



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

JÉSSICA ALVES CAVALCANTE

**EFEITOS INIBITÓRIOS DE *RHIPSALIS BACCIFERA* (CACTACEAE)
FRENTE AO CARCINOMA DE EHRLICH EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL**

RECIFE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**EFEITOS INIBITÓRIOS DE *RHIPSALIS BACCIFERA* (CACTACEAE)
FRENTE AO CARCINOMA DE EHRlich EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Linha de pesquisa: Modelos morfofisiológicos e imunológicos das doenças.

Projeto de pesquisa: Aplicações de plantas medicinais nos estudos de neoplasias em modelos experimentais.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C376e Cavalcante, Jéssica Alves.
Efeitos inibitórios de *Rhipsalis baccifera* (cactaceae) frente ao carcinoma de Ehrlich em experimentação animal / Jéssica Alves Cavalcante. – 2017.
92 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antônia de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Carcinoma de Ehrlich. 2. Cactaceae. 3. Camundongos. I. Souza, Ivone Antônia de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-201)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: Jéssica Alves Cavalcante

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

NOME DA DISSERTAÇÃO: **“Efeitos inibitórios de *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae) frente ao Carcinoma de Ehrlich em experimentação animal”.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza

DATA DA DEFESA: 13 de julho de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Profa. Dra. Viviane de Araújo Gouveia

Prof. Dr. Antônio Fernando Moraes de Oliveira

“Dedico esse trabalho aos meus pais Josias (*in memorian*) e Débora,
com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim
ao longo da minha vida”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai todo poderoso, criador das coisas possíveis e impossíveis, como estar aqui agradecendo a presença de sua mão na minha e dos anjos postos em meu caminho.

À Universidade Federal de Pernambuco, por ter me acolhido ao Programa de Pós-graduação em Patologia com os seus professores e coordenadores, possibilitando apoio para aquisição de novos conhecimentos e crescimento pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar bolsa de estudo.

Ao departamento de Antibióticos da UFPE, por ter disponibilizado a estrutura do biotério para o nosso trabalho.

A toda minha família e amigos, pelo apoio e carinho.

A todos os colegas da turma de mestrado.

À minha admirável orientadora, Profa. Dra. Ivone Antônio de Souza, que me acolheu tão bem. Foi muito bom ter o seu apoio incondicional.

A todos os alunos do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia experimental, pela ajuda fundamental nas práticas com os animais.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernando Moraes de Oliveira por ter contribuído na pesquisa e ajudado em seu Laboratório de Ecologia aplicada e Fitoquímica.

Aos professores Mário Ribeiro de Melo Junior e Jeymesson Raphael Cardoso Vieira por ter contribuído na histologia.

À Simone da Paz Leôncio Alves, do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas por toda sua contribuição.

Ao pessoal do Departamento de química fundamental por ter cedido suas instalações.

Às grandiosas funcionárias da Pós-graduação, Silvania e Margarete, prestativas, companheiras e amigas.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, conseguiram fazer dos nossos objetivos gerais e específicos resultados científicos.

Muito obrigada por fazerem parte desta minha trajetória!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

O avanço nos estudos do câncer e a compreensão de diversos mecanismos se deve principalmente a oncologia experimental. Este ramo da oncologia surgiu com a introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis e são mantidos em laboratório através da inoculação seriada em animais ou mantidos em cultura celular. O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmea. Nesse contexto, o presente trabalho visou avaliar os efeitos inibitórios do extrato bruto etanólico de *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae) sobre o Carcinoma de Ehrlich, assim como analisar o perfil fitoquímico e avaliação da toxicidade. O estudo foi realizado através de método experimental, desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. O vegetal foi coletado no campus da UFPE, identificado e preparado exsiccata para depósito em herbário. O processo extrativo de *Rhipsalis baccifera* para obtenção do extrato foi em etanol e em seguida obtido por filtração e concentrado em evaporador rotativo. Foi realizado perfil fitoquímico através de cromatografia delgada, avaliação da toxicidade “*in vitro*” por *Artemia Salina* Leach e avaliação da toxicidade aguda “*in vivo*” pelo método OECD 423. Para os ensaios da atividade antitumoral foram utilizados vinte e quatro camundongos albinos Swiss fêmeas com 60 dias, pesos entre 25 a 40 g com ração e água *ad libitum*. Para o implante da massa tumoral, as células tumorais foram retiradas de animal doador através da aspiração da forma ascítica e introduzidos nos animais receptores, por via subcutânea numa concentração de 25×10^6 células/mL. Após sete dias de tratamento dos animais, estes foram eutanasiados para realização de exames hematológicos e bioquímicos. Os órgãos foram processados para análise quanto às alterações macroscópicas e microscópicas. Toda investigação foi realizada de acordo com as normas do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE. A análise fitoquímica encontrou a presença de alcaloides, flavonoides, terpenos, triterpenos e fenilpropanóides; citotoxicidade para as *A. salinas* foi elevada com CL_{50} de 0,9788 µg/mL; toxicidade aguda com DL_{50} encontrada de 2500 mg/kg; o EERB apresentou inibição tumoral de 84,1% e 75,8% para as doses de 250 mg/kg e 125 mg/kg, respectivamente em relação ao grupo controle. Recomenda-se novas pesquisas para avaliar diferentes componentes fitoquímicos e influências ambientais; o EERB revelou alta citotoxicidade, no entanto resultados com outras espécies da mesma família são divergentes, onde se faz necessário outros estudos para melhor avaliação; o EERB apresentou baixa toxicidade aguda e alta potencial para uso, assim outras investigações envolvendo estudos pré-clínicos e clínicos do extrato serão necessárias para determinar a dose segura; o EERB apresentou inibição tumoral significativa em relação ao grupo controle. Sugere-se, no entanto, um estudo mais detalhado a partir de outras vias de administração do extrato, bem como a utilização de outras linhagens tumorais.

Palavras-chave: Carcinoma de Ehrlich. Cactaceae. Camundongos.

ABSTRACT

Advances in cancer studies and the understanding of various mechanisms are mainly due to experimental oncology. This branch of oncology arose with the introduction of so-called transplantable or transmissible tumors and are maintained in the laboratory through serial inoculation in animals or maintained in cell culture. The Ehrlich tumor is a spontaneous adenocarcinoma of the mammary gland from female mice. In this context, the present work aimed to evaluate the inhibitory effects of the crude ethanolic extract of *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae) on the Ehrlich Carcinoma, as well as to analyze the phytochemical profile and toxicity evaluation. The study was carried out through an experimental method, developed in the Laboratory of Pharmacology and Experimental Cancerology of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco. The plant was collected on the campus of UFPE, identified and prepared exsiccata for herbarium deposit. The extractive process of *Rhipsalis baccifera* to obtain the extract was in ethanol and then obtained by filtration and concentrated in a rotary evaporator. A phytochemical profile was performed through thin chromatography, in vitro toxicity evaluation by *Artemia Salina* Leach and evaluation of acute toxicity in vivo using the OECD 423 method. Twenty-four female Swiss albino mice were used for antitumor activity assays. 60 days, weights between 25 and 40 g with feed and water ad libitum. For tumor mass implantation, tumor cells were withdrawn from donor animal through ascitic aspiration and introduced into the recipient animals subcutaneously at a concentration of 25×10^6 cells / ml. After seven days of treatment, the animals were euthanized for haematological and biochemical tests. The organs were processed for macroscopic and microscopic alterations. All research was carried out according to the standards of the Ethics Committee on the use of animals (CEUA) of the Bioscience Center of UFPE. Phytochemical analysis found the presence of alkaloids, flavonoids, terpenes, triterpenes and phenylpropanoids; Cytotoxicity for *A. salinas* was elevated with LC₅₀ of 0.9788 µg / mL; Acute toxicity with LD₅₀ found at 2500 mg / kg; The EERB showed tumor inhibition of 84.1% and 75.8% for the 250 mg / kg and 125 mg / kg doses, respectively, in relation to the control group. New research is recommended to evaluate different phytochemical components and environmental influences; The EERB revealed high cytotoxicity, however results with other species of the same family are divergent, where other studies are necessary for a better evaluation; The EERB showed low acute toxicity and high potential for use, so other investigations involving preclinical and clinical studies of the extract will be necessary to determine the safe dose; The EERB showed significant tumor inhibition in relation to the control group. However, a more detailed study is suggested from other routes of administration of the extract, as well as the use of other tumoral strains.

Keywords: Carcinoma of Ehrlich. Cactaceae. Mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 01- Fluxograma da espécie *Rhipsalis baccifera*26

Figura 02– Aspecto geral de *Rhipsalis baccifera*.....29

Materiais e métodos

Figura 03– Exsicata de *Rhipsalis baccifera*.....34

Figura 04– Avaliação de toxicidade aguda de acordo com o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).....39

Artigo original 1

Figura 1- Análise histopatológica do grupo controle em camundongos após avaliação da toxicidade aguda: A- fígado; B- rim; C- pulmão; D- baço.....58

Figura 2- Análise histopatológica do grupo tratado com EERB 2000 mg/kg em camundongos após avaliação da toxicidade aguda: A- fígado; B- rim; C- pulmão; D – baço.....59

Artigo original 2

Figura 1- Macroscopic analysis of Ehlich Carcinoma in mice after antitumor evaluation of EERB. A) Control group, b) Standard group, c) EERB treated group 250 mg / kg, d) EERB treated group 125 mg / kg.....67

Figura 2- Histopathological evaluation of the mouse tumor of the control group after an antitumor evaluation of the EERB in Erlich's Carcinoma.....69

Figura 3- Histopathological evaluation of the mouse tumor of the standard group after an antitumor evaluation of the EERB in Erlich's Carcinoma69

Figura 4- Histopathological evaluation of the mouse tumor of the EERB 250 mg/kg group after an antitumor evaluation of the EERB in Erlich's Carcinoma.....70

Figura 5- Histopathological evaluation of the mouse tumor of the EERB 125 mg/kg group after an antitumor evaluation of the EERB in Erlich's Carcinoma.....70

LISTA DE TABELAS

Artigo original 1

Tabela 1- Número de larvas vivas e mortas segundo a dose da CL₅₀ após 24 horas.....52

Tabela 2- Sinais clínicos observados em camundongos após administração do EERB por via oral para avaliação da toxicidade aguda.....53

Tabela 3- Média e desvio padrão do peso dos animais, órgãos avaliados e consumo alimentar segundo o grupo de estudo em camundongos após avaliação da toxicidade aguda para o EERB55

Artigo original 2

Tabela 1- TWI values for the control and treated groups after antitumor evaluation in the EERB in mice bearing Ehrlich's Carcinoma67

Tabela 2- Mean and standard deviation of the weight of the animals, evaluated organs and weight of the tumors of the mice after antitumor assessment with EERB in Ehrlich's Carcinoma.71

Tabela 3- Mean and standard deviation of levels of urea, creatinine, AST, ALT and ALP after antitumor evaluation in mice with Ehrlich's Carcinoma.....72

Tabela 4- Antitumor evaluation of EERB through hematological markers in Ehrlich Carcinoma mice.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ETOH 70%	Álcool 70%
AST/TGO	Aspartato Aminotransferase
ALT/TGP	Alanina Aminotransferase
Cm	Centímetros
CB	Centro de Biociências
CHCl ₃	Clorofórmio
COBEA	Colégio Brasileiro para Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CL ₅₀	Concentração Letal 50
CONSEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DL ₅₀	Dose Letal 50
EERB	Extrato bruto Etanólico de <i>Rhipsalis Baccifera</i>
FA	Fosfatase Alcalina
GHS	Harmonized Classification System
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Kg	Kilograma
mg	Miligramas
mL	Mililitros

nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
v/v	Porcentagem Volumétrica
TWI	Porcentagem de Inibição Tumoral
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
SF 0,9%	Solução salina 0,9%
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VO	Via Oral
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	16
1.1.CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	16
1.2.JUSTIFICATIVA.....	20
1.3.OBJETIVOS.....	21
1.3.1.Objetivo Geral:	21
1.3.2.Objetivos Específicos:.....	21
2.REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1.CÂNCER	22
2.2.TUMOR DE EHRLICH	22
2.3. <i>RHIPSALIS BACCIFERA</i>	24
2.4.TOXICIDADE.....	29
3.MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1.LOCAL DO ESTUDO	33
3.2.PERÍODO DE REFERÊNCIA	33
3.3.TIPO DE ESTUDO	33
3.5.PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE <i>RHIPSALIS BACCIFERA</i> (EERB)	35
3.6.ANIMAIS.....	35
3.8.AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH	36
3.9.AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀	37
3.10.ATIVIDADE ANTITUMORAL	39
3.11.ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	40
3.12.ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.ARTIGOS	43
4.1.PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO DE <i>RHIPSALIS BACCIFERA</i> (CACTACEAE) SOBRE <i>ARTEMIA SALINA</i> E <i>MUS MUSCULUS</i>	43
4.2.MACROSCOPIC, HISTOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL INVESTIGATION OF EHRLICH'S CARCINOMA AFTER TREATMENT WITH <i>RHIPSALIS BACCIFERA</i> (CACTACEAE) IN MICE.....	63
5.CONCLUSÕES	81
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO A – Exsicata de <i>Rhipsalis baccifera</i>.....	91

ANEXO B – Parecer da comissão de Ética no uso de animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.....	92
---	-----------

1. APRESENTAÇÃO

1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Vêm aumentando cada vez mais a ocorrência de câncer nas sociedades ocidentais como resultado de fatores ambientais e do estilo de vida adotado (JEMAL, A. et al, 2011). Dessa forma, assume papel cada vez mais relevante a pesquisa científica em Oncologia Clínica e/ou experimental.

Paralelamente a isto, o campo da pesquisa terapêutica vem se desenvolvendo no sentido de testar novas formas de tratamento para o câncer, bem como, estudando a possibilidade de usar novas substâncias potencialmente eficazes contra as neoplasias. A pesquisa de teste realizada com novas drogas é um procedimento oneroso e demorado. Como em toda a investigação com drogas ou medicamentos, antes de se iniciar e realizar as fases de farmacologia clínica impõe-se a execução de estudos pré-clínicos em laboratório. Para isto, faz-se necessária a utilização de modelos experimentais em animais para testar novas drogas, um modelo muito empregado nesta linha de investigação é o tumor de Ehrlich em camundongo. Este tumor tem a capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico e em tecido celular subcutâneo (EHRlich, P; APOLANT, H., 1905; LOEWENTHAL, H, JAHN, G., 1932; KLEIN, G., KLEIN, E., 1951), e após a sua implantação na cavidade peritoneal em camundongos sadios tem como resultado a formação de líquido ascítico tumoral, ou a implantação no tecido subcutâneo que resulta na formação de tumor sólido.

A pesquisa atual sobre o câncer se concentra principalmente na cura da doença. Porém, segundo Harlev (2013) a prioridade deveria se concentrar no desenvolvimento de drogas de origem vegetal, devido a menor predisposição para produzir efeitos secundários quando comparada às drogas sintéticas.

Os extratos de plantas medicinais são fontes importantes de agentes anticancerígenos. Atualmente, cerca de 60% dos fármacos utilizados são a partir de produtos naturais (GORDALIZA, M., 2007). Extratos de plantas têm sido uma importante fonte de agentes anticancerígenos usados na medicina (SAKLANI, A., KUTTY, S.K., 2008; JACOBO-SALCEDO, M.R. et al., 2011).

As plantas têm tido papel fundamental para o desenvolvimento humano, tanto como componentes na alimentação, quanto na busca de estratégias para a cura de enfermidades. Além da eficácia atribuída a diversas espécies conhecidas como plantas medicinais, o contínuo uso de vegetais pela população para fins terapêuticos está também relacionado com o custo elevado dos medicamentos alopáticos convencionais e a falta de acesso aos mesmos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; SAAD *et al.*, 2006; SHAW, 2010). Essa prática vem crescendo a cada dia devido ao grande interesse da população por terapias menos agressivas (YUNES *et al.*, 2001).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, 85% da população mundial dependem da utilização de partes de plantas ou medicamentos à base desses vegetais como fontes de tratamento (BRASIL, 2006).

No Brasil, o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica é uma prática realizada por milhares de pessoas, sendo influenciada por fatores sociais, econômicos e culturais. Fazendo-se necessária a adoção de medidas que visem à ampliação das pesquisas relacionadas ao uso seguro de plantas medicinais (VENSON *et al.*, 2011).

A descoberta de novas drogas que apresentam ação antineoplásica, com insignificantes efeitos colaterais, é uma meta de todos os pesquisadores. Os produtos naturais representam a fonte mais abundante e acessível de substâncias

com estrutura não usuais, muitas vezes não descritos até o momento (YOUNES et al., 2000).

De acordo com o grande número de aplicações farmacológicas de substâncias oriundas de plantas, recentes trabalhos têm investigado as atividades antitumorais desses produtos naturais (KIDD, 2000; ALVES et al., 2004). Esses fatores somados ao limitado efeito dos medicamentos sintéticos em doenças crônicas têm estimulado à pesquisa de plantas medicinais como alternativa terapêutica, com resultados bastante satisfatórios (RATNER & BRYANT, 2004).

Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. A maioria dos conceitos da tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (KAMB, 2005).

A ação antitumoral da família Cactaceae está relacionada com a presença de flavonoides e triterpenos visto que esses podem atuar em diferentes fases do desenvolvimento tumoral, devido a sua ação contra danos oxidativos no DNA, inativação de agentes cancerígenos, inibindo a expressão mutagênica dos genes e enzimas responsáveis pela ativação de substâncias pró-carcinógenas (BENAVENTE-GARCIA et al., 2008), assim como os alcalóides que têm efeitos anticancerígenos e reduzem o desenvolvimento de tumores (WANG et. al., PETTIT et al., LI CH et al., 2009), uma vez que essas classes de compostos têm pronunciada atividade anticâncer já testadas (FERNANDES et al., 2005).

Frente a extensa ocorrência de câncer no mundo e carência de tratamento, propõe-se analisar as propriedades antitumorais de *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn,

a fim de encontrar alternativa eficaz, com baixo custo e menos efeitos colaterais, assim como uma avaliação toxicológica do vegetal e análise de perfil fitoquímico.

1.2. JUSTIFICATIVA

Por ser o câncer um problema de saúde pública mundial, a descoberta de novos agentes fitoterápicos com propriedades antitumorais torna-se cada vez mais necessário, devido a procura de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Assim como a busca por alternativas com baixo custo, gerando economia para os centros de saúde.

