



# Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae

Ligianne P. Oliveira,<sup>1</sup> Renata C. Pinheiro,<sup>1</sup> Marcelo S. Vieira,<sup>1</sup> José Realino Paula,<sup>2</sup>  
Maria Teresa F. Bara,<sup>2</sup> Marize C. Valadares<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás,  
Praça Universitária, 1166-Setor Universitário, 74605-220 Goiânia-GO, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás,  
Praça Universitária, 1166-Setor Universitário, 74605-220 Goiânia-GO, Brasil.

**RESUMO:** *Punica granatum* L., Punicaceae, amplamente usada no Brasil, foi avaliada quanto ao seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Investigou-se *in vitro* a citotoxicidade do extrato etanólico do fruto e folha da *P. granatum* utilizando células K-562 e células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), pelos métodos de redução do MTT e exclusão do azul de tripano. Nos estudos *in vivo* avaliou-se o aumento da sobrevida de animais portadores do TAE e tratados, por via oral, com diferentes doses dos extratos etanólicos da *P. granatum* (12,5; 25; 50 e 100 mg/kg) por dez dias consecutivos. Além disso, nestes animais analisou-se o potencial de inibição tumoral e a atividade antiangiogênica da *P. granatum*. Os resultados dos estudos *in vitro* demonstraram uma redução na viabilidade das células K-562 e do TAE, concentração-dependente, nos métodos investigados. Os resultados *in vivo* demonstraram aumento da sobrevida dos animais portadores do TAE tratados, de forma dose-dependente. Em paralelo, observou-se diminuição do número de células tumorais na cavidade peritoneal dos animais portadores e tratados. Além disto, os tratamentos empregados reduziram o padrão de vascularização da parede abdominal. Dessa forma, os dados apresentados revelaram que o extrato de *P. granatum* possui atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em paralelo a redução da angiogênese peritoneal.

**Unitermos:** *Punica granatum*, Punicaceae, atividade antitumoral, citotoxicidade, angiogênese, tumor ascítico de Ehrlich.

**ABSTRACT:** “Cytotoxic and antiangiogenic activities of *Punica granatum* L., Punicaceae”. *Punica granatum* L., a plant widely used in Brazil, was tested for its antitumor and antiangiogenic activities *in vitro* and *in vivo*. In this work, the *in vitro* cytotoxicity was evaluated using the K-562 cell line and Ehrlich ascites tumour cells, by MTT tetrazolium reduction test and the trypan blue exclusion test. *In vivo* studies investigated the increase in the survival time of Ehrlich tumour-bearing mice after treatment with different doses of *Punica granatum* L. ethanol extract (12.5; 25; 50 e and 100 mg/kg), by gavages, for ten consecutive days. In addition, we also investigated the tumour inhibition potential and antiangiogenic activity of this plant. *In vitro* results demonstrated a decrease of K-562 and Ehrlich ascites tumour cells viability, with both methods used, in a dependent-manner concentration. *In vivo* results showed a significant antitumor activity against Ehrlich ascites tumour growth, increasing survival time. In parallel, we detected a significant inhibition of the tumour growth, along with a decrease in the vascular pattern of the peritoneal wall. Thus, the data presented herein clearly showed that *Punica granatum* L. has antitumor and antiangiogenic activities.

**Keywords:** *Punica granatum* L., Punicaceae, cytotoxicity, angiogenesis, Ehrlich ascites tumor.

## INTRODUÇÃO

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, apontam que ocorrerão aproximadamente 490 mil casos novos de câncer, número válido também para 2011. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, serão os cânceres de próstata e de

pulmão em homens e, os cânceres de mama e de colo do útero em mulheres (INC, 2009).

Apesar dos variados esforços despendidos na busca de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer, o sucesso nos tratamentos medicamentosos tem se mostrado discreto, não somente pelo grau de agressividade da doença ou pelos mecanismos de escape das células neoplásicas, mas também pela toxicidade medular exercida

\*E-mail: marizecv@farmacia.ufg.br, Tel/Fax: + 55 62 3209 6044 R 227.

pelos agentes antineoplásicos clássicos (Rafferty et al., 1996; Newmann, 2003).

