



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TATYANNA KELVIA GOMES DE SOUSA

**Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas
de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae)**

João Pessoa/PB

2013

TATYANNA KELVIA GOMES DE SOUSA

**Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas
de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

**João Pessoa/PB
2013**

TATYANNA KELVIA GOMES DE SOUSA

Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em / /2013

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Orientadora

Profa. Ms. Daiene Martins Lunguinho
Examinadora

Prof. Ms. João Carlos Lima Rodrigues Pita
Examinador

*Dedico esta monografia aos meus exemplos de vida, meus pais: **Valter Justino de Sousa e Maria Salete Gomes Lima de Sousa**. Agradeço pelo amor, presença constante, ensinamentos e apoio em todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser meu Pai protetor, me carregar nos braços ao longo desse curso, me dando força para superar todas as dificuldades e me permitir chegar até aqui. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, **Valter Justino de Sousa e Maria Salete Gomes Lima de Sousa**, por serem meus exemplos de vida, meu alicerce. Agradeço por todo amor, carinho, apoio, preocupação, incentivo. Vocês são tudo para mim! Amo vocês.

A minha irmã, **Tacyanne**, pelo amor e carinho, e aos meus sobrinhos **Lucas, Maria Vitória e Ana Livia**, pela alegria e carinho que sempre me deram. Amo vocês!

A **Edgar**, que além de namorado é meu grande amigo. Obrigada por ter me acompanhado durante toda essa caminhada, sempre me ajudando, me apoiando e dando forças para seguir em frente. Você foi presença constante nessa etapa da minha vida!

Aos meus **avós**, por serem exemplos de vida para mim, de força e determinação. Além dos meus **tios, tias, primos e primas** por pela torcida e apoio.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral**, por me acompanhar há 4 anos, por ter me recebido ainda quando “engatinhava” e ter me preparado para andar com minhas próprias pernas. Obrigada por toda contribuição para a vida profissional e mais ainda para a vida pessoal. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos do **LABETOX**, por também terem ajudado no meu crescimento, marcando positivamente minha vida durante a graduação.

Aos professores **João Carlos Lima Rodrigues Pita e Daiene Martins Lunguinho** por aceitarem contribuir com a melhoria desse trabalho.

A todos os professores da graduação, pelos ensinamentos.

Aos amigos da turma **Farmassa**, porque ao lado de você vivi os melhores momentos da minha vida universitária, foram muitas alegrias e tristezas, mas que no fim tudo valeu a pena. Carregarei cada um dentro do meu coração sempre!

As grandes amigas que a Universidade me deu, **Aninha e Dani**. Vocês foram anjos na minha vida. Obrigada pelo apoio, incentivo que sempre me deram. Agradeço também a **Alan**, porque mesmo de longe sempre dá um jeito de se fazer presente, dando o apoio necessário. Obrigada!

A minha amiga-irmã **Maria Emilia**, por ter sido minha companheira desde o jardim de infância até a vida universitária. Você foi de grande importância nessa nova etapa da vida. Obrigada por sempre está comigo!

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

MUITO OBRIGADA!

Tatyanna Kelya Gomes de Sousa

RESUMO

O câncer pode ser considerado uma doença genética complexa, que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Os produtos naturais são amplamente utilizados no tratamento do câncer. *Croton grewioides* é conhecida popularmente como “canelinha” ou “canelinha-de-cheiro” e é uma espécie pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista farmacológico como toxicológico. O estudo fitoquímico caracterizou o óleo essencial obtido das folhas, que tem como constituinte majoritário o α -pineno. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *C. grewioides* (O.E.C.), através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. No bioensaio frente *A. salina*, o valor de CL_{50} obtido foi 191,4 (185,4 – 197,6) $\mu\text{g/mL}$. O valor de CH_{50} obtido no experimento de citotoxicidade em eritrócitos (hemólise) foi 370,3 (357,0 – 384,0) $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação de citotoxicidade em células tumorais Sarcoma 180, através do ensaio de redução do MTT, o O.E.C. mostrou uma inibição do crescimento tumoral, de maneira concentração-dependente, com valor de CI_{50} de 217,7 (212,6 - 223,0) $\mu\text{g/mL}$. Durante o ensaio de toxicidade aguda, os animais apresentaram alterações comportamentais depressoras. O valor estimado da DL_{50} obtido foi 366,1 mg/kg. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente sarcoma 180, as taxas de inibição do crescimento tumoral foram, 19,3 e 39,7 % após tratamento com 60 e 120 mg/kg do O.E.C., respectivamente, quando comparados ao grupo controle. As análises toxicológicas desses animais mostraram que não houve alteração no índice de baço e timo após os tratamentos, alterações estas que ocorrem com quimioterápicos utilizados na prática clínica, nem dos rins, coração e fígado, quando comparado ao grupo controle transplantado. Portanto, é possível inferir que o O.E.C. não apresentou atividade imunoestimulante como parte do seu mecanismo de ação antitumoral, porém, também não produziu imunossupressão, que representa um dos principais efeitos indesejáveis da maioria dos quimioterápicos utilizados na prática clínica.

Palavras-chave: *Croton grewioides*. Óleo essencial. Atividade antitumoral. Toxicidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de <i>Croton grewoides</i> em seu habitat.....	27
Figura 2 – Camundongos <i>Swiss</i> provenientes do biotério Prof. Thomas George.....	31
Figura 3 – Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólico)] a formazan.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com O.E.C. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.....37

Gráfico 2 - Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.C. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.....38

Gráfico 3 - Viabilidade celular após tratamento com o O.E.C. ($\mu\text{g/mL}$). Concentração-resposta através do ensaio de redução do MTT, Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.....38

Gráfico 4 - Efeito do O.E.C. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor (%) dos diferentes grupos experimentais. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido por Tukey.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides*.....28

Tabela 2 – Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas (250, 375, 500 mg/kg) do O.E.C. em camundongos.....39

Tabela 3 – Consumo de água e ração e avaliação da variação de massa corpórea dos animais (n = 6) dos diferentes grupos experimentais.....41

Tabela 4 – Efeitos do O.E.C. (60 e 120 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos dos diferentes grupos experimentais.....42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Câncer	14
2.2 Modelos experimentais no estudo do câncer	15
2.3 Produtos naturais e câncer	19
2.4 Óleos essenciais biologicamente ativos	20
2.5 Toxicologia de produtos naturais	21
2.6 <i>Croton grewioides</i> : família, gênero e espécie	25
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Local da pesquisa	30
4.2 Material	30
4.2.1 Óleo essencial de <i>Croton grewioides</i>	30
4.2.2 Animais	30
4.2.3 Células	31
4.2.4 Cistos de <i>Artemia salina</i> Leach	31
4.3 Métodos	31
4.3.1 Ensaio <i>in vitro</i>	31
4.3.2 Ensaios <i>in vivo</i>	35
4.4 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Ensaios <i>in vitro</i>	37
5.1.1 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	37
5.1.2 Avaliação da citotoxicidade do O.E.C frente eritrócitos de camundongos	37
5.1.3 Avaliação da citotoxicidade do O.E.C. frente células da linhagem sarcoma 180 ...	38
5.2 Ensaios <i>in vivo</i>	39
5.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do O.E.C.	39
5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> do O.E.C. frente células tumorais da linhagem sarcoma 180	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, sustentada na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, num cenário que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças (BRAZ FILHO, 2010).

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (VIEGAS JR; BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas pelos homens no tratamento de inúmeras enfermidades. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Os produtos naturais com propriedades terapêuticas constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e vêm sendo utilizados em muitas partes do mundo ao longo de décadas, despertando o interesse de vários pesquisadores (ARAÚJO, 2011).

Inúmeras pesquisas evidenciam que produtos naturais representam a principal fonte da diversidade química durante a condução de novas descobertas no ramo farmacêutico (FIRN; JONES, 2003; MISHRA; TIWARI, 2011). Assim, a natureza continua a influenciar na concessão de novas moléculas importantes no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas, diabetes, infecções, doença de Alzheimer, câncer, entre outras (LAM, 2007).

As indústrias farmacêuticas foram e continuam sendo beneficiadas pelos conhecimentos populares sobre o uso medicinal das plantas. Estima-se que mais de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. As chances de se obter novas entidades químicas de plantas, animais, fungos e bactérias são reais. Mesmo que a nova entidade química não passe em todos os testes clínicos, ela servirá de modelo para a síntese de

novos candidatos a fármaco. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais. No caso das drogas antitumorais e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; FERREIRA; PINTO, 2010; BRASIL, 2011).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com 20% de toda a flora mundial e aproximadamente 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Esse imenso patrimônio genético é considerado como uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (SIMÕES et al., 2004; HEINZMANN; BARROS, 2007; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8% foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas e/ou tóxicas (VARANDA, 2006).

Dentre os produtos obtidos de espécies vegetais estão os óleos essenciais, que ganharam popularidade e têm despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo (FONTENELLE, 2008). Devido a sua complexa composição, os óleos essenciais demonstram, entre muitas outras atividades farmacológicas descritas, a inibição do crescimento de células tumorais, tanto *in vitro* como *in vivo* (LAHLOU, 2004; SOEUR et al., 2011; BRITTO et al., 2012). Portanto, óleos essenciais de composição química variada, obtidos de espécies pouco estudadas do ponto de vista farmacológico, representam um dos tipos de derivados vegetais mais promissores na busca por alternativas farmacológicas, mais ativas e menos tóxicas contra o câncer.

Um alvo iminente ao qual muitos estudos das ciências da saúde tem se dirigido, no sentido de prolongar a vida humana é a oncologia. Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (BRASIL, 2011).

O câncer é uma doença com elevado índice de mortalidade, que atinge anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo e estes números vêm aumentando progressivamente. Embora tenha havido muito progresso na terapia do câncer, muitos tumores ainda são de difícil remissão (RIVA et al., 2012). A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Os fitoterápicos são utilizados por automedicação ou por prescrição médica e a maior parte não tem o seu perfil tóxico bem conhecido. Atualmente estão incorporados aos vários Programas de Fitoterapia como opção terapêutica eficaz e pouco custosa. Nos últimos anos, vários países da Europa, como Reino Unido e Alemanha, vem reconhecendo a importância de monitorar esses efeitos tóxicos das plantas utilizadas terapeuticamente em seus países e muitas delas foram retiradas do mercado devido a importantes efeitos tóxicos e risco para uso humano (SILVEIRA et al., 2008).

