolysacharides. **Cambridge university press**, Cambridge, 1990.

URBAN I.. Monographie der familie der Turneraceen. Jahrb Königl Bot Gart Berlin 2: 1-155.

VINEGAR, R., J.F. TRUAX & J.L. SELPH (1973) **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 143: 711-4, 1883.

WAGNER, H. & BLANDT, S. **Plant Drug Analysis**. New York, Springer, 1996.

WALL ME, WANI MC, HUGHES TJ, TAYLOR H.. Plant antimutagenic agents, 1. General bioassay and isolation procedures. **J Nat Prod** 51: 866-873, 1988.

WINKELMAN, M.. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. **Med Anthropol** 11: 255-268, 1989.

ARTIGO: ESTUDO ANTIINFLAMATÓRIO, ANTITUMORAL E CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *Turnera ulmifolia* L.

A ser submetido ao periódico: **Journal of Ethnopharmacology.**

6. CAPÍTULO 1

Avaliação das Atividades Antiinflamatória, Antitumoral e Citotóxica de Extratos de *Turnera ulmifolia* L.

Jailson Oliveira da Silva¹, Teresinha Gonçalves da Silva², Maria Tereza Jansem de Almeida Catanho², Silene Carneiro do Nascimento¹,

Departamento de Antibióticos, LBPF, Av. Professor Moraes Rego, s/n , Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil; Departamento de Biofísica, laboratório de biofísica Celular e Molecular Av. Professor Moraes Rego, s/n , Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

e-mail: Jailson Oliveira – jbiologia@hotmail.com, Silene Carneiro – silenen@yahoo.com.br, Maria Tereza Jansem – mariajansem@hotmail.com, Terezinha Gonçalves – teresinha100@gmail.com.

RESUMO

A *Turnera ulmifolia* L. é uma planta encontrada em diversas partes do mundo, com aplicação na medicina popular. No Brasil, conhecida como chanana ou albina ela pode ser usada no combate a úlceras gástricas e duodenais, segundo a medicina popular. Este trabalho teve como objetivo o estudo da atividade Antitumoral, antiinflamatória e citotóxica de extratos de *Turnera ulmifolia* L.. Foram realizados testes fitoquímicos para as classes de compostos: flavonóides, cumarinas, alcalóides, saponinas e taninos. A atividade antiinflamatória foi realizada por teste de peritonite, para a atividade antitumoral foram utilizadas células de tumor carcinoma de Ehrlich, as quais foram retiradas de animais doadores e implantadas na região axilar de camundongos albinos swis *mus musculus*, 24 horas após a implantação deu-se início ao tratamento que teve duração de sete dias consecutivos, em seguida os animais foram sacrificados, retirados tumor, fígado, rim e baço para análise histopatológica. e na atividade citotóxica foram utilizadas células de linhagem NCI-H292 (câncer de pulmão) frente a diferentes concentrações dos extratos da planta. Através da análise dos resultados foram realizados cálculos estatísticos com $p < 0,05$ de significância.

Palavras Chave: *Turnera ulmifolia*, Carcinoma de Ehrlich, Antitumoral, Camundongos, Citotoxicidade.

Apoio: FACEPE

6.1 Introdução

Apesar das investigações e estudos científicos sobre plantas com o uso medicinal, não se conhece muito sobre os princípios ativos e as extraordinárias qualidades curativas de muitas espécies vegetais. Dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial de cura (MIGUEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 1999; SOEJARTO *et al.*, 1996). Durante muito tempo, o uso dos remédios naturais e as plantas medicinais baseadas no conhecimento popular foram os principais e únicos recursos disponíveis aos médicos. Isto produziu um grande conhecimento, ainda que empírico, sobre as espécies vegetais que possuem propriedades medicinais e ampliou experiências no uso de produtos extraídos destas espécies. A validação científica das propriedades características das plantas, tornam-se necessários para evitar o surgimento dos chamados “produtos milagrosos” e combater o charlatanismo que cerca tais produtos. Após a comprovação da eficácia ou mesmo a descoberta de novas atividades medicinais das plantas já usadas popularmente, pode-se informar à comunidade a maneira correta de utilização de tais plantas. *Turnera ulmifolia* L é uma planta encontrada em diversas partes do mundo, com aplicação na medicina popular. No Brasil, é conhecida como chanana ou damiana, ela é de fácil cultivo e bastante adaptável aos diversos climas, podendo resistir até uma temperatura de 85°C em algumas ocasiões. As plantas que compõem a família Turneraceae são típicas de florestas úmidas, campos e jardins tropicais, por isso, são consideradas como erva daninha. A *Turnera ulmifolia* L, é um arbusto denso perene, com folhas lanceoladas, oblongolanceolada ou estreita-elíptica. Suas flores são formadas por pétalas que variam do amarelo a brancas-amareladas tendo na base cor marrom. Através de sua beleza e exuberância esta planta é utilizada como ornamento em países tropicais. Testes fitoquímicos mostraram que a chanana possui uma variedade de flavonóides glicosilados. Popularmente vem sendo usada em alguns países contra amenorréia, cólicas menstruais e como antipiréticas. A chanana pode ser ainda usada no combate a úlceras gástricas e duodenais, segundo a medicina popular. (GRACIOSO *et al.*, 2002). As pesquisas direcionadas à atividade antitumoral de plantas, tem aumentado nos últimos anos devido à descoberta de produtos naturais com ação anti-proliferativa, proporcionando novos campos de investigação nesta área. A vincristina é um exemplo de substância antineoplásica derivada de plantas como a *Vinca rosea*, amplamente utilizada no tratamento quimioterápico, que atua em protocolos para tumores como linfomas, leucemias, mama e ovário. Outros derivados de compostos naturais também fazem parte dos

tratamentos convencionais, como os taxanos, antibióticos, enzimas, epipodofilotoxinas, campotecinas e modificadores da resposta biológica (RANG *et al.*, 2000; HARDMAN & LIMBIRD, 2003; ALMEIDA, 2004). Nesta pesquisa será verificada a atividade antiinflamatória, antitumoral e citotóxica de extratos de *Turnera ulmifolia* L.

7. Materiais e Métodos

7.1. Procedimentos Éticos

Os procedimentos experimentais apresentados nesta pesquisa foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (Comitê de Ética em Experimentação Animal / Centro de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Pernambuco - CEEA-UFPE, ofício nº 143/09). Encontrando-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179-art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

7.2. Material Botânico

Turnera ulmifolia L. utilizadas no estudo foram coletadas na região metropolitana, zona da mata da cidade de Camaragibe em fragmento de mata atlântica, onde as plantas crescem sob condições naturais. Parte do material coletado foi herborizada, seguindo as técnicas descritas por Forman e Bridson (1989). A exsicata foi depositada no Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, sob o número de **registro 59.221**. A coleta do material foi realizada no período da manhã, onde as plantas encontram-se mais vigorosas, pois ainda não estão sobre forte influência do sol. Após coletar a coleta, das plantas foram retiradas e separadas as folhas. Em seguida estas passaram por análise macroscópica e separadas as que apresentavam perfeito estado (ausência de fungos e insetos ou ainda dejetos destes, folhas sem partes cortadas ou comidas por animais, apenas folhas com pigmentação verde). Em seguida as folhas foram espalhadas em bancada, mantidas arejadas e ao abrigo da luz solar durante duas semanas para sofrer desidratação.

7.3. Preparação dos Extratos

O extrato aquoso foi obtido pelo processo de infusão 27g de pó das folhas para (2x) 270 mL durante 30 minutos a temperatura de $43 \pm 2^\circ\text{C}$ e ao abrigo de luz, logo após foi filtrado e liofilizado. O rendimento foi de aproximadamente 26%. Para a preparação de extrato em metanol foi utilizado o método de maceração exaustiva, 75g de folhas secas e trituradas foram embebidas em metanol à temperatura ambiente durante sete dias. O extrato alcoólico foi levado ao rotaevaporador modelo: Flash-evaporator, banho Maria CT 246 (CIENTEC) a $40 \pm 3^\circ\text{C}$ e reduzido a 1/5 de seu volume inicial e o rendimento foi de aproximadamente 14%. Em seguida ficou em repouso por dois dias a 4°C . após este período, a solução foi submetida a sucessivas partições em *n*-hexano, acetato de etila (AcOEt) e *n*-Butanol (*n*-ButOH). O solvente de cada fase orgânica foi evaporado. (PIZZOLATTI, 2003).

7.4. Animais Experimentais

O estudo foi realizado com camundongos albinos swiss *Mus musculus* fêmeas saudáveis, com 60 dias de idade, pesando entre 30 e 35g. Os animais foram abrigados em gaiolas de plástico em estante e ventilação interna, temperatura e umidade controlada e ciclo de claro/escuro de 12 horas, de acordo com as Normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS). Os camundongos foram pesados e separados em lotes de 06 animais, sendo 7 grupos tratados e 3 grupos controles, os quais permaneceram em jejum de 8 horas, antes da realização de cada experimento. A via de administração da droga foi intraperitoneal (I.P.) para a atividade antitumoral e por via oral (Vo) para os ensaios de atividade antiinflamatória.

7.5. Preparação das doses

O extrato aquoso submetido à secagem e liofilizado foi reconstituído em solução salina. Enquanto que os extratos em *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol submetidos à secagem por

rota-evaporação foram reconstituídos em tween 80 (até 10% do volume da solução total) e solução salina 0,9% e as doses calculadas e injetadas em mg/kg de peso corpóreo do animal.