O modelo experimental do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) tem sido amplamente empregado como ferramenta em estudos que buscam a elucidação de mecanismos de ação antitumoral de novas substâncias. Este modelo é de fácil manejo, facilmente transplantável e permitiu o crescimento tumoral na forma sólida, subcutâneo, e ascítica na cavidade peritoneal dos animais (Chen & Watkins, 1970).

*Punica granatum* L., Punicaceae, conhecida popularmente como romanzeira, romeira e granado, é amplamente distribuída por todo Brasil sendo originária da Ásia (Braga, 1961). Dentre os fitoconstituintes presentes na planta, destacam-se flavonóides (apigenina e narigenina), antocianinas, taninos (ácidos gálico e elágico), alcalóides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados (ácido púnico) e o ácido ursólico (Lansky & Newmann, 2007).

A romanzeira é popularmente usada para o tratamento de um grande número de doenças inflamatórias e infecciosas, incluindo lesões e abscessos de pele e mucosas, amidalites, faringites, estomatites, gengivite, glossite, afecções febris, diarreias de origem bacteriana e parasitária, cólicas, hemorróidas, infecções de vias urinárias e genitais, viroses em geral, infecções por fungos, conjuntivites e doenças respiratórias, como bronquites (Jimenez et al., 1979; Sivarajan & Balachandran, 1994; Zhang et al., 1995; Longuefosse & Nossin, 1996; Navarro et al., 1996; Fengchun et al., 1997; Jassim, 1998; Holetz et al., 2002).

Recentemente, estudos têm mostrado atividade citotóxica de extratos de diferentes partes de *P. granatum* em uma série de subtipos de células tumorais (Jeune et al., 2005). Alguns dos trabalhos demonstraram que o suco do fruto da *P. granatum* além de retardar a oxidação e a síntese de prostaglandinas, pode inibir a proliferação de células tumorais, reduzir a invasão tumoral, promover a apoptose e ainda inibir a formação de vasos no modelo *in vitro* da membrana corioalantóide (Toi et al., 2003).

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (González, 2000). O crescimento tumoral demanda grande aporte nutricional sendo crucial o aumento da angiogênese local (Haubner et al., 1997; Nicolaou, 1998). Desta forma, a angiogênese é um ponto chave de uma série de eventos fisiológicos e patológicos para o crescimento tumoral e disseminação metastásica, o que faz de todos os mecanismos que participam da angiogênese alvos promissores para a terapêutica antitumoral (González, 2000). Neste cenário, diante de evidências da literatura de efeitos antiangiogênicos da *P. granatum*, fez-se importante investigar os potenciais efeitos desta planta sobre o crescimento e angiogênese tumoral (Lansky & Newmann, 2007).

Diante dos dados acima, o presente estudo investigou a atividade antitumoral do extrato etanólico do

fruto e das folhas de *P. granatum in vitro* e *in vivo*. Os efeitos citotóxicos foram avaliados *in vitro* em linhagens leucêmicas de células K-562 e células ascíticas do TAE. A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada em camundongos portadores do TAE e tratados com diferentes doses dos extratos. Em adição, a capacidade de inibir o crescimento do TAE e o efeito antiangiogênico *in vivo* também foram analisados.

## METODOLOGIA

### Extrato etanólico de *Punica granatum*

O material botânico (folha e fruto) de *P. granatum* foi colhido em junho de 2005, em Goiânia-GO (768 m de altitude; 16°40'33,3" S e 49°14'39,5" O). O material foi identificado pelo Professor Associado da disciplina de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia-Universidade Federal de Goiás, Dr. José Realino de Paula. Exsicata foi depositada com a identificação UFG-41497.

As folhas da planta foram secas em estufa a 40 °C, pulverizadas e maceradas em álcool etílico 95%. O material resultante foi filtrado e rotaevaporado a pressão reduzida, a 40 °C. Para maior remoção do solvente, o extrato foi levado à estufa a 40 °C por cerca de 10 h. O extrato do fruto foi preparado seguindo o mesmo procedimento para a preparação do extrato da folha, exceto que o fruto foi triturado antes da extração com o álcool etílico 95%.