Em busca de alternativas para a terapêutica de doenças de tamanho impacto, tal qual o câncer, a população faz uso da fitoterapia, tomando como base para o consumo de plantas medicinais da flora nativa, pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes, expondo-se assim, a riscos (BRANDÃO et al., 2006). Um dos motivos para essa busca na fitoterapia, não só pela população isoladamente como pelos pesquisadores, é a necessidade de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento do câncer, uma vez que a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Desta forma, ratifica-se a importância e necessidade dos estudos com produtos naturais, e vislumbrando o potencial farmacológico da família Euphorbiaceae e reconhecendo a importância do gênero *Croton* optamos por enveredar os estudos da espécie *Croton grewoides* BAILL. mais especificamente do óleo essencial das folhas desta planta, cujos estudos farmacológicos ainda são pouco conhecidos, o que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas com atividade antitumoral.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

A proliferação e diferenciação morfológica e funcional são processos essenciais para os seres vivos. Esses dois processos são mantidos através do controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. De forma não surpreendente, com certa frequência, surgem transtornos nos mecanismos que os controlam. Alterações nesse sistema regulador resultam em distúrbios do crescimento e da diferenciação ou distúrbios de ambos ao mesmo tempo, e uma das consequências é a proliferação anômala de células, as chamadas neoplasias (FERREIRA; ROCHA, 2004; PORTUGAL, 2012).

Dessa forma, o termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças heterogêneas do material genético que promovem alterações essenciais na fisiologia da célula. Dentre essas alterações podem ser citadas: auto-suficiência em relação aos fatores de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão à morte celular programada por apoptose; potencial ilimitado de replicação; angiogênese aumentada; invasão tecidual e metástase (LUO, 2009). A capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de formar as metástases é responsável, em última análise, pela morte de dois a cada três pacientes com o diagnóstico de câncer (OTAKE; CHAMMAS e ZATZ, 2006).

O processo de transformação de uma célula normal em célula tumoral geralmente é resultado de um processo multifatorial, que inclui a interação de fatores genéticos e três categorias de agentes externos: carcinógenos físicos (como ultravioleta e radiação ionizante), carcinógenos químicos (como vários constituintes da fumaça do cigarro ou contaminantes de água e alimentos) e carcinógenos biológicos (como infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas), além do estilo de vida do indivíduo (WHO, 2011; SILVA, 2011).

As características morfológicas mais marcantes das células cancerosas são: i) anormalidades no núcleo: volumoso, múltiplos, nucléolos visíveis, hiperploídia; ii) anormalidades no tamanho das células: heterogêneas; iii) anormalidades citoplasmáticas: aumento da relação citoplasma-núcleo; iv) anormalidades da membrana citoplasmática: perda da inibição por contato, modificação da adesividade, modificação dos antígenos de superfície, entre outras (APTSIAURI et al., 2007).

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, representando cerca de um oitavo do total de mortes. Sua incidência é fortemente afetada por aspectos

demográficos, como o envelhecimento da população, hábitos de alimentação e, em especial, fatores ambientais como a incidência de raios ultra-violeta (MATSUO et al., 2010). Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (BRASIL, 2011).

No Brasil, de acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA) o número estimado para 2012/2013 é de 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil), reforçando a magnitude do problema do câncer no país (BRASIL, 2011).

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, assim como na pesquisa, possibilitando um conhecimento maior da etiologia da doença e o desenho de novas e eficazes estratégias terapêuticas, menos tóxicas e mais específicas para cada paciente e para cada tipo específico de tumor (FERREIRA e ROCHA, 2004).

2.2 Modelos experimentais no estudo do câncer

O tratamento do câncer vem sendo suportado por terapias convencionais, as quais causam sérios efeitos colaterais, podendo ainda desencadear processos de resistência ao agente usado no tratamento, e no melhor dos casos, conseguem estender meramente a vida do paciente por alguns anos, não aliando a isto uma melhora na sua qualidade de vida. Há assim, uma clara necessidade de utilizar conceitos e/ou terapias alternativas na prevenção e tratamento do câncer (REDDY et al., 2003).

A busca por quimioterápicos tem aumentado com o objetivo de se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. Baseadas em avanços significativos no conhecimento da biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (BRANDÃO et al., 2010). Dessa

forma, a Oncologia Experimental procura estudar os mecanismos de desenvolvimento das neoplasias em modelos experimentais, assim como encontrar as possíveis formas de tratá-las (COSTA-LOTUFO, 2010).

Para a descoberta de novos agentes antitumorais, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Os testes de citotoxicidade (*in vitro*), os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células tumorais em cultura, são os mais amplamente utilizados (HOLBECK, 2004). Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, é uma técnica relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, auxilia na elucidação de um provável mecanismo de ação da droga (SUGGITT et al., 2005).

Para os testes antitumorais *in vitro*, geralmente são utilizadas várias linhagens celulares tumorais com o intuito de se obter uma visão ampliada dos efeitos do produto em estudo. Essas linhagens devem ser de cânceres originados de diferentes tecidos com diferentes origens embrionárias e com características morfológicas e fisiológicas distintas.

Porém, a atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Nesse último modelo, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são obtidas, enquanto em testes *in vitro* muitos desses dados não são obtidos facilmente. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão mais definitiva a respeito da atividade de uma nova substância com potencial antitumoral (SMITH et al, 2005).

Os modelos tumorais murinos atuais mimetizam precisamente a sua contraparte humana e, possuem aplicações potenciais nos testes de eficácia de novas terapias anticâncer (PANTALEÃO e LUCHS, 2010).

O Sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, foi isolado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo *Swiss* macho (*Mus musculus*). O tumor foi descoberto em 1914 pelo Dr. W. H. Woglom no Laboratório Crocker nos Estados Unidos e é mantido por transplantes sucessivos desde então. Inicialmente, este tumor foi caracterizado como sendo de origem epitelial, pois, em estudos com microscopia óptica e eletrônica, foram observados contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando que se tratava de um carcinoma (ZUCKERBERG, 1973). No entanto, estudos posteriores verificaram que estas células não expressam laminina e desta forma não podem ter origem epitelial, sendo realmente classificado como sarcoma, pois provavelmente se originou de um tecido conjuntivo (ASSEF et al., 2002; OLIVEIRA JUNIOR, 2008). O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos

sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982; PITA, 2010). Essa linhagem celular é utilizada em todo mundo, tanto para estudos de atividade antitumoral *in vitro*, como para estudos de atividade antitumoral *in vivo*.

Atualmente a linhagem de células tumorais sarcoma 180 (TIB-66) pode ser obtida pela “American Type Culture Collection” (ATCC). As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor pode ser implantado de duas maneiras - células inoculadas na cavidade intraperitoneal se desenvolvem formando um tumor ascítico (“líquido”), enquanto células neoplásicas inoculadas subcutaneamente formam tumores sólidos. Em geral, ocorre ulceração da pele ao redor do 28º dia após inoculação subcutânea e os animais morrem entre 28º e 30º dias, após esse processo (ZUCKERBERG, 1973; KAWAKUBO et al., 1980). A forma sólida é pouco hemorrágica e se caracteriza pelo rápido crescimento, atingindo aproximadamente 18x14x10 mm por volta de sete dias após o transplante (O’PESSOA, 1992; PITA, 2010).

Os agentes terapêuticos hoje conhecidos são de dois tipos: os agentes bloqueadores (quimiopreventivos), que inibem a iniciação do processo carcinogênico e os agentes supressores, que inibem a proliferação de células malignas durante as fases de promoção e progressão tumoral. O mecanismo antitumoral mais conhecido atualmente é o de indução seletiva das células tumorais a um mecanismo de morte celular denominado apoptose (SUBHASHINI et al., 2005). Apoptose é considerada como morte celular programada (fisiológica) altamente regulada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos. É essencial para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, formação das vilosidades intestinais, entre outros processos (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; DUARTE, 2010).

Nesse processo apoptótico ocorre uma sequência de eventos morfológicos como condensação de seu citoplasma e núcleo, com formação de vesículas a partir de sua membrana plasmática (corpos apoptóticos), exposição de resíduos de fosfatidilserina em sua membrana, fragmentação internucleossomal do DNA (HIGUCHI, 2004; ZHANG e XU, 2006) e várias alterações mitocondriais, tais como perda da diferença de potencial de membrana, liberação de fatores pró-apoptóticos e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ARAVINDARAM et al., 2010).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no

DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de EROS (DASH, 2010).

A degradação celular e as alterações observadas em células apoptóticas são decorrentes da ativação de caspases (CAVALCANTI, 2010). As caspases são uma família de cisteíno proteases, presentes nas células num estado inativo, que estão especificamente envolvidas nos mecanismos moleculares dessa forma de morte celular (PHILCHENKOV, 2004) e são ativadas em resposta a estímulos externos, tais como os ligantes para receptores de morte (na via extrínseca da apoptose) ou sinais internos que surgem a partir de danos aos componentes celulares (na via intrínseca da apoptose) (DUNCAN et al., 2010).

Ambas as vias ativam caspases iniciadoras (procaspases -8, -9, -10) que transmitem os sinais apoptóticos iniciais, levando a ativação proteolítica de caspases efetoras (procaspases -3, -6, -7) que clivam substratos específicos, produzindo assim as alterações morfológicas características da apoptose (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

A apoptose não induz inflamação, fato importante na reciclagem dos tecidos adultos e na embriogênese, diferentemente da morte celular por necrose, onde ocorre um processo de morte celular descontrolado, com lise das células, resposta inflamatória e potencialmente sérios danos ao organismo (LONGATO, et al., 2011).

A maioria das drogas utilizadas na terapia antineoplásica interfere de algum modo no ciclo celular, e a melhor compreensão do funcionamento e regulação desse processo celular é essencial para definição clara dos mecanismos de ação da maioria das drogas utilizadas no tratamento do câncer (ALMEIDA et al., 2005; GOODMAN; GILMAN, 2006).