7.6. Toxicidade aguda em camundongos após dose única

O teste para avaliação de toxicidade aguda dos extratos obtidos de *Turnera ulmifolia* em dose única foi realizado de acordo com o método descrito por OECD (2000). Grupos de camundongos pesando entre 30 e 35g receberam dose única de 300mg/kg de peso de cada extrato. Os animais foram observados durante os 60 primeiros minutos, tomando como parâmetros de toxicidade: piloereção, taquicardia, contorções abdominais, estiramento, agitação, evacuação e poliúria. Posteriormente em intervalos maiores até completar um período de 14 dias. Segundo Litchfield e Wilcoxon (1949) a partir dos dados coletados durante os teste de toxicidade, foram analisados como parâmetros principais: O número de morte dos animais foi utilizado para determinar o cálculo da dose letal em 50% dos animais testados (DL_{50}).

7.7. Avaliação da Atividade antitumoral

Para realização dos testes “*in vivo*”, o tumor carcinoma de Ehrlich na forma ascítica, com 7 dias de implantado, foi transplantado a partir de animal doador, para animais sadios dos grupos experimentais previamente marcados para permitir sua identificação. O tumor ascítico (aproximadamente 7mL), foi removido do animal doador, diluído (100 vezes) em solução salina. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, permitindo a preparação de uma suspensão equivalente a 25×10^6 célula/mL, da qual 0,2 mL (5×10^6 célula/mL) foram injetados na região axilar direita dos animais dos grupos experimental e controle. O tempo decorrido entre a remoção do tumor do animal doador até seu implante nos animais receptores, não ultrapassou 60 minutos, conforme recomendado por (GERAN et al., 1972). Antes de iniciado o tratamento, os animais foram pesados e marcados aleatoriamente para formação dos grupos experimentais. Durante o tratamento os animais tiveram seus pesos confirmados em dias alternados até o final do período aplicação dos extratos.

Após 24h do implante, foi iniciado o tratamento quimioterápico, mediante administração intraperitoneal dos extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol de *Turnera ulmifolia* L. nas concentrações de 3 e 10mg/kg de peso corporal para os grupos experimentais tratados com extrato aquoso e 100mg/kg de peso corporal para os animais experimentais tratados com os extratos de n-hexano, acetato de etila e n-butanol respectivamente. O grupo controle recebeu apenas solução salina 0.9%. O período de tratamento foi de 7 dias consecutivos, 24 horas após o implante das células tumorais.

Ao término do tratamento, os animais foram novamente pesados e então sacrificados. A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula abaixo descrita, onde a relação T/C= 50% deve ser considerada como atividade significativa da droga. (GERAN et al., 1972).

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100, \text{ onde:}$$

TWI% = percentual de inibição do peso tumoral

C = média do peso dos tumores do grupo controle

T = média do peso dos tumores tratados.

7.8. Avaliação da Atividade Antiinflamatória

Para a avaliação da atividade antiinflamatória foi utilizado o modelo da peritonite induzida por carragenina (VINEGAR, TRUAX & SELPH, 1973). Os animais foram divididos em três grupos de seis animais por lote. Os animais do grupo controle receberam por via oral apenas o veículo (solução fisiológica 0,9%), e os dos grupos teste receberam por via oral o extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* L., nas concentrações de 10mg e 30mg/kg de peso corporal. Uma hora após a administração do extrato foi injetado nos animais, por via I.P., um volume de 10%/peso corporal do animal de carragenina (1% em solução fisiológica). Após 4 h, os animais foram sacrificados e foram injetados na cavidade peritoneal de cada animal 2,0 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL). Em seguida o fluido peritoneal foi coletado, o número de leucócitos totais migrados foi realizada em contador automático. O cálculo da inibição da migração

leucocitária (%I) foi determinada através da fórmula: $\%I = (C - T) / C \times 100$, onde “C” representa a média do número de leucócitos contados no grupo controle e “T” a média do número de leucócitos do grupo teste (PALASKA et al., 2002)

7.9. Atividade Citotóxica

As células HEp-2 (derivadas de carcinoma epidermoide de laringe), k652 (derivadas de eritroleucemia humana) e NCI H292 (carcinoma de pulmão). foram mantidas em DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/ml + estreptomicina 250 mg/ml) e 1% de L-glutamina 200mM.

Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o corante vital Azul Tripán (Merck) 0,4% em PBS. A contagem das células foi realizada em microscópio invertido Leitz, com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizada.

Para determinação da citotoxicidade uma suspensão celular de 10^5 células/mL, foi distribuída em placas de cultura com 96 poços (180µl em cada poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa Cole Parmer, Modelo 39200-15, com atmosfera úmida enriquecida com CO₂. Após 24h, dos extratos testes (aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol) foram adicionados 20 µl/poço e as placas foram reincubadas a 37°C (COSTA, AGUIAR, NASCIMENTO, 2004).

Decorridas 72h de contato das células com os extratos, foram adicionados a cada poço, 25µL de MTT brometo (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), (MOSMANN, 1983), a uma concentração de 5mg/ml em PBS, as placas foram deixadas por duas horas em estufa a 37°C. Ao final das duas horas o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foi aspirado e em seguida, 100 µl de DMSO adicionado a cada poço para dissolução dos cristais Formazan (FINGERT et al.,1988).

A leitura óptica foi realizada através de leitor automático do tipo Multiskan a 540nm,cuja densidade óptica (DO) média dos poços testes foram comparadas às (DO) média dos poços controle. A CI₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao

controle) foi determinada a partir de uma curva, onde estão relacionados o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações dos extratos testados admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ($p < 0,01$) (NASCIMENTO, 1993).

7.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados, empregando-se análise de variância ANOVA/Newman-Keuls, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância estatística para as atividades antitumoral e antiinflamatória (KLEMM et al., 1995; SOKAL & ROHLF, 1981) e o valor de $p < 0,01$ como nível de significância estatística para atividade citotóxica (NASCIMENTO, 1993).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Toxicidade aguda em camundongos

A dose letal foi obtida através da observação da ausência de mortes nos grupos testados até o 14^o dia após a administração dos extratos n-hexano, acetato de etila e n-butanol nas doses de 300mg/kg de peso corporal. Sinais e sintomas de efeito tóxico foram avaliados 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 e 48 horas após a administração de cada extrato. Nenhum dos extratos vegetais produzidos a partir de folhas secas de *Turnera ulmifolia* promoveu a morte dos animais na dose de 300mg/kg, foram observados apenas sinais de estiramento abdominal logo em seguida a aplicação perdurando por durante os 15 primeiros minutos nos animais do grupo n-butanol e acetato de etila principalmente. Além desses sintomas não foram observados resultados significativo de toxicidade aguda. Segundo Gracioso (2002) para os extratos alcoólico 100%, o extrato diclorometano e o extrato hexânico de partes aéreas de *Turnera ulmifolia* em doses de 100, 500, 1000, 2500 e 5000 mg/kg não apresentam nenhum efeito tóxico.

8.2. Atividade Antitumoral

Os resultados expressos na figura 2, abaixo, traz uma comparação entre os pesos dos tumores para animais tratados com a dose de 10mg/kg de peso do extrato aquoso de *t. ulmifolia* e o grupo controle que recebeu apenas solução fisiológica. Na figura 3 podem ser visualizadas macroscopicamente a diferença entre as massas tumorais dos animais dos grupos tratados com extrato de *T. ulmifolia* nas doses de 10 e 3mg/Kg, o grupo controle (solução salina 0,9%) e o grupo padrão no qual foi utilizado o metotrexato em dose de 2,5mg/kg respectivamente.

Tabela 1: Atividade antitumoral do extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* L. Os valores da massa tumoral representam a média por grupo (n=6 animais), $p<0,05$.

Grupo	Dose mg/Kg	Massa tumoral /grupo (g)	TWI%	Desvio
Controle	Soro fisiológico	1,73	0	0,31
Extrato aquoso	3mg/Kg	0,82	52,97	0,34
	10mg/Kg	0,57	67,16	0,30
Metotrexato	2,5mg/kg	0,25	89	0,11

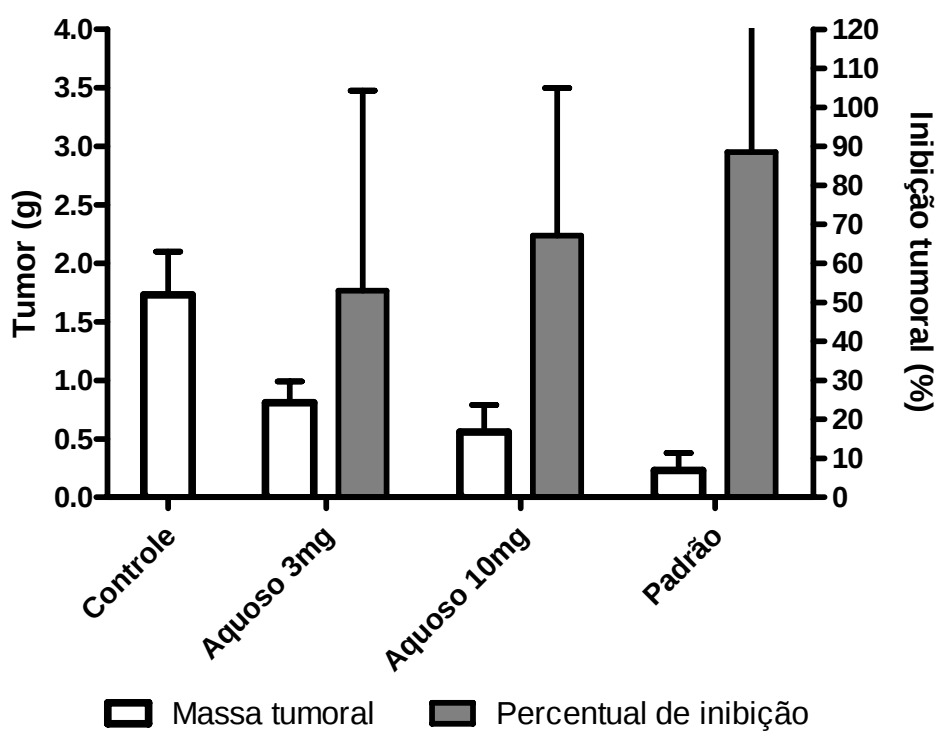


Figura 2: Relação da massa tumoral/grupos teste e o percentual de inibição tumoral. Os grupos tratados receberam dose de 3 e 10mg/kg de extrato aquoso, o controle apenas solução salina 0,9% e o grupo padrão 2,5mg/Kg de metotrexato para $p<0,05$.