Segundo o INCA, os custos dos tratamentos à base de quimioterapias realizadas pelo Sistema único de Saúde aumentaram 450% nos últimos anos, como resultado do envelhecimento da população brasileira e da chegada de novas drogas e tratamentos.

Assim, o presente estudo visa contribuir não somente para uma melhor compreensão da atividade antitumoral de *Rhipsalis baccifera*, mas também verificar a avaliação toxicológica do vegetal.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar a atividade antitumoral in vivo da espécie *Rhipsalis baccifera* em camundongos com Carcinoma de Ehrlich.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Identificar o perfil fitoquímico da espécie *Rhipsalis baccifera*;
- Verificar a toxicidade in vitro do extrato frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach;
- Averiguar a toxicidade aguda in vivo do extrato bruto seco etanólico de *Rhipsalis baccifera* segundo o método OECD;
- Avaliar histopatologicamente a atividade antineoplásica do extrato de *Rhipsalis baccifera* em Carcinoma de Ehrlich.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2013).

O câncer é a terceira causa de morte (11,84% do total de óbitos) e a segunda causa de morte por doença (27.63%) no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, e a cada ano atinge pelo menos 9 milhões de pessoas, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (WUNSC FILHO et al., 2012).

Entre os tipos de tratamento para essa doença, a quimioterapia é uma abordagem sistêmica e torna possível a cura de alguns tumores, além de permitir o tratamento precoce de metástases não detectáveis, entretanto pode causar inúmeros efeitos colaterais indesejáveis (BONASSA, 2005).

Dessa forma, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas com novos fármacos antitumorais, que apresentem baixas ou nenhuma toxicidade para células normais (ALMEIDA *et al.*, 2011).

2.2. TUMOR DE EHRLICH

O avanço nos estudos do câncer e a compreensão de diversos mecanismos

relacionados à sua etiologia, progressão, diagnóstico e tratamento, se deve principalmente a oncologia experimental. Este ramo da oncologia surgiu com a introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Estes são mantidos em laboratório através da inoculação seriada em animais suscetíveis ou mantidos em cultura celular (GUERRA, J.L., 2002).

O Carcinoma de Ehrlich foi desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906 como adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária de camundongos fêmea. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932 o tumor foi convertido para a forma ascítica (DAGLI, 1989).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica (EHRlich, 1906). Tem sido utilizada no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SEGURA *et al.*, 2000; MADY, 2002; PALERMO-NETO *et al.*, 2003; SILVA, 2003).

O tumor de Ehrlich se desenvolve com duas variáveis de comportamento, de conformidade com o local do implante. Quando a inoculação de suas células é feita na cavidade peritoneal, este cresce em suspensão, traduzindo-se na forma ascítica do referido tumor. Contudo, quando a inoculação de células é feita no tecido celular subcutâneo de qualquer localização do tegumento do animal, este cresce sob a forma sólida. Por essa razão é que se justifica a denominação, habitualmente usada, de forma sólida ou ascítica do tumor (GUERRA, 1983).

Ao exame macroscópico sob a forma ascítica, depois de aproximadamente sete dias de implante na cavidade peritoneal, se caracteriza pela presença de grande quantidade de fluido discretamente viscoso e de aspecto leitoso. Por outro

lado, a forma sólida neste mesmo período de evolução, apresenta-se como uma massa palpável, de consistência firme, coloração esbranquiçada, aspecto homogêneo e brilhante, pouco aderente ao plano profundo e relativamente móvel.

A histologia típica do tumor se caracteriza por apresentar parênquima indiferenciado e estroma delicado. As células tumorais são arredondadas, com limites celulares distintos, citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovóide, denso, com nucléolos proeminentes e pleomorfismo celular evidente. Mitoses quase sempre presentes e com figuras aberrantes são observadas. O arranjo destas células simula paliçadas, entretanto na maioria das vezes, estas se distribuem caoticamente. Seu estroma é formado de fibras colágenas e delicados capilares (GUERRA, 1983).

Devido a suas características didáticas e de facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado para a chamada Oncologia Experimental, um ramo da Oncologia Comparada dedicada ao desenvolvimento dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis. A Oncologia Comparada, por sua vez, "procura melhorar o conhecimento das neoplasias do homem, de animais e mesmo de plantas" (DAWE, 1982).

2.3. *RHIPSALIS BACCIFERA*

A família cactaceae possui distribuição neotropical, compreende 124 gêneros e 1438 espécies distribuídas no novo mundo (HUNT *et al.* 2006), exceto por *Rhipsalis baccifera*, também conhecido como cacto macarrão, cuja distribuição chega até a África e Ásia (TAYLOR, 1997; ANDERSON, 2001; HUNT *et al.*, 2006). Das quais, cerca de 10% são representadas por plantas epífitas, de acordo com BENZING (1990) e são adaptadas às regiões mais úmidas, distribuídas desde o México até a Argentina e os centros da diversidade da família são o México, costa

leste do Brasil e nos Andes (HUNT *et al.*, 2006, ZAPPI *et al.*, 2007, CALVENTE 2010).

De acordo com ZAPPI *et al.* (2010), são 233 espécies de cactaceae no Brasil, distribuídos em 37 gêneros. O monofiletismo da família e sua divisão em quatro subfamílias, Pereskioideae, Opuntioideae, Maihuenioideae e Cactoideae (figura1), são sustentados por características morfológicas e moleculares (NYFFELER, 2002; WALLACE & GIBSON, 2002). As espécies ocorrem em ambientes diversos, como o Cerrado, a Caatinga e a Floresta Atlântica (TAYLOR & ZAPPI, 2004). O leste do Brasil, em particular, inclui uma alta diversidade de espécies endêmicas; estima-se que 74% do total das espécies da família ali conhecidas sejam endêmicas da região (MYERS *et al.*, 2000; TAYLOR & ZAPPI, 2004; CALVENTE 2010). No entanto, as populações de cactos desta região vêm sofrendo degradação acentuada, especialmente em virtude do desmatamento, desenvolvimento agrícola, urbanização, coleta para exploração comercial e mineração (TAYLOR, 1997).

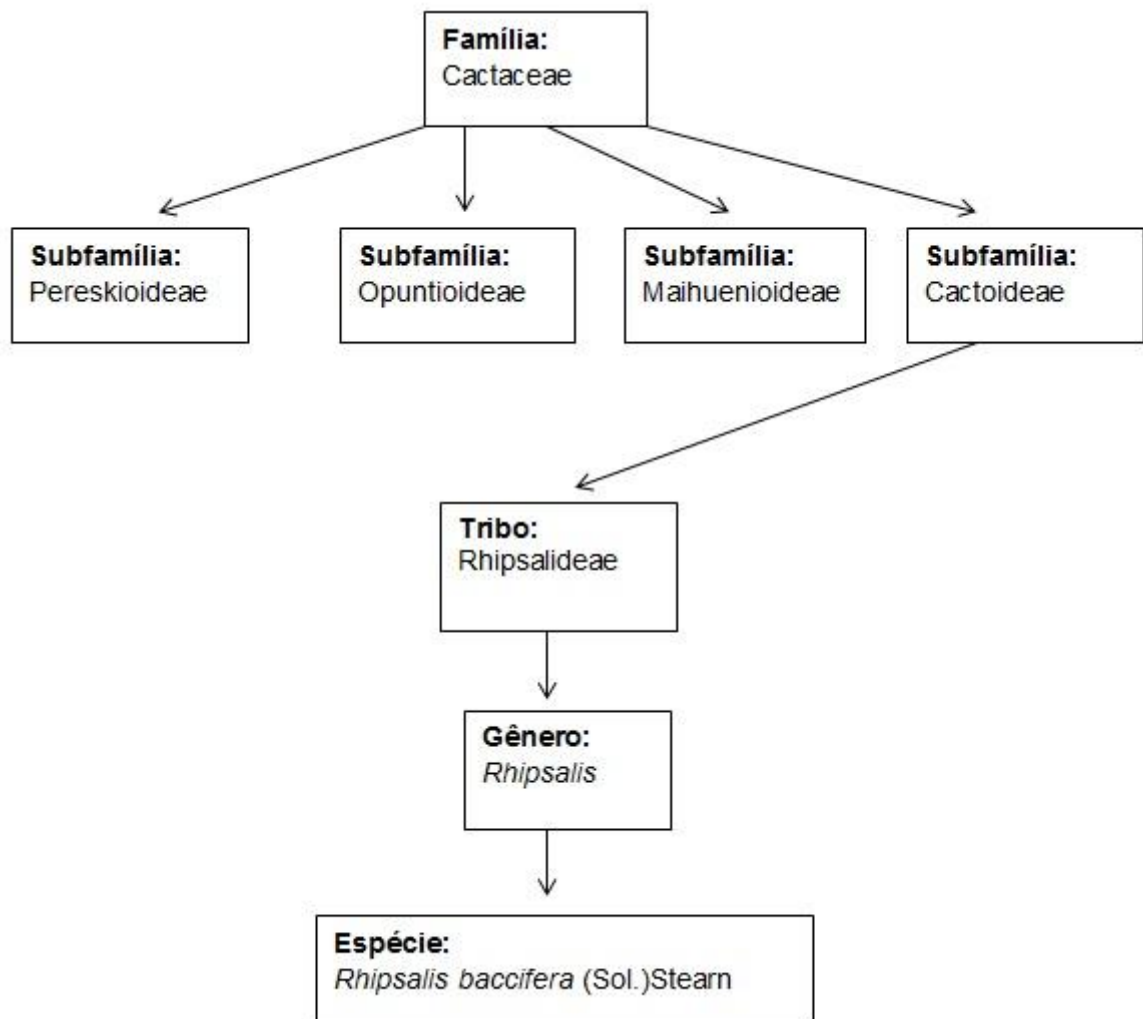


Figura 1 - Fluxograma da espécie *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn.

Fonte: próprio autor.

A subfamília cactoideae constitui um grupo monofilético, suportado por caracteres moleculares e caracterizada pela redução completa de suas folhas (NYFFELER, 2002).

Cactoideae é a mais diversificada das subfamílias de cactaceae, composta por nove tribos (HUNT *et al.*, 2006), sendo rhipsalideae bem representada nas formações de Floresta Atlântica e com centro de diversidade no sudeste do Brasil (HUNT *et al.*, 2006).

As características morfológicas e fisiológicas de espécies de cactaceae constituem adaptações aos ambientes áridos e semi-áridos (GIBSON & NOBEL 1986). Dentre as modificações fisiológicas registra-se a rápida absorção de água pelas raízes depois de uma seca prolongada e ausência de folhas, resultando em um caule fotossinteticamente ativo, são algumas das principais adaptações morfológicas encontradas neste grupo (NOBEL, 1978; SCHEINVAR, 1985; DARLING, 1989).

Cerca de 220 espécies são epífitas e ocorrem em florestas tropicais e subtropicais úmidas, sendo que a maioria destas pertence às tribos *Hylocereeae* e *Rhipsalideae* (NYFFELER, 2002; HUNT *et al.*, 2006; CALVENTE *et al.*, 2011). Plantas epífitas são aquelas que passam a maior parte de sua vida sobre outras plantas (BENZING, 1987).

A família apresenta uma considerável importância econômica, com destaque para seu valor ornamental, já que espécies de cactaceae são cultivadas, colecionadas e comercializadas em diversas partes do mundo. Além disso, muitas espécies são utilizadas como forragem, na alimentação (caules, folhas e frutos) e medicina, entre outros (BARTHLOTT & HUNT, 1893; TAYLOR, 1997; ANDERSON, 2001; ANDRADE *et al.*, 2006). Esta grande utilização como plantas ornamentais tem provocado a rápida diminuição do habitat de espécies endêmicas de cactaceae, fazendo com que os estudos sobre a taxonomia, biologia e evolução do grupo que são críticos para o estabelecimento de estratégias para a conservação das espécies tornem-se urgentes (CALVENTE, 2010).

A maioria das espécies de *Rhipsalis* são holoepífitas, que são as epífitas verdadeiras que nascem, vivem e morrem no ambiente epifítico (BENZING, 1987), entretanto algumas espécies também são rupícolas, crescendo em ambientes

abertos e ensolarados, com poucas exclusivas desses ambientes. As espécies de *Rhipsalis* são, em maioria, endêmicas do Brasil (81%) e diversas espécies apresentam uma distribuição restrita do país. Apenas três espécies de *Rhipsalis* possuem ampla distribuição na América tropical: *Rhipsalis micranta* (Kunth) DC. (Peru até a Costa Rica), *Rhipsalis floccosa* Salm-Dyck ex Pfeiff. (Paraguai até a Venezuela) e *Rhipsalis baccifera* (em toda a América do Sul, México, Caribe e Flórida nos EUA). De acordo com GENTRY & DODSON (1987), existem poucos gêneros de plantas epífitas vasculares que são amplamente distribuídos nas regiões tropicais e *Rhipsalis* está entre eles, em razão da ampla ocorrência de *R. baccifera*.

Rhipsalis baccifera habita florestas perenifólias (TATLOR & ZAPPI, 2004) e ocorre na América (dos E.U.A. até a Argentina), na África, em Madagascar e em Sri Lanka (HUNT, 2006). No Ceará, ocorre em florestas serranas, onde frequentemente cresce juntamente com *E. phyllanthus* (MENEZES *et al.* 2011).

Segundo DETTKE *et al.* 2004, na espécie *Rhipsalis baccifera* apresenta apenas drusas como inclusões celulares. É relatada a função dos cristais de oxalato de cálcio como proteção contra a herbivoria, pelo fato de causarem irritações em vertebrados quando ingeridos e ao controle dos níveis de cálcio citossólico (FRANCESCHI & HORNER, 1980; PAIVA & MACHADO, 2005).

Figura 02 – Aspecto geral de *Rhipsalis baccifera*.



Fonte: <http://worldofsucculents.com/wp-content/uploads/2015/07/Rhipsalis-baccifera>

2.4. TOXICIDADE

Toxicidade é uma propriedade relativa de uma substância química que se refere ao seu potencial de causar danos aos organismos vivos e é uma função da concentração da substância química e da duração da exposição (RAND & PETROCELLI, 1985). Quando se fala em toxicologia, algumas definições são levadas em consideração, como exemplo, toxicidade aguda e crônica. A toxicidade aguda refere-se à exposição ao agente toxicante, em um curto espaço de tempo, capaz de promover os efeitos indesejáveis, desde simples tontura até mesmo à morte. A toxicidade crônica está correlacionada a exposições repetidas, de longa duração e doses freqüentemente insuficientes para provocar uma intoxicação aguda, na qual o ser humano apresentará sintomas após meses ou anos de contato com o agente toxicante. Lembrando que uma mesma substância pode provocar intoxicação aguda e após certo tempo, desencadear uma intoxicação crônica (OGA, 2014).

Práticas relacionadas ao uso popular de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde (AMOROZO, 2012). E devido a isto os estudos toxicológicos têm a importância de demonstrar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por

serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia destes medicamentos (LAPA, 1999; LAPA, 2001; CRAVEIRO *et al.*, 2008; MARLIÉRE *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008).

De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), no ano de 2010, no Brasil foram registrados 1132 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 5 foram a óbito (SINITOX, 2009).

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos e a relação-dose resposta.

Dentre os ensaios de toxicidade *in vitro*, encontra-se o ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo de água salgada comumente utilizado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008). Os ensaios de letalidade são largamente empregados em testes toxicológicos podendo-se obter a concentração letal mediana (CL₅₀), que é a dose necessária para causar a morte de 50% de uma amostra em estudo (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

De acordo com MEYER *et al.*, (1982), existe uma relação entre a toxicidade e a concentração letal mediana (CL₅₀) de extratos vegetais sobre a *A. salina*, sendo que, quando são encontrados valores de CL₅₀ maiores que 1000 µg/mL e não é

observada a morte de mais de 50% de uma população, estes extratos não são considerados tóxicos.

Este bioensaio, além de determinar a toxicidade geral, apresenta uma boa correlação com atividade citotóxica em alguns tipos de tumores sólidos. Dessa forma, este teste pode servir como indicador de compostos bioativos para atividades antineoplásica. (MCLAUGHLIN *et al.* 1993, 1998, PARRA *et al.* 2001).

Dentre vários métodos ou testes empregados para avaliar efeitos toxicológicos *in vivo*, o teste de toxicidade aguda permite definir o grau de toxicidade intrínseca do composto, identificar órgãos que podem ser alvos de efeitos indesejados e selecionar doses para estudos de longa duração (ALMEIDA, 2011).

O método OECD é um procedimento gradual com a utilização de 3 animais do mesmo sexo por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou estado de morbidez dos animais, em média, 2 ou 4 etapas podem ser necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Este procedimento é reprodutível e utiliza poucos animais. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco (OECD, 2001).

Três animais são usados para cada dose. A dose inicial deve ser selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo aquela mais propensa a produzir mortalidade com base em relatos de dose com toxicidade evidente, quando possível, ou por meio de relatos evidenciados com base na estrutura química. Na ausência de ambas, a informação pode iniciar o estudo de triagem com a dose de 300 mg/kg (OECD, 2001).

Quando informações avaliadas sugerem que a mortalidade significativa não seja iniciada com o valor maior de dose 2000 mg/kg de peso corpóreo, o teste para se conhecer o limite deve ser conhecido. Excepcionalmente, e somente quando justificado por necessidades específicas, o uso de um valor de dose maior de 5000 mg/kg pode ser considerado. O tempo de intervalo entre o tratamento dos grupos é determinado pelo início, duração e gravidade dos sinais tóxicos. O tratamento de animais com a próxima dose deve ser esperado até que se confirme a sobrevivência de um animal previamente doseado (OECD, 2001).

Os animais são observados nos tempos de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Dependendo da mortalidade ou do estado de morbidez dos animais outras doses são necessárias para que se admita um critério da toxicidade aguda da substância testada. A classificação da substância administrada é feita de acordo com o Sistema de classificação harmonizada (GHS), estimando-se sua DL_{50} (dose letal em 50% dos animais) (OECD, 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DO ESTUDO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com suporte do laboratório de Histotecnologia e Microscopia do Programa de Pós-graduação em Patologia da UFPE, Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE e Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica do Departamento de Botânica da UFPE

3.2. PERÍODO DE REFERÊNCIA

A parte prática experimental do estudo foi realizada no período de janeiro de 2016 a junho de 2017. Durante esse período, foi realizada a indução do tumor em camundongos, uso das substâncias testes, processamento e análise das amostras sanguíneas e teciduais e ainda, análises estatísticas dos dados, interpretação dos resultados e redação dos manuscritos.