### Linhagem celular

As células K-562 foram cultivadas em meio RPMI 1640 medium (Gibco BRL Co., Grand Island, NY) com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina G e 2mM de L-glutamina, em estufa úmida, com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C. As células foram repassadas duas vezes na semana e utilizadas na fase exponencial de crescimento. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão de azul de tripano e de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]).

### Animais

Foram utilizados camundongos Swiss com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pela Indústria Química do Estado de Goiás. Os animais foram agrupados ao acaso em caixas de polipropileno, em sala climatizada sob temperatura constante de 26±2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecidos *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade (CEPMHA/HC/UFG n°: 162/06).

## Tumor ascítico de Ehrlich

O TAE foi mantido em camundongos Swiss por meio de passagens sucessivas intraperitoneais. A suspensão de células tumorais foi preparada com uma solução salina balanceada com pH 7,4, até a obtenção final de uma concentração de  $2 \times 10^6$  células viáveis/mL. Camundongos foram inoculados por via intraperitoneal no dia 0 com  $6 \times 10^8$  células tumorais/mL, em um volume de 0,2 mL. A viabilidade das células foi determinada pelo método de exclusão por azul de tripano. As culturas de células derivadas do TAE foram coletadas por lavagem peritoneal em camundongos, 8 a 10 dias após o transplante tumoral.

### Ensaio *in vitro*

#### Avaliação de citotoxicidade

As células K-562 e TAE foram semeadas ( $2 \times 10^6$  cels/mL; 100  $\mu$ L/poço), em triplicata, em microplaca de 96 poços (Corning, USA), em meio de cultura RPMI 1640, suplementadas com 10% de soro bovino fetal e expostas a diferentes concentrações (0,062 a 2 mg/mL) do extrato de *P. granatum* da folha e do fruto, por 24 h. Foram adicionados 10  $\mu$ L da solução de 5 mg/mL do corante MTT em cada poço. Após exposição por 4 h, o meio de cultura foi removido e 80  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Alemanha) foram adicionados a cada poço, para solubilização dos cristais de formazam. As placas foram agitadas cuidadosamente por 10 min e em seguida a absorbância foi medida no aparelho de ELISA a 570 nm.

O crescimento e a viabilidade das células do TAE também foram avaliados pelo método de exclusão do azul de tripano. Após o período de exposição (24 h) uma alíquota de 20  $\mu$ L da suspensão de células foi retirada e diluída em 180  $\mu$ L de azul de tripano (0,2%, Sigma®). As células foram observadas por suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram este corante, possuíam um aspecto translúcido e as células mortas apresentavam coloração azulada.

### Ensaios *in vivo*

#### Avaliação da sobrevida

Os extratos de do fruto e da folha *P. granatum* foram diluídos em salina com 5% de Tween 80 e usados imediatamente após do preparo. Os camundongos portadores do TAE receberam 0,2 mL por via oral, as seguintes doses: 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg/dia do extrato de *P. granatum*, por dez dias consecutivos. O tratamento iniciou-se 24 h após a inoculação do tumor. O grupo controle portador do tumor recebeu apenas 0,2 mL do solvente do extrato. A atividade antitumoral *in vivo* foi determinada pelo aumento do tempo de sobrevida dos

animais tratados (n=9 por grupo) comparados com os animais controle portadores do TAE não-tratado.

#### Inibição tumoral e da angiogênese

Para o estudo da inibição tumoral e potencial antiangiogênico, os animais receberam o mesmo protocolo de tratamento da avaliação da sobrevida, contendo quatro grupos tratados, conforme descrito acima e um grupo controle (n=6 por grupo). Os animais foram submetidos à eutanásia, 24 h após a administração da última dose, e o fluido ascítico foi isolado por lavagem da cavidade peritoneal. O número total de células tumorais foi contado pelo método de exclusão por azul de tripano. Avaliou-se a inibição ou não do tumor nos grupos tratados em relação ao controle. Retirou-se também a pele de toda a região abdominal, as quais foram fotografadas e analisadas quanto ao aumento no número e calibre dos vasos sanguíneos presente nesta região.