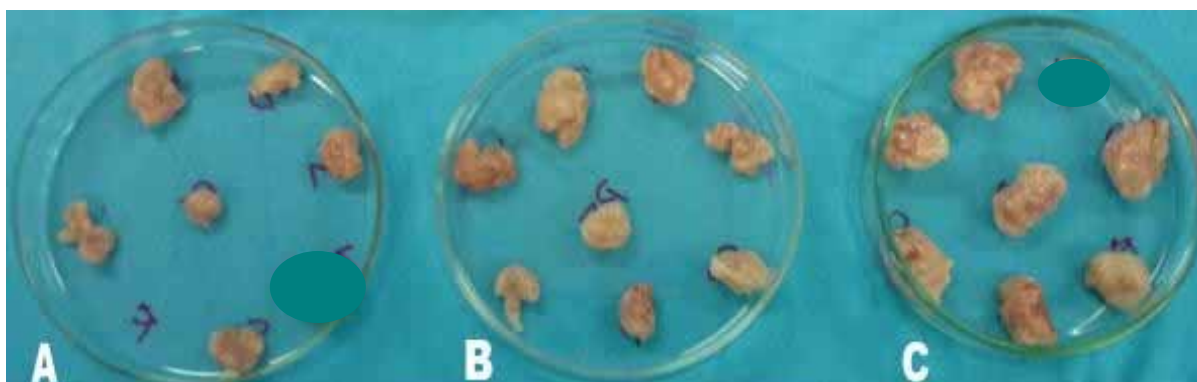


Figura 3: Fotos de tumores de Ehrlich no pós-tratamento. “A” massas tumorais dos animais do grupo tratado 10mg/kg do extrato aquoso de *Turnera ulmifolia*., “B” massas tumorais dos animais do grupo tratado 3mg/kg do mesmo extrato e “C” massas tumorais dos animais do grupo controle (salina 0,9%).

Nos cálculos da porcentagem de inibição tumoral verificou-se que o extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* L. nas concentrações de 3mg/Kg e 10mg/kg de peso corporal apresentam 52,9 e 67,2% respectivamente de inibição sobre o crescimento de células tumorais, enquanto que a concentração de 2,5mg/kg de metotrexato, droga utilizada como padrão, inibe em 88,56% o crescimento do tumor comparado ao grupo controle. Segundo Sutherland et al. (1990). para que uma substância seja considerada como inibidora do crescimento de neoplasias, esta deve apresentar atividade acima de 50%.

Tabela 2: Atividade antitumoral dos extratos n-hexano, Acetato etila e n-butanol de *T. ulmifolia* L. Os valores da massa tumoral representam a média por grupo (n=6 animais).

Grupo	Dose mg/Kg	Massa tumoral /grupo (g)	TWI%	Desvio da média
Controle	Soro fisiológico	2,83	0	0,31
n-hexano	100mg/Kg	0,89	68,59	0,34
Acto Etila	100mg/Kg	1,93	31,7	0,30
n-butanol	100mg/Kg	2,80	1,15	0,27
Metotrexato	2,5mg/kg	0,25	89	0,11

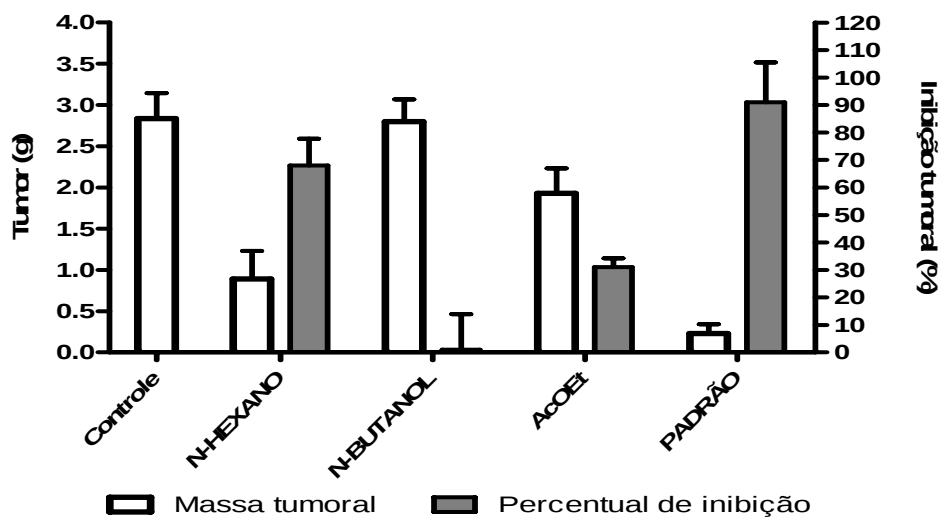


Figura 4. Relação da massa tumoral/grupos testes e o percentual de inibição tumoral. Os grupos tratados com os extratos n-hexano, Acetato de Etila e n-butanol de *T. ulmifolia* receberam dose de 100mg/Kg, o grupo controle recebeu solução salina 0,9% e o grupo padrão 2,5mg/Kg de metotrexato. Os valores são para $P < 0,05$.

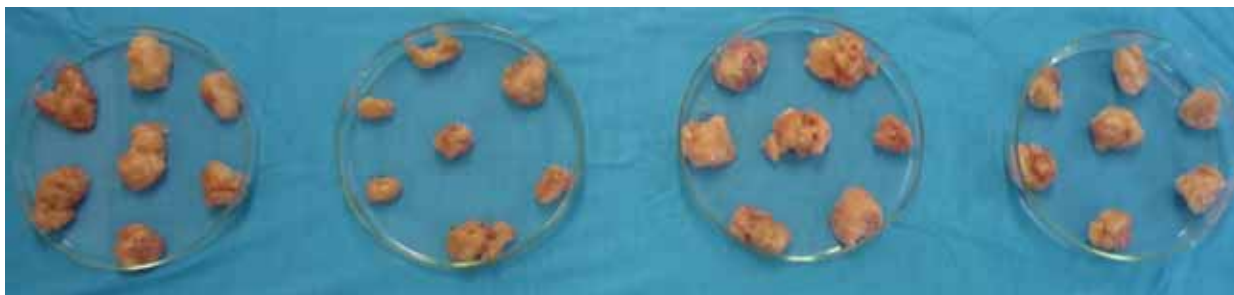


Figura 5: Fotos de tumores de Ehrlich no pós-tratamento. Da esquerda para direita, massas tumorais dos animais do grupo controle (salina 0,9%), n-hexano, Acetato de etila e n-butanol de extratos de *Turnera ulmifolia*.

De acordo com os resultados apresentados é evidenciado que tanto o extrato aquoso, quanto o em n-hexano de *T. ulmifolia* apresentam inibição do crescimento acima de 50%, enquanto que o extrato em acetato de etila reduziu em menos de 50%, porém todos os três extratos citados proporcionaram redução sobre o desenvolvimento tumoral, consideradas estatisticamente significativas, com $p < 0,05$, isso quando comparadas aos animais do grupo controle. A atividade anti-neoplásica, demonstrada pelo extrato aquoso na dose de 3mg/Kg apresentou-se em menor atividade, não tendo diferença estatística significativa em relação à inibição observada na concentração de 10mg/kg. Já o extrato n-hexano na concentração de 100mg/kg peso corporal demonstrou ter uma atividade antitumoral promissora, visto que a inibição foi de 68,59% em relação ao controle. Esta evidência sugere que a eficácia como inibidor tumoral tem correlação direta com a dose aplicada. A diminuição na proliferação das células neoplásicas tem possivelmente, origem nos flavonóides presentes nessa planta, flavonas C-glicosilados derivadas da luteolina e da apigenina (GRACIOSO *et al.*, 2002). Essas flavonas atuam principalmente induzindo a diferenciação e apoptose de células neoplásicas ou também como Antioxidantes e Pró-oxidantes, quimiopreventivos, moduladores da atividade de enzimas e indução do reparo do DNA (DI CARLO *et al.*, 1999).

Em estudos realizados anteriormente, demonstrou-se que o extrato hidroalcoólico *T. ulmifolia* contém flavonóides e apresenta atividade antiulcerogênica significativa desenvolvida em ratos. (ANTÔNIO e SOUZA BRITO, 1998).