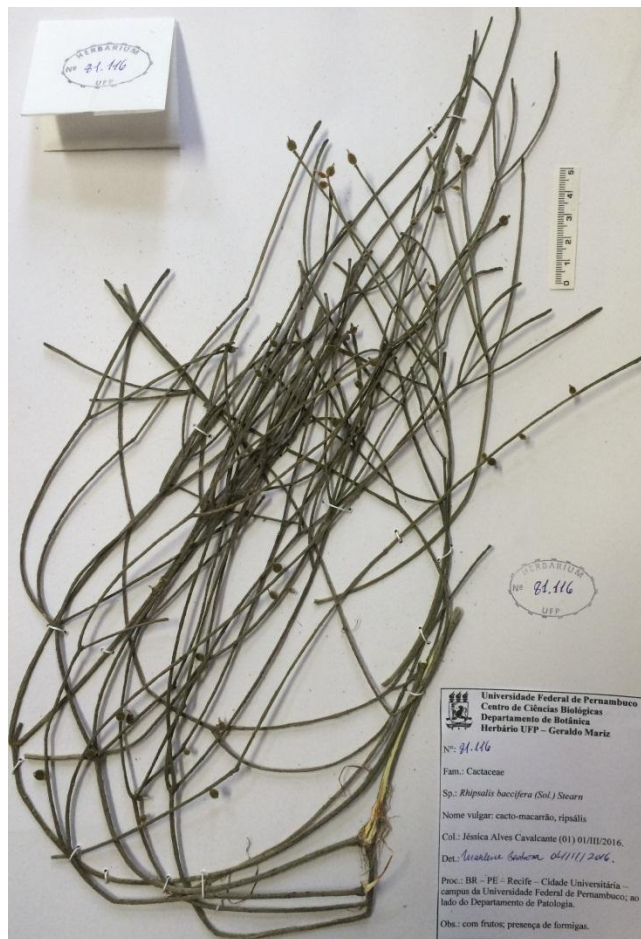
3.3. TIPO DE ESTUDO

O estudo foi realizado através do método experimental comparativo controlado.

3.4. MATERIAL BOTÂNICO E EXTRAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Amostras de *Rhipsalis baccifera* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Marlene Barbosa. Uma exsicata foi depositada no herbário – Geraldo Mariz do Centro de Biociências (CB) da UFPE, sob o registro 81.116 (Anexo A).

FIGURA 03 – Exsicata de *Rhipsalis baccifera*



FONTE: Foto do próprio autor.

3.5. PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *RHIPSALIS BACCIFERA* (EERB)

O processo de secagem do vegetal ocorreu em temperatura ambiente (com média de 28 ° C) de toda planta durante 30 dias e posteriormente foi triturado a pó em moinho de facas. Deste material foi utilizado 257 g para a extração com 2000 mL de álcool etílico absoluto. Posteriormente o extrato bruto obtido por filtração foi concentrado em evaporador rotativo sob temperatura constante de 40°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

3.6. ANIMAIS

Foram utilizados trinta (seis para avaliação da toxicidade aguda e vinte e quatro para atividade antitumoral) camundongos adultos albinos *Swiss (Mus musculus)*, fêmeas, com aproximadamente 60 dias de idade e pesos entre 25 e 40g, procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12h cada) e temperatura de $+25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, em gaiolas de polipropileno com dimensões de 20x30x12cm, forradas com maravalha, receberam ração da marca presence® e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE, sob o registro 23076.041254/2016-75 (Anexo B) de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação animal (COBEA) e Conselho Nacional de Experimentação animal (CONCEA).

3.7. ABORDAGEM FITOQUÍMICA

A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia em camada delgada, com utilização de placas de gel de sílica 60 (Merk), nas quais foram aplicadas 15µL

do extrato previamente preparado, selecionados os sistemas de desenvolvimento cujos reveladores foram de acordo com as moléculas pesquisadas (WAGNER & BLADT, 1998). Para pesquisa de alcalóides, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff e utilizado escopolamina como substância padrão. Para flavonóides, uma alíquota do extrato foi solubilizado em álcool 70% (ETOH 70%), adicionado Clorofórmio (CHCl₃) e agitado para obtenção de duas fases, clorofômica e hidroalcoolica, empregou-se uma mistura de acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético glacial : água (100: 11: 11: 26 v/v) como fase móvel e foi revelada com o reagente de NEU, com observação em câmara de Ultravioleta (365 nm), que utilizou como substância padrão a quercetina. Em relação à pesquisa de fenilpropanóides também utilizou-se a criação de duas fases, clorofômica e hidroalcoolica, empregou-se uma mistura de tolueno: éter (1: 1) como fase móvel, revelada com solução hidróxido de potássio (KOH) a 10%, observada em câmara de Ultravioleta (365 nm) e como substância padrão a cumarina. Para a pesquisa de terpenos empregou-se como fase móvel uma mistura, tolueno: acetato de etila (93: 7 v/v), revelada com vanilina sulfúrica a 1%, seguida de aquecimento em estufa (100°C), o surgimento de manchas com coloração roxo/verde/azul foi usado como critério diagnóstico. Na pesquisa de triterpenos empregou-se uma mistura, tolueno: clorofórmio: etanol (40: 40: 10 v/v) como fase móvel, revelada com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento em estufa (100°C), a identificação de manchas com coloração levemente rósea e avermelhada foi usado como critério de evidência.

3.8. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR *ARTEMIA SALINA* LEACH

A metodologia foi realizada segundo Meyer et al. (1982), com cistos de *A. Salina* que foram postos para eclodir em água do mar em incubadora, na

temperatura de 25°C, com iluminação artificial, aeração constante e coberto com papel alumínio por 48 horas com a finalidade de manutenção da temperatura.

Após a eclosão, as larvas foram dispostas em tubos de ensaio com 10 larvas de metanúplios cada com auxílio de uma pipeta Pasteur e 9 mL de água do mar, onde o extrato etanólico de *Rhipsalis baccifera* obtido foi colocado nas diferentes concentrações: 50 mg/mL, 100 mg/mL, 500 mg/mL e 1000 mg/mL.

Foi utilizado como controle negativo água do mar e artemias. O ensaio foi realizado em triplicata, com contagem das espécies vivas e mortas após 24 horas, considerando-se todos microcrustáceos imóveis durante a observação e com a leve agitação do frasco.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico com modelo Probit e análise de regressão linear para determinar a concentração letal média (CL_{50}) do extrato estudado. A CL_{50} foi a concentração letal média para 50% das larvas. Considerou-se atóxica quando a CL_{50} for maior do que 1000 µg/mL. A atividade citotóxica é considerada fraca se a CL_{50} for entre 500 e 1000 µg/mL; moderada com CL_{50} entre 100 e 500 µg/mL; elevada com CL_{50} entre 0 e 100 µg/mL.

3.9. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL_{50}

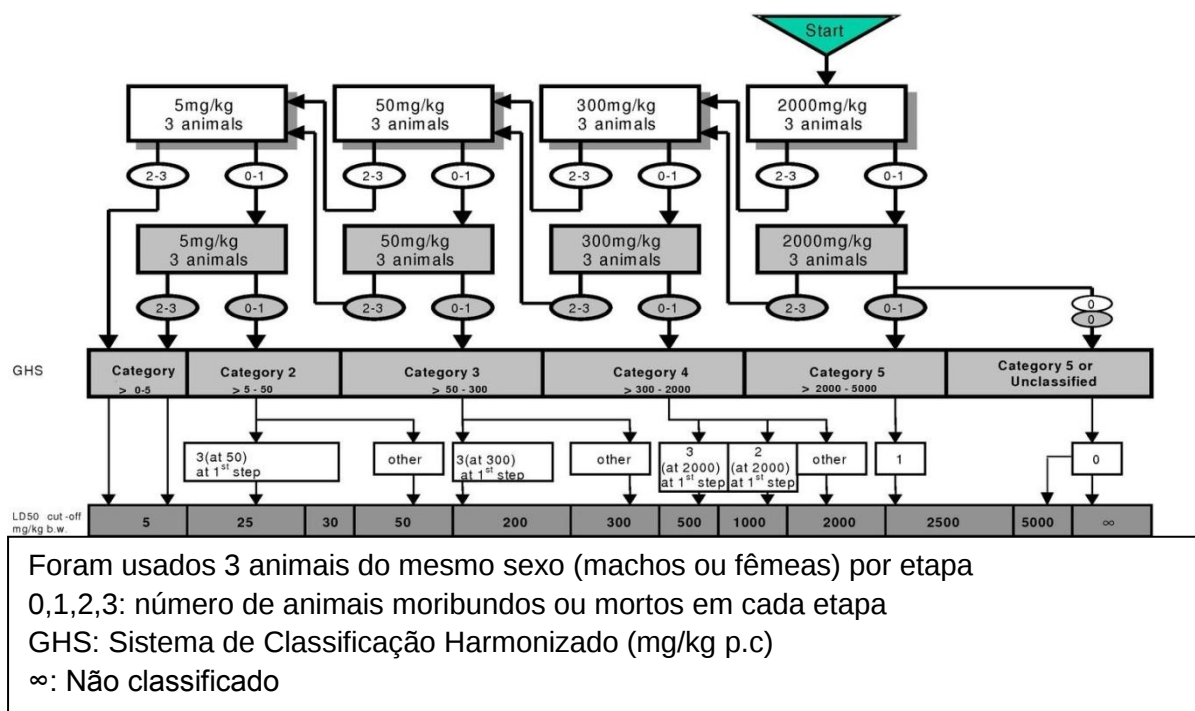
A avaliação da toxicidade aguda in vivo foi realizada por via oral de acordo com a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), utilizando como base o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423, 2011) para identificar a dose letal média (DL_{50}). A DL_{50} é a dose letal média para 50% dos animais. Esse protocolo estabelece 4 níveis de dose (2000 mg/kg, 300 mg/kg, 50 mg/kg e 5 mg/kg) e é classificado segundo os critérios do Sistema de Classificação Harmonizada (GHS) (figura 4). Os grupos experimentais de camundongos foram

distribuídos com 3 animais por gaiolas. Este procedimento é reprodutível e utiliza poucos animais. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco (OECD, 20011).

Inicialmente foi utilizado um grupo tratado com EERB 2000 mg/kg e um controle que receberam apenas soro fisiológico 0,9%. Aos grupos testes foram administrados por gavagem o extrato de *Rhipsalis baccifera*. Para melhor identificação dos animais todos foram marcados, receberam ração e água *ad libitum* durante todo o experimento e privados de alimentação por 6h antes da administração do extrato.

As alterações comportamentais dos animais foram avaliadas separadamente após a administração do extrato durante 60 minutos e em seguida diariamente por um período de quatorze dias, com pesagens diárias dos animais, do alimento, assim como verificação do volume de água ingerido.

Figura 04 – Avaliação de toxicidade aguda de acordo com o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001).



3.10. ATIVIDADE ANTITUMORAL

3.10.1. Implante da massa tumoral

A implantação do Carcinoma de Ehrlich foi realizada de acordo com a metodologia de STOCK et al., (1955) e KOMIYAMA (1992). Este tumor é mantido através da inoculação seriada em animais provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Para o transplante do tumor, as células foram retiradas de animal doador com oito dias de implantação, através da aspiração da forma ascítica e foram introduzidas nos animais receptores, por via subcutânea na região subaxilar, numa concentração de 25×10^6 células/mL de líquido ascítico.

3.10.2. Tratamento

O tratamento foi iniciado 48 horas após o implante e divididos em 4 grupos

com 6 animais cada, e tratados por 7 dias com: Grupo 1 (G1): Controle (solução salina 0,9%); Grupo 2 (G2): Padrão (Cisplatina 5mg/kg); Grupo 3 (G3): tratado com EERB 250 mg/kg e Grupo 4 (G4): tratado com EERB 125 mg/kg os quais receberam, respectivamente, 10% e 5% da dose letal mediana (DL₅₀) encontrada no teste de toxicidade aguda por via oral (v.o).

No oitavo dia os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical. Amostras sanguíneas coletadas por punção cardíaca, e alocados em dois tubos, um com EDTA para análise hematológica (contagem de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina) e índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e outro com gel separador, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro destinado as análises bioquímicas tais como: uréia, creatinina, transaminases e fosfatase alcalina; Logo após, os tumores foram extirpados, dissecados, pesados e calculados quanto à diferença entre os grupos tratados e controle para obtenção do índice de inibição tumoral.

A inibição tumoral foi calculada em comparação ao grupo controle após pesagem dos tumores, segundo a fórmula de NACHON et al., 1981:

$$TWI (\%) = \frac{(C - T) \times 100}{C}$$

Onde: TWI = Percentual de inibição tumoral.

C = Média dos pesos dos tumores do grupo controle.

T = Média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

3.11. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a eutanásia foi procedida incisão cirúrgica nos animais que se estende do

tórax até o abdomen para a retirada do baço, rim, fígado e pulmão. Os órgãos foram fixados em formaldeído tamponado a 10% durante 24 horas e processados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%). Foi realizado o processamento histológico de rotina, embebidos em parafina, emblocados, realizados cortes em microtomia com espessura de 4 μ m, montados em lâminas histológicas e lamínulas e coradas para a técnica Hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica subsequente.

Análises microscópicas foram realizadas em microscópio binocular modelo Kinon® L1000b-AC, e fotografias de cortes histológicos foram realizadas com auxílio de programa de captura Motic Images Plus 2.0 com câmera digital no modelo Samsung® marca PL 120 14.2MP com Zoom óptico de 10x.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi construído um banco de dados na planilha eletrônica Microsoft Excel em Windows 8.0 a qual foi exportado para o software SPSS versão 18 onde foi realizada a análise. A avaliação da normalidade foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos casos em que a normalidade não foi indicada foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparação da distribuição do parâmetro de interesse entre os grupos de tratamento e através do teste de Mann-whitney na comparação do parâmetro de interesse entre os grupos, dois a dois. Para avaliar o percentual de mortalidade foram calculadas as frequências percentuais. Na avaliação da mortalidade da *A. salina* para cada dose realizada foi aplicado o Probit, modelo que estima a chance de morte em diferentes dosagens e, após a estimação da mortalidade para cada grupo de dose recebida, foi aplicado o modelo de regressão linear para determinar o valor do CL₅₀. Para análise dos tumores foi

calculado o índice de inibição tumoral através da pesagem dos tumores, segundo fórmula pré-estabelecida por Nachon et al., 1981. Todas as conclusões foram tiradas considerando o nível de significância de 5%.

4. ARTIGOS

- 4.1. PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO DE *RHIPSALIS BACCIFERA* (CACTACEAE) SOBRE *ARTEMIA SALINA* E *MUS MUSCULUS*

Submetido à REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS.

Qualis B3 (Medicina II)

Perfil fitoquímico e avaliação toxicológica do extrato etanólico de *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae) sobre *Artemia salina* e *Mus musculus*

Introdução

Atualmente várias enfermidades têm sido tratadas por meio da utilização de plantas medicinais. No entanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente este recurso natural como medicamentos eficazes e seguros (Turolla & Nascimento, 2006; Agra et al., 2008).

Estudos toxicológicos têm o objetivo de avaliar a ideia de que plantas medicinais, por serem naturais, são isentas de efeitos tóxicos ou adversos. É fundamental, porém o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia na qualidade das preparações com esses vegetais, como também o conhecimento prévio da composição química para a confirmação dos princípios ativos. (Craveiro et al., 2008).

A família Cactaceae possui distribuição neotropical, compreende 124 gêneros e 1438 espécies distribuídas no novo mundo (Hunt et al., 2006), exceto por *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn, cuja distribuição chega até a África e Ásia (Anderson, 2001; Hunt et al., 2006). Cerca de 220 espécies são epífitas e ocorrem em florestas tropicais e subtropicais úmidas (Hunt et al., 2006; Calvente et al., 2011). Apresenta uma considerável importância econômica, com destaque para seu valor ornamental, já que espécies de Cactaceae são cultivadas, colecionadas e comercializadas em diversas partes do mundo (Anderson, 2001; Andrade et al., 2006).

O método de análise com *Artemia salina* Leach é proposto como um simples bioensaio para pesquisa preliminar de atividade de produtos naturais. Por esse método, é possível determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) de componentes ativos e extratos em um meio salino. A atividade do teste é manifestada pela

toxicidade de componentes ativos, frações ou extrato de produtos naturais frente ao organismo marinho, e pode ser usado como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido, seguro e acessível (Meyer, 1982; McLaughlin, 1998). O ensaio permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.

O teste de toxicidade aguda define o grau de toxicidade intrínseca do composto, identifica órgãos que podem ser alvos de efeitos indesejados e seleciona doses para estudos de longa duração (Almeida, 2011). O método da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) é um procedimento gradual com a utilização de 3 animais do mesmo sexo por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou estado de morbidez dos animais, em média, 2 ou 4 etapas podem ser necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda do produto a ser avaliado. Este procedimento é reprodutível e utiliza poucos animais. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco (OECD, 20011).

Espécies da família Cactaceae são bastante estudadas em todo o mundo, porém a avaliação do potencial tóxico de *Rhipsalis baccifera* é escasso. Diante do exposto, objetivou-se determinar a composição química do extrato etanólico de *Rhipsalis baccifera* e avaliar sua toxicidade *in vitro* em *Artemia salina* Leach e “*in vivo*” sobre *Mus musculus*.

Materiais e métodos

Material botânico e extração da matéria prima

Amostras de *Rhipsalis baccifera* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Marlene Barbosa. Uma exsicata foi depositada no herbário – Geraldo Mariz do Centro de Biociências da UFPE, sob o registro 81.116.

Preparação e concentração do extrato bruto etanólico de *Rhipsalis baccifera* (EERB)

O processo de secagem do vegetal ocorreu em temperatura ambiente (com média de 28 ° C) de toda a planta durante 30 dias e posteriormente foi triturado a pó em moinho de facas. Deste material foi utilizado 257 g para a extração com 2000 mL de álcool etílico absoluto. Posteriormente o extrato bruto obtido por filtração foi concentrado em evaporador rotativo sob temperatura constante de 40°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

Animais

Foram utilizados seis camundongos adultos albinos *Swiss (Mus musculus)*, fêmeas, com aproximadamente 60 dias de idade e pesos entre 25 e 40g, procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12h cada) e temperatura de 25 ±3°C, em gaiolas de polipropileno com dimensões de 20x30x12cm, forradas com maravalha, receberam ração da marca presence® e água *ad libitum*. Foram dispostos três animais por gaiola. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE, sob o registro 23076.041254/2016-75.