### Análise estatística

Os resultados da citotoxicidade foram transformados em porcentagem em relação ao controle e a  $CI_{50}$  (concentração que produz 50% de efeito inibitório nos parâmetros avaliados) foi graficamente obtida da curva de concentração-resposta. Os resultados foram expressos considerando o desvio padrão ( $\pm DP$ ) da triplicata. A curva de sobrevida dos animais portadores do tumor tratados com extratos de *P. granatum* foi calculada através do teste de Kaplan-Maier e a diferença entre os grupos foi comparada usando o teste Long-Rank ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

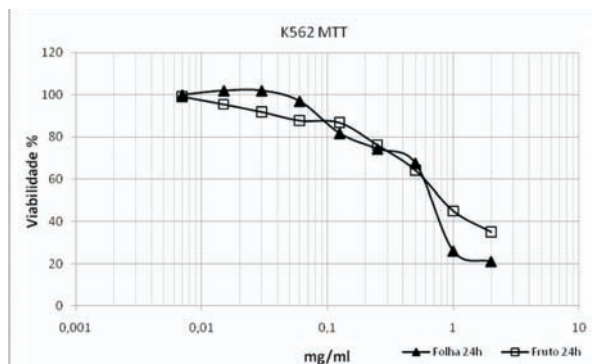
### Atividade antitumoral *in vitro*

As viabilidades das células K-562 e do TAE, avaliadas após 24 h de exposição a diferentes concentrações dos extratos de *P. granatum* pelo método de redução do corante MTT, estão apresentadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente. O emprego deste método demonstrou que ambos os extratos, folha e fruto, produziram um efeito citotóxico concentração-dependente. Os valores de  $CI_{50}$  da folha e do fruto foram respectivamente 1,0 e 1,2 mg/mL para células K-562, e 0,8 e 0,7 mg/mL para células do TAE. Resultado semelhante foi observado com o método de exclusão do azul de tripano (Figura 3). Os valores de  $CI_{50}$  da folha e do fruto foram 0,65 e 0,76 mg/mL.

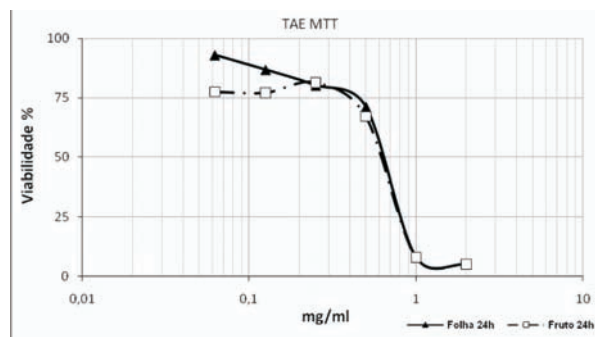
### Atividade antitumoral *in vivo*

Os efeitos do tratamento com os extratos da folha e do fruto de *P. granatum* sobre a sobrevida dos animais portadores do TAE estão apresentados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. O estudo mostrou que a dose de 50 mg/

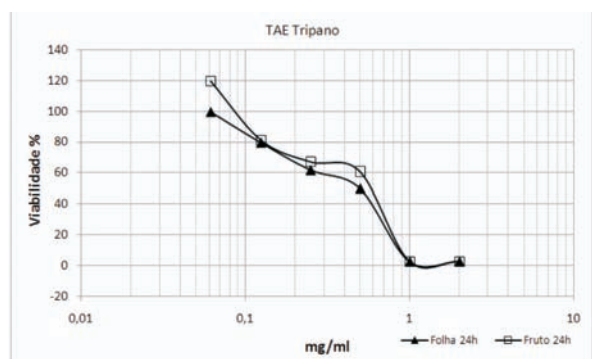
kg de extrato da folha de *P. granatum* produziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ; Teste de Long-Rank) um aumento na sobrevida dos animais portadores de 44,5%, quando comparados ao controle. O mesmo foi observado no tratamento com o extrato do fruto de *P. granatum*, no qual a dose de 50 mg/kg também apresentou o maior aumento da sobrevida, com aumento de 64,7% em relação ao controle.