O ciclo celular pode ser conceituado como uma cadeia de eventos que leva à proliferação celular por mitose. A divisão celular nos seres eucariontes compreende quatro fases: G1, S, G2 e M. Células quiescentes encontram-se em uma condição denominada G0, onde não existe célula se replicando, o DNA encontra-se superenovelado e a atividade nuclear é baixa. A fase G1 é considerada uma fase pré-sintética, na qual a célula inicia a ativação de uma série de genes, incluindo proto-oncogenes e genes necessários à síntese de ribossomos e tradução de proteínas. A fase S compreende o período da duplicação do DNA. O período G2 é o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose propriamente dita da célula, sendo por essa razão denominada fase pré-mitótica, onde há a produção de componentes essenciais para a mitose. Na fase M ocorre a divisão do núcleo seguida da citocinese (separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares) (KUMAR et al., 2010; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

A regulação do ciclo celular também é um processo diretamente relacionado com a geração e desenvolvimento de neoplasias. Existem pontos de verificação nas fases G1 e G2 do ciclo que são responsáveis pelo prosseguimento ou parada do mesmo. Estes são regulados por uma série de proteínas cinases como as CDKs (cinases dependentes de ciclina) (HEMAISWARYA; DOBLE, 2006). Quando algum tipo de anormalidade é reconhecido, o ciclo celular para até a completa reparação celular. Caso essa reparação não seja eficiente, a célula é encaminhada para a morte celular programada (ALBERTS et al., 2002). No câncer, as células são incapazes de pausar em ambos os pontos de verificação, resultando em desregulação do ciclo celular (HEMAISWARYA; DOBLE, 2006). Muitos fármacos eficazes no tratamento do câncer ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (ALMEIDA et al., 2005).

2.3 Produtos naturais e câncer

Publicações recentes reafirmam a importância dos produtos naturais como fonte de fármacos, desse modo, a contribuição dos produtos naturais no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos é inquestionável (BARREIRO e BOLZANI, 2009). Calcula-se que somente nos últimos 25 anos, 77,8% dos agentes anticancerígenos testados e aprovados foram derivados de produtos naturais (NOGUEIRA et al., 2010).

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas no campo da oncologia, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Dentre estes se destacam os produzidos pela espécie *Catharanthus roseus* ou *Vinca rosea* (Apocynaceae) - a vimblastina (Velban[®]) e a vincristina (Oncovin[®]) e os análogos vindesina (Eldisine[®]) e vinorelbina (Navelbine[®]); pela *Taxus brevifolia* - paclitaxel (Taxol[®]) e o análogo docetaxel (Taxotere[®]); pela *Podophyllum peltatum* - podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (topophos[®]) e teniposídeo (Vumon[®]); e pela *Camptotheca accuminata* - camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin[®]) e irinotecano (Camptosar[®]). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Todas estas substâncias naturais e seus derivados atuam em diferentes tipos de câncer, revelando espectro de atividade e toxicidade diferentes, ampliando a utilidade medicinal em benefício da saúde (BRAZ FILHO, 2010).

Considerando esses aspectos, é óbvio o espaço e a importância que os produtos naturais ocupam na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos para o tratamento do câncer. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade (VIEIRA et al., 2010). De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas. Além disso, um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foi aprovado para utilização clínica entre 2005 e 2007 (HARVEY, 2008; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

2.4 Óleos essenciais biologicamente ativos

Óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, são concentrados de produtos naturais que possuem aroma e compostos voláteis, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, etc., de baixo peso molecular, geralmente lipofílica e odorífera, podendo exercer diferentes atividades biológicas nos seres humanos, animais e outras plantas. São utilizados em perfumes, cosméticos, produtos de limpeza doméstica, além de apresentam diferentes ações biológicas em humanos e outras plantas, neste último estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos. Eles são muito úteis no tratamento de diferentes doenças, como câncer, inflamação, dor, além de apresentar propriedade antioxidativa e serem utilizados como antissépticos, antimicrobianos, com sua aplicação medicinal se tornando popular ao longo dos tempos (BAKKALI et al., 2008; ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

No foco da quimioterapia, diversas espécies de diferentes gêneros tem demonstrado atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, e os estudos sobre tais produtos naturais evoluíram de tal maneira que existem até mesmo os que associam estatisticamente a atividade farmacológica do óleo em questão a determinado componente do óleo, que pode apresentar-se como componente majoritário ou não (AFOULOUS et al., 2011).

Nesse sentido, óleos essenciais e seus componentes aromáticos individuais já mostraram atividade supressora tumoral quando testadas em um significativo número de linhagens tumorais humanas, incluindo glioma, câncer de cólon, câncer gástrico, tumor hepático, tumores pulmonares, câncer de mama, leucemia e outros (DEANGELIS, 2001; EDRIS, 2007). Como por exemplo o óleo essencial obtido de *Guatteria friesiana* teve sua

atividade testada em comparação com seus componentes majoritários, α -, β -, and γ -eudesmol, demonstrando citotoxicidade contra HCT-8 e HL-60, para o óleo essencial; contra HL-60 e MDA-MB-435, para o α -eudesmol, e contra SF-295 e MDA-MB-435, para β - e γ -eudesmol, respectivamente (BRITTO et al., 2012).

Estudos demonstram que o óleo essencial preparado por destilação da resina das árvores da família Burseraceae (*Boswellia* sp.) tradicionalmente utilizado para terapia aromática possui atividades anti-proliferativa e pró-apoptótica em células tumorais (SUHAIL et al., 2011). Assim como o óleo essencial das folhas de *Pinus densiflora* possui atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica em células YD-8 (células de câncer oral humano) devido à produção de (EROS) dependente de caspases (JO et al., 2011).

Diferentes mecanismos de ação têm sido propostos relacionados à atividade antitumoral de óleos essenciais, já estando evidenciada a participação de vias apoptóticas e parada no ciclo celular em consequência aos seus efeitos citotóxicos (JAAFARI et al., 2009; HARZALLAH et al., 2011).

Assim, os óleos essenciais representam uma importante fonte natural com atividade biológica contra o câncer.

2.5 Toxicologia de produtos naturais

As plantas consideradas medicinais beneficiaram, e continuam beneficiando a humanidade. Ainda hoje muitas são utilizadas para tratamento de enfermidades, mesmo havendo medicamentos sintéticos no mercado para o tratamento das mesmas doenças. No entanto, existem plantas que são consideradas venenos por conterem toxinas poderosas que podem levar à morte. Algumas plantas medicinais são, inclusive, incompatíveis com o uso de certos medicamentos (FERREIRA; PINTO, 2010; ZHANG et al., 2012).

Os grupos das plantas medicinais e tóxicas ocasionalmente são tomados indistintamente, já que se tem o pressuposto de conterem princípios ativos, que dependendo da dose, podem ser benéficos ou tóxicos para o organismo. O grau de toxidade, capaz de alterar o conjunto funcional orgânico, depende da dosagem e do indivíduo. Há substâncias altamente tóxicas que, em dosagens mínimas, entram na composição de vários remédios. E, há ainda, aquelas que só fazem efeito cumulativamente, mas a maioria entra em ação ao primeiro contato. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial (ROMERO-JIMÉNEZ et al., 2005), assim como diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais

possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (SILVA et al., 2009b).

A sociedade tem a percepção errônea de que todo produto natural é seguro e desprovido de efeitos colaterais, entretanto, não podemos esquecer que os mesmos possuem moléculas ativas que podem apresentar eficácia terapêutica, mas também inúmeros efeitos adversos, podendo, portanto, representar um problema sério de saúde pública (FERREIRA, 2010).

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas, e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAVALCANTE, et al., 2006). Outro exemplo é o confrei (*Symphytum officinale* L. - Boraginaceae), planta utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas que também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998).

Os óleos essenciais em especial, também não são isentos de propriedades tóxicas. Muitos deles, por exemplo, são agentes fotossensibilizantes como é o caso daqueles obtidos de frutos cítricos que possuem defuranocumarinas em sua composição. Os óleos de canela, funcho e alho que possuem alto teor de cinamaldeído podem ocasionar uma sensibilização, tipo reação alérgica, na primeira exposição à substância. Os óleos ricos em tujona (ex: sálvia), fenchona (ex: funcho), cânfora e pinocanfona (ex: manjeriço) são neurotóxicos em altas doses, podendo provocar convulsões, distúrbios sensoriais e até psíquicos. O óleo volátil de noz-moscada também pode produzir excitação, alucinações visuais e distorções de cores, devido possivelmente à presença de miristicina e elemicina (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

São exemplos de óleos essenciais que devem ser evitados, os provenientes de bétula (*Betula alba*), cedro (*Cedrela brasiliensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), jasmim (*Jasminum officinalis*), manjerona (*Majorana hortensis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), rosa (*Rosa sp.*) e lavanda (*Lavanda angustifolia*) (DAVIS, 1996; VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

A atividade de um fármaco antineoplásico baseia-se na busca da destruição de células tumorais, que têm como característica comum se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Porém, podem ocorrer efeitos secundários em células normais de

crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as células sanguíneas (especialmente na medula óssea), causando efeitos como anorexia, diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010). Considerando que as substâncias citotóxicas não são letais às células neoplásicas de modo seletivo, o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (ALMEIDA et al., 2005).

Diante disso, é evidente a importância da avaliação do balanço entre a atividade antitumoral *versus* toxicidade de um determinado produto para verificar sua aplicabilidade farmacológica, através de estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade, a qual não é tão econômica quanto se pensa, visto que exige um razoável investimento para o desenvolvimento das pesquisas (PUPO; GALLO e VIEIRA, 2007).

Modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são importantes para a obtenção de informações sobre a toxicidade de uma droga em estudo (TALMADGE et al., 2007).

Laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de produtos derivados de plantas na procura de substâncias bioativas.

Dentre esses bioensaios, encontra-se o ensaio frente *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada comumente usado 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 diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral, através da determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

Artemia salina Leach é um microcrustáceo da classe Anostraca de fácil cultivo e estudo, encontrado em águas salinas e salobras de todo o mundo, e é amplamente utilizado em um bioensaio para determinação de atividade biológica de extratos, frações ou compostos isolados de plantas (Brine Shrimp Test – BST).

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente *A. salina* e atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MacRAE et al., 1988) parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), tripanossomicida (ZANI et al., 1995), entre outras. Há, também, correlação com a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas (MacLAUGHLIN, 1991). As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais humanas, obtendo-se uma boa correlação. A significativa correlação entre o BST e a inibição do crescimento *in vitro* de linhagens de células tumorais humanas mostra

que esse bioensaio pode ser uma ferramenta útil para triagem na pesquisa de drogas antitumorais (ANDERSON et al., 1991).

Carballo et al. (2002) compararam extratos de produtos marinhos em relação ao ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e à citotoxicidade em duas linhagens de células humanas. Segundo os autores, os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já estabelecido para extratos de plantas (MCLAUGHLIN, 1991), ratificando que este bioensaio pode ser utilizado para testar produtos naturais com potencial atividade farmacológica.