Abordagem fitoquímica

A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia em camada delgada, com utilização de placas de gel de sílica 60 (Merk), nas quais foram aplicadas 15µL do extrato previamente preparado, selecionados os sistemas de desenvolvimento cujos reveladores foram de acordo com as moléculas pesquisadas (WAGNER et al., 1998). Para pesquisa de alcalóides, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff e utilizado escopolamina como substância padrão. Para flavonóides, uma alíquota do extrato foi solubilizado em álcool 70% (ETOH 70%), adicionado Clorofórmio (CHCl₃) e agitado em agitador magnético para obtenção de duas fases, clorofômica e hidroalcoolica, empregou-se uma mistura de acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético glacial : água (100: 11: 11: 26 v/v) como fase móvel e foi revelada com o reagente de NEU, com observação em câmara de Ultravioleta (365 nm), que utilizou como substância padrão a quercetina. Em relação à pesquisa de fenilpropanóides também utilizou-se a criação de duas fases, clorofômica e hidroalcoolica, empregou-se uma mistura de tolueno: éter (1: 1) como fase móvel, revelada com solução hidróxido de potássio (KOH) a 10%, observada em câmara de Ultravioleta (365 nm) e como substância padrão a cumarina. Para a pesquisa de terpenos empregou-se como fase móvel uma mistura, tolueno: acetato de etila (93: 7 v/v), revelada com vanilina sulfúrica a 1%, seguida de aquecimento em estufa (100°C), o surgimento de manchas com coloração roxo/verde/azul foi usado como critério diagnóstico. Na pesquisa de triterpenos empregou-se uma mistura, tolueno: clorofórmio: etanol (40: 40: 10 v/v) como fase móvel, revelada com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento em estufa (100°C), a identificação de manchas com coloração levemente rósea e avermelhada foi usado como critério de evidência subjetivamente.

Avaliação da toxicidade do EERB

In vitro com *Artemia salina* Leach

A metodologia foi realizada segundo Meyer et al. (1982), com cistos de *A. Salina* que foram postos para eclodir em água do mar em incubadora, na temperatura de 25°C, com iluminação artificial, aeração constante e coberto com papel alumínio por 48 horas.

Após a eclosão, as larvas foram dispostas em tubos de ensaio com 10 larvas de metanúplios cada com auxílio de uma pipeta Pasteur e 9 mL de água do mar, onde o extrato etanólico de *Rhipsalis baccifera* obtido foi colocado nas diferentes concentrações: 50 mg/mL, 100 mg/mL, 500 mg/mL e 1000 mg/mL.

Foi utilizado como controle negativo água do mar e artemias. O ensaio foi realizado em triplicata, com contagem das espécies vivas e mortas após 24 horas, considerando-se todos microcrustáceos imóveis durante a observação e com a leve agitação do frasco.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico pelo probit, modelo que estima a chance de morte em diferentes dosagens, para determinar a concentração letal média (CL₅₀) do extrato estudado. A CL₅₀ foi a concentração letal média para 50% das larvas. Considerou-se atóxica quando a CL₅₀ for maior do que 1000 µg/mL. A atividade citotóxica é considerada fraca se a CL₅₀ for entre 500 e 1000 µg/mL; moderada com CL₅₀ entre 100 e 500 µg/mL; elevada com CL₅₀ entre 0 e 100 µg/mL.

In vivo com toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda “in vivo” foi realizada por via oral de acordo com a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), utilizada como base o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423, 2011) para identificar a dose letal média (DL₅₀). A DL₅₀ é a dose letal média para 50% dos

animais. Esse protocolo estabelece 4 níveis de dose (2000 mg/kg, 300 mg/kg, 50 mg/kg e 5 mg/kg) e é classificado segundo os critérios do Sistema de Classificação Harmonizada (GHS). Os grupos experimentais de camundongos foram distribuídos com 3 animais cada por gaiolas nos grupos controle e tratado. Este procedimento é reprodutível e utiliza poucos animais. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco (OECD, 20011).

Inicialmente foi utilizado um grupo tratado com EERB 2000 mg/kg e um controle que receberam apenas soro fisiológico 0,9%. Aos grupos testes foram administrados por gavagem o extrato de *Rhipsalis baccifera*. Para melhor identificação dos animais todos foram marcados, receberam ração presence e água *ad libitum* durante todo o experimento e privados de alimentação por 6h antes da administração do extrato.

As alterações comportamentais dos animais foram avaliados separadamente após a administração do extrato durante 60 minutos e em seguida diariamente por um período de quatorze dias, com pesagens diárias, consumo de alimento e água.

Análises microscópicas foram realizadas em marca microscópico binocular modelo Kinon® L1000b-AC, e fotografias de cortes histológicos realizadas com câmera digital no modelo Samsung® marca PL 120 14.2MP com Zoom óptico de 10x e Software Motic Images Plus 2.0 para captura.

Análise estatística

Para análise dos dados foi construído um banco de dados na planilha eletrônica Microsoft Excel a qual foi exportado para o software SPSS onde foi realizada a análise. Para avaliar o percentual de mortalidade foram calculadas as frequências percentuais. A avaliação da normalidade foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Nos casos em que a normalidade não foi indicada aplicou-se o teste de Mann-whitney na comparação do parâmetro de interesse entre os grupos, dois a dois. Na avaliação da mortalidade da *A. salina* para cada dose realizada foi aplicado o probit, modelo que estima a chance de morte em diferentes dosagens e, após a estimação da mortalidade para cada grupo de dose recebida, foi aplicado o modelo de regressão linear para determinar o valor do CL50. Todas as conclusões foram obtidas de acordo com o nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

Perfil fitoquímico

A abordagem fitoquímica de *Rhipsalis baccifera* realizada com extrato bruto etanólico, indicou a presença de alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, terpenos e triterpenos.

De acordo com a literatura, dentre as substâncias mais encontradas em Cactaceas, estão os alcalóides (Neal et al., 1971; Dingerdissen; McLaughlin, 1998), ratificando achados em nosso estudo.

Além de alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, terpenos e triterpenos encontrados em nossa espécie, foram encontrados em outras espécies da mesma família Cactaceae, corroborando com os estudos de Lemos (2015), onde demonstrou que o extrato bruto etanólico de *Harrisia adscendens* (Cactaceae) detectou apenas os alcalóides. É importante ressaltar que testes qualitativos não apresentaram alta sensibilidade, por isso é importante a realização de análises quantitativas para comprovar a existência ou não de determinado composto.

Resultados obtidos por Santana (2016), também evidenciou a presença de terpenos e flavonóides nas frações da raiz de *Cereus jamacaru* (Cactaceae). No entanto,

resultados negativos de alcalóides na raiz não implicam necessariamente na sua ausência, possivelmente a quantidade dos mesmos esteja pequena para ser detectada (Brum et al., 2011) ou que o clima ou a área de coleta tenha influência na produção desses metabólitos.

Os resultados da análise por cromatografia por Santos (2013) para investigação de compostos da Palma forrageira (*Opuntia ficus indica*), também pertencente à família Cactaceae, detectou a presença de flavonóides. Foram encontrados vestígios de terpenos, o que corrobora com a literatura que menciona a presença de terpenos na composição química da palma (Feugang et al., 2006). Os flavonoides e vestígios de terpenos detectados nesta pesquisa estão de acordo com os descritos por Zhong et al., (2010).

O perfil fitoquímico analisado de *Astrpophytum myriostigma* (Cactaceae) resultou em achados positivos para triterpenos e alcaloides confirmando novamente nossos achados (Garza-Padrón et al., 2010).

Toxicidade por *Artemia salina* Leach

A avaliação da letalidade de compostos bioativos frente a microcústáceos se faz importante devido à alta toxicidade de alguns deles quando em doses elevadas. A *Artemia Salina* é de fácil manutenção em condições de laboratório (Pimentel et al., 2011) e foi utilizada com o objetivo de calcular a CL₅₀ (dose letal do extrato para 50% da população).

Na tabela 1 temos a mortalidade das larvas para cada grupo de acordo com a dose utilizada. Verificou-se que o grupo com maior percentual de mortalidade foi de 1000 mg/mL (53,3%) seguido ao de 500 mg/mL (20,0%) e 100 mg/mL (6,6%). No grupo

controle e o de 50 mg/mL não houve mortalidade. A letalidade dos microcrustáceos aumentou com a concentração do extrato.

Foram encontradas as probabilidades de mortalidade através do modelo probit e após este ajuste realizou-se a análise de regressão linear entre o nível da dose e a probabilidade de mortalidade. Foi encontrado que a CL_{50} é a dose de 0,9788 $\mu\text{g/mL}$. A atividade citotóxica é considerada elevada devido a CL_{50} está entre 0 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 1. Número de larvas vivas e mortas segundo a dose da CL_{50} após 24 horas.

Réplica	Dose				
	Controle	1000mg/mL	500mg/mL	100mg/mL	50mg/mL
1	10 vivas	5 vivas	9 vivas	10 vivas	10 vivas
	0 mortas	5 mortas	1 mortas	0 mortas	0 mortas
2	10 vivas	4 vivas	7 vivas	9 vivas	10 vivas
	0 mortas	6 mortas	3 mortas	1 mortas	0 mortas
3	10 vivas	5 vivas	8 vivas	9 vivas	10 vivas
	0 mortas	5 mortas	2 mortas	1 mortas	0 mortas
Total	30 vivas	14 vivas	24 vivas	28 vivas	10 vivas
	0 mortas	16 mortas	6 mortas	2 mortas	0 mortas
% de mortas	0,0%	53,3%	20,0%	6,6%	0,0%

Nossos resultados vão de encontro com os obtidos por Sánchez et al. (2016), que ao avaliarem a toxicidade do extrato de *Opuntia ficus* indica, também pertencente a família das Cactaceas, conhecida popularmente como “palma forrageira”, frente as larvas de *A. salina*, verificaram baixa toxicidade com CL_{50} de 939.2 $\mu\text{g/mL}$. A baixa toxicidade pode ser explicada com o uso comum desta planta em medicina tradicional. Além disso, experiências in vitro e in vitro de cladóides e frutas mostram um efeito benéfico na saúde devido à presença de flavonóides, que possuem propriedades relacionadas à saúde, que se baseiam na sua atividade antioxidante (GINESTRA et al., 2009).

Assim como Dias (2016) que avaliou a polpa de frutos de pitaia branca (*Hylocereus undatus*) e pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*), ambas Cactáceas, encontrando

CL₅₀ de 1.515,98 µg/mL para a pitia vermelha e 1.148,14 µg/mL para a pitia branca, não apresentando toxicidade.

Ao contrário dos estudos anteriores, o de Trennepohl (2016) realizado com outra espécie da família Cactaceae, *Pereskia aculeata* Mill., suas frações do extrato bruto cetônico e do extrato bruto alcoólico foram consideradas moderadamente tóxicas no período avaliado.

Toxicidade aguda

A administração do extrato bruto etanólico de *Rhipsalis baccifera* foi por via oral com dose equivalente a 2000 mg/kg, que produziu sinais clínicos de intoxicação nos primeiros 60 minutos de observação, como demonstrado na tabela 2. Foi utilizado um grupo controle que recebeu apenas soro fisiológico 0,9%. De acordo com os dados desta tabela observou-se que os efeitos agudos mais pronunciados foram no sistema nervoso central (SNC), principalmente estimulante, tais como postura em garra, reação de fuga e frêmitos vocais; depressores, como prostração; e outros comportamentos foram verificados como refluxo. Reduzidos ou eliminados após o período inicial de observação.

No ensaio realizado, apenas um animal apresentou convulsão e foi a óbito após 12 min da administração do extrato bruto etanólico. Os outros animais foram acompanhados até o 14º dia de experimento com monitorações diárias.

TABELA 2: Sinais clínicos observados em camundongos após administração do EERB por via oral para avaliação da toxicidade aguda.

Sinais Clínicos - Avaliação V.O (mg/Kg)	
1. Sistema nervoso central	2000 mg/kg (grupo tratado)
1.1 Sinais estimulantes	
Agressividade	-

Tremores finos/grosseiros	+
Convulsões	+
Piloereção	+
Movimento de vibrissas	-
Postura em garra	+++
Salto	+
Frêmitos vocais	++
Taquicardia	-
Agitação	+
Ereção de cauda	-
Reação de fuga	+++
1.2 Depressores	
Mov. Pavilhão auricular	+
Prostração	++
1.3 Outros comportamentos	
Estereotipia	+
Refluxo	+++
Edema de focinho	+
2. Sistema N. Autônomo	
Aumento da frequência respiratória	+
Diurese	+
Fotofobia	-
3. Mortalidade	33,3%

- = sem efeito; + = efeito leve; ++ = efeito moderado; +++ = efeito acentuado.

Fonte: MALONE; ROBICHAUD (1983).

De acordo com os resultados obtidos e análise da toxicidade por via oral, o extrato etanólico de *Rhipsalis baccifera* foi classificado seguindo os critérios do Sistema de Classificação Harmonizado (GHS), pertencente à categoria 5 (>2000 – 5000), onde a DL₅₀ ficou estabelecida em 2500 mg/kg, de acordo com o protocolo seguido (OECD, 2011).

Na tabela 3 foi observada média e desvio padrão do ganho de peso dos animais, peso dos órgãos e consumo alimentar do grupo controle e tratado. Observa-se que a maior média do consumo de água e ração foi no grupo controle, sendo estatisticamente significativa (p-valor = 0,046 para ambos), indicando que o grupo controle há maior nível de consumo de água e ração durante o tempo do experimento, mas não há diferença estatística do ganho de peso dos animais e do peso dos órgãos.

TABELA 3. Média e desvio padrão do peso dos animais, órgãos avaliados e consumo alimentar segundo o grupo de estudo em camundongos após avaliação da toxicidade aguda para o EERB.

Fator avaliado	Dose		p-valor ¹
	2000 mg/kg	Soro Fisiológico 0,9%	
Ganho de peso médio	1,89±0,65g	0,38±1,39g	0,248
Fígado	1,86±0,17g	1,99±0,12g	0,248
Baço	0,13±0,00g	0,23±0,66g	0,083
Rins	0,38±0,01g	0,37±0,03g	1,000
Pulmão	0,19±0,06g	0,23±0,02g	0,564
Água (mL)	9,57±0,00g	14,28±0,00g	0,046
Ração(g)	6,17±0,00g	11,78±0,00g	0,046

¹p-valor do teste de Mann-Whitney (se p-valor < 0,05 a distribuição do fator avaliado difere entre os grupos avaliados).

A investigação da toxicidade aguda constitui o primeiro passo para análise toxicológica de fármacos à base de plantas (Déciga-Campos, 2007). Em geral, os modelos animais têm uma boa previsibilidade para toxicidades humanas de cerca de 70-80% (Kola et al., 2004).

Os estudos de toxicidade aguda visam à caracterização da relação dose/resposta e cálculo da DL₅₀ (dose letal média), que é útil à identificação da toxicidade da substância. A resposta tóxica apresentada por uma substância está relacionada à dose administrada ou absorvida pelo indivíduo, o tempo e frequência de exposição, além da via de administração utilizada (Barros; Davino, 2008). A DL₅₀ é a “dose única de uma substância capaz de causar 50% de mortalidade dos animais tratados” (Sá; Almeida, 2006).

Toxicidade aguda por via oral foi realizada no estudo de Sim et al. (2010) para determinar os parâmetros de segurança dos extratos bruto metanólico das folhas de *Pereskia bleo* e *Pereskia grandifolia* (Cactáceas) utilizando procedimento descrito pela OECD (2011). Não houve alterações significativas no comportamento em nenhum dos camundongos, pois não produziram quaisquer reações e ganharam peso sem sinais clínicos adversos de toxicidade a qualquer dose.

Abdul-Wahab et al. (2012) também avaliou a possibilidade de os extratos de *Pereskia bleo* Kunth (Cactaceae) desenvolverem efeito tóxico após administração oral, os ratos receberam dose única de 500 mg/kg. Não apresentaram alterações comportamentais e nenhuma lesão ou hemorragia. Isto confirma que o extrato tem baixo perfil de toxicidade, o qual indica segurança para as doses farmacologicamente ativas.

Segundo Hor et al. (2012) o extrato de *Hylocereus polyrhizus* (Cactaceae), conhecido popularmente como pitaya, não foi tóxico na toxicidade aguda, uma vez que a dose única de 1250, 2500 ou 5000 mg/kg não causou qualquer mortalidade, sinais ou sintomas tóxicos.

De acordo com Messias (2010), o extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae) não apresentou toxicidade para as ratas gestantes na gestação, não havendo alteração no ganho de peso dessas fêmeas. A maioria dos órgãos com exceção do baço, não apresentou variação significativa, em relação ao peso, quando comparada ao grupo controle, e o exame macroscópico também não evidenciou alterações dos órgãos analisados.

A avaliação da toxicidade aguda oral do extrato metanólico de *Opuntia joconostle* (Cactaceae) foi realizada seguindo o método prescrito pela OECD por Osorio-Esquivel (2012). Não foi mostrado sintomas toxicológicos, todos os animais

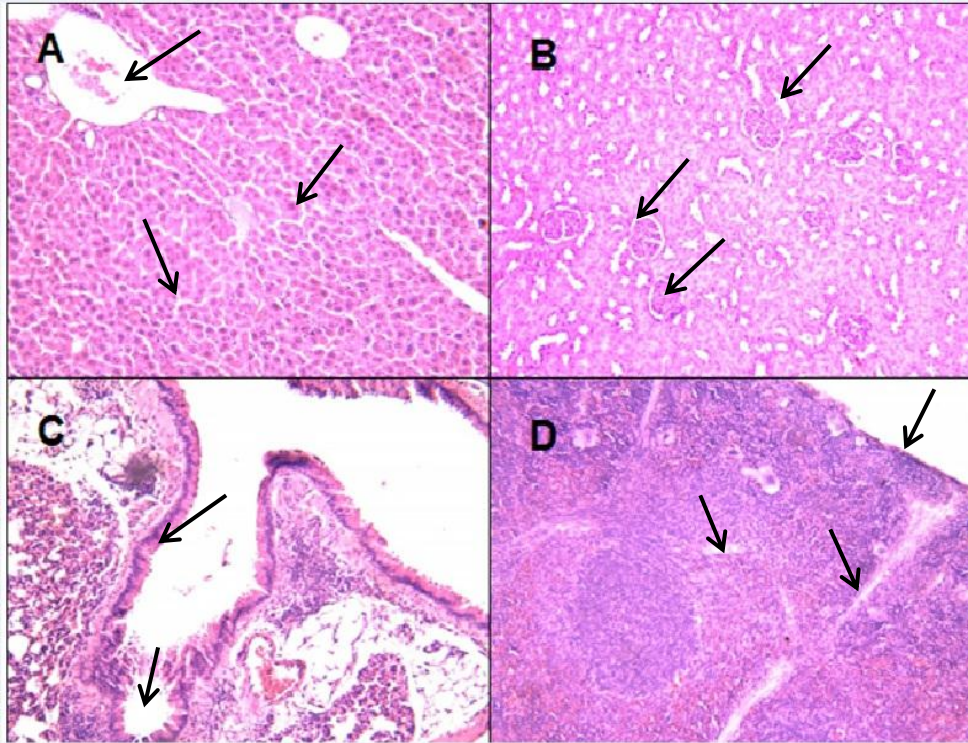
sobreviveram e o ganho de peso nos grupos tratado foi semelhante ao valor do grupo controle. A DL_{50} oral determinada foi > 5000 mg/kg de peso corporal, mostrando sua baixa toxicidade.