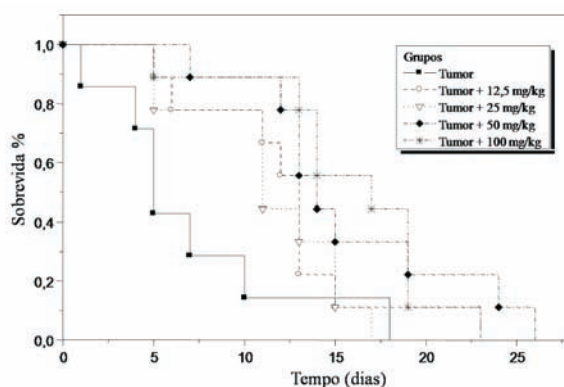
**Figura 1.** Viabilidade celular de células K-562 após 24 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha e do fruto de *P. granatum* (0,062 a 2 mg/mL) pelo método de redução do corante metiltetrazolium. Cada ponto representa a média da triplicata.



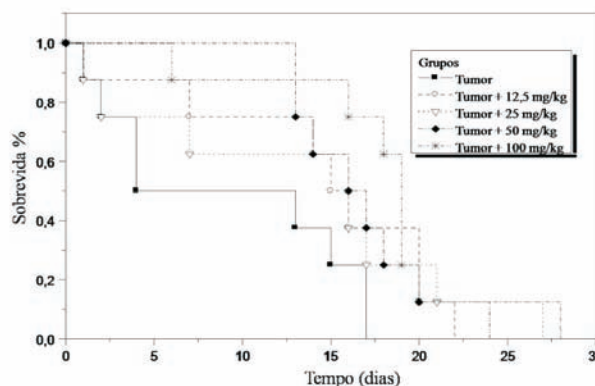
**Figura 2.** Viabilidade celular de células ascíticas do Tumor de Ehrlich após 24 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha e do fruto de *P. granatum* (0,062 a 2 mg/mL) pelo método de redução do corante metiltetrazolium. Cada ponto representa a média da triplicata.



**Figura 3.** Viabilidade celular de células ascíticas do tumor de Ehrlich após 24 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha e do fruto de *P. granatum* (0,062 a 2 mg/mL) pelo método de exclusão pelo corante azul de tripano. Cada ponto representa a média da triplicata.



**Figura 4.** Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extrato da folha de *P. granatum* (12,5; 25; 50 e 100 mg/kg/dia) por dez dias consecutivos. Log-rank ( $P = 0,04134$ ).



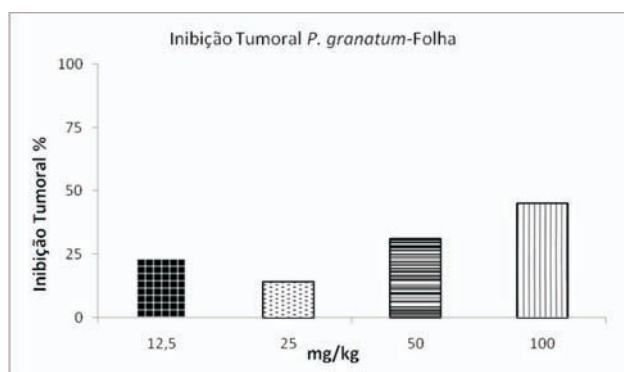
**Figura 5.** Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extrato do fruto de *P. granatum* (12,5; 25; 50 e 100 mg/kg/dia) por dez dias consecutivos. O tratamento com o extrato foi iniciado 24 h após a inoculação de  $6 \times 10^8$  células do tumor. Log-rank ( $P = 0,04334$ ).

Conforme apresentado nas Figuras 6 e 7 a administração dos extratos da folha e do fruto de *P. granatum* promoveu uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ) do crescimento das células do TAE na cavidade abdominal. As doses de 50 e 100 mg/kg da folha apresentaram maior porcentagem de inibição de células tumorais, com 31,2% e 45,1%, respectivamente. A inibição com as doses do fruto foi maior, sendo 93,9% na dose de 25 mg/kg, e 94,1% na dose de 50 mg/kg.