Por motivos éticos e financeiros, a utilização de ensaios *in vitro* é fortemente recomendada para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de prever o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO et al., 2001). Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas a fim de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* em eritrócitos do organismo (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005). A membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos (AKI; YAMAMOTO, 1991). Vários estudos indicam que certos compostos isolados de plantas, tais como polifenóis, glicosídeos, saponinas e triterpenoides podem causar alterações nas membranas das células vermelhas do sangue e, posteriormente, produzir hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; BADER et al., 1996; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Resolução atual (RDC n. 14 de 31 de março de 2010), que dispõe o registro de medicamentos fitoterápicos, determina que um dos critérios para a avaliação da segurança de uso e indicações terapêuticas é a apresentação da comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica, e clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde - CNS através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução Específica (RE) n. 90, de 16 de março de 2004. Esse guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de Toxicologia pré-clínica de acordo com a resolução vigente para Registro e renovação de registro de fitoterápicos.

Esta resolução foi elaborada em conformidade com as normas da OMS, e recomenda estudos de toxicidade aguda (avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose

fracionada administrada no período de 24 horas), de doses repetidas (avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas), e quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos, estudos de genotoxicidade (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O ensaio toxicológico agudo permite conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte, as alterações hematológicas e bioquímicas, além de avaliar as lesões em órgãos específicos através dos exames histopatológicos. São obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (LARINI, 1999).

Em geral, o estudo da toxicidade de drogas derivadas de produtos naturais candidatas a agentes farmacológicos, é de fundamental importância, principalmente na área da quimioterapia antineoplásica.

2.6 *Croton grewoides*: família, gênero e espécie

A Fitoterapia, dada a sua capacidade de transformar e imprimir um saldo positivo quanto aos aspectos sócio-político-econômico, constitui-se uma valiosa opção para todos na América Latina, notadamente para o Brasil, visto que é considerado o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos (NOLDIN et al., 2006). O país tem mais de 56.000 espécies de plantas distribuídas em cinco diferentes ecossistemas, constituindo cerca de 19% da flora mundial (GUILIETTI et al., 2005).

As plantas, por sua vez, têm sido tradicionalmente utilizadas por populações em todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas, sendo reconhecidas mais de 13.000 espécies que são mundialmente consumidas como fármacos ou fonte de fármacos (SIMÕES et al., 2004).

Dentre as famílias de plantas medicinais existentes destaca-se a família Euphorbiaceae, que é a sexta maior família de vegetais do mundo, representada por 300 gêneros e nestes estão incluídos mais de 8.000 espécies distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo. Apesar de amplamente distribuída na região Amazônica, algumas espécies da família nunca foram estudadas do ponto de vista químico, farmacológico e/ou toxicológico (CRONQUIST, 1981; BERRY, 2006). Seus principais gêneros em número de espécies são: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (1.300), *Acalypha* L. (400), *Macaranga* Du

Petit Thouars (400), *Antidesma* Burman (150), *Drypetes* Vahl (150), *Jatropha* L. (150), *Manihot* Miller (150) e *Tragia* Plumier (150) (WEBSTER, 1994). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, de hábito e habitat diferentes, e difundidas em todos os tipos de vegetação (BARROSO et al., 1991).

O gênero *Croton* L. pertence à subfamília Crotonoideae, sendo uma das mais numerosas Euphorbiaceae com quase 1.300 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Para o Brasil, é o maior gênero da família, com um total de cerca de 350 espécies (BERRY, 2006). Esse gênero detém expressiva relevância alicerçada em seu conteúdo de óleos essenciais e diversas substâncias ativas como terpenoides, flavonoides e alcaloides (BRAGA, 1976).

No Nordeste, espécies desse gênero são usadas na medicina popular para o tratamento de inflamações (*C. sellowii*), úlceras (*C. cajucara*), diarreia (*C. triqueter*), hipertensão (*C. jacobinensis*), diabetes (*C. argyrophylloides*), asma (*C. rhamnifolius*) e câncer (*C. erythrochilus*) (PIACENTE et al., 1998; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; RAMOS et al., 2009).

Dentre as atividades farmacológicas experimentalmente comprovadas para o gênero *Croton* estão em destaque o seu potencial anti-inflamatório (ORTEGA et al., 1996), antifúngico (MACBAE; HUDSON; TOWERS, 1988), moluscicida (ROUQUAYROL et al., 1980), hipotensor (BHAKUNI et al., 1969), larvicida (KALYANASUNDARAM; DAS, 1985), antiviral (MACBAE; HUDSON; TOWERS, 1988), antiulcerogênico (HIRUMA-LIMA et al., 1999), analgésico (NARDI et al., 2006), antiestrogênico (COSTA et al., 1999), inseticida (ATAL et al., 1978), antimicrobiano (KUMAR; BAGCHI; DAROKAR, 1997), antioxidante (NARDI et al., 2003), antidiabético (TORRICO et al., 2007), laxativo (FARNSWORTH et al., 1969), antimutagênico (ROSSI et al., 2003), vasorelaxante (MILLER et al., 2001) e ainda mostraram citotoxicidade frente *A. salina* (HORGAN, 2001) e indução de diferenciação celular (MATA-GREENWOOD et al., 2001).

Adicionalmente, diversas espécies de *Croton* e diferentes constituintes delas isolados apresentam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* por diferentes mecanismos de ação. Dentre elas, podemos citar: *C. argyratus*, *C. cascarilloides*, *C. hieronymi*, *C. insularis*, *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. tiglium* e *C. zambesicus* (MORAES et al., 1997). Através de levantamento etnofarmacológico foi evidenciado que algumas espécies são utilizadas na medicina popular para o tratamento do câncer como *C. draco*, *C. tiglium*, *C. urucurana*, *C. oblongifolius*, *C. lechleri*, *C. erythrochilus* e *C. draconoides* (PIACENTE et al., 1998).

Os óleos essenciais de várias espécies de *Croton* têm sido caracterizados pela predominância de constituintes químicos da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos como principais componentes (MECCIA et al., 2000). Fenilpropanoides, como anetol e derivados do eugenol, são mais comuns nos óleos de erva-doce, cravo e manjerição, porém também têm sido relatados como os principais componentes dos óleos essenciais de algumas espécies de *Croton* encontradas em diferentes partes do mundo, como por exemplo, *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*, no Brasil (MORAIS et al., 2006); *C. molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ et al., 2005); e *C. pseudonivensis* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR; MONROY; BUSTAMANTE, 2003).

A espécie *Croton grewioides* Baill. (Figura 1) é conhecida popularmente como “canelinha” ou “canelinha-de-cheiro” em alusão ao aroma exalado pelas suas flores (SILVA; SALES; TORRES, 2009). É pouco relatada na literatura em relação aos seus aspectos farmacológicos nem toxicológicos.

Estudos recentes envolvendo a equipe de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, coordenada pelo Prof. Dr. Marcelo Sobral, permitiram a análise do óleo essencial obtido a partir das folhas de *C. grewioides* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM).

Um total de 18 compostos foi identificado, perfazendo 97,40 % do óleo essencial das folhas de *C. grewioides*. Monoterpeno (55,56%) e sesquiterpenos (44,44%) foram os principais grupos de constituintes químicos isolados, sendo os compostos majoritários: α -pineno (47,43%), sabineno (12,09%), limoneno (7,98%), biciclogermacreno (5,96%), trans-cariofileno (5,51%), germacreno D (4,96%). Por outro lado, outros componentes presentes no óleo das folhas, em menor percentual são: α -felandreno (0,61 %), 4-tujanol (0,55 %), α -humuleno (0,61 %), e delta-cadineno (0,46 %) (Tabela 1).



Figura 1 – Foto de *Croton grewioides* em seu habitat. (Foto: Josean Fachine Tavares).

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Croton grewioides*

SUBSTÂNCIAS	(% RELATIVA)
α -pineno	47,43
Sabineno	12,09
β -pineno	1,91
Mirceno	0,70
α -felandreno	0,61
Limoneno	7,98
1,8 cineol	2,21
γ -terpineno	0,61
4-tujanol	0,55
4-terpeneol	0,75
α -copaeno	1,29
trans-caryophylleno	5,51
α -humuleno	0,61
germacreno D	4,96
Bicyclogermacreno	5,96
β -bisabolenol	2,99
delta-cadineno	0,46
Spathulenol	0,78
Total identificado	97,40

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (O.E.C.) através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a bioatividade do O.E.C.. frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a citotoxicidade do O.E.C., em eritrócitos de camundongos Swiss, através da avaliação da atividade hemolítica;
- Avaliar a possível atividade antitumoral *in vitro* do O.E.C., frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do O.E.C., em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com base na RE n. 90/04 da ANVISA;
- Avaliar a possível atividade antitumoral *in vivo* do O.E.C., frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180 e sua toxicidade através da avaliação do consumo de água e ração, e evolução ponderal;
- Avaliar o efeito imunomodulador do O.E.C., através da determinação dos índices de baço e timo;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George localizados no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Material

4.2.1 Óleo essencial de *Croton grewoides*

O óleo essencial de *Croton grewoides* foi obtido por técnicas específicas e gentilmente fornecido por colaboradores da fitoquímica, os Professores Doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares.

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/CBiotec/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida (pellets de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB (CEPA), sob a certidão N° 0112/10.



Figura 2 – Camundongos Swiss provenientes do biotério Prof. Thomas George (Foto: Aline Xavier)

4.2.3 Células

Para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram utilizadas células tumorais da linhagem sarcoma 180 (linhagem murina) cedida pela Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (UFPE), e mantidas *in vivo* através de repiques semanais no Biotério Professor Thomas George (UFPB).

4.2.4 Cistos de *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram obtidos da *San Francisco Bay Brand*[®].

4.3 Métodos

4.3.1 Ensaio *in vitro*

4.3.1.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

A avaliação preliminar de uma possível atividade biológica do O.E.C. foi realizada utilizando-se o bioensaio com *Artemia salina*, segundo Meyer et al. (1982) e Nascimento; Araújo (1999). Os cistos de *A. salina* foram armazenados sob resfriamento a 4 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostraca, na forma de náuplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica. Em um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura e distribuídos uniformemente, foi adicionada água salina artificial preparada pela solubilização de 38 g de sal marinho (Marinex[®]) em 1 litro de água destilada. O recipiente permaneceu sob iluminação

através de uma lâmpada incandescente. Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 24 horas (22 - 29 °C) em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz para o outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo coletadas com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (Figura 2). O.E.C. foi solubilizado em DMSO (5%) e água salina artificial (Marinex[®]), para preparação de soluções em concentrações variando de 0 - 1000 µg/mL. A cada 5 mL dessas soluções foram adicionados 500 µL de água salina artificial contendo 10 náuplios. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em pelo menos três experimentos. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o solvente e as larvas. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para posterior determinação da CL₅₀ (concentração que produz 50 % de letalidade).