Na nossa análise histopatológica para a toxicidade aguda revelou que o fígado, rins, pulmão e baço do grupo controle apresentaram respectivamente, veia centro lobular preservada, hepatócitos preservados e organizados radialmente em fileiras com preservação dos sinusóides hepáticos; glomérulos e túbulos renais conservados, e espaço peri-glomerular conservado; alvéolos preservados, brônquios e bronquíolos terminais com tecido epitelial de revestimento preservados; preservação da cápsula/trabécula e linfonodos com sinusóides esplênicos preservados (figura 1).

Observou-se no grupo tratado com EERB 2000 mg/kg apresentaram veia centro lobular preservada, desorganização de fileiras dos hepatócitos com consequente desorganização dos sinusóides, aumento do volume de hepatócitos e presença de vacuolizações citoplasmáticas sugerindo esteatose hepática, no fígado; discreta diminuição do espaço peri-glomerular, glomérulo e túbulos renais preservados, nos rins; discreto aumento das paredes dos alvéolos e diminuição do lúmen, no pulmão; preservação da cápsula/trabécula e linfonodos com sinusóides esplênicos em desorganização devido a provável congestão sanguínea, no baço (figura 2).

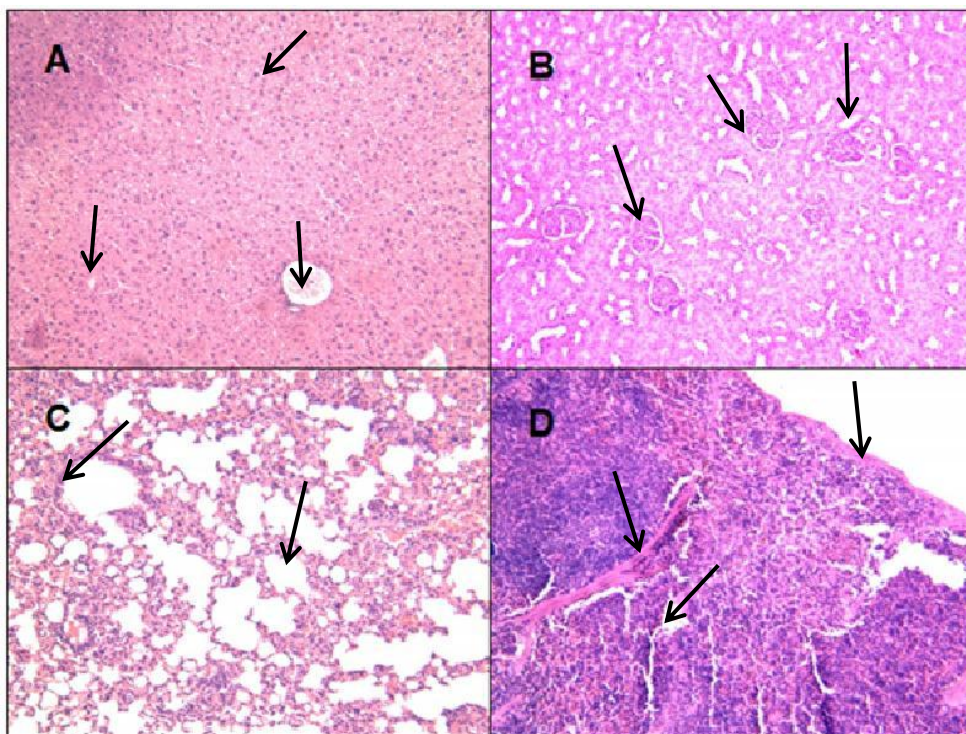
A presença de vacuolizações citoplasmáticas, que aumentam o volume dos hepatócitos, indica a existência de regiões com provável concentração de lipídeos e glicogênio, ou a combinação de agentes tóxicos com lipídeos intracitoplasmáticos (Santos et al., 2004). O acúmulo de lipídeos e a diminuição de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos prejudicam as atividades metabólicas (Gayão et al., 2013).

FIGURA 1: Análise histopatológica do grupo controle em camundongos após avaliação da toxicidade aguda: A- fígado; B- rim; C- pulmão; D- baço.



Aumento de 10x e coloração com Hematoxilina-eosina (He). Fig. 1A- Veia centro lobular, hepatócitos e sinusóides hepáticos preservados; 1B- Glomérulos, túbulos renais e espaço peri-glomerular conservado; 1C- Alvéolos preservados, brônquios e bronquíolos terminais com tecido epitelial de revestimento preservados; 1D- Cápsula/trabécula e linfonodos com sinusóides esplênicos preservados.

FIGURA 2: Análise histopatológica do grupo tratado com EERB 2000 mg/kg em camundongos após avaliação da toxicidade aguda: A- fígado; B- rim; C- pulmão; D – baço.



Aumento de 10x e coloração com Hematoxilina-eosina (He). Fig. 2A- Veia centro lobular preservada, desorganização de fileiras dos hepatócitos, desorganização dos sinusóides, aumento do volume de hepatócitos; 2B- Discreta diminuição do espaço peri-glomerular, glomérulo e túbulos renais preservados; 2C- Discreto aumento das paredes dos alvéolos e diminuição do lúmen; 2D- Preservação da cápsula/trabécula e linfonodos com sinusóides esplênicos em desorganização.

Conclusão

A partir da análise fitoquímica do EERB, foi possível definir a presença de alcaloides, flavonoides, terpenos, triterpenos e fenilpropanóides em *Rhipsalis baccifera*. Assim recomenda-se novas pesquisas para avaliar diferentes componentes e influências ambientais.

A CL₅₀ do EERB revelou alta citotoxicidade, no entanto resultados com outras espécies da mesma família são divergentes, onde se faz necessário outros estudos para melhor avaliação por baixa sensibilidade do teste.

A DL₅₀ apresentou baixa toxicidade aguda e alta potencial para uso seguindo os critérios do Sistema de Classificação Harmonizada, pertencente à categoria 5 (>2000 – 5000). E suas alterações histopatológicas foram condizentes com sua baixa toxicidade.

Referências

- ABDUL-WAHAB, IR. Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology** 144: 741–746, 2012;
- AGRA, MF; SILVA, KN; BASÍLIO, IJLD et al. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia** 18(3): 472-508, 2008;
- ALMEIDA, JRGS et al. Evaluation of hypoglycemic potencial and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 30, p. 96-100. 2011;
- ANDERSON, EF. The Cactus Family. **Timber Press**. Portland, EUA. p776. 2001;
- ANDRADE, C.T.S. et al. Utilização de cactáceas por sertanejos baianos. **Sitientibus**. 6: 3-12. 2006;
- BARROS, SBM; DAVINO, SC. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed.. São Paulo: Atheneu, p. 59-70, 2008;
- BRUM, SS et al. Esterificação de ácidos graxos utilizando zircônia sulfatada e compósitos carvão ativado/zircônia sulfatada como catalisadores. **Química Nova**, v. 34, p. 1511-1516, 2011;
- CALVENTE, AM et al. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for Schlumbergera and Hatiora. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 58:456-468. 2011;
- CRAVEIRO, ACS; CARVALHO, DMM; NUNES, RS et al. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista brasileira de farmacognosia**: 739-743, 2008;
- DÉCIGA-CAMPOS, M; Rivero-Cruz, I; Arriaga-Alba, M et al., “Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine,” **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 110, no. 2, pp. 334–342, 2007;
- DIAS, PMS. **COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ECOTOXICIDADE DA POLPA DE FRUTOS DE PITAIA BRANCA (*Hylocereus undatus*) E PITAIA VERMELHA (*Hylocereus polyrhizus*)**. 2016. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora;
- DINGERDISSE, JJ; MCLAUGHLIN, JL. Cactus Alkaloids XXI: β - Phenethylamines from *Dolichothela sphaerica*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 62, n. 10, p. 1633-1666. 1973;
- Garza-Padrón, RA; Verde-Star, MJ; Morales-Rubio, ME; Oranday-Cárdenas, A; Rivas-Morales, C; Núñez-González, MA y Barrón-González, MP. ACTIVIDAD AMEBICIDA, ANTIOXIDANTE Y PERFIL FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *ASTROPHYTUM MYRIOSTIGMA* OBTENIDOS DE CULTIVO DE CALLO Y DEL CACTUS SILVESTRE. **Polibotânica**. Núm. 30, pp. 111-121, ISSN 1405-2768; México, 2010;
- GINESTRA, G; PARKER, PL; BENNETT RN et al., “Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.],” **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, no. 21, pp. 10323–10330, 2009;

FEUGANG, JM et al. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2574-2589. 2006;

GAYÃO, ALBA. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nylo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.991-997, ago. 2013;

HOR, SY. Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): Acute and subchronic toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 63: 106–114, 2012;

HUNT, D; Taylor, NP; Charles, G. The new cactus lexicon. **Dhbooks**, London. 2006;

KOLA, I; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**; 3:711-6. 2004;

LEMONS, EL. **Análise físico-química e fitoquímica do extrato etanólico bruto das raízes de *Harrisia adscendens* (Gurke) Britton & Rose (CACTACEAE)**. 2015. Trabalho de conclusão de curso, Universidade estadual da Paraíba, Paraíba;

McLaughlin, JL. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**. 1998; 32:513-24;

MESSIAS, JB. **Cereus jamacaru DC: EFEITO TOXICOLÓGICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Rattus norvegicus***. 2010. Tese – Programa de pós-graduação em Ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife;

MEYER, BN. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. 1982; 45:31-4;

NEAL, JM et al. Cactus alkaloids X: Isolation of hordenine and Nmethyltyramine from *Ariocarpus kotschoubeyanus*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60, n. 3. p. 477-488. 1971;

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-**Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD. 2011;

OSORIO-ESQUIVEL, O et al. Antihyperlipidemic Effect of Methanolic Extract from *Opuntia joconostle* Seeds in Mice Fed a Hypercholesterolemic Diet. **Plant Foods for Human Nutrition** 67:365–370, 2012;

PIMENTEL, MF et al. O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para Avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011;

SÁ, RCS; ALMEIDA, RN. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia**. Rio de Janeiro: Koogan, p. 130, 2006;

SÁNCHEZ, E et al. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 16, 2016;

SANTANA, AF. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMICA E HIDROMETANÓLICA DO EXTRATO DA RAIZ DE *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae)**. 2016. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana;

SANTOS, AA; RANZANI-PAIVA, MJT; FELIZARDO, NN; RODRIGUES, E de L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*, criadas em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.141-145, 2004;

SANTOS, MM. **PERFIL FITOQUÍMICO DA PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia fícus indica*) E ATIVIDADE CICATRIZANTE IN VIVO**. 2013. Dissertação – Programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife;
SIM, KS et al. Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. **Pharmacognosy Magazine**. Vol 6, Issue 21. 2010;

TRENNEPOHL, BI. **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Pereskia aculeata* Mill.** 2016. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição do centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba;

TUROLLA, MSR & NASCIMENTO, ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas** 42(2): 189-306, 2006;

ZHONG, XK et al. Chemical analyses and antioxidants activities *in vitro* of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivated in China. **Carbohydrate Polimers**, n.82, p. 722-727. 2010;

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis. **Springer**. Second edition. 1998.

4.2. MACROSCOPIC, HISTOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND
HEMATOLOGICAL INVESTIGATION OF EHRlich'S CARCINOMA
AFTER TREATMENT WITH *RHIPSALIS BACCIFERA* (CACTACEAE) IN
MICE

Submetido à PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH

Qualis B1 (Medicina II).

MACROSCOPIC, HISTOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL INVESTIGATION OF EHRlich'S CARCINOMA AFTER TREATMENT WITH *RHIPSALIS BACCIFERA* (CACTACEAE) IN MICE

Introduction

The Ehrlich tumor is a spontaneous adenocarcinoma derived from the mammary gland of female mice, developed by Paul Ehrlich in 1896. The solid-form development occurs when inoculated subcutaneously or intramuscularly in mice and the ascitic form when inoculated intraperitoneally [1-4]. The advantages of transplantable neoplasms, compared to others, lie in the prior knowledge of the amount and initial characteristics of the tumor cells to be inoculated and the fast development which limits the study time [5,6].

Advances in cancer studies and the understanding of several mechanisms related to its etiology, progression, diagnosis and treatment are mainly due to experimental oncology. This branch of oncology arose with the introduction of so-called transplantable or transmissible tumors. These are kept in the laboratory by serial inoculation in susceptible animals or in cell culture [7].

According to the location, extent and type of cancer, one or a combination of treatments may be chosen, among which surgery, radiotherapy and chemotherapy [8-10] stand out. The demand for alternative methods for the treatment of cancer remains very high and studies in different cell lines in animal and human epidemiological studies suggest a protective role of a large number of plant molecules against different types of cancers [11-14]. Therefore, scientific research in clinical and/or experimental oncology assumes an increasingly relevant role.

Thus, the selection of plant species for research and development based on the allegation of a given therapeutic effect may improve for the discovery of new drugs that are more effective, less toxic and/or have new action mechanisms [15].

The substances obtained from Brazilian native plants have contributed favorably to the process of antineoplastic action that can be used as biomaterials of efficient pharmacological action [16].

The Cactaceae family are from arid and semi-arid areas, which, due to severe environmental conditions (water scarcity, strong radiation, temperature differences and poor soils) are designed to develop highly effective protection systems against the environment [17]. In these protection systems we highlight the phytochemicals, such as alkaloids, flavonoids, terpenes and tannins, already proved to exhibit remarkable bioactivities against human diseases, such as cancer [18,19] and diabetes [20].

Rhipsalis baccifera (Sol.) Stearn is the only species to extrapolate from the American distribution of the Cactaceae family, by also occurring widely in humid tropical areas of the African continent and part of the Asian continent [21]. In view of the widespread occurrence of cancer in the world and the lack of alternatives for treatment, it was to evaluate the antitumor properties of *Rhipsalis baccifera*.

Materials and methods

Botanical material and raw material extraction

Samples of *Rhipsalis baccifera* were collected from the Federal University of Pernambuco's (UFPE), Recife / PE, Brazil, campus and later identified by the botanist Dr. Marlene Barbosa. An exsiccata was deposited in UFPE's, UFP - Geraldo Mariz herbarium, under the record 81.116.

Preparation and concentration of the raw ethanolic extract of *Rhipsalis baccifera* (EERB)

The drying process of the plant occurred at room temperature (with a mean of 28 ° C) of the whole plant during 30 days and later it was ground to powder in a knife mill. From this material, 257 g was used for the extraction with 2000 mL of absolute ethyl alcohol. Subsequently the crude extract obtained by filtration was concentrated in a rotary evaporator under a constant temperature of 40 ° C to eliminate the organic solvent and obtain the crude extract.

Animals

Twenty-four Swiss albino female mice (*Mus musculus*) were used, with approximately 60 days of age and weights between 25 and 40g, from the Biotherm of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco. The animals were kept under controlled lighting conditions (light / dark cycle of 12h each) and temperature of $+25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, in polypropylene cages with dimensions of 20x30x12cm, lined with wood, received ration of presence® and water brand *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Biosciences Center of UFPE, under registration 23076.041254 / 2016-75.

Antitumor activity

Implantation of tumor mass

The implantation of Ehrlich's Carcinoma was performed according to the methodology of STOCK et al., [22] and KOMIYAMA [23]. This tumor is maintained through serial inoculation in animals from the vivarium of the Department of Antibiotics of UFPE. For tumor transplantation, cells were withdrawn from the donor animal eight days after implantation by ascitic aspiration and were introduced into the recipient animals subcutaneously in the subaxillary region at a concentration of 25×10^6 cells / ml of liquid ascitic.

Treatment

The treatment began 48 hours after the implantation and divided in groups with 6 animals each and treated for 7 days with: Group 1 (G1): Control (saline solution 0.9%); Group 2 (G2): Standard (Cisplatin 5mg/kg); Group 3 (G3): Treated with EERB 250 mg/kg and Group 4 (G4): Treated with EERB 125 mg/kg which received respectively 10% and 5% of the median lethal dose (LD50) found in the oral (v.o) acute toxicity test.

On the eighth day the animals were weighed and sacrificed by cervical dislocation. Blood samples were collected by cardiac puncture and placed in two tubes, one with EDTA for hematological analysis (erythrocyte, leukocytes and hemoglobin counts), and hematimetric indices like the mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and another with separator gel, which was centrifuged for 10 minutes at 3500 rpm, to obtain serum for biochemical analyzes such as: urea, creatinine, transaminases, alkaline

phosphatase; subsequently, the tumors were excised, dissected, weighed and calculated for the difference between the treated and control groups to obtain the tumor inhibition index.

Microscopic analyzes were performed using binocular microscope model Kinon® L1000b-AC, and photographs of histological sections made with a digital camera in the model Samsung® PL 120 14.2MP mark with 10x optical zoom and Motic Images Plus 2.0 software for capture.

Tumor inhibition was calculated in comparison to the control group after tumor weighing, according to the NACHON et al [24] formula.

$$TWI (\%) = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Onde: **TWI** = Tumor inhibition percentage.

C = Control group's tumor weights mean.

T = Treated group's tumor weights mean.

Statistical analysis

For the data analysis, a database was built in a Microsoft Excel spreadsheet, which was exported to the SPSS software where the analysis was performed. Normality was assessed by the Shapiro-Wilk test. In cases where normality was not indicated, the Kruskal-Wallis test was used to compare the distribution of the parameter of interest between the treatment groups. All conclusions were got considering the significance level of 5%.