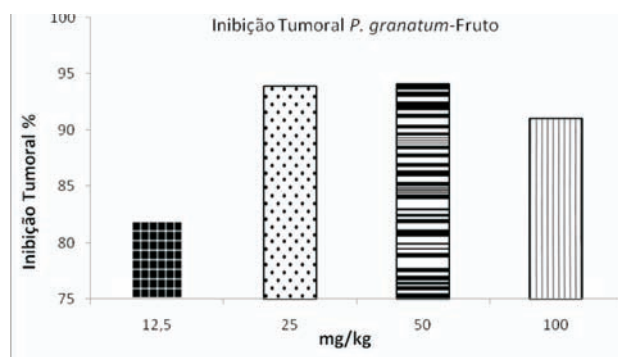
As Figuras 8 e 9 apresentam os dados referentes aos efeitos dos extratos sobre a vascularização da parede abdominal dos camundongos. Os resultados demonstraram redução significativa do padrão de vascularização, reduzindo o número e o calibre dos vasos, quando comparado ao grupo controle.

## DISCUSSÃO

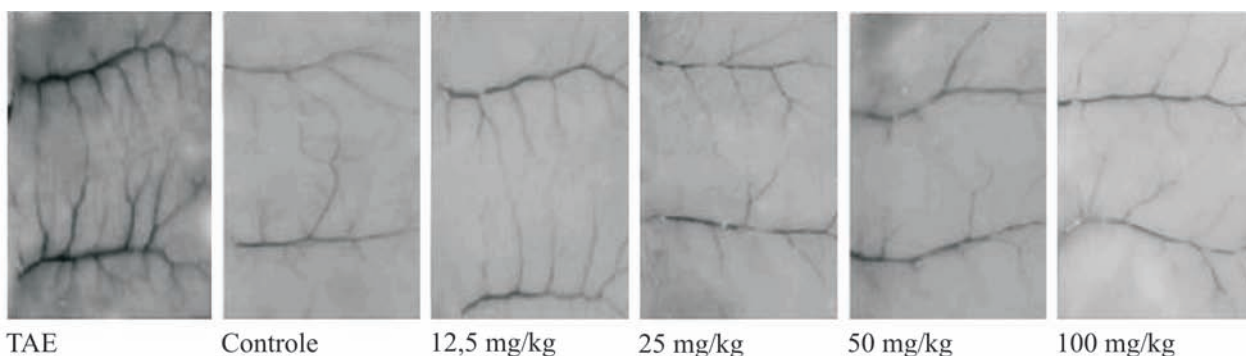
Estima-se que 80% da população mundial utiliza



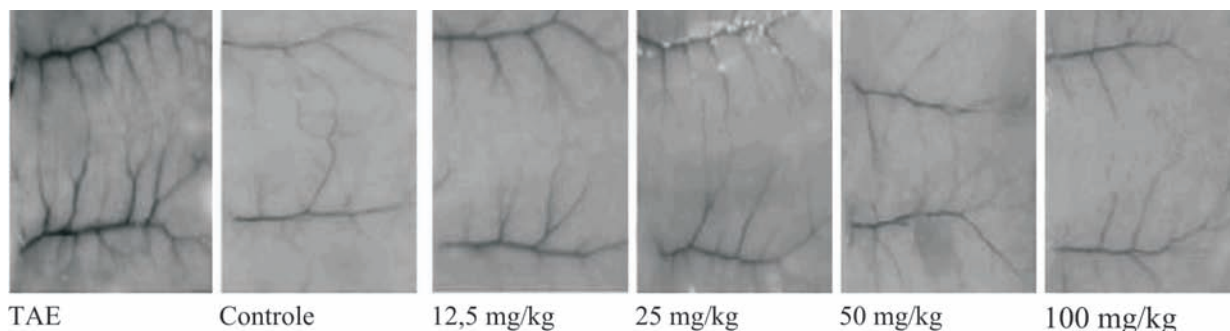
**Figura 6.** Inibição do crescimento tumoral de camundongos inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 10 dias com diferentes concentrações (12,5, 25, 50 e 100 mg/kg) do extrato bruto da folha da *P. granatum*.



**Figura 7.** Inibição do crescimento tumoral de camundongos inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich e tratados por 10 dias com diferentes concentrações (12,5, 25, 50 e 100 mg/kg) do extrato bruto do fruto da *P. granatum*.



**Figura 8.** Estudo comparativo sobre o efeito do extrato da folha da *P. granatum* na inibição da vascularização da parede peritoneal.