4.3.1.2 Avaliação da citotoxicidade do O.E.C. frente eritrócitos de camundongos

Os ensaios para avaliação da atividade hemolítica foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex[®] - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritócitos, 2 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução (0,9%) salina e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em salina (0,9%), obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O.E.C. foi solubilizado em DMSO (5%) e preparado em salina (0,9%), no dobro das concentrações desejadas. A cada 1 mL dessas soluções foi adicionado 1 mL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. O controle positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich[®]) em salina (0,9 %) (1 mL) e DMSO (5%) em salina (0,9%) (1 mL), respectivamente. Os tubos foram mantidos sob agitação suave por 60 minutos. Logo após esse período, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm para cálculo da CH₅₀ (concentração que produz 50 % de hemólise) através da determinação da percentagem de hemólise pela fórmula:

$$\%Hemólise = \left[\frac{(DO - DO_{CONTROLE NEGATIVO})}{(DO_{CONTROLE POSITIVO} - DO_{CONTROLE NEGATIVO})} \right] \times 100$$

Onde:

DO = Densidade óptica do tubo com o produto teste

DO_{CONTROLE NEGATIVO} = Densidade óptica do controle negativo

DO_{CONTROLE POSITIVO} = Densidade óptica do controle positivo

4.3.1.3 Avaliação da citotoxicidade do O.E.C. frente células da linhagem sarcoma 180

Células da linhagem sarcoma 180 foram utilizadas para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. As células foram coletadas da cavidade peritoneal de um camundongo com 7-10 dias de inoculação, solubilizadas com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e em seguida centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Nutricell®) suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10% SBF (Nutricell®). As células tumorais foram então semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware®) e incubadas com diferentes concentrações (10 – 640 µL) do O.E.C. por 24 h (37°C e 5% CO₂). O óleo essencial foi solubilizado em DMSO e então em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,1%. O experimento foi realizado em quadruplicata e repetido pelo menos duas vezes. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich®).

✓ Redução do sal de tetrazólio (MTT)

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa (Figura 3). A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado espectrofotometricamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido

é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

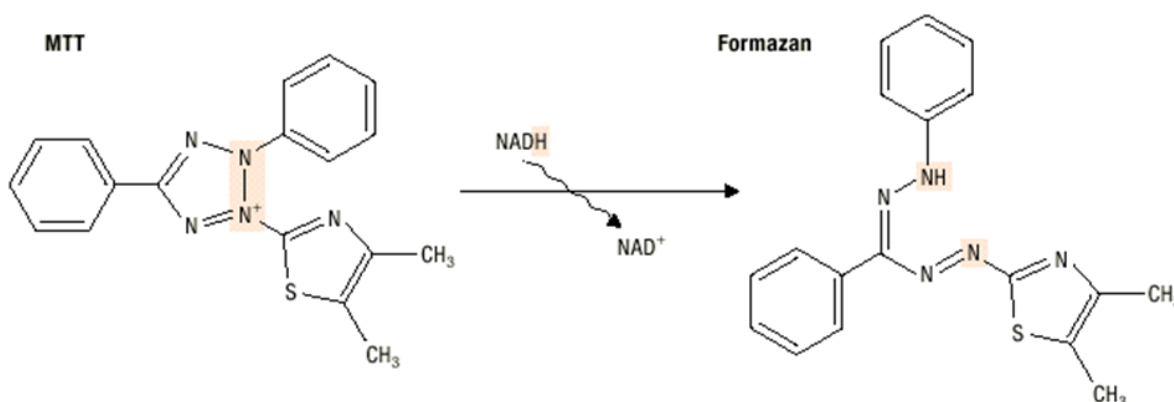


Figura 3 – Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan (MOSMANN, 1983).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Melo et al. (2003), com algumas modificações. Na placa de 96 poços com as células sob 24 h de tratamento, foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 h (37°C e 5% CO₂), o sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se aos 96 poços, 100 μ L de etanol absoluto para solubilizar o formazan produzido. A placa foi então agitada por 15 minutos e a absorbância lida em 570 nm. O cálculo da concentração da droga que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI₅₀) foi realizado através da determinação da percentagem de células viáveis com base na seguinte fórmula:

$$\% Viabilidade celular = \frac{[(DO_{Células\ tratadas} - DO_{Branco})]}{[(DO_{Controle\ negativo} - DO_{Branco})]} \times 100$$

Onde:

DO_{Células tratadas} = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO_{Controle negativo} = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DO_{Branco} = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

4.3.2 Ensaios *in vivo*

4.3.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do O.E.C.

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” (RE n. 90/2004 – ANVISA), com algumas modificações (BRASIL, 2004).

Camundongos Swiss, seis machos e seis fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses de 250, 375 e 500 mg/kg do O.E.C., via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (5% de Tween 80 em salina). O número de animais mortos foi contabilizado para determinação da dose responsável pela morte de 50 % dos animais experimentais (DL_{50}), com limite de confiança de 95 %.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do O.E.C. por via intraperitoneal, foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida e colaboradores (1999).

Durante todo o experimento foram observados o consumo de água e de alimentos. Ao final dos 14 dias todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por deslocamento cervical e autopsiados para observação de alterações macroscópicas dos órgãos (coração, fígado, rins, baço e timo) e determinação de seus índices [Índice = peso órgão (mg)/peso animal (g)]. (BRASIL, 2004).

4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do O.E.C. frente células da linhagem sarcoma 180

Células tumorais ascíticas da linhagem sarcoma 180, com oito dias após implante, foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via subcutânea (0,2 mL - 25×10^6 células/mL), na região subaxilar dos animais experimentais ($n = 6$). Vinte e quatro horas após a implantação, O.E.C. foi solubilizado em Tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5%) e administrado por via intraperitoneal durante sete dias, nas doses de 60 e 120 mg/kg. 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®) (25 mg/kg) foi usado como controle positivo. Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução de 5 % de Tween 80 (MONTENEGRO et al., 2008). No nono dia, todos os animais foram eutanasiados e os tumores extirpados e pesados. A inibição tumoral foi calculada seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{PI \%} = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

PI % = percentual de inibição do peso tumoral

A = média dos pesos dos tumores do grupo controle transplantado-S180

B = média dos pesos dos tumores de cada grupo tratado

4.3.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos com o tratamento de sete dias com o O.E.C., os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e ração.

4.3.2.2.2 Avaliação dos índices dos órgãos

No nono dia, todos os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado e rins) extirpados, pesados e examinados macroscopicamente, para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações, bem como determinação de seus índices.

4.4 Análise estatística

Os ensaios *in vitro* com células tumorais, foram realizados vezes com quatro replicatas cada. Os valores de CL₅₀, CH₅₀ e CI₅₀ foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95 %.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de *Tukey*, para a comparação de mais de dois grupos experimentais. Ambos para os dados que seguiam a distribuição gaussiana (paramétricos). Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m.), e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *in vitro*

5.1.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade com o microcrustáceo *A. salina* foi utilizado para avaliar a toxicidade do O.E.C., utilizando a CL₅₀ como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

A viabilidade dos náuplios de *Artemia salina* foi reduzida de maneira dependente de concentração após tratamento com O.E.C. em concentrações até 500 µg/mL, produzindo 100 % de mortalidade na concentração de 400 µg/mL. O valor de CL₅₀ obtido no bioensaio com *A. salina* foi de 191,4 (185,4 – 197,6) µg/mL (Gráfico 1).

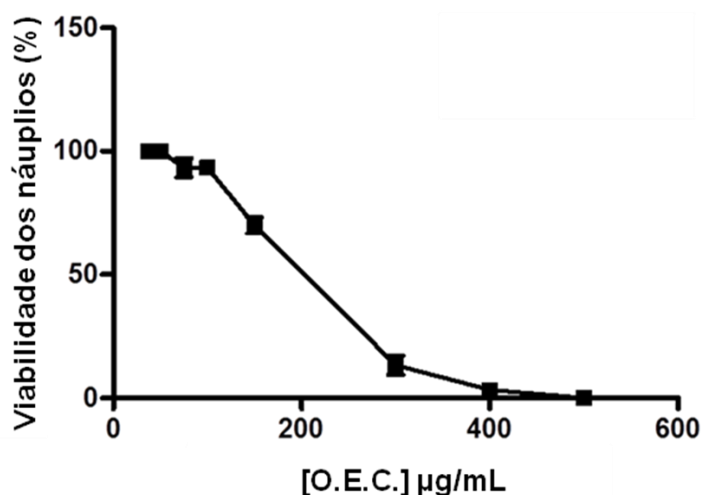


Gráfico 1 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com O.E.C. (µg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.1.2 Avaliação da citotoxicidade do O.E.C frente eritrócitos de camundongos

Para avaliar a citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* em células não tumorais foi realizado o ensaio de citotoxicidade com eritrócitos de camundongos Swiss. Os resultados obtidos mostram que a percentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com O.E.C., que produziu 100 % de hemólise em concentrações acima de 1500 µg/mL. O valor de CH₅₀ obtido foi de 370,3 (357,0 – 384,0) µg/mL (Gráfico 2).

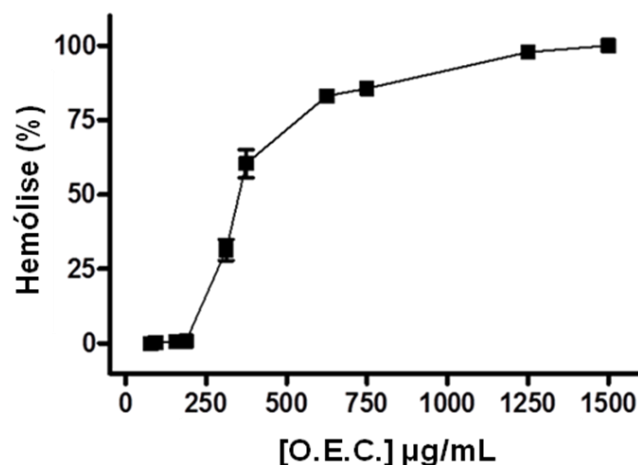


Gráfico 2 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com O.E.C. (µg/mL). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.1.3 Avaliação da citotoxicidade do O.E.C. frente células da linhagem sarcoma 180

Células da linhagem tumoral sarcoma 180 foram incubadas com concentrações crescentes do O.E.C. por 24 h e a viabilidade celular foi analisada através do ensaio de redução do MTT.