Results and discussion

Antitumor activity

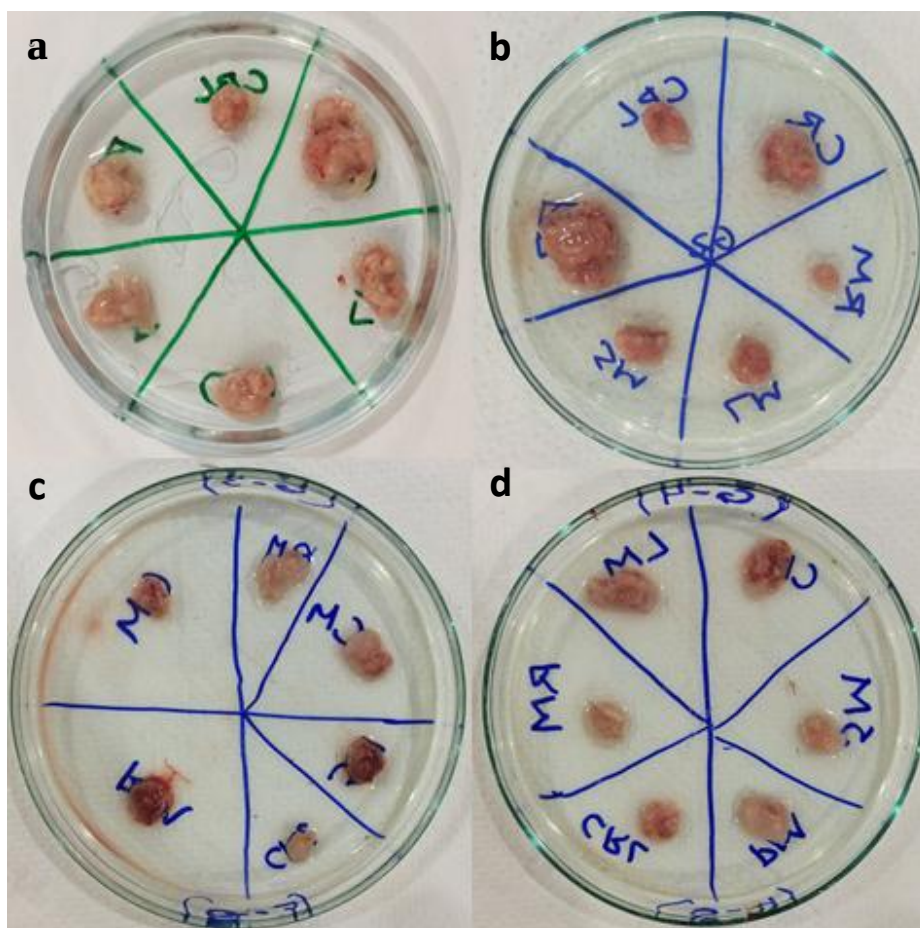
It was observed that EERB presented inhibitory effects on tumor growth. The percentage of tumor inhibition was calculated by the mean of the tumor weights after 24 hours of the last dose of treatment. Table 1 shows the percentages of tumor inhibition (TW%) with the respective tumors in the treated and control groups. The highest percentage of tumor inhibition for Ehrlich's Carcinoma was 84.1% with the dose of 250 mg/kg, when compared to the control group (0.9% saline), and the dose of 125 mg/kg showed TW% of 75.8%, compared to the control group. All the animals treated survived until the end of treatment.

Table 1. TWI values for the control and treated groups after antitumor evaluation in the EERB in mice bearing Ehrlich's Carcinoma.

Treated group	Control group (0.9% saline)
EERB 250 mg/kg	84.1 %
EERB 125 mg/kg	75.8 %

As observed in Table 1, the most significant inhibition (84.1%) of Ehrlich's Carcinoma was observed with the 250 mg/kg dose of the EERB, compared to the control group. The standard drug (cisplatin) was able to inhibit 74.7% of tumor growth with the respective dose. Each tumor on the petri dish represents an animal of its respective group.

Fig. 1 Macroscopic analysis of Ehrlich Carcinoma in mice after antitumor evaluation of EERB. a) Control group, b) Standard group, c) EERB treated group 250 mg / kg, d) EERB treated group 125 mg / kg.

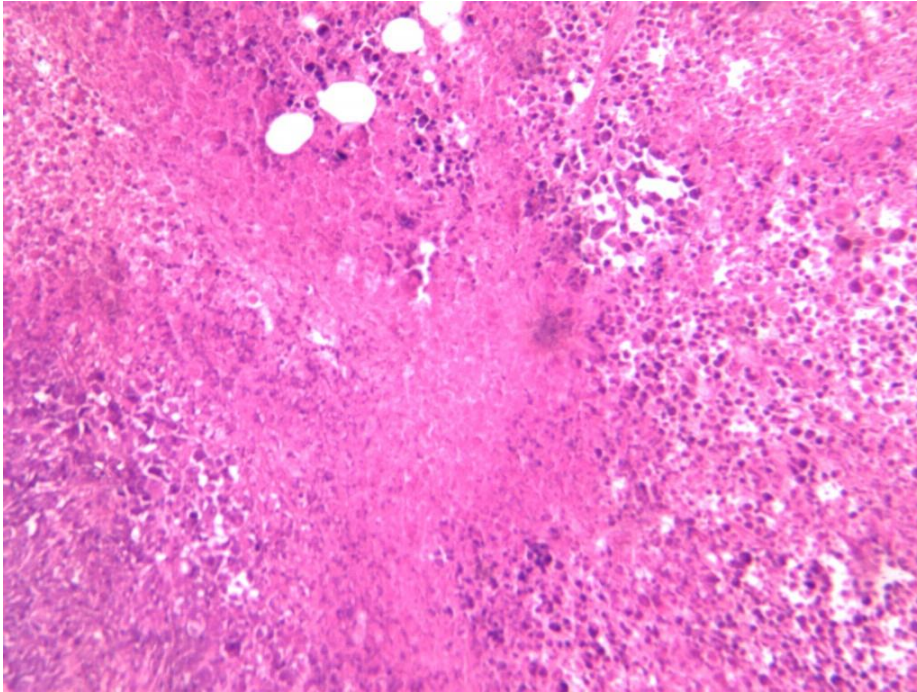


The histopathological analysis for the antitumor activity presented in the control group, tumor with necrotic center, cells with pleomorphism and infiltration of adjacent muscle and adipose tissue (figure 2); liver with lobular center vein and sinusoidal capillaries of normal aspect, hepatocytes with normal morphology and regular nuclei; lungs with alveoli, bronchi and terminal bronchioles with preserved epithelial lining; kidneys with glomeruli as well as the renal tubules in normal preservation, and preserved peri-glomerular space; spleen with preserved capsule, trabecula, lymph nodes and preserved spleen sinusoids.

The standard group presented, tumor with smaller area of necrosis, slower growth and less infiltration of adjacent muscle and adipose tissue (figure 3); liver with preserved lobular center vein, smaller caliber sinusoids, increased hepatocyte nuclei and condensed chromatin; Lungs with alveoli, bronchi and terminal bronchioles with preserved epithelial lining; Kidneys with preserved glomeruli and renal tubules and increased peri-glomerular space; Spleen with preserved capsule, trabeculae, lymph nodes and increased spleen sinusoids.

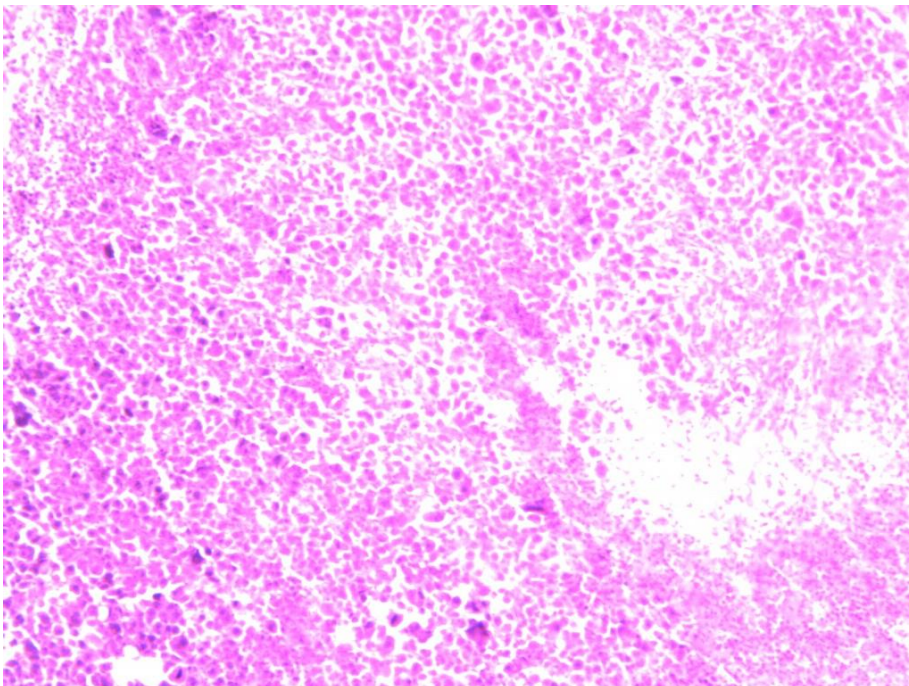
The treated group receiving EERB 250 mg/kg presented a tumor with an extensive area of necrosis (figure 4), which indicates high toxicity to Ehrlich's carcinoma, corroborating with the high percentage of tumor inhibition; liver with preserved lobular center vein, smaller caliber sinusoids, increased hepatocyte nuclei with disarray and condensed chromatin; lungs with enlarged alveolar wall, bronchi and terminal bronchioles with greater caliber; kidneys with preserved glomeruli and increased peri-glomerular space and preserved renal tubules; spleen with preserved capsule, trabecula, lymph nodes and intact splenic sinusoids. The treated group receiving EERB 125 mg/kg presented a tumor with extensive area of necrosis, accentuated pleomorphism, presence of mitosis figures, absence of hemorrhage or calcification and less infiltration of adjacent adipose tissue (figure 5); liver with lobular center vein with larger caliber, increased and disorganized hepatocytes with the presence of vesicles in its interior and condensed chromatin; lungs with alveoli, bronchi and terminal bronchioles with preserved epithelial lining; kidneys with unharmed glomeruli, smaller caliber renal tubules with cell nuclei of the epithelial lining tissue increased; spleen with preserved capsule, trabecula, lymph nodes and spleen sinusoids maintained.

Fig. 2 Histopathological evaluation of the mouse tumor of the control group after an antitumor evaluation of the EERB in Ehrlich's Carcinoma.



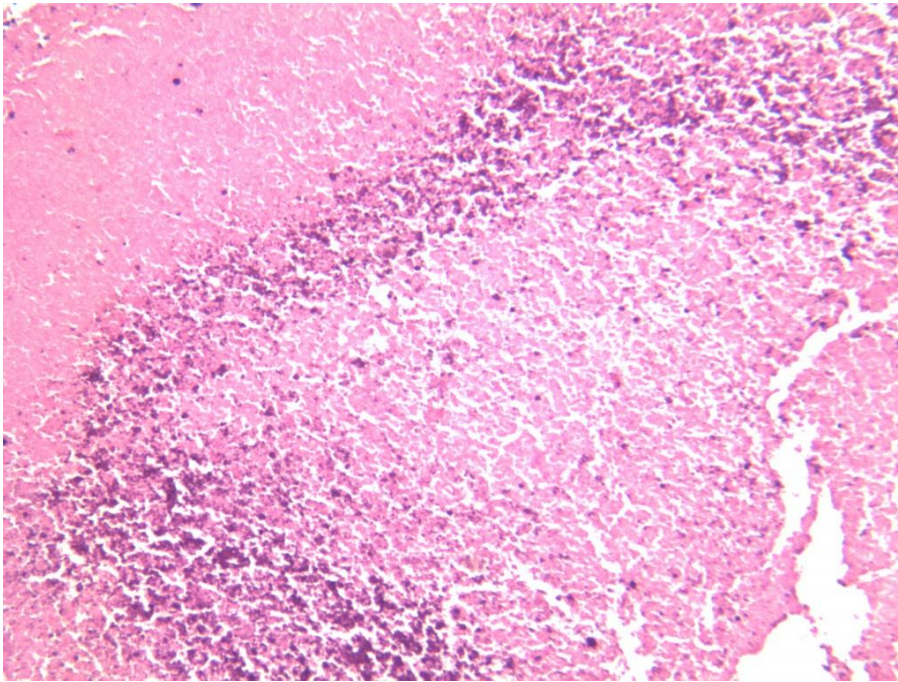
10x magnification and staining with Hematoxylin-eosin (He).

Fig. 3 Histopathological evaluation of the mouse tumor of the standard group after an antitumor evaluation of EERB in Ehrlich's Carcinoma.



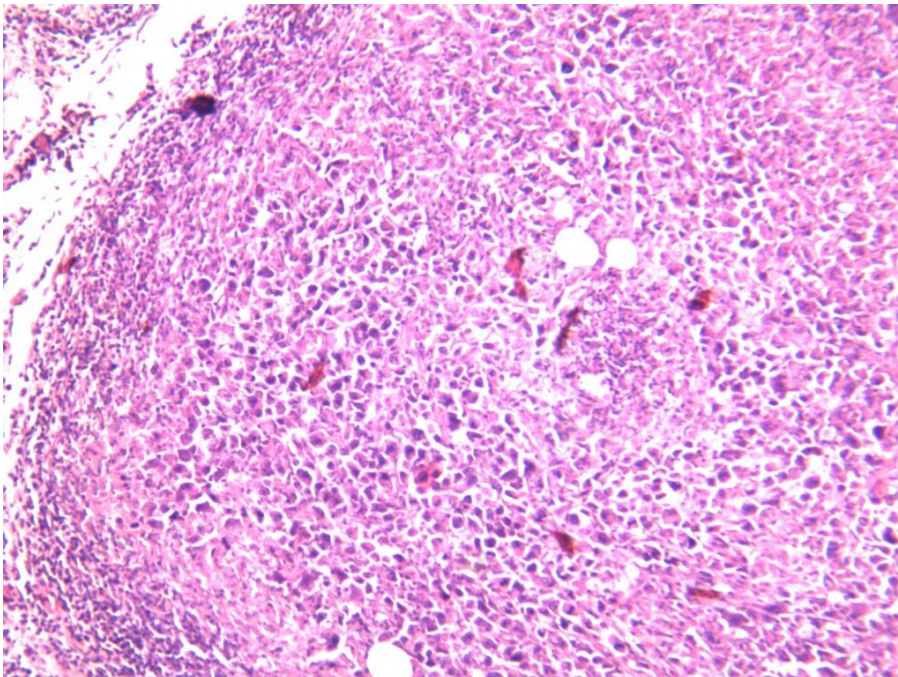
10x magnification and staining with Hematoxylin-eosin (He).

Fig. 4 Histopathological evaluation of the mouse tumor of the EERB 250 mg/kg group after an antitumor evaluation of EERB in Ehrlich's Carcinoma.



10x magnification and staining with Hematoxylin-eosin (He).

Fig. 5 Histopathological evaluation of the mouse tumor of the EERB 125 mg/kg group after an antitumor evaluation of EERB in Ehrlich's Carcinoma.



10x magnification and staining with Hematoxylin-eosin (He).

Table 2 shows the mean and standard deviation of weight of animals, organs and tumor evaluated in the study according to the experimental groups: control (0.9% saline), standard (cisplatin), EERB 250 mg / kg treated and EERB treated 125 Mg / kg. It was found to be higher in the standard group (mean = -2.714) and control group (mean = -0.048). It was also observed that the comparison test was significant (p-value = 0.047), which indicated a significant difference in weight loss between the experimental groups.

In relation to the kidneys, the highest average weight was in the group that received EERB 250 mg/kg (mean = 0.622) and the lowest average weight was in the standard group (mean = 0.434), the comparison test was significant for this evaluated organ (p-value = 0.006), showing that there was greater relevance among the evaluated groups.

For the tumor, the highest average weight was observed in the control group (mean = 0.947) and the lowest weight in the group treated with EERB 250 mg/kg (mean = 0.151). Furthermore, it was verified that the mean comparison test was significant (p-value = 0.004), which confirmed the existence of an experiment with a significant difference in tumor weight.

Regarding another organs, may to affirmed that the weight variations of liver, spleen and lung were not statistically significant.

Table 2. Mean and standard deviation of the weight of the animals, evaluated organs and weight of the tumors of the mice after antitumor assessment with EERB in Ehlich's Carcinoma.

Evaluated factor	Evaluated group				p-value ¹
	0.9% saline	Cisplatin	EERB 250 mg/kg	EERB 125 mg/kg	
Weight	-0.04±1.59g	-2.71±1.48g	-1.04±0.74g	-1.71±1.92g	0.047
Liver	2.33±0.42g	2.03±0.33g	2.73±1.27g	1.75±0.97g	0.376
Spleen	0.38±0.12g	0.28±0.06g	0.38±0.28g	0.34±0.02g	0.196
Kidneys	0.44±0.05g	0.43±0.09g	0.62g±0.10g	0.54g±0.07g	0.006
Lung	0.26±0.04g	0.27±0.05g	0.36±0.10g	0.28±0.03g	0.162
Tumor	0.94±0.54g	0.59±0.59g	0.15±0.04g	0.22±0.10g	0.004

¹p-value of the Kruskal-Wallis test (if p-value <0.05 the distribution of the evaluated factor differs between the evaluated groups).

Table 3 shows the mean and standard deviation of the biochemical parameters, with urea, creatinine, aspartate transaminase (AST/SGOT), alanine transaminase (ALT/SGPT) and alkaline phosphatase (ALP) levels. Even though differences in the means of the measurements between the evaluated groups were found, the comparison test was not significant in any of the measurements (p-

value was greater than 0.05 in all parameters), indicating that there is no relevant difference in urea, creatinine, AST, ALT and ALP among the study groups.

Table 3. Mean and standard deviation of levels of urea, creatinine, AST, ALT and ALP after antitumor evaluation in mice with Ehlich's Carcinoma.