8.3. Atividade Antiinflamatória

Para a avaliação da atividade antiinflamatória de extratos aquosos de *Turnera ulmifolia* foi utilizado o método de peritonite induzida por carragenina. Os extratos aquosos foram administrados através de via oral na dose de 10mg/kg e 30mg/kg de peso corpóreo. Os resultados da avaliação do efeito antiinflamatório estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* L. em ensaio de peritonite induzida por carragenina. Os valores de polimorfonucleares (PMN) representam a média por grupo (n=6 animais).

GRUPO	Nº PMN mm ³	% INIBIÇÃO	DESVIO
Controle	14,95	-	2,615
10mg/Kg	15,77	-5,46	3,618
30mg/Kg	12,62	19,96	1,565
Indometacina (10mg/Kg)	5,52	54,3	1,213

Através da análise dos dados é possível dizer que o extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* na dose de 10mg/Kg de peso corpóreo não apresenta atividade antiinflamatória. No grupo tratado com a dose de 30mg/Kg a atividade Antiinflamatória é caracterizada de forma relativamente baixa em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas solução fisiológica

Os testes fitoquímicos realizados com os extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol, demonstraram que os flavonóides são os principais constituintes dessa espécie vegetal. A confirmação desses compostos presentes nos extratos de *T. ulmifolia* auxiliaram no estudo das atividades antitumoral e antiinflamatória das amostras obtidas das folhas dessa planta.

Flavonóides têm sido descritos como bons agentes antiinflamatórios e esta atividade estaria relacionada à capacidade que estes compostos têm em promover a modulação ou inibição da liberação de grande parte de células do sistema imune. A ativação ou inibição de enzimas relacionadas ao processo inflamatório também poderia estar relacionada a esse potencial terapêutico (CRUZ et al. 1998). Ao contrário das informações achadas em trabalhos anteriores, nas doses de 10 e 30 mg/kg do extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* não promoveram uma atividade antiinflamatória significativa.

8.4. Atividade Citotóxica

A citotoxicidade foi verificada pelo método colorimétrico do MTT, sobre as linhagens celulares K562, HEp-2 e NCI-H292, seguindo o protocolo do Instituto Nacional do Câncer. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade citotóxica frente às linhagens celulares estudadas. Segundo o mesmo protocolo, apenas valores de CI50 acima de 30µg/mL para extratos vegetais devem ser considerados significativos (GERAN, 1972)

Tabela 4: Resultado dos testes de citotoxicidade de diferentes extratos de *T. ulmifolia* frente às linhagens celulares NCI – H292 , HEp – 2 e K562, a dose é expressa em µm/mL.

	LINHAGEM CELULAR		
	NCI – H292	HEp – 2	K 562
Aquoso	>50	>50	>50
n-hexano	>50	>50	>50
Acetato Etila	>50	>50	>50
n-butanol	>50	>50	>50

9. CONCLUSÕES

O extrato aquoso, n-hexano e acetato de etila promovem redução da massa tumoral em tumor Carcinoma de Ehrliche e se mostram promissores para uso no tratamento contra este tipo de tumor. O extrato aquoso de *Turnera ulmifolia* não possui propriedades antiinflamatórias. A atividade citotóxica para células de linhagem K652, HEp-2 e NCI-H292 é ausente para os testes realizados com os extratos aquoso, n-hexano, acetato de etila e n-butanol desta planta.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEY, M.C. **Cancer Res.** v. 48, p. 589-601, 1988

ALMEIDA, J.R.C. Farmacêuticos em oncologia – uma nova realidade. Ed. Atheneu, São Paulo. p. 111-275, 2004.

ANTONIO, M.A., SOUZA BRITO A.R. M.. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic Activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) **journal of ethnopharmacology**, 61:215-228, 1998.

ARBO, MM. Turneraceae (*Turnera* Family). In: N. Smith *et al.* (Eds.) Flowering Plants of Neotropics. **The New York Botanical Garden**. Princeton University Press, 2004.

ARBO, MM. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III Series *Anomaliae y Turnera*. *Bonplandia* 14: 115-318, 2005.

BURGESS GM, PERKINS MN, RANG HP, CAMPBELL EA, BROWN MC, MCINTYRE P, URBAN L, DZIADULEWICZ EK, RITCHIE TJ, HALLETT A, SNELL CR, WRIGGLESWORTH R, LEE W, DAVIS C, PHAGOO SB, DAVIS AJ, PHILLIPS E, DRAKE GS, HUGHES GA, DUNSTAN A, BLOOMFIELD GC. Bradyzide, a potent non-peptide B-2 bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 77-86, 2000.

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

CRUZ, T., GÁLVEZ, J., OCETE, M.E., CRESPO, M.E., SANCHEZ DE MEDINA, L.H. and ZARZUELO, A.Z.. oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. **Life Science**, 62 (7) 687-695, 1998.

DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A. and CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, 65: 337-353, 1999.

FINGERT HJ, PU AT, CHEN ZY, GOOGE PB, ALLEY MC, PARDEE AB., In vivo and in vitro Enhanced Antitumor Effects by Pentoxifylline in Human Cancer-Cells Treated with Thiotepea. **Cancer Research**, v. 48, n. 15, p. 4375-4381, 1988.

FORMAN L, BRIDSON, D. The Herbarium handbook, **Great Britanic: Royal Botanic Gardens**, Kew, 1989.

GERAN, R.I., N.H. GREENBER, M.M. MACDONAL, R.I. SCHUMACH & B.J. ABOOTT. **Cancer Chemother**. Rep. 2: 121-35, 1972.

GRACIOSO J.S, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA C.A, SOUZA BRITO A.R. apr. Effects of tes from turnera ulmifolia L. On mouse gastric mucosa support the turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Boil pharm bull.**; 25 (4); 487-91. Pmid: 11995930 [pubmed – indexed for medline], 2002.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival-Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, S.C. “Recherche de Pactivitéantitumorale de produits de synthese ou d’origine naturelle. Utilisation du SAMBA pour l’analyse de modifications cellulaires induites”. Tese Doutorado, **Université Joseph Fourier**, UFR de Pharmacie, Grenoble, France, págs. 1-173, 1993.

OECD ,. Guidance Document on Acute Oral Toxicity. **Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment** No 24, 2000.

PALASKA, E., G. SAHIN, P. KELICEN, N.T. DURLU & G. ALTINOK. **Il Farmaco** 57:101-7, 2002.

PIZZOLATTI, M.G., CUNHA JR,A., SZPOGANICZ, B., SOUSA, E. Flavonóides Glicosilados das Folhas e Flores Dde Bauhinia Forficata (Leguminosae). **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao Medicamento**. Florianópolis: UFSC & UFRS, 1999.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing : perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol. (Limerick)**, v.51, 1996.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry - the principles and practice of statistics**. New York: W.H. Freeman, 2. ed., p.859, 1981.

SOUZA BRITO A. R. M., “**Manual de ensaios toxicológicos in vivo,**” Campinas, editora UNICAMP, p122, 1994.

SUTHERLAND, I. W.. Biotechnology of microbial exopolysacharides. **Cambridge university press**, Cambridge, 1990.

VINEGAR, R., J.F. TRUAX & J.L. SELPH (1973) **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 143: 711-4, 1883.

11. ANEXOS

11.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE *Turnera ulmifolia*

A triagem fitoquímica dos extratos de *T. ulmifolia*, revelou que os principais compostos presentes no liofilizado desta espécie são flavonóides e cumarina presentes no extrato aquoso e flavonóides para os extratos acetato de etila e n-butanol. O conjunto de substâncias encontrado nestes extratos está representado na tabela 5.

Tabela 5: Resultados da triagem fitoquímica realizada com extratos de *T. ulmifolia*. Os sinais (+) e (-) indicam presença e ausência respectivamente.

	Aquoso	n-hexano	Acetato de etila	n-butanol
Alcalóide	–	–	–	–
Cumarina	+	–	–	–
Flavonóide	+	–	++	+++
Tanino	–	–	–	–
Saponina	–	–	–	–

(-) Negativo; (+) Positivo

Estudos semelhantes foram feitos por Gracioso (2002) e revelaram que os principais compostos desta espécie são flavonas C-glicosiladas derivadas da luteolina e apigenina.

Tabela 6: Sistemas de análise fitoquímica

T-E-A = Tolueno : Éter : Ácido acético (50:50:50)

A-A-A-A = Acetato de etila : Ácido fórmico : Ácido acético : Água (100:11:11:26)

Metabólito	Sistema de Eluição(v/v)	Revelador	Padrão
Alcalóides	A-A-A-A	Dragendorff	Yoimbina
Cumarinas	T-E-A	Reativo de borntrager	Lapachol Esculatina
Taninos	T-E-A	Sulfato de ferro amoniacal (1%)	Ácido gálico Ácido tânico
Flavonóides	A-A-A-A	UV-NEU	Quercetina Rutina
Saponinas	A-A-A-A	Vanilina sulfúrica	Saponina

(WAGNER, 1996)

11.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Laudo confeccionado e conferido pela Prof^{ta} Dr^a Paloma Lys Medeiros. PROFESSOR ADJUNTO do Departamento de Citologia e Histologia da Universidade federal de Pernambuco/UFPE.