**Figura 9.** Estudo comparativo sobre o efeito do extrato do fruto da *P. granatum* na inibição da vascularização da parede peritoneal.

plantas medicinais como recurso principal no atendimento básico a saúde. Os medicamentos fitoterápicos são reconhecidos oficialmente como importantes fontes de recurso terapêutico desde 1978 pela Organização Mundial de Saúde (Gasparri, 2005).

Estudos na literatura estabeleceram a importância da atividade quimiopreventiva da *P. granatum* contra a incidência e a multiplicação tumoral (Kim et al., 2002; Hora et al., 2003).

A citotoxicidade é um indicativo inicial da atividade antitumoral presente na maioria dos quimioterápicos. Atualmente, os agentes antitumorais usados clinicamente, na sua grande maioria, possuem marcada atividade citotóxica (Ajith & Janardhanan, 2003). O método de redução do MTT fornece informações sobre

a função mitocondrial através da avaliação da atividade da succinato desidrogenase (Mosmann, 1983), enquanto que, o método de exclusão por azul de tripano permite avaliar a integridade estrutural da membrana celular. O ensaio do MTT com o extrato da folha de *P. granatum* mostrou que 1,0 mg/mL e menos de 0,8 mg/mL deste extrato diminuiu em 50% a viabilidade das células K-562 e das células ascíticas, respectivamente. Já com o extrato do fruto a viabilidade dessas células foi reduzida a 50% pelas concentrações de 1,2 e 0,7 mg/mL. Através do método de exclusão por azul de tripano, a  $CI_{50}$  foi 0,65 mg/mL para o extrato da folha e 0,76 mg/mL para o do fruto quando utilizadas as células ascíticas.

Em consonância com estes resultados *in vitro*, os dados *in vivo* mostraram que o extrato de *P. granatum*

apresenta eficácia contra o crescimento do TAE, proporcionando aumento do tempo de sobrevida dos animais. As melhores respostas foram verificadas com a dose de 50 mg/kg, com aumento de 44,5% na sobrevida de animais tratados com o extrato da folha e, 64,7% nos animais tratados com o fruto. Os ensaios também mostraram claramente inibição do crescimento das células tumorais na cavidade abdominal.

Inúmeros trabalhos estudaram a ação de *P. granatum* sobre vários indicadores de atividade antitumoral. Nestes trabalhos, os resultados tanto da fração lipídica quanto da aquosa do extrato de *P. granatum* sugerem potencial apoptótico seletivo contra diferentes linhagem de células cancerígenas, incluindo aquelas hormônio-dependente (Kim et al., 2002; Albrecht et al., 2004; Johar et al., 2004; Seeram et al., 2005). Estudos acerca do potencial terapêutico do extrato da casca de *P. granatum* têm demonstrado retardar a proliferação tumoral em diferentes linhagens de células cancerígenas (Lansky et al., 2007).

Sabe-se que aproximadamente 90% de todas as mortes por câncer advêm do desenvolvimento de metástase de tumores primários. De todos os processos que envolvem a carcinogênese, o local de invasão e a formação de nova vascularização são clinicamente relevantes, porém são pouco entendidos. Recente pesquisa indica que a *P. granatum* parece conter componentes capazes de suprimir a invasão de células tumorais (Kim et al., 2002; Lansky et al., 2005 a,b). Existem fortes evidências de que a angiogênese esteja relacionada não apenas ao crescimento tumoral, mas desempenha ainda uma importante ação no processo de formação e desenvolvimento de metástases (Pinho, 2005). Neste contexto, estudo da literatura aponta para propriedades anti-angiogênica da *P. granatum* (Lansky et al., 2007).

Neste sentido, o presente estudo agrega evidências aos dados da literatura que demonstraram efeito antiangiogênico de *P. granatum*. Observamos uma modificação do padrão de vascularização da parede peritoneal no animal portador do TAE, com redução da vascularização da parede abdominal, tanto no número quanto no calibre dos vasos, quando comparado ao grupo controle.