Os resultados mostram que O.E.C. reduziu a viabilidade celular de maneira dependente de concentração, com valor de CI_{50} de 217,7 (212,6 - 223,0) µg/mL (Gráfico 3).

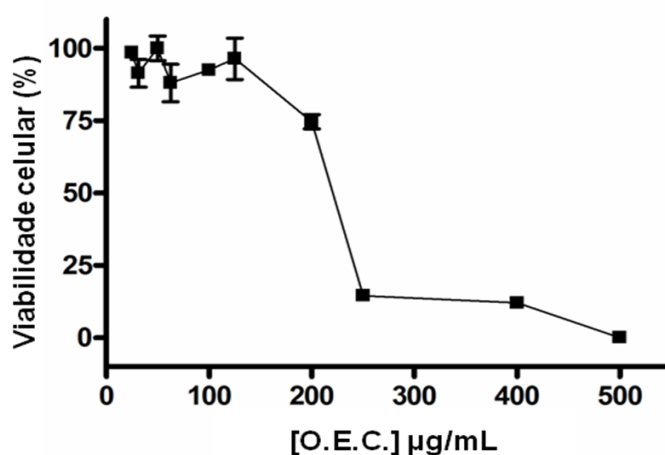


Gráfico 3 – Viabilidade celular após tratamento com O.E.C. Concentração-resposta através do ensaio de redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.2 Ensaios in vivo

5.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do O.E.C.

Após o tratamento agudo com doses de 250, 375 e 500 mg/kg do O.E.C. em camundongos Swiss, foi evidenciada uma relação dose-dependente na morte dos animais experimentais (nenhuma morte na dose de 250 mg/kg, 8 mortes na dose de 375 mg/kg, bem como na de 500 mg/kg). O valor de DL_{50} foi em torno de 366,1 mg/kg. Além disso, foram observados alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) como sedação, anestesia, analgesia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular dentre outros. Foi também observado efeitos como respiração forçada, característico da ativação do SNA. Os efeitos foram mais exacerbados nas doses mais elevadas tanto em machos como em fêmeas (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas (250, 375, 500 mg/kg) do O.E.C. em camundongos.

DOSE (mg/kg)	SEXO	M/T*	SINTOMAS
0	Machos	0/6	Nenhum
	Fêmeas	0/6	Nenhum
250	Machos	0/6	Ptose, sedação, anestesia, analgesia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, respiração forçada.
	Fêmeas	0/6	Ptose, sedação, anestesia, analgesia, perda do reflexo corneal e auricular, respiração forçada.
375	Machos	5/6	Sedação, anestesia, analgesia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, respiração forçada, piloreção.
	Fêmeas	3/6	Sedação, anestesia, analgesia, perda do reflexo corneal e auricular, respiração forçada, piloreção.
500	Machos	3/6	Sedação, anestesia, analgesia, ataxia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, respiração forçada.
	Fêmeas	5/6	Sedação, anestesia, analgesia, ataxia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, respiração forçada.

*M/T= número de camundongos mortos/número de camundongos tratados.

5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do O.E.C. frente células tumorais da linhagem sarcoma 180

Para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais da linhagem sarcoma 180, os camundongos transplantados foram tratados com O.E.C. nas doses de 60 e 120 mg/kg durante 7 dias.

Os efeitos inibitórios do O.E.C. no crescimento do tumor, em camundongos transplantados com sarcoma 180, estão mostrados no Gráfico 4.

Houve redução significativa do peso do tumor dos animais tratados com O.E.C., bem como nos tratados com 5-FU (droga padrão) em relação ao controle transplantado. No 9º dia, a média do peso do tumor do grupo controle transplantado foi $2,21 \pm 0,19$ g. Na presença do O.E.C. (60 e 120 mg/kg) as médias dos pesos dos tumores reduziram para $1,78 \pm 0,12$ e $1,33 \pm 0,04$ g, respectivamente. Para o grupo tratado com 5-FU (25 mg/kg), a média do peso do tumor foi $0,74 \pm 0,05$ g. As taxas de inibição do crescimento tumoral foram de 19,3% e 39,7% para os camundongos tratados com O.E.C. nas doses de 60 e 120 mg/kg, respectivamente, e 66,3% para os camundongos tratados com 5-FU (25 mg/kg).

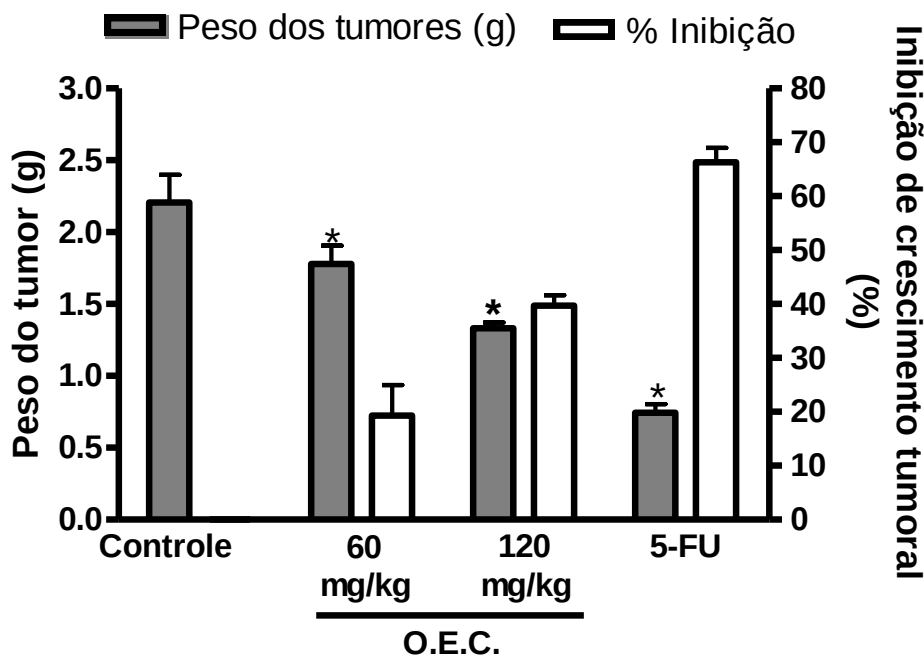


Gráfico 4 – Efeito do O.E.C. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor (%) dos diferentes grupos experimentais. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido por Tukey.

5.2.2.1 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Na Tabela 3 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e a evolução ponderal avaliados durante os sete dias de tratamento com O.E.C. e 5-FU. Observa-se que não houve diferenças significativas no consumo de água e ração nos animais tratados com O.E.C. em ambas as doses e com o 5-FU, quando comparados ao grupo controle transplantado.

Também não houve alteração na variação de massa corpórea dos animais tratados quando comparados com o grupo controle transplantado.

Tabela 3 – Consumo de água e ração e avaliação da variação de massa corpórea dos animais (n = 6) do diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	CONSUMO DE ÁGUA (mL)	CONSUMO DE RAÇÃO (g)	VARIAÇÃO DE MASSA CORPÓREA (g)
Controle – S180	---	32,5 ± 1,9	22,2 ± 0,9	+ 6,38 ± 0,9
5-FU	25	41,7 ± 3,1	20,4 ± 1,4	+ 4,63 ± 0,5
O.E.C.	60	31,4 ± 2,3	21,3 ± 1,2	+ 6,69 ± 0,7
O.E.C.	120	33,6 ± 2,5	19,8 ± 1,4	+ 4,34 ± 0,7

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

5.2.2.2 Avaliação dos índices dos órgãos

Para avaliar possíveis efeitos tóxicos do O.E.C. sobre os órgãos dos animais, fígado, rins, baço e timo foram extirpados e pesados, após a eutanásia dos animais, e analisados macroscopicamente. Nenhuma alteração macroscópica foi observada, em ambas as doses utilizadas. Os animais do grupo tratado com 5-FU também não apresentaram alterações macroscópicas em seus órgãos.

O tratamento com O.E.C. com as diferentes doses não resultou em nenhuma alteração significativa nos índices de todos os órgãos em relação ao controle transplantado. Após tratamento com 5-FU foi observado redução significativa nos índices de fígado, timo e baço, em relação ao controle transplantado (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeitos do O.E.C. (60 e 120 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ÍNDICE DE CORAÇÃO (mg/g)	ÍNDICE DE FÍGADO (mg/g)	ÍNDICE DE RINS (mg/g)	ÍNDICE DE TIMO (mg/g)	ÍNDICE DE BAÇO (mg/g)
Controle- S180	----	4,0 ± 0,2	60,2 ± 2,3	10,6 ± 0,4	2,7 ± 0,3	7,3 ± 0,4
5-FU	25	3,2 ± 0,2	49,2 ± 1,8 ^a	10,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,2 ^a
O.E.C.	60	4,0 ± 0,1	64,2 ± 2,1	11,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3	7,9 ± 0,5
O.E.C.	120	3,6 ± 0,3	57,6 ± 3,2	11,8 ± 0,8	2,2 ± 0,3	7,0 ± 0,6

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey

6 DISCUSSÃO

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetou de forma significativa o impacto do câncer no mundo (WHO, 2011). Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (BRASIL, 2011).

Considerando a situação atual, uma nova alternativa para o tratamento do câncer é urgente, visto que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou até mesmo desenvolvem resistência a estes agentes. O uso de produtos naturais como agentes anticâncer tem uma longa história que iniciou com a medicina popular e através dos anos foi incorporada à medicina alopática (COSTA-LOTUFO et al., 2005).

Nos últimos anos a importância dos organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, superando obstáculos na construção de cenário crescente, estimulando, inclusive, a percepção das lideranças industriais empenhadas na fabricação de produtos sintéticos (BRAZ FILHO, 2010). De acordo com Cragg e Newman (2005), cerca de 50 % das drogas utilizadas na clínica com atividade anticâncer foram isoladas de fontes naturais ou relacionadas a elas. Portanto, o uso de produtos naturais representa a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos usados na terapia anticâncer (BEZERRA et al., 2008).