Tabela 7: Análise histológica por grupo teste

Órgão	Grupos experimentais					
	Controle	Aquoso 3mg/Kg	Aquoso 10mg/Kg	n-hexano	Acetato de etila	n-butanol
Fígado	Presença de veias centro lobulares e hepatócitos dispostos radialmente.	Idem ao controle	Presença de infiltração linfocitária ao redor de algumas das veias centro lobulares e dispersos no parênquima hepático, caracterizando uma provável inflamatória medicamentos a	Discreta vacuolização a nível citoplasmático dos hepatócitos	Idem ao controle	Idem ao controle
Rim	Glomérulos renais sem alterações e túbulos contorcidos proximais e distais preservados	Idem ao controle	Idem ao controle	Redução do espaço capsular de alguns glomérulos	Redução do espaço capsular de alguns glomérulos e presença de congestionamento vascular entre os túbulos da região cortical.	Idem ao controle
Baço	Nódulos linfáticos de aparência normais	Nódulos linfáticos fusionados, denotando um processo de ativação dos sistema imune	Presença de nódulos linfáticos ativados e aparentemente em maior quantidade quando comparado ao controle	Idem ao controle	Idem ao controle	Idem ao controle

Tumor	Células tumorais atípicas, infiltrações de tecido muscular e gorduroso, áreas de necrose e formação de ductos em áreas de tecido adiposo	Dispersão dos adiposos no tecido tumoral e infiltração muscular, presença de formação ductal em áreas de infiltrações gordurosas mais compactas	Idem ao controle	Células atípicas como o controle porém mais contidas e sem diferenciação ductal no tecido adiposo periférico	Dispersão dos adipócitos no tecido tumoral e infiltração muscular, presença de formação ductal em áreas de infiltrações gordurosas mais compactas	Células atípicas, infiltração muscular, pequenas áreas de infiltração lipídica, ausência de ductos, angiogênese acentuada e presença de grandes áreas necróticas.
-------	--	---	------------------	--	---	---

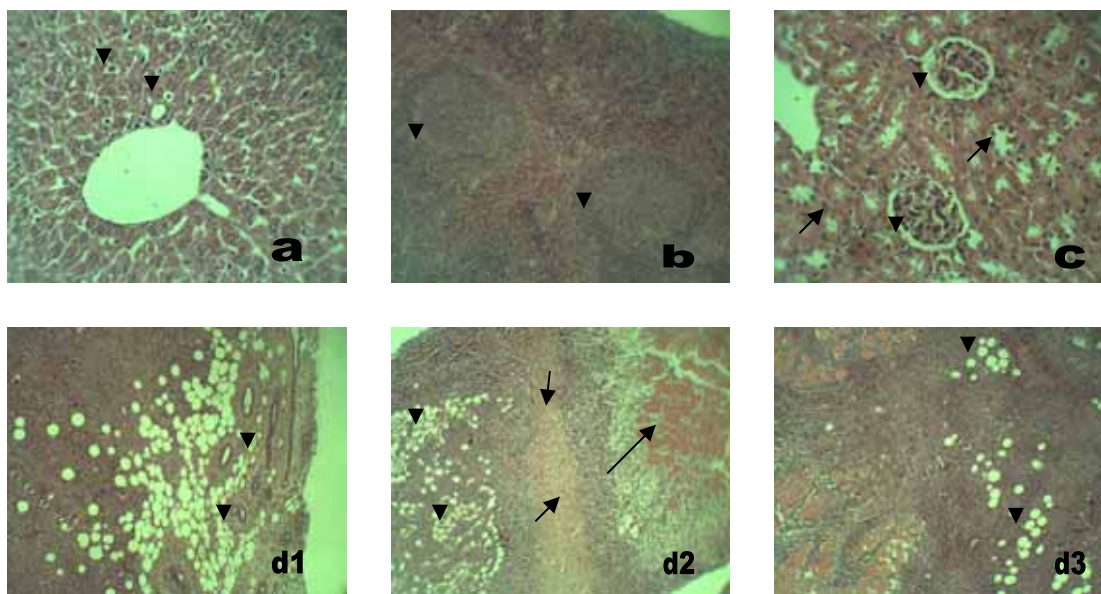


Figura 6: Fotomicrografias do grupo controle (salina 0,9%).

Fígado “a”, hepatócitos apresentando vacuolizações (pontas de seta); baço “b”, nódulos linfáticos normais (pontas de seta); Rin “c”, cápsulas glomerulares (pontas de seta) e túbulos contorcidos (setas) sem alterações; Tumor: “d1” diferenciação ductal (pontas de seta); “d2” adipócitos (pontas de seta), área de necrose (setas curtas) e inserções musculares (seta longa); “d3” tecido adiposo disperso (pontas de seta) massa de células tumorais (seta). Aumento de 100X para Baço e Tumor e de 400X para Rins e Fígado. Microscópio MOTIC-BA 200; Câmera MOTICAM 1000, 1,3M pixel USB 2.0.

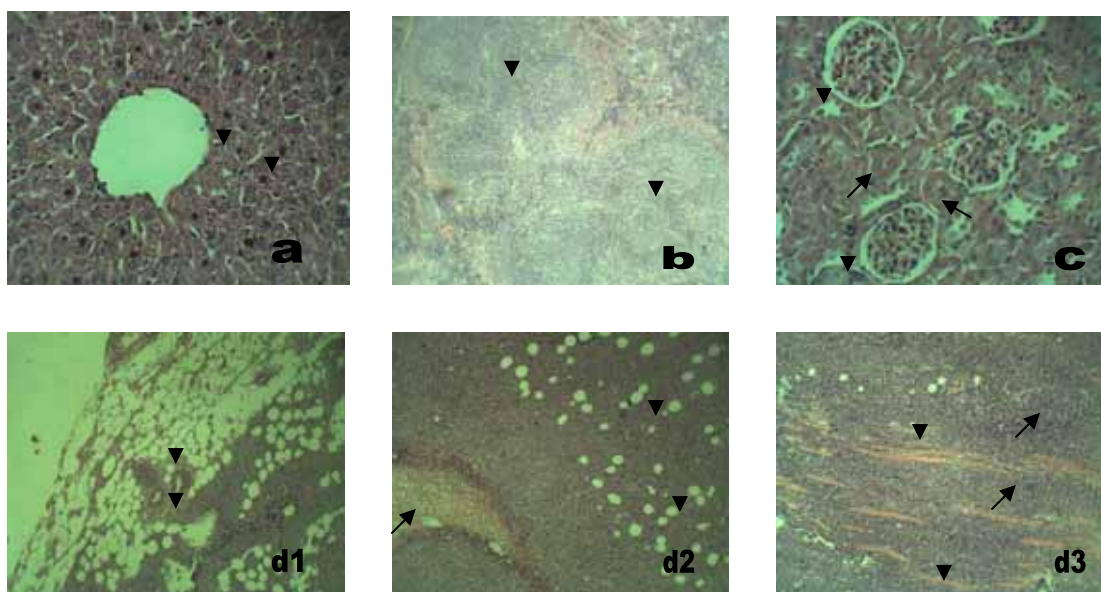


Figura 7: Fotomicrografias do grupo tratado 3mg/Kg de extrato aquoso de *Turnera ulmifolia*.

Fígado “a”, hepatócitos normais (pontas de seta); baço “b”, nódulos linfáticos fusionados (pontas de seta); Rin “c”, cápsulas glomerulares (pontas de seta) e túbulos contorcidos (setas) sem alterações; Tumor: “d1” diferenciação ductal (pontas de seta); “d2” adipócitos dispersos (pontas de seta), área de necrose (seta curta); “d3” inserções de tecido muscular (pontas de seta) massa de células tumorais (seta). Aumento de 100X para Baço e Tumor e de 400X para Rins e Fígado. Microscópio MOTIC-BA 200; Câmera MOTICAM 1000, 1,3M pixel USB 2.0.

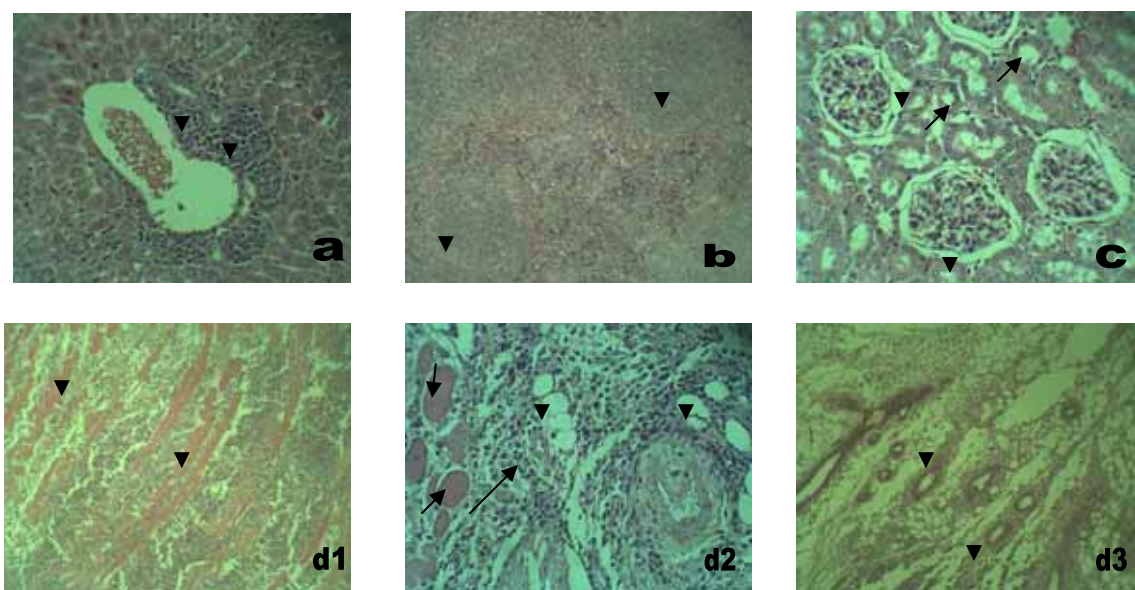


Figura 8: Fotomicrografias do grupo tratado 10mg/Kg de extrato aquoso de *Turnera ulmifolia*.