Evaluated parameter	Evaluated group				p-value ¹
	0.9% saline	Cisplatin	EERB 250 mg/kg	EERB 125 mg/kg	
Urea	22.00±3.16	20.33±2.25	19.67±1.21	21.67±3.50	0.484
Creatinine	0.55±0.14	0.50±0.09	0.43±0.05	0.48±0.10	0.291
AST	11.07±6.36	15.53±13.44	8.73±4.26	11.57±6.61	0.819
ALT	12.95±6.91	17.87±14.85	10.40±5.07	13.45±7.23	0.751
ALP	21.83±4.49	26.73±6.90	22.33±4.13	23.42±4.27	0.530

¹p-value of the Kruskal-Wallis test (if p-value <0.05 the distribution of the evaluated factor differs between the evaluated groups). AST= aspartate transaminase, ALT= alanine transaminase and ALP= alkaline phosphatase.

The biochemical examination has the purpose of evaluating the metabolic functions performed by the organs and tissues, as well as evidencing occult pathologies [25]. Renal assessment is determined by measuring urea and creatinine. Urea is a product of the catabolism of amino acids and proteins. Produced in the liver, it is the main source of nitrogen excretion of the organism, mainly by the urine, being, therefore, also used to evaluate renal functions [26]. In mice at seven weeks of age, the mean of this metabolite found in serum is 20.7 mg/dL [27]. Creatinine is derived from the catabolism of creatine, which exists in large quantities in the skeletal and cardiac muscles, liver and kidneys, resulting in the production of inorganic phosphate and creatinine, which is normally excreted by the kidneys, mainly by glomerular filtration [28]. Its dosage in eight weeks old mice's plasma has a mean of 0.28 mg / [29].

Hepatic assessment measures alanine transaminase (ALT/SGPT), aspartate transaminase (AST/SGOT) and alkaline phosphatase (ALP) dosages. ALT/SGPT is found abundantly in the liver, in moderate amounts in the kidney and in small amounts in the heart and skeletal muscles. Its origin is predominantly plasma, causing it to rise rapidly after hepatic injury [30]. AST/SGOT is found in various organs and tissues, including heart, liver, skeletal muscle and erythrocytes. It is present in the cytoplasm and mitochondria, so its elevation indicates a deeper cellular involvement [30]. According to Rusyn & Threadgill, The Jacksons Laboratory [27], the average dosage of the parameters mentioned above in seven-week-old mice serum is 41U/L and 152 U/L, respectively. Alkaline phosphatase is composed of a group of membrane-associated isoenzymes, located in several tissues,

but only two are important for diagnosis, bone and hepatobiliary tissue. It is present in the liver (epithelial cells of the bile duct), bones (osteoblasts), intestines, kidneys and placenta. With the exception of growing animals or patients with bone disease, the elevated alkaline phosphatase serum activity is hepatobiliary, mainly due to cholestasis and necrosis due to intrahepatic biliary obstruction [25]. In six-month-old mice, the average ALP found in the serum is 86 U/L [31].

Table 4 shows the mean and standard deviation of the hematological markers according to the evaluated group. The comparison test of the means of the parameters between the evaluated groups was significant only in factor hematocrit (p-value = 0,040). In other parameters, the test was close to significance. The elevated hematocrit value in the group receiving EERB 125 mg / kg may be related to the lowest statistically significant water consumption and consequent dehydration in the acute toxicity evaluation performed in a previous analysis for the LD50.

Table 4. Antitumor evaluation of EERB through hematological markers in Ehrlich Carcinoma mice.

Evaluated parameter	Evaluated group				p-value ¹
	0.9% saline	Cisplatin	EERB 250 mg/kg	EERB 125 mg/kg	
Red blood cells	4475000.00±	5170000.00±	5111666.67±	4651666.67±	0.151
	647047.14	235457.00	336239.00	1047462.01	
Hemoglobin	14.47±0.80	15.52±0.80	15.40±0.93	16.03±1.46	0.070
Hematocrit	42.67±1.75	46.67±2.42	46.00±2.83	48.17±4.45	0.040
MCV	90.68±1.30	91.62±1.49	90.97±0.79	91.85±2.16	0.677
MCH	29.87±0.43	30.08±0.12	30.02±0.04	29.95±0.47	0.360
MCHC	33.03±0.82	33.10±0.11	33.07±0.10	33.12±0.16	0.394
Leukocytes	6666.67	6833.33±	6416.67±	6833.33±	0.965
	±1505.54	1471.96	917.42	1602.08	
Typical lymphocytes	51.50%±3.02	52.33%±4.50	52.50%±2.17	52.33%±1.86	0.956
Neutrophils	41.17%±2.48	40.50%±5.65	41.83%±2.79	42.00%±2.68	0.919
Monocytes	4.00%±1.41	2.83%±1.33	3.50%±2.07	3.33%±1.63	0.617
Eosinophils	3.33%±1.51	4.33%±1.86	2.17%±0.75	2.33%±1.21	0.111
Platelets	238500.00±	177666.67	150833.33±	226666.67±	0.071
	75434.08	17511.90±	41920.96	62295.00	

¹p-value of the Kruskal-Wallis test (if p-value <0.05 the distribution of the evaluated factor differs between the evaluated groups). MCV= mean corpuscular volume, MCH= mean corpuscular hemoglobin and MCHC= mean corpuscular hemoglobin concentration.

Hematology involves the analysis of the concentration, structure and functions of the elements that make up the blood and its products. Among the three major components of the blood are red blood cells (erythrocytes, red blood cells), white blood cells (leukocytes) and platelets (thrombocytes) [32]. The mass of red blood cells is measured by three parameters: red blood cells, hematocrit (Hct) and hemoglobin (Hb). The main function of RBCs is to transport oxygen to tissues, and all accumulated energy is directed to the maintenance of cell shape, membrane structure, and enzymatic functions, among others [33]. The red cell count varies from 7 to 11 x 10⁶/mm³ in mice [34]. The hematocrit is measured by the relative percentage of red blood cells in the total amount of blood [35] and their values in mice are generally between 40 and 50% [34]. Hemoglobin is the main component of red blood cells and is responsible for transporting oxygen (O₂) from the lungs to tissues and returning carbon dioxide (CO₂) to the lungs. Its concentration in mice is between 10 and 17 g/dL [34].

The erythrocyte count indices will provide additional information about the RBCs and hemoglobin. The mean corpuscular volume (MCV) evaluates the average size (volume) of RBCs [35]. The MCV of mice is approximately 45 to 55 fm³. Mean corpuscular hemoglobin (MCH) corresponds to the average hemoglobin amount in each erythrocyte and in mice ranges from 13 to 17 pg. Meanwhile, the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) measures hemoglobin concentration in erythrocytes and is generally around 30 and 38 g/dL in this same species [34].

Leukocytes participate in immune and inflammatory processes and their quantification in rodents includes total and differential counts. Usually their count in rodents is between 2 and 10 x 10³/mm³. The main types of leukocytes evaluated during differential count are lymphocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils and basophils [34,36]. Lymphoid cells assist in the body's innate immune response, but most of them are responsible for mediating the adaptive immunity [37]. Lymphocytes comprise 70-80% of the differential leukocyte count in mice, and may have counts above 80% in young animals [34,36]. Neutrophils present the first line of defense against invasion of microorganisms, tissue trauma or some inflammatory signal such as circulating phagocytes and modulators of the immune response. Its count in mice is between 20 and 30% of the total leukocyte count [34,36]. Monocytes are the cells responsible for phagocytosis and destruction of bacteria [38]. In this species they comprise from 0 to 2% of the total leukocyte count [34,36]. Eosinophils are mediating cells of the pathogenesis of many inflammatory processes along with basophils, including helminth infections and allergic diseases. Its percentage in mice represents from 0 to 7% of the total leukocyte count [34,36].

Platelets, in addition to hemostatic function, also play an important role in the maintenance of endothelium integrity, through the release of proangiogenic cytokines and growth factors [39]. Its count is between 900 and 1600 x 10³/mm³ [34].

The discovery of new drugs that have an antineoplastic function, with insignificant side effects, is a goal for all researchers. Natural products represent the most abundant and accessible source of substances with unusual structure, often described so far [40].

Due to the large number of pharmacological applications of plant substances, recent studies have investigated the antitumor activities of these natural products [41,42]. These factors, coupled with the limited effect of synthetic drugs on chronic diseases, have stimulated the search for medicinal plants as a therapeutic alternative, with very satisfactory results [43].

Laboratory animals represent a powerful experimental system for understanding the intricate pathogenesis of cancer in humans. Most of the concepts of tumorigenesis currently accepted are strongly influenced by models of cancer development in mice, since these organisms are accessible models and have systems, organs and genes similar to ours [44].

As shown in the results, EERB 250 mg/kg showed activity when used in the treatment of Ehrlich's Carcinoma in mice. This tumor is an experimental model of a fast-growing transplantable tumor of epithelial origin that has a very aggressive behavior and has been widely cited in the literature for investigation of the antitumor properties of new therapeutic agents [45-47]. We found that the higher dose had greater inhibition, clearly showing that the effect of EERB is in this case dose-dependent.

Studies of plants of the same cactaceae family demonstrate effective antitumor activity as assessed by Orozco-Barocio [48], which evaluated the response of *Lophocereus schottii* to gastrocnemius muscle solid-lymphoma in mice, measuring tumor volume. Slower tumor development was observed in the animals treated with 100 mg/kg of the extract injected both intratumorally and intramuscularly in comparison to the group receiving 50 mg/kg and to the control group. The references found indicated that the whole plant and stem contain alkaloids [49,50] as well as triterpenes [51]. It is known that alkaloids generally have anticancer effects and reduce the development of tumors [52-55]; Likewise, a number of triterpenoids have been shown to be promising as antineoplastic agents and exhibit antiproliferative activity when tested against various cancer cell lines. Reports have shown that triperpenes directly inhibit tumor growth, cell cycle progression and induce apoptosis of tumor cells under in vitro and in vivo conditions [56-60].

Abdul Malek et al [61] evaluated the activity of *Pereskia bleo* (Kunth) DC (Cactaceae) against the normal MRC5 cell line, a human lung fibroblast cell line, where the extract evaluated was not as effective as doxorubicin, which is used as standard. This result supports the claim that doxorubicin is a potent cytostatic drug that is used for the treatment of cancerous diseases, but the routine use of this drug can bring about a significant adverse effect [62]. Although the cytotoxicity of *Pereskia bleo* are not as effective as doxorubicin, they do, have a lower toxicity against the normal MRC5 cell line compared to doxorubicin. Thus, their use in combination with cytotoxic therapeutic drugs may reduce the adverse effects of some of these drugs. Amir et al. [63], who reported that, in addition to possessing potent anti-tumor properties as unique agents, the natural products also demonstrated

potential synergy with cytotoxic therapeutic drugs established in preclinical studies, provide support for this suggestion.

A review article by Harlev et al [17] on the preventive and curative properties of cancer in plants of the Cactaceae family has revealed studies conducted using several cancer cell lines, providing impressive evidence of anticancer activities. However, a limited number of studies have documented similar results using in vivo tumor models. If it is accessible or not the replicate the concentrations revealed in the in vitro activity in laboratory animal's blood or serum. In fact, the same bioactive plant or component has not been studied in both in vitro and in vivo systems.

No studies were found in the literature with evaluation of antitumor action, concerning the species *Rhipsalis bacciferam*. The mechanism by which *R. baccifera* showed antitumor activity could not be elucidated. Its inhibitory action may be related to the presence of flavonoids and triterpenes since they may act at different stages of tumor development due to their action against oxidative DNA damage, inactivation of carcinogenic agents, inhibiting the mutagenic expression of genes and enzymes responsible for activation of procarcinogenic substances [64], since these classes of compounds have already tested pronounced anticancer activity [65-67].

Conclusion

It can be concluded that EERB showed significant tumor inhibition in comparison to the control group for Ehrlich's Carcinoma. With a percentage of tumor growth inhibition of 84.1% and 75.8% at doses of 250 mg/kg and 125 mg/kg of weight, respectively, in Swiss albino mice (*Mus musculus*). However, more detailed studies using other administration routes of the extract, as well as the use of other tumor cell lines, are suggested.

Compliance with Ethical Standards

Financing: It has no financing agency.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval: All applicable international, national and / or institutional guidelines for the care and use of the animals have been followed. All procedures performed in studies with animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice in which the studies were performed.

Referências

1. DAGLI MLZ, GUERRA JL, SALDIVA PHN (1989) An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., v.29, p.97-103;
2. MATSUZAKI P (2004) Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffiapaniculata* sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo;

3. NOGUEIRA IAL (2008) Atividade antitumoral e antiangiogênica de *Synadenium umbellatum* Paxin vitro e in vivo. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia;
4. RIBEIRO AFC (2012) Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Toxicologia e Plantas Tóxicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte;
5. PALERMO JN, MASSOCO CO, SOUZA WR (2003) Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behavior and Immunity*; v.17, p.:43-54;
6. VALADARES MC, QUEIROZ MLS (2002) The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂NCS₂ on the hematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. *Eur J Pharmacol*; v.439, p.35-42;
7. GUERRA JL (2002) Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. *Fitoterapia*, v.73, p.730-733;
8. RANG HP, DALE MM (2001) *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;
9. ARAÚJO EC et al (2007) Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). *Revista Espaço para a Saúde*, Londrina, v.8, n.2, p.44-52;
10. BRASIL (2009) Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa/2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA;
11. FERREIRA P M P et al (2001) Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais Academia Brasileira Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1373-1384;
12. FERREIRA PMP et al (2011) Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, p. 1045-1058;
13. LIU J, OUYANG L, CHEN Y, LIU B (2013) Plant natural compounds targeted cancer cell autophagy: research advances. *Journal of International Pharmaceutical Research*, v. 40, n. 6, p. 688-694;
14. ULLAH MF et al (2014) Chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. *Phytochemistry Reviews*, p. 1-23;
15. OLIVEIRA LP, PINHEIRO RC, VIEIRA MS, PAULA JR, BARA MTF, VALADARES MC (2010) Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(2): 201-207;
16. SENEL S & McCLURE SJ (2004) Potencial applications of chitosan in veterinary medicine, *Advanced Drug Delivery Review*: 56(10): 1467-1480;
17. HARLEV E et al (2013) Cancer Preventive and Curative Attributes of Plants of the Cactaceae Family: A Review. *Planta Med* 79: 713–722;
18. HARLEV E, NEVO E, LANSKY EP, LANSKY S, BISHAYEE A (2012) Anticancer attributes of desert plants: a review. *Anticancer Drugs* 33: 255–271;
19. HARLEV E, NEVO E, LANSKY EP, OFIR R, BISHAYEE (2012) A. Anticancer potential of aloes: antioxidant, antiproliferative and immunostimulatory attributes. *Planta Med* 78: 843–852;
20. HARLEV E, NEVO E, MIRSKY N, OFIR R (2013) Antidiabetic attributes of desert and steppic plants: a review. *Planta Med* 79: 425–436;
21. BARTHLOTT W (1883) Biogeography and evolution in Neo and Paleotropical Rhipsalinae (Cactaceae). Dispersal and Distribution: An Internacional Symposium, Sonderbande Des Naturwissenschaftlichen vereins. Hamburg, 7: 241-248;
22. STOCK CC, CLARCK DA, PHILIPS FS (1955) Sarcoma 180 - inhibitor screening date. *Cancer Res.*, v.15, n.2, p.2-3;

23. KOMIYAMA K. & FUNAYAMA S (1922) Antitumor agentes. In: OMURA, S. (edt). The search for bioactive compounds from microorganisms. New York: Spriger-Verlag, p. 79-97;
24. NACHON Z et al (1981) Chemical and biological properties of 3-pyridil-benzyl-carbind. Archivium immunological et Therapiae Experimentalis, v. 29, p.217-233;
25. FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC (2000) Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins;
26. BURTIS CA, ASHWOOD ER, BRUNS DE (Eds) (2008) Tietz Fundamentos de Química Clínica. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier;
27. RUSYN I, THREADGILL DW (2010) Effects of trichloroethylene in males of 17 inbred mouse strains. MPD:Rusyn2. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 20 Feb 2012;
28. GUYTON SC, Hall JE (2006) Tratado de Fisiologia Médica. 11a ed. Rio de Janeiro: Elsevier;
29. RIKEN BioResource Center / Experimental Animal Division (2008) Blood chemistry, hematology, and body size for 33 RBRC wild-derived mouse strains. MPD:37811. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 10 Jan 2012;
30. SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, FÉRARD G, FERRERO CA, FRANCK PF et al (2002) IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gammaglutamyltransferase. Clin Chem Lab Med. 40(7): 734-8;
31. YUAN R, KORSTANJE R (2008) Aging study: Blood chemistry for 32 inbred strains of mice. MPD:Yuan3. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 4 Jan 2012;
32. LEWIS SM, BAIN BJ, Bates I (2006) Dacie and Lewis practical haematology. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier;
33. HOFFBRAND AV, PETTIT JE, MOSS PAH (2001) Essential haematology. 4th ed. Oxford: Wiley-Blackwell;
34. WEISS DJ, WARDROP KJ (Eds) (2010) Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Ames: Wiley Blackwell;
35. BAIN BJ (2006) Blood cells: a practical guide. 4^a ed. Oxford, UK: Blackwell;
36. HEDRICH HJ (Ed) (2004) The Laboratory Mouse. London: Academic Press;
37. TURGEON ML (2005) Clinical hematology: theory and procedures. 4th ed. Hagerstown: Lippincott Williams & Wilkins;
38. BRANDT CT, LEITE CRC, MANHÃES-DE-CASTRO R, BRANDT FILHO C, CASTRO CMMB (2003) Aderência e atividade microbiciada de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica cirúrgica. Acta Cir Bras; 18(2): 143-153;
39. KAPLAN ZS, JACKSON SP (2011) The Role of Platelets in Atherothrombosis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. pp 51-61. PubMed; PMID 15867408;
40. YOUNES RN, VARELLA AD, SUFFREDINI IB (2000) Seleção, extração e identificação de drogas novas anticâncer de plantas brasileiras. Revista Oncológica Brasileira, art.2, p.1-10;
41. KIDD PM (2000) The use of mushroom glucans and proteoglycans in câncer treatment. Alternative Medicine Review. 5: 4-27;