O potencial terapêutico de diversos óleos essenciais tem, portanto, chamado a atenção de pesquisadores para testá-los para a atividade anticâncer, aproveitando o fato de que seu mecanismo de ação é diferente daquele dos clássicos agentes quimioterápicos citotóxicos. Os primeiros relatórios indicaram que componentes do óleo essencial, especialmente monoterpenos, têm múltiplos efeitos farmacológicos sobre o metabolismo do mevalonato, o que poderia explicar a atividade terpeno-tumor supressiva. Tais componentes têm sido relatados por exercer atividades quimiopreventivas bem como quimioterápicas em modelos tumorais e assim podem representar uma nova classe de agentes terapêuticos (EDRIS, 2007).

Dentro desse contexto, considerando uma gama de estudos evidenciando potentes atividades biológicas dos óleos essenciais e seus constituintes, tem-se um cenário propício

para a obtenção de novos produtos naturais com atividade antitumoral (BAKKALI et al., 2008; HUANG et al., 2010; BRITTO et al., 2012).

Vale aqui ressaltar que o produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico. Esses compostos podem servir como protótipo para o desenho e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais, (ORTHOLAND e GANESAN, 2004). Ou ainda ser utilizado em combinação com antitumorais já no mercado, que são altamente tóxicos, prática essa comum nos dias atuais, promovendo melhora da atividade farmacológica, com redução da dose, e assim diminuição dos efeitos colaterais.

Toxicidade é um evento complexo expresso em um largo espectro de efeitos, que variam desde simples morte celular até mudanças metabólicas complexas como neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade, onde não há morte celular necessariamente, mas sim alterações funcionais. Além da eficácia, a segurança de medicamentos fitoterápicos é de suma importância, pois pouco se sabe sobre o potencial tóxico de muitas plantas que são usadas na medicina tradicional (EISENBRAND et al., 2002).

Na investigação da atividade biológica de extratos de plantas e produtos naturais isolados de plantas, o teste de letalidade com *Artemia salina* tem sido usado como um método preliminar e valioso para o estabelecimento de toxicidade geral e parâmetros de citotoxicidade (MOSHI et al., 2007).

O teste frente *Artemia salina* tem demonstrado boa aceitabilidade decorrente da sua alta sensibilidade, baixo custo, rapidez e por ser de fácil manuseio (CAVALCANTE, 2000). *A. salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas (CALOW, 1993). Essa espécie marinha tem sido utilizada em experimentos laboratoriais como um bioindicador, sendo o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo que apresenta uma resposta nítida frente a pequenas variações na qualidade do ambiente (ABEL, 1989). A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de respostas biológicas, onde as variáveis morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982).

Uma correlação muito positiva entre o teste de letalidade com *Artemia salina* e citotoxicidade em células tumorais humanas foi estabelecida por pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos obtidos de plantas no Instituto Nacional de Câncer nos Estados Unidos (ANDERSON et al. 1991). Essa correlação é considerada tão boa que a triagem frente ao microcrustáceo é recomendada pelos

pesquisadores como um *pré-screen* eficaz para existência de citotoxicidade *in vitro* (ANDERSON et al., 1991; QUIGNARD et al., 2003; SILVA et al., 2009).

McLaughlin e colaboradores têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de compostos de plantas conhecidas como antitumorais (MEYER et al., 1982; McLAUGHLIN, 1991; RUPPRECHT et al., 1990). As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. A significativa correlação entre o bioensaio e a inibição do crescimento *in vitro* de linhagens de células tumorais mostra que esse método pode ser uma ferramenta útil para triagem na pesquisa de drogas antitumorais (ANDERSON et al., 1991, DA COSTA et al., 2010).

Como o teste pode ser utilizado para identificar potenciais substâncias anticâncer, os resultados podem significar que as plantas em teste apresentam alguma toxicidade ou podem ter atividade anticâncer em potencial. Todavia, resultados de toxicidade em animais serão cruciais como uma maneira de julgar definitivamente a segurança dos produtos testados (MOSHI et al., 2007).

Na avaliação do bioensaio com *A. salina*, valores de CL_{50} menores que 1.000 $\mu\text{g/mL}$ representam produtos bioativos (MEYER et al., 1982). Dessa forma, pode-se sugerir que O.E.C. é bioativo frente *A. salina*, uma vez que o valor de CL_{50} obtido para O.E.C. foi menor que 1.000 $\mu\text{g/mL}$, apresentando CL_{50} de 191,4 $\mu\text{g/mL}$, indicando assim que o óleo é um possível candidato a droga antitumoral.

Sabendo que o O.E.C. possui bioatividade, prosseguiu-se o estudo para avaliar a atividade antitumoral frente células da linhagem murina sarcoma 180. A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. O sistema MTT, usado para medir a atividade metabólica de células viáveis, é quantitativo e sensível. Por causa da relação linear entre atividade celular e absorbância, o crescimento ou taxa de morte de células pode ser mensurado (ATCC, 2001). O resultado do ensaio mostrou que o O.E.C. reduziu o crescimento de células sarcoma 180, de forma dependente de concentração, apresentando um valor de CI_{50} de 217,7 $\mu\text{g/mL}$, o que caracteriza uma fraca atividade citotóxica para o referido óleo na linhagem utilizada. Entretanto, outras linhagens de células, incluindo linhagens humanas, bem como outros ensaios de citotoxicidade devem ser realizados para melhor definir esse efeito.

Esse resultado mostra que não houve uma boa correlação com o resultado obtido no bioensaio com *A. salina*, o que pode ser pelo fato da linhagem testada ser murina, uma vez que essa correlação é bem sucedida com células tumorais humanas, reforçando ainda mais a necessidade de estudos utilizando tais linhagens celulares.

Considerando que as substâncias citotóxicas não são letais às células neoplásicas de modo seletivo, ou seja, estruturas celulares normais também são afetadas significativamente, a busca por novas drogas com maior potência quimioterápica e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante (PITA, 2010).

Efeitos citotóxicos de diferentes compostos podem estar relacionados com danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY et al., 2003).

A membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos (AKI e YAMAMOTO, 1991). Vários estudos indicam que certos compostos isolados de plantas, tais como polifenóis, glicosídeos, saponinas e triterpenoides podem causar alterações nas membranas das células vermelhas do sangue e, posteriormente, produzir hemólise (NG; LI e YEUNG, 1986; BADER et al., 1996; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

A partir deste fato, é possível inferir que a estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um indicador para avaliação da citotoxicidade de uma droga em estudo frente células não tumorais do organismo, fornecendo por meio de seus resultados indícios para uma possível toxicidade *in vivo* (AKI e YAMAMOTO, 1991; SILVA, 2007). Eritrócitos também fornecem um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células não tumorais *in vivo* (APARICIO et al., 2005; LEXIS et al., 2006; MUNOZ-CASTANEDA et al., 2006; SILVA et al., 2009). Este ensaio permite avaliar o potencial da droga-teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Agências regulatórias, a exemplo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam a realização de ensaios desta natureza para a aprovação de produtos cosméticos. O ensaio permite quantificar e avaliar os efeitos adversos dos tensoativos empregados em xampus, sabonetes líquidos e produtos de higiene sobre a membrana plasmática das hemácias e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise) e ainda, o índice de desnaturação da hemoglobina, avaliado através de sua forma oxidada, ambos quantificados por espectrofotometria. A relação entre a hemólise e oxidação da hemoglobina fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* (BRASIL, 2003).

Partindo dessas premissas, avaliou-se a citotoxicidade do O.E.C. em células não tumorais através do ensaio de citotoxicidade com eritrócitos de camundongos Swiss. O resultado obtido ($CH_{50} = 370,3 \mu\text{g/mL}$) sugere que O.E.C. apresenta moderada toxicidade

frente eritrócitos, células estas comumente afetadas nos tratamentos com agentes antineoplásicos. Segundo dos Santos Júnior e colaboradores (2010), um produto natural em estudo, para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar CH₅₀ maior que 1250 µg/mL.

Tal atividade corrobora com achados na literatura, uma vez que estudos indicam que alguns compostos isolados de plantas, tais como terpenoides, assim como polifenóis, epicatequinas e saponinas podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e subsequentemente produzir hemólise (NG et al., 1986; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

Um grande número de compostos de diferentes fontes foi apontado como sendo responsáveis por hemólise *in vitro*. Entre estes destacam-se substâncias derivadas de plantas (GANDHI e CHERIAN, 2000), metais pesados (RIBAROV e BEMOV, 1981) e produtos farmacêuticos (YAMAMOTO et al., 2001). O efeito hemolítico direto de diferentes agentes tóxicos é devido a uma variedade de mecanismos não específicos. Por exemplo, surfactantes causam hemólise através da dissolução da membrana plasmática de eritrócitos devido a aumento da fragilidade ou devido à lise osmótica causada pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (APARICIO et al., 2005). Por outro lado, compostos do tipo xenobióticos, tais como fenois, são capazes de promover hemólise através da oxidação da hemoglobina, formando metahemoglobina (BUKOWSKA e KOWALSKA, 2004). A bilirrubina promove a perda de lipídeos na membrana plasmática dos eritrócitos, com a exposição de resíduos de fosfatidilserina (BRITO et al., 2002). Saponinas, por sua vez, podem ser utilizadas como controle positivo para avaliação da ação hemolítica, pois são capazes de produzir modificações na membrana do eritrócito, causando ruptura e liberação de pigmentos de hemoglobina característicos (BADER et al., 1996).

Adicionalmente, estudos de uma variedade de agentes antineoplásicos, em diferentes linhagens celulares, têm demonstrado que alguns desses agentes executam sua função por indução de estresse oxidativo (CAO et al., 2004; MESHKINI e YAZDANPARAST, 2010).

É evidente que para que se possa precisar uma possível atividade oxidativa do O.E.C. sobre eritrócitos murinos, são necessários outros experimentos que investiguem esta atividade em especial, não realizados neste trabalho. Contudo, recentes estudos mostram que em células eucarióticas, óleos essenciais podem agir como pró-oxidantes afetando as membranas internas e organelas como a mitocôndria. Dependendo do tipo e concentração, eles exibem efeitos citotóxicos nas células vivas, mas são geralmente não-genotóxicos. Em alguns casos, mudanças no potencial redox intracelular e disfunção mitocondrial induzidas por óleos

essenciais podem ser associadas com sua capacidade de exercer efeitos antigenotóxicos. Esses achados sugerem que, pelo menos em parte, efeitos benéficos encontrados em óleos essenciais podem ser devido a efeitos pró-oxidantes em nível celular (BAKKALI et al., 2008).