Fígado “a”, infiltrado linfocitário em veias centro-lobulares (pontas de seta); baço “b”, nódulos linfáticos (pontas de seta); Rin “c”, cápsulas glomerulares (pontas de seta) e túbulos contorcidos (setas); Tumor: “d1” infiltração muscular (pontas de seta); “d2” mistura entre tecido adiposo (pontas de seta), muscular (setas curtas) e células tumorais (setas longas); “d3” diferenciação ductal em áreas de tecido adiposo compacto (pontas de seta). Aumento de 100X para Baço e Tumor e de 400X para Rins e Fígado. Microscópio MOTIC-BA 200; Câmera MOTICAM 1000, 1,3M pixel USB 2.0.

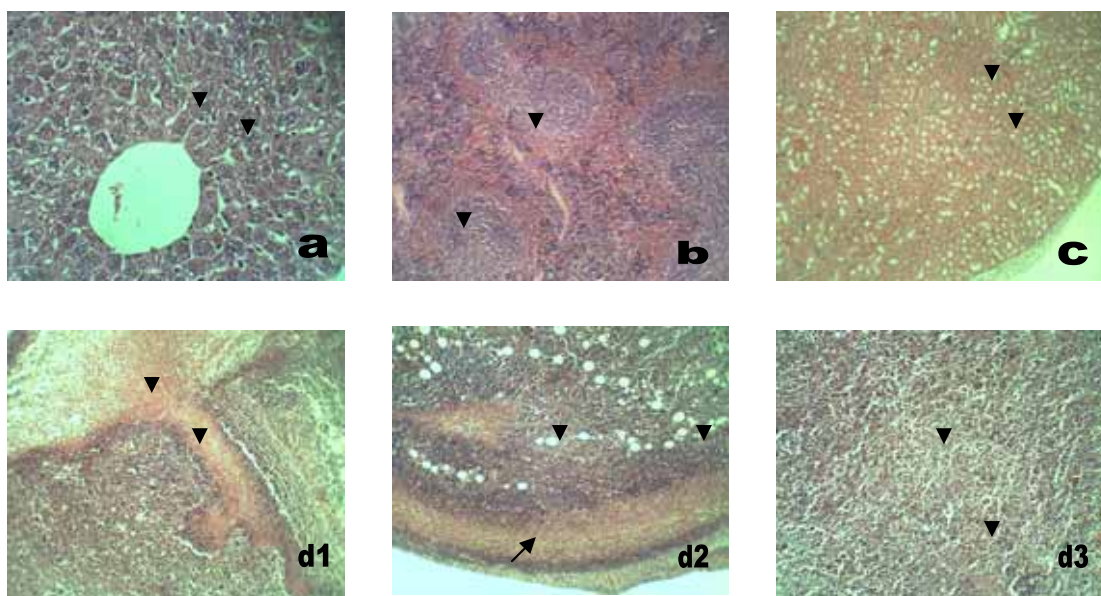


Figura 9: Fotomicrografias grupo 100mg/Kg extrato n-xenano de *Turnera ulmifolia*.

Fígado “a”, hepatócitos vacuolizados (pontas de seta); baço “b”, nódulos linfáticos normais (pontas de seta); Rim “c”, redução do espaço capsular dos glomérulos (pontas de seta); Tumor: “d1” área de necrose extensa (pontas de seta); “d2” adipócitos dispersos (pontas de seta), área de necrose tumoral (seta); “d3” massa tumoral de células atípicas (pontas de seta), diferenciação ductal ausente. Aumento de 100X para Baço e Tumor e de 400X para Rins e Fígado. Microscópio MOTIC-BA 200; Câmera MOTICAM 1000, 1,3M pixel USB 2.0.

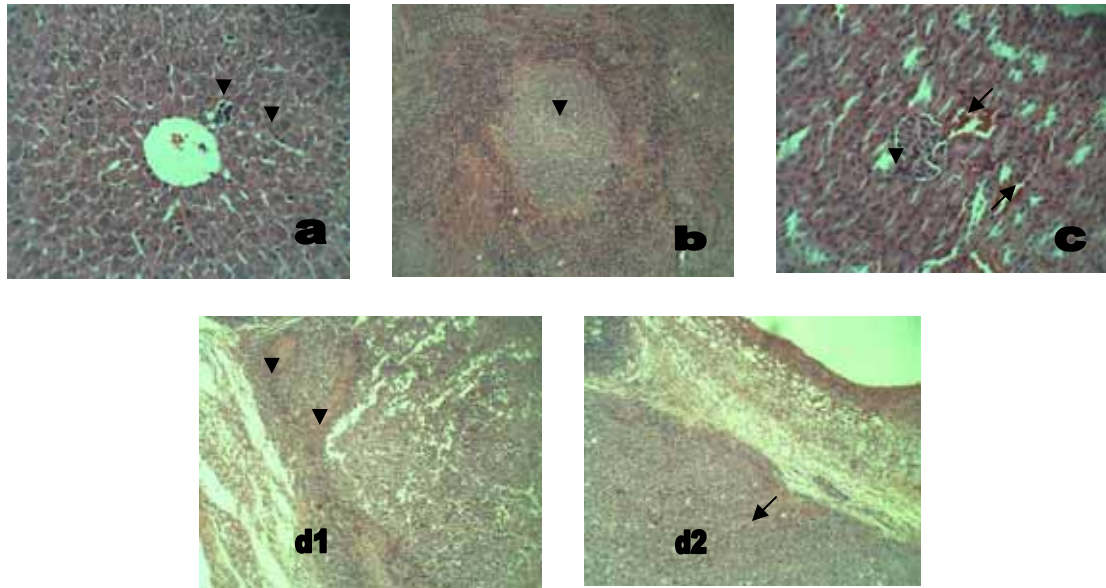


figura 10: Fotomicrografias grupo 100mg/kg extrato Acetato de etila de *Turnera ulmifolia*.

Fígado “a”, hepatócitos normais dispersos radialmente em veias centro-lobulares (ponta de setas); baço “b”, nódulos linfáticos normais (ponta de seta); Rin “c”, reduzido espaço capsular (pontas de seta) e congestionamento sanguíneo (setas); Tumor: “d1” área de necrose tumoral (pontas de seta); “d2” massa tumoral de células atípicas (seta). Aumento de 100X para Baço e Tumor e de 400X para Rins e Fígado. Microscópio MOTIC-BA 200; Câmera MOTICAM 1000, 1,3M pixel USB 2.0.

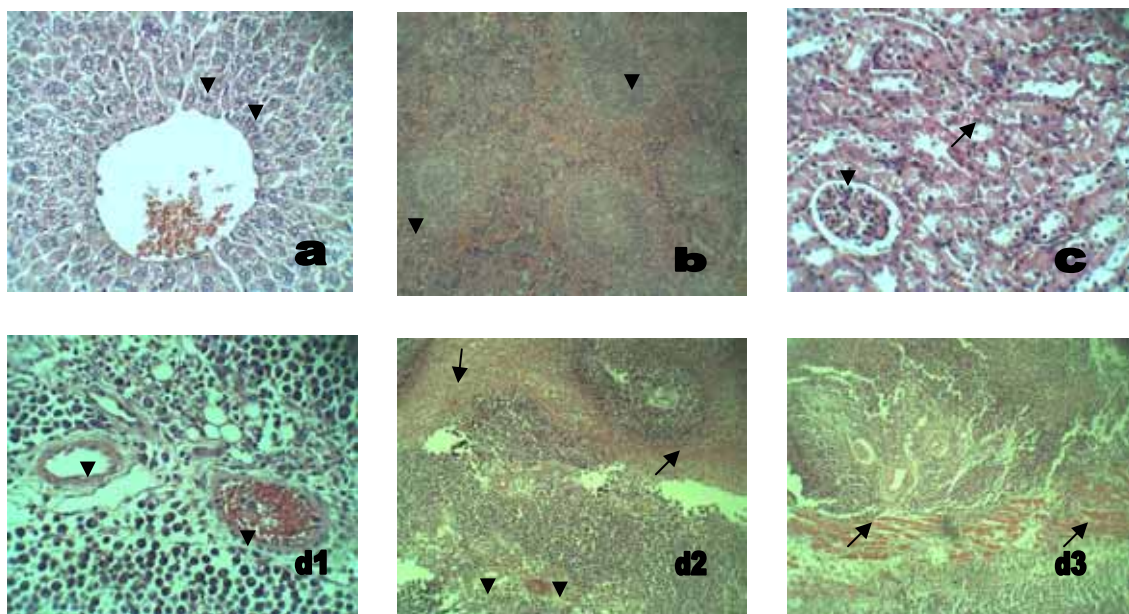


Figura 11: Fotomicrografias grupo 100mg/Kg de extrato n-butanol de *Turnera ulmifolia*.