42. ALVES APNN, GUEDES RC, COSTA-LOTUFO LV, MORAES MEA, PESSOA CO, FERREIRA FVA, MORAES MO (2004) Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinoma de Walker 2561. *Acta cirúrgica brasileira*. 19(4): 251-258;
43. RATNER BD & BRYANT SJ (2004) Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 6: 41-75;
44. KAMB A (2005) What's wrong with our cancer models? *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 4, n. 2, p. 161-165;
45. AJITH TA & JANARDHANAN KK (2003) Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 157-162;
46. KANENO R, FONTANARI LM, SANTOS AS, DISTASI LC, RODRIGUES FILHO E, EIRA AF (2004) Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*. 42(6): 909-916;
47. MELO PS, JUSTO GZ, DURÁN N, HAUN M (2004) Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. *European Journal of Pharmacology*. 487: 47-54;
48. OROZCO-BAROCIO A et al (2013) CYTOTOXIC EFFECT OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *LOPHOCEREUS SCHOTTII*: AMEXICAN MEDICINAL PLANT. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 10(3):397-404;
49. WANI MC, Thompson JB, Taylor HL, Wall ME, Miller RW, Mc Phail AT (1980) X- ray crystal and molecular structure of the racemic dimeric tetrahydroisoquinoline alkaloid lophocine, probably an artifact, from *Lophocereus schottii*. *Journal of Chemical Research- S*. (1):15;
50. KIRCHER HW (1969) The distribution of sterols, alkaloids and fatty acids in senita cactus, *Lophocereus schottii*, over its range in Sonora, México. *Phytochemistry*, 8: 1481-1488;
51. ARGUETA-VILLAMAR A, CANO-ASSELEIH LM, RODARTE Me (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. Instituto Nacional Indigenista México 1028;
52. WANG GY, LV QH, DONG Q, XU RZ, DONG QH (2009) Berbamione induces Fas mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and inhibits its tumor growth in nude mice. *Journal of Asian natural products research*. 11(3): 219 – 228;
53. PETTIT GR, DUCKI S, EASTHAM SA and MELODY N (2009) Antineoplastic Agents. 454. Synthesis of the Strong Cancer Cell Growth Inhibitors trans-Dihydronarciclasine and 7-Deoxy-trans-dihydronarciclasine. *Journal Natural Products*. 72, 1279–1282;
54. LI CH, LEE D, GRAF TN, PHIFER SS, NAKANISHI Y, RISWAN S, SETYOWATI FM, SARIBI AM, SOEJARTO DD, FAMSWORTH NR, FALKINHAM JO, KROLL DJ, KINGHOM AD, WANI MC and OBERLIES NH (2009) Bioactive Constituents of the Stem Bark of *Mitrephora glabra*. *Journal Natural Products*. 72(11): 1949–1953;
55. STAERK D, LYKKEBERG AK, CHRISSTENSEN J, BUDNIK JB, ABE F and JAROSZEWSKI JW (2002) In Vitro Cytotoxic Activity of Phenanthroindolizidine Alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Journal Natural Products*, 65, 1299-1302;
56. PALANIMUTHU D, BASKARAN N, SILVAN S, RAJASEKARAN D, MANOHARAN S (2012) Lupeol, a bioactive triterpene, prevents tumor formation during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced oral carcinogenesis. *Pathology and Oncology Research*. 18(4):1029-37;
57. MISAWA E, TANAKA M, NOMAGUCHI K, NABESHIMA K, YAMADA M, TOIDA T, IWATSUKI K (2012) Oral ingestion of Aloe vera phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (11):2799-806;
58. SIDDIQUE HR, SALEEM M (2011) Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sciences*. 14; 88(7-8):285-93;

59. HE Y, LIU F, ZHANG L, WU Y, HU B, ZHANG Y, LI Y and LIU H (2011) Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Lupeol, a Dietary Triterpene, in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(4) 517—522;
60. SALEEM M (2009) Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*. 28; 285(2): 109-115;
61. ABDUL MALEK SN et al (2009) Cytotoxic Components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) Leaves. *Molecules*, 14, 1713-1724;
62. GILLE L, KLEITER M, WILLMANN M, NOHL H (2002) Paramagnetic species in the plasma of dogs with lymphoma prior to and after treatment with doxorubicin An ESR study. *Biochem. Pharmacol*. 64, 1737-1744;
63. AMIR D, SUNIL K, GAUTAM S, BHARAT BA (2007) Back to basics: how natural products can provide the basis for new therapeutics. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 16, 1753-1773;
64. BENAVENTE-GARCIA O, CASTILLO J (2008) Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*. Aug 13;56 (15):6 p.185-205;
65. CAI Y, LUO Q, SUN M, CORKE H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157-2184;
66. FERNANDES J, DA FONSECA CO, TEIXEIRA A, GATTASS CR (2005) Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. *Oncology Reports*. 13: 9430947;
67. KUO SM (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letter*. 10: 41-48.

5. CONCLUSÕES

A partir da análise fitoquímica do EERB, foi possível definir a presença de alcaloides, flavonoides, terpenos, triterpenos e fenilpropanóides em *Rhipsalis baccifera*. Assim recomenda-se novas pesquisas para avaliar diferentes componentes e influências ambientais.

A avaliação da toxicidade in vitro com *A.salina* na avaliação EERB foi simples e eficiente revelando alta citotoxicidade. No entanto, resultados com outras espécies da mesma família são divergentes, necessitando de outros estudos para melhor avaliação. O EERB apresentou baixa toxicidade aguda para os camundongos, apresentando alto potencial para uso. Outras investigações envolvendo estudos pré-clínicos e clínicos do extrato serão necessárias para determinar a dose segura antes que ela seja prescrita como uma droga, a fim de proteger a população dos possíveis efeitos tóxicos.

Ao término do trabalho, concluímos que o EERB apresentou inibição tumoral significativa em relação ao grupo controle para o Carcinoma de Ehrlich. Com um percentual de inibição do crescimento tumoral de 84,1% e 75,8% nas doses de 250 mg/kg e 125 mg/kg de peso em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), respectivamente. Sugere-se, no entanto, estudos mais detalhados utilizando outras vias de administração do extrato, bem como a utilização de outras linhagens tumorais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, é absolutamente satisfeitos ao verificar que um extrato possui propriedades antitumorais e ainda com a vantagem de possuir menos efeitos colaterais com baixa toxicidade, além de ser eficaz em camundongos através do uso oral, administrado somente uma vez ao dia. O extrato parece ser muito promissor no tratamento do câncer e possivelmente com menos efeitos colaterais. Serão necessários mais estudos em torno do extrato de *Rhipsalis baccifera*, inclusive visando reproduzir em ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.R.G.S.. et al. **Evaluation of hypoglycemic potencial and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae).** Latin American Journal of Pharmacy. v. 30, p. 96-100. 2011;
- ALVES, A.P.N.N; GUEDES, R.C; COSTA-LOTUFO, L.V; MORAES, M.E.A; PESSOA, C.; FERREIRA, F.V.A; MORAES, M.O. **Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinoma de Walker 2561.** Acta cirúrgica brasileira. 19(4): 251-258, 2004;
- AMOROZO, M.C.M. **Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil.** Atlas Botânica Brasília. São Paulo, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2012;
- ANDERSON, E.F. **The Cactus Family.** Timber Press. Portland, EUA. p776. 2001;
- ANDRADE, C.T.S. et al. **Utilização de cactáceas por sertanejos baianos.** Sitientibus. 6: 3-12. 2006;
- BARTHLOTT, W; HUNT, D. Cactaceae. *In*: K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Bittrich (eds.). **The families and genera of vascular plants.** Flowering plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Springer-Verlag, Berlin. v. 2. pp. 161-197. 2003;
- BEDNARCZUK, V.O. et al.. **Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais.** Visão Acadêmica, Curitiba. v.11, n. 2, p.44. 2010;
- BENAVENTE-GARCIA, O; CASTILLO, J. **Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity.** J Agric Food Chem. Aug 13;56 (15):6 p.185-205, 2008;
- BENZING, D.H. **Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity.** Annals of the Missouni Botanical Garden. 74: 183-204. 1987;
- BONASSA, E.M.A. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. *In*: BONASSA E.M.A; SANTANA, T.R. **Enfermagem em terapêutica oncológica.** 3a ed. São Paulo: Atheneu. p. 3-19. 2005;

CALVENTE, A.M. **Filogenia molecular, evolução e sistemática de *Rhipsalis* (Cactaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010;

CALVENTE, A.M. et al. **Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora***. Molecular Phylogenetics and Evolution. 58:456-468. 2011;

CRAVEIRO, A.C.S. et al. **Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais**. Rev Bras Farmacogn 18 (Supl.). 739-743. 2008;

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehlich: estudo experimental**. São Paulo, USP, 1989, p. 148. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 1989;

DARLING, M.S. **Epidermis and hypodermis of the saguaro cactus (*Cereus giganteus*): anatomy and spectral properties**. American Journal of Botany 76: 1698-1706. 1989;

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F; FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea & Febiger. p. 209. 1982;

EHRlich, P; APOLANT, H. **Beobachtungen über maligne mausetumoren**. Berl Klin Wschr. 28:871-4. 1905;

EHRlich, P. **Experimentelle carcinomstudien an Mäusen**. Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt. v.1, p. 78-80. 1906;

FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A.; GATTASS, C.R. **Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells**. Oncology Reports. 13: 9430947, 2005;

GIBSON, A.C; NOBEL, P.S. **The cactus primer**. Haward University Press, Cambridge. 1986;

GORDALIZA, M. **Natural products as leads to anticancer drugs**. Clin Transl Oncol 9: 767 – 776. 2007;

GUERRA, J.L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de ehrlich**. 79f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 1983;

GUERRA.J.L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich**. Fitoterapia, v.73, p.730-733, 2002;

HARLEV, E. et al. **Cancer Preventive and Curative Attributes of Plants of the Cactaceae Family: A Review**. Planta Med 79: 713 – 722. 2013;

HUNT, D; TAYLOR, N.P; CHARLES, G. **The new cactus lexicon**. Dhbooks, London. 2006;

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2ª. Ed. Rio de Janeiro: INCA. 2013;

JACOBO-SALCEDO, M.R. et al. **Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants**. Natural Product Communications 6(12)1925 – 1928. 2011;

JEMAL, A. et al. **Global câncer statistics**. CA Cancer J Clin ; 61: 69–90. 2011;

KAMB, A. **What's wrong with our cancer models?** Nature Rev. Drug Discov., v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005;

KIDD, P.M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in câncer treatment. Alternative Medicine Review. 5: 4-27, 2000;

KLEIN, G., KLEIN, E. **The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into a “ascite tumor”**. Cancer Res:11:466-9. 1951;

KOMIYAMA, K. & FUNAYAMA, S. Antitumor agentes. In: OMURA, S. (edt). **The search for bioactive compounds from microorganisms**. New York: Spriger-Verlag, p. 79-97, 1992;

LAPA, A.J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. (Ed). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina. p.181-196. 1999;

LAPA, A.J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). 74p. 2001;

Li, C.h.; Lee, D.; Graf, T.N.; Phifer, S.S.; Nakanishi, Y.; Riswan, S.; Setyowati, F.M.; Saribi, A.M.; Soejarto, D.D.; Farnsworth, N.R.; Falkinham, J.O.; Kroll, D.J.; Kinghorn, A.D.; Wani, M.C. and Oberlies, N.H. **Bioactive Constituents of the Stem Bark of *Mitrephora glabra***. Journal Natural Products. 72(11): 1949–1953, 2009;

LOEWENTHAL, H, JAHN, G. **Übertraungsversuche mit carcinomatosis mause ascitesflussigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemise einwirkungen**. Z Krebsforsch;37:439-47. 1932;

LUNA, J.S. et al. **A study of the larvicidal and molluscicidal activies of some medicinal plants from northeast Brazil**. Journal of Ethonopharmacology. v.97, p. 199-206. 2005;

MARLIÉRE, L.D.P. et al. **Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil**. Rev Bras Farmacogn 18 (Supl.). p754-760. 2008;

MCLAUGHLIN, J.L; CHANG, C.J; SMITH, C.J. Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds: Review of recent progress. In KINGHORN, A.D; BALANDRIN, M.F. (Eds). **Human Medicinal Agents from Plants**. Washington. DC: American Chemical Society. p.112-134. 1993;

MCLAUGHLIN, J.L; ROGERS, L.L; ANDERSON, J.E. **The use of biological assays to evaluate botanicals**. Drug Inf. J., 32: p513-524. 1998;

MEYER, B.N. et al. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents**, Planta Medica. vol. 45, no. 1, pp. 31-34. 1982;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas e Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf. Brasília. 2006;

MYERS, N. et al. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature 403: 853-858. 2000;

NACHON, Z. et al. Chemical and biological properties of 3-pyridil-benzyl-carbind. **Archivium immunological et Therapiae Experimentalis**, v. 29, p.217-233, 1981;

NASCIMENTO, J.E. et al. **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae).** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 29, p. 143-148. 2008;

NOBEL, P.S. **Surface temperatures of cacti-influences of environmental and morphological factors.** Ecology 59: p986-996. 1978;

NYFFELER, R. **Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences.** American Journal of Botany 89: 312–326. 2002;

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423.** Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: OECD. 2001;

OGA, SEIZI; CAMARGO, MARCIA MARIA DE A.; BATISTUZZO, JOSÉ ANTÔNIO DE O. **Fundamentos de Toxicologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014;

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. **Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth.** *Brain Behav. Immun.* v.17, p. 43-54. 2003;

PARRA, L.A. et al. **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L.and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.** *Phytomedicine*, 8: 395-400. 2001;

PETTIT, G.R.; DUCKI, S.; EASTHAM, S.A. and MELODY, N. **Antineoplastic Agents. 454. Synthesis of the Strong Cancer Cell Growth Inhibitors trans-Dihydronarciclasine and 7-Deoxy-trans-dihydronarciclasine.** Journal Natural Products. 72, 1279–1282, 2009;

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington, D.C.: Hemisphere. 1985;

RATNER, B.D. & BRYANT, S.J. **Biomaterials: where we have been and where we are going**. Annual Review of Biomedical Engineering. 6: 41-75, 2004;

SAAD, B. **Safety of traditional Arab herbal medicine**. Evidence-based Complementary and Alternative. v. 3, p. 433-439. 2006;

SAKLANI, A., KUTTY, S.K. **Plant-derived compounds in clinical trials**. Drug Discovery Today, 13, 161-171. 2008;

SEGURA, J.A; BARBERO, L.G; MÁRQUEZ, J. **Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation**. *Immunol. Lett.* v.74, p.111-115. 2000;

SCHEINVAR, L. **Cactáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1985;

SHAW, D. **Toxicological Risks of Chinese Herbs**. Planta Medica. v. 76, p. 2012-2018. 2010;

SILVA, A.E. **Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos**. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003;

SILVEIRA, P.F; BANDEIRA, M.A.M; ARRAIS, P.S.D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade**. *Rev Bras Farmacogn* 18: 618-626. 2008;

SINITOX. **Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região**. Brasil. 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf>;

STOCK, C. C.; CLARCK, D. A.; PHILIPS, F. S. **Sarcoma 180 - inhibitor screening date**. Cancer Res., v.15, n.2, p.2-3, 1955;

TAYLOR, N.P. Cactaceae. *In* **Cactus and Succulent Plants – Status Survey and Conservation Action Plan (S. Oldfield, ed.)**. Species Survival Commission/Cactus and Succulent Specialist Group Species, Gland. Switzerland and Cambridge. 214p. 1997;

TAYLOR, N.P; ZAPPI, D.C. **Cacti of Eastern Brazil**. The Royal Botanic Gardens, Kew. 2004;

VEIGA-JUNIOR, V.F; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura ?** Química Nova. v. 28, p. 519-528. 2005;

VENSON, R. et al. **Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná**. Physis: Revista de Saúde Coletiva. v. 21, p. 359-376. 2011;

YOUNES, R.N; VARELLA, A.D; SUFFREDINI, I.B. **Seleção, extração e identificação de drogas novas anticâncer de plantas brasileiras**. Revista Oncológica Brasileira, art.2, p.1-10, 2000;

YUNES, R.A; PEDROSA, R.C; CECHINEL, F.V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. Química Nova. 24(1):147-152. 2001;

ZAPPI, D; AONA, L.Y.S; TAYLOR, N.P. Cactaceae. *In*: M.G.L, Wanderley et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo. v.5, pp. 163-193. 2007;

ZAPPI, D; TAYLOR, N.P; MACHADO, M. Cactaceae. *In*: R.C. Forzza et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. CNCFlores, Andrea Jacobson Estúdio, Rio de Janeiro. v.1, pp. 822-833. 2010;

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis. **Springer**. Second edition. 1998.

WALLACE, R.S; GIBSON, A.C. Evolution and Systematics. *In* **Cacti: biology and uses** (P.S. Nobel, ed.). University of California Press, Berkeley. p. 1-21. 2002;

WANG, G.Y; LV, Q.H; DONG, Q; XU, R.Z; DONG, Q.H. **Berberine induces Fas mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and**

inhibits its tumor growth in nude mice. Journal of Asian natural products research. 11(3): 219 – 228, 2009;

WUNSCH FILHO, V; MONCAU, J. E. **Mortalidade por Câncer no Brasil:** Padrões Regionais e Tendências Temporais. Rev Assoc Méd. 3: 250-57. 2012.

ANEXO A – Exsicata de *Rhipsalis baccifera*

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Herbário UFP – Geraldo Mariz

Nº:

Fam.: Cactaceae

Sp.: *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn

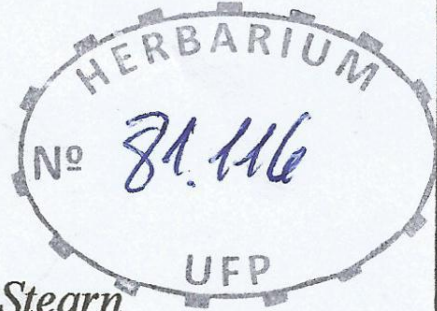
Nome vulgar: cacto-macarrão, ripsális

Col.: Jéssica Alves Cavalcante (01) 01/III/2016.

Det.: MARLENE BARBOSA 01/III/2016

Proc.: BR – PE – Recife – Cidade Universitária –
 campus da Universidade Federal de Pernambuco; ao
 lado do Departamento de Patologia.

Obs.: com frutos; presença de formigas.



ANEXO B – Parecer da comissão de Ética no uso de animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 23 de março de 2017.

Ofício nº 18/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Ivone Antônia de Souza**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

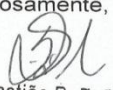
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.041254/2016-75**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico de *Rhipsalis baccifera*(Sol.) Stearn(Cactaceae)** registrada com o nº**23076.041254/2016-75** sob a responsabilidade de Prof.ª **Ivone Antônia de Souza** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2016 a 30/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênicos(Swiss)
Nº de animais	40
Peso/Idade	25- 40g 60dias
Sexo	fêmea
Origem	Biotério do Detpa de Antibióticos

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