Em conclusão, os dados apresentados neste trabalho sugerem que os extratos de *P. granatum*, tanto da folha quanto do fruto, relevante atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, *P. granatum* pode ser um grande projeto farmacêutico, com inúmeras possibilidades, entre as quais o tratamento do câncer.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu apoio financeiro das seguintes instituições: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa (FUNAPE)-UFG, Goiânia-GO, Financiadora

de Estudos e Projetos (FINEP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Ajith TA, Janardhanan KK 2003. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *J Ethnopharmacol* 84: 157-162.
- Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, Mansel RE, Neeman I, Geldof AA, Campbell MJ 2004. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food* 7: 274-283.
- Braga R 1961. *Plantas do nordeste - Especialmente do Ceará*. Rio Grande do Norte: Editora Universitária/UFRN.
- Chen L, Watkins JF 1970. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich Ascites Tumour Cells. *Nature* 225: 734-735.
- Fengchun H, Liu X, Chen H 1997. Medicine for treatment of infectious oral diseases. *Chinese Patent* 1145793A.
- Gasparri S 2005. *Estudo das atividades antioxidantes e mutagênicas/antimutagênicas induzidas pelo extrato vegetal da Costus spicatus*. Canoas, 79 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil.
- González RP 2000. Método para estudo *in vivo* da Angiogênese: Indução de Neovascularização na Córnea de Coelho. *Acta Cirurgica Bras* 15: 64-73.
- Haubner R, Fisinger D, Kessler H 1997. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha\beta 3$  integrin for a new cancer therapy. *Chemie Int Ed English* 36: 1374-1389.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias BPF 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- Hora JJ, Maydew ER, Lansky EP, Dwivedi C 2003. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD 1 mice. *J Med Food* 6: 157-161.
- Instituto Nacional de Câncer 2009. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro.
- Jassim SAA 1998. Antiviral or antifungal composition comprising an extract of pomegranate rind or other plants and method of use. *U.S. Patent* 5840308.
- Jeune ML, Diaka JK, Brown J 2005. Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. *J Med Food* 18: 469-475.
- Jimenez CA, Rojas N, Lopez AM 1979. Biological evaluation of Cuban plants (IV). *Rev Cubana Med Trop* 31: 29-35.
- Johar D, Roth JC, Bay GH, Walker JN, Krocak TJ, Los M 2004. Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic like and apoptotic) cell death and cancer. *Ann Acad Med Bialostocensis* 49: 31-39.
- Kim ND, Mehta R, Yu WP, Neeman I, Livney T, Amichay A,

- Poirier D, Nicholis P, Kirby A, Jiang WG, Mansel R, Ramachandran C, Rabi T, Kaplan B, Lansky E 2002. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Tr* 71: 203-217.
- Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ 2005a. Possible synergistic prostate cancers suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drug* 23: 11-20.
- Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG 2005b. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drug* 23: 121-122.
- Lansky EP, Newmann RA 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109: 177-206.
- Longuefosse JL, Nossin E 1996. Medical ethnobotany survey in Martinique. *J Ethnopharmacol* 53: 117-142.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Navarro V, Villareal ML, Rojas G, Lozoya X 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol* 53: 143-147.
- Newmann DJ, Cragg GM, Snade KM 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.
- Nicolaou KC, Trujillo JI, Jandeleit B, Chibale K, Rosenfeld M, Diefenbach B, Cheresch DA, Goodman SL 1998. Design, synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists. *Bioorg Med Chem* 6: 1185-1208.
- Pinho MSL 2005. Angiogênese: o gatilho proliferativo. *Rev Bras Coloproctol* 25: 396-402.
- Rafferty JA, Hickson I, Lashford LS, Margison GP, Dexter TM, Fairbairn LJ 1996. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. *Cancer Metast Rev* 15: 365-383.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D 2005. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 16: 360-367.
- Sivarajan VV, Balachandran I 1994. *Ayurvedic drugs and their plant sources*. Mohan P: Oxford 7 IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Toi M, Bando H, Ramachandran C, Melnick SJ, Imai A, Fife RS, Carr RE, Oikawa T, Lansky EP 2003. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions *in vitro* and *in vivo*. *Springer Netherlands* 6: 121-128.
- Zhang J, Zhan B, Yao X, Gao Y, Shong J 1995. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against herpes virus *in vitro*. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* 20: 556-558.