Fígado “a”, hepatócitos normais dispersos radialmente em veias centro-lobulares (ponta de setas); baço “b”, nódulos linfáticos normais (pontas de seta); Rin “c”, cápsulas glomerulares normais (ponta de seta) e túbulos contorcidos íntegros (setas); Tumor: “d1” angiogênese evidente (pontas de seta); “d2” área de necrose (seta); vasos sanguíneos (pontas de seta); “d3” inserção muscular (seta). Aumento de 100X para Baço e Tumor e de 400X para Rins e Fígado. Microscópio MOTIC-BA 200; Câmera MOTICAM 1000, 1,3M pixel USB 2.0.

Figura 12: Fluxograma de aquisição do material vegetal para produção dos extratos de *Turnera ulmifolia* L.

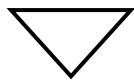
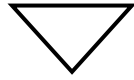


Figura 13: Fluxograma preparação do extrato aquoso

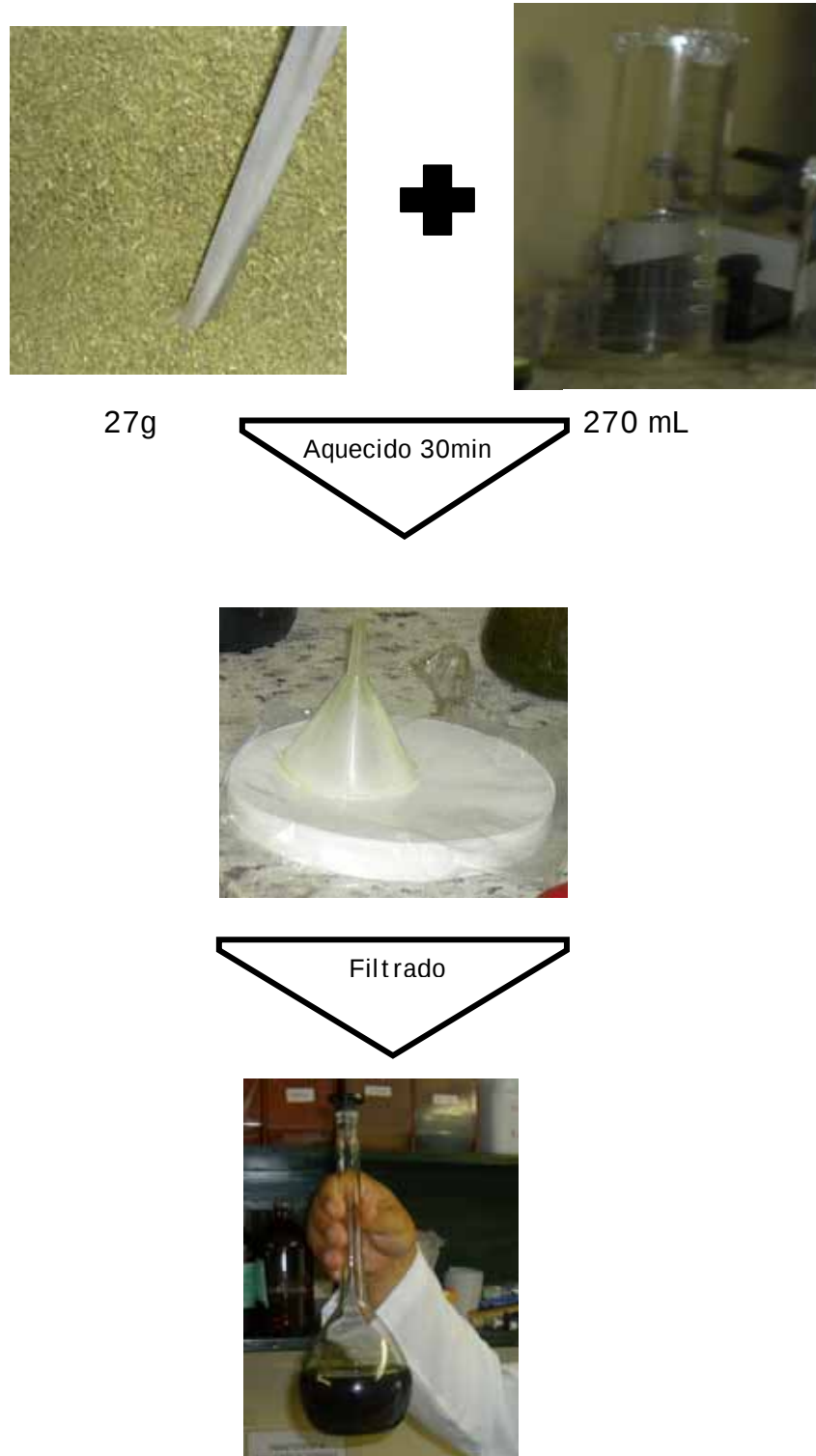


Figura 14: Fluxograma extração em metanol e particionamento em n-hexano, acetato de etila e n-butanol

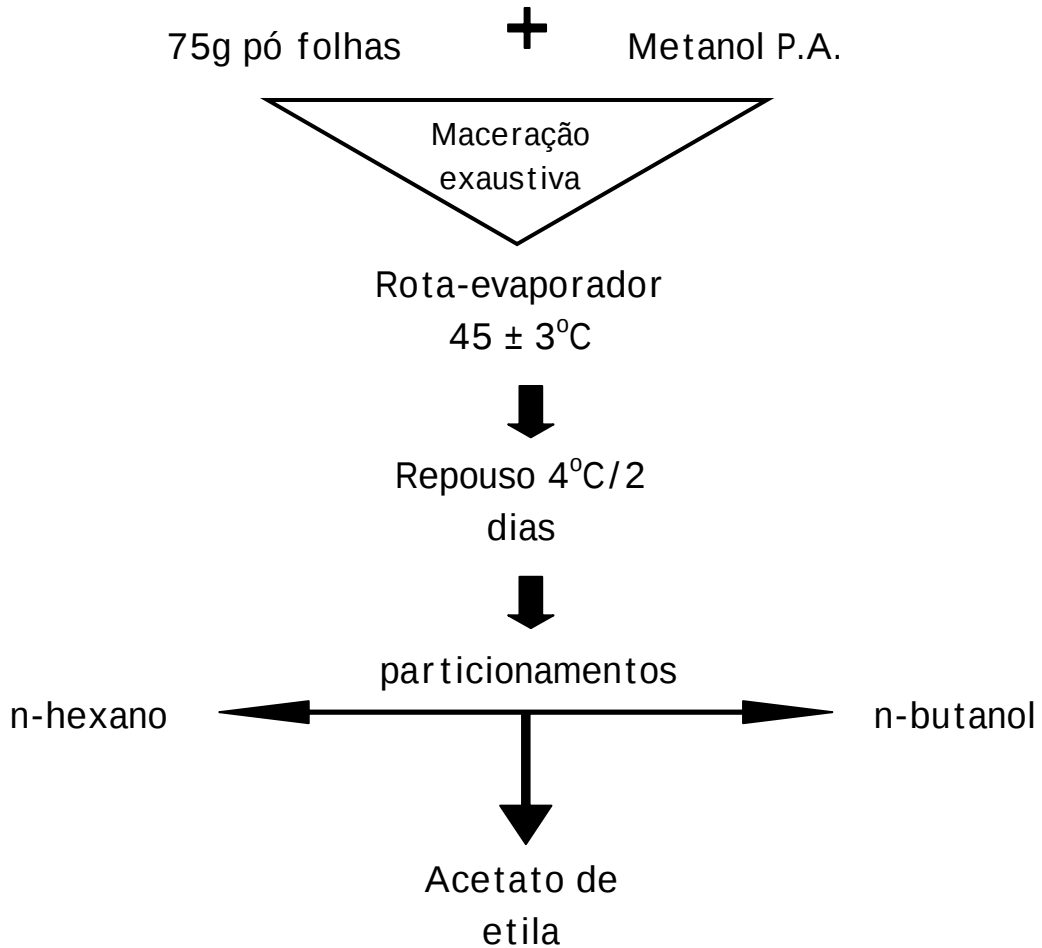


Figura 15: Fluxograma de manutenção dos animais experimentais

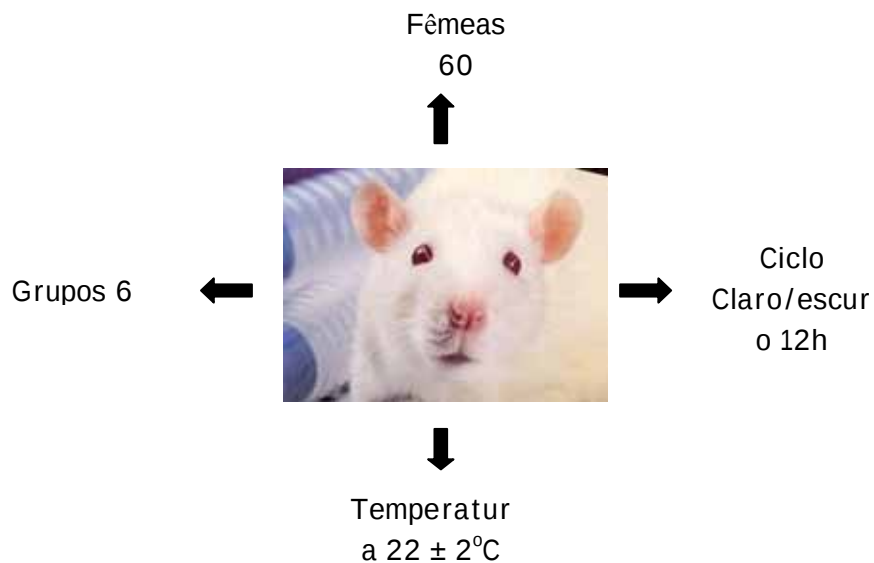


Figura 16: Fluxograma de Obtenção de células tumorais, implante e iniciação ao tratamento quimioterápico

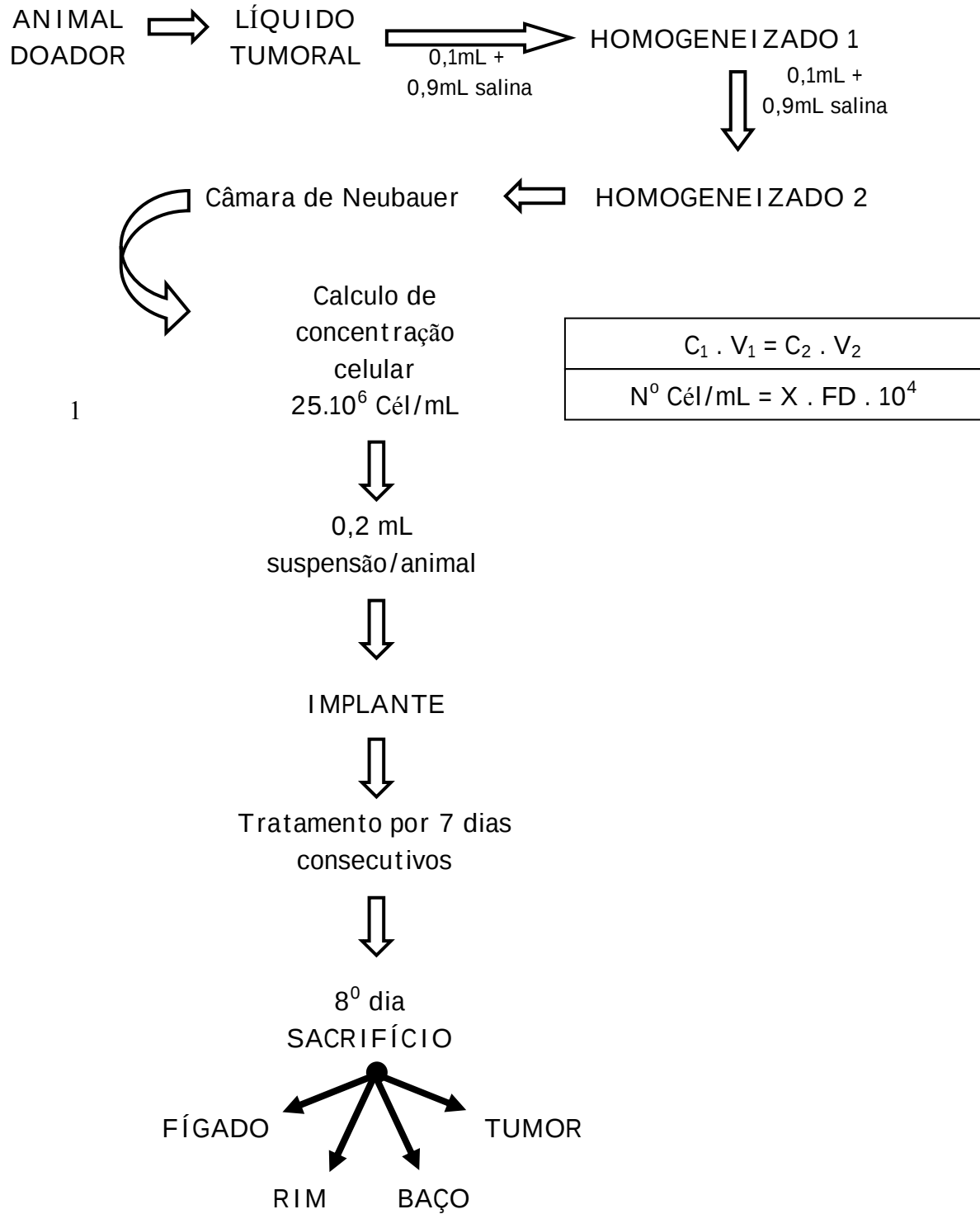
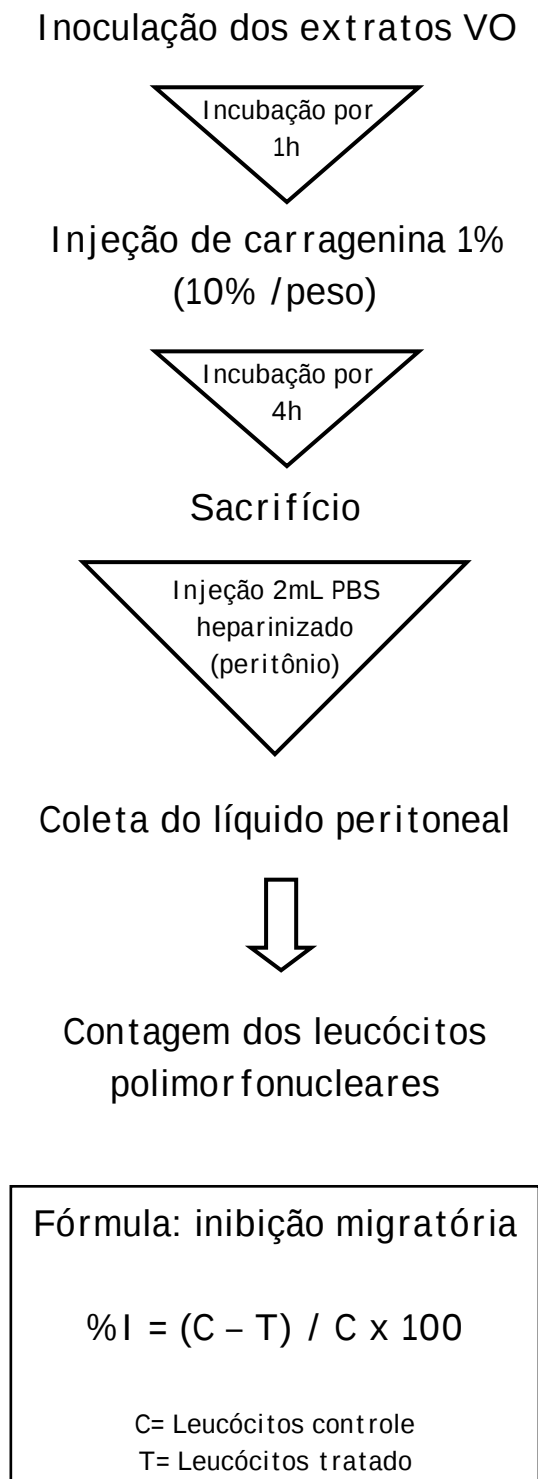


Figura 17: Fluxograma: Procedimento para Atividade Antiinflamatória



11.3. ATIVIDADE PARALELA AO MESTRADO COM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO.

Effect of the extract of *ricinus communis* l. On the osmotic fragility, labeling of red blood cells with technetium-99m and morphology of the cells

Periódico: Brazilian Archives of biology and technology, Vol. 51, n. 6 : pp. 1139-1146,
November-December 2008

ISSN 1516-8913

Journal of Ethnopharmacology

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs



ISSN: 0378-8741

Imprint: ELSEVIER

INTRODUCTION

• The "rules of 5"

• Types of paper

BEFORE YOU BEGIN

• Ethics in Publishing

• Policy and ethics

• Conflict of interest

• Submission declaration

• Copyright

• Retained author rights

• Role of the funding source

• Funding body agreements and policies

• Language and language services

• Submission

• Additional information

PREPARATION

• Use of wordprocessing software

• Article structure

• Essential title page information

• Abstract

• Graphical abstract

• Keywords

• Acknowledgements

• Math formulae

• Footnotes

• Artwork

• Tables

• References

• Reference style

• Supplementary data

• Submission checklist

AFTER ACCEPTANCE

• Use of the Digital Object Identifier

• Proofs

• Offprints

AUTHOR INQUIRIES



Introduction

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of

editing and reviewing at work. [Click here.](#)

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.
7. Conference announcements and news.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is

used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*. J Ethnopharmacol 2006, 106: 290-302. [Click here.](#)

Matteucci, E., Giampietro, O. *Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 163-172. [Click here.](#)

T.S.A. Froede and Y.S. Medeiros *Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 173-183. [Click here.](#)



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the headings *Aim of the study*, *Materials and Methods*, *Results*, and *Conclusions*.

Graphical abstract

Authors must supply a graphical abstract for all types of articles at the time the paper is first submitted. The graphic

should summarize the contents of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership and for compilation of databases. Carefully drawn figures that serve to illustrate the theme of the paper are desired. The dimensions of the graphical abstract are: 5 cm by 17 cm and 200 x 500 pixels. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. For an example of a graphical abstract please [click here](#).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply

"as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com>) and Reference Manager (<http://www.refman.com>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Please use full journal names.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary and multimedia data to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ➡ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
 - Full postal address
 - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at ➡ <http://epsupport.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from 

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: 

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at  <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

 [Top of Page](#)