Dessa forma, são necessários experimentos adicionais para descobrir o exato mecanismo responsável pelo efeito hemolítico do óleo em estudo, dentre eles, experimentos para quantificar o envolvimento do estresse oxidativo nesse mecanismo.

A investigação dos efeitos *in vivo* do O.E.C. iniciou-se com o teste toxicológico pré-clínico agudo, uma vez que a pesquisa com um novo produto natural deve apresentar estudos toxicológicos pré-clínicos capazes de proporcionar aos pesquisadores clínicos alguma segurança sobre as doses potencialmente tóxicas em animais de laboratório, além das provas de eficácia que deve demonstrar. Estes indícios de toxicidade são fornecidos pela dose letal mediana (DL₅₀), caracterizada como a dose única de uma substância capaz de provocar a morte de 50% dos animais experimentais, justificando a escolha das doses utilizadas para os experimentos de atividade antitumoral *in vivo* subsequentes (LITCHFIELD e WILCOXON, 1949; EATON e GILBERT, 2008).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado com O.E.C., em camundongos submetidos às doses de 250, 375 e 500 mg/kg, pela via intraperitoneal, obtendo-se uma DL₅₀ de 366,1 mg/kg. A triagem farmacológica descrita por Almeida e colaboradores (1999) apresenta uma metodologia simples para triagem de extratos, substâncias, dentre outros produtos vegetais com possíveis atividades estimulantes e depressoras do SNC e SNA.

Na observação dos parâmetros descritos no protocolo foram evidenciadas que as alterações/ efeitos foram tanto mais frequentes e intensos quanto maior a dose. Associando-se isso ao fato de não terem sido observados no grupo controle, e na primeira dose experimental (250 mg/kg) em grau bem diminuído, aparenta-se haver uma relação entre doses e efeitos tóxicos agudos do produto natural avaliado.

Nas demais doses experimentais (a partir de 375 mg/kg), foi constatado que as alterações neurológicas observadas em alguns animais logo nas primeiras 4 horas após o tratamento mostraram-se com predominância de sinais indicativos de ação depressora do Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente: ptose, sedação, analgesia e resposta ao toque diminuído.

A ocorrência de ptose palpebral é descrita em algumas classes de drogas depressoras como os neurolépticos e os analgésicos de ação central. Já a diminuição ou perda do reflexo à dor, sugere uma atividade antinociceptiva ou analgésica (ALMEIDA et al., 2006).

Foram ainda observados efeitos do O.E.C. sobre o SNA que sugerem inibição parassimpática, uma vez que foi registrado em destaque a respiração forçada (ALMEIDA et al., 2006).

De acordo com Mariz e colaboradores (2006), alguns dos parâmetros que evidenciam toxicidade são: paralisia do trem posterior, ptose palpebral, dispneia, perda de peso, dentre outras. Esta informação pode ser importante em estudos de mecanismos de toxicidade.

Não se ignora o fato, portanto, de que os indícios de toxicidade neurológica foram obtidos em doses que, apesar de elevadas, eram únicas, como convinham ao objetivo do experimento. É importante a observação ainda de que esses efeitos que se sugerem depressores sobre o SNC ocorreram em doses superiores às recomendadas para a terapêutica em ensaios farmacológicos com esse produto natural. Entretanto, maiores observações, como as realizadas a partir de experimentos toxicológicos com o tratamento prolongado com o produto em questão e/ou experimentos específicos de atividade sobre o SNC, seriam necessários para obterem-se maiores conclusões sobre os dados observados.

Uma vez realizado a triagem toxicológica inicial foi possível determinarmos as doses farmacológicas para prosseguirmos com o estudo, investigando a atividade antitumoral do O.E.C. *in vivo*.

Sarcoma 180 é um tumor de origem murina e é uma das linhagens mais frequentemente utilizadas em pesquisas de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*. Muitos efeitos farmacológicos observados em animais podem estender os resultados em alto valor de aplicação para a espécie humana (ITO et al., 1997; LEE et al., 2003; KINTZIOS, 2004).

Nos estudos de atividade antitumoral *in vivo* foi utilizado como controle positivo o antineoplásico 5-FU. Desde 1957, esse medicamento tem um importante papel no tratamento do câncer. Hoje em dia é utilizado principalmente no tratamento de cânceres de cólon, mama, cabeça e pescoço (PETERS e KÖHNE, 1999). O seu mecanismo de ação inclui inibição da timidilato sintase (TS) pelo 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), incorporação de 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação do 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA. A inibição da TS, uma enzima importante na síntese de pirimidina, resulta na depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoxiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA (NOORDHUIS et al., 2004).

Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, após sete dias de tratamento com o O.E.C., houve redução significativa do peso do tumor dos animais tratados com O.E.C., bem como nos tratados com 5-FU em relação ao controle transplantado. Portanto, pode-se afirmar

que existe uma atividade antitumoral *in vivo* significativamente moderada para o produto natural estudado (Gráfico 4).

Os dados de toxicidade de uma amostra são muito importantes e relevantes, uma vez que as neoplasias são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e muitos dos tratamentos utilizados nessas neoplasias, como os radioterápicos e quimioterápicos, tem efeitos colaterais indesejáveis (MACHADO et al., 2008). Portanto, há uma incessante busca de fármacos eficientes, que tenham baixa toxicidade e, conseqüentemente, causem o mínimo de efeitos colaterais (VERÇOSA JUNIOR et al., 2007).

Sabendo-se dos diversos efeitos colaterais que os fármacos antineoplásicos apresentam como resultado de sua toxicidade sobre outras células do organismo que não tumorais, procedeu-se também a investigação de possíveis efeitos tóxicos do O.E.C. durante o experimento de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, que foi caracterizado por doses repetidas ao longo de sete dias.

Praticamente todas as drogas antineoplásicas causam alterações gastrintestinais, dentre elas a anorexia. A anorexia está diretamente associada à desnutrição e à perda de peso. A incidência da primeira em pacientes com câncer varia de 40 a 80%, resultando em efeitos clínicos que se manifestam por dificuldade de cicatrização, aumento do risco de infecção, diminuição da resposta ao tratamento, da qualidade de vida e sobrevida, dentre outros (OLIVEIRA, 2010). Já a perda de peso está tipicamente associada à toxicidade (TALMADGE et al., 2007).

Neste contexto, parâmetros que podem ser avaliados nos estudos de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, realizados com animais, para investigação da toxicidade da droga em estudo sobre o sistema gastrintestinal, são o consumo de alimentos e a evolução ponderal (XAVIER, 2011).

No que diz respeito ao consumo de água e ração e variação de massa corpórea, os animais tratados com O.E.C. nas doses de 60 e 120 mg/kg não apresentaram nenhuma alteração em relação ao grupo controle transplantado, o que pode sugerir ausência de toxicidade gastrintestinal da substância em teste.

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o órgão excretor mais importante, e ambos são susceptíveis a drogas quimioterápicas. (KATZUNG, 2003).

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos. Está envolvido com a síntese de proteínas plasmáticas, lipídios e lipoproteínas, mas também tem função na reserva de energia, síntese de vários hormônios e, principalmente, é o órgão onde ocorre o metabolismo das drogas lipossolúveis, bem como de outros compostos potencialmente tóxicos (HENRY,

2008). Dessa forma, assim como os rins, o fígado é um órgão susceptível aos efeitos dos antineoplásicos.

Em relação ao índice desses órgãos, foi possível observar que não houve alteração no índice dos rins em nenhum grupo experimental e uma diminuição significativa no índice do fígado nos animais tratados com o 5-FU quando comparados ao grupo controle transplantado. A hepatotoxicidade apresentada está em concordância com os autores que mostram que hepatócitos, expostos a altas concentrações do 5-FU após administração intraperitoneal, apresentam redução de aproximadamente 5% do peso do órgão devido à ativação de processos apoptóticos (EICHHORST et al., 2001).

O sistema imune é um conjunto de células e órgãos que trabalham juntos para defender o corpo contra ataques de “invasores estrangeiros”. A degeneração ou atrofia dos órgãos relacionados ao sistema imune, influenciam as funções normais de todo o organismo. Nesse contexto, o baço e o timo são órgãos com funções importantes no sistema imunológico que geralmente são susceptíveis a várias drogas, principalmente aos agentes antineoplásicos (MOURA, 2012).

Em animais adultos, o timo está envolvido no estabelecimento e restauração das funções imunes, em particular a produção e desenvolvimento de linfócitos (YOKOZI, 1973). Assim, o timo fornece resistência contra o desenvolvimento de tumores em animais (OGISO et al., 1976).

A diminuição nos índices do timo e baço nos animais tratados com o 5-FU sugere que houve apoptose nesse tipo celular, como relatado por Eichhorst e colaboradores (2001) em seu estudo.

Não observou-se alterações nos índices do timo e baço dos animais tratados com o O.E.C. quando comparados ao grupo controle transplantado, o que permite uma conclusão parcial de ausência de uma possível imunomodulação pelo produto natural estudado. Vale ressaltar que os animais tratados com o 5-FU tiveram os índices do timo e baço diminuídos em relação ao controle transplantado, indicando atividade imunodepressora dessa droga, efeito este não foi observado no tratamento com o óleo essencial.

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, é possível concluir que o óleo essencial das folhas de *Croton grewioides*:

- Mostrou ser bioativo frente *Artemia salina*;
- Apresentou moderada toxicidade frente eritrócitos de camundongos Swiss;
- Apresentou fraco efeito antitumoral *in vitro* frente células da linhagem murina sarcoma 180;
- Apresentou moderada toxicidade aguda quando administrado a camundongos Swiss (i.p.);
- Apresentou atividade antitumoral *in vivo* significativamente moderada frente células tumorais murinas da linhagem sarcoma 180;
- Apresentou baixa toxicidade após ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, nas doses utilizadas;
- Não apresentou atividade imunoestimulante como parte do seu mecanismo de ação antitumoral, porém, também não produziu imunossupressão, que representa um dos principais efeitos indesejáveis da maioria dos quimioterápicos utilizados atualmente na prática clínica;

REFERÊNCIAS

- ABEL, P. D. **Water Pollution Biology**. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, 2010.
- AFOULOUS, S. et al. Helichrysum gymnocephalum Essential Oil: Chemical Composition and Cytotoxic, Antimalarial and Antioxidant Activities, Attribution of the Activity Origin by Correlations. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8273-8291, 2011.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da célula**. 4º ed. Editora Artmed, 2002.
- ALMEIDA, F.; OLIVEIRA, F.; ALMEIDA, R. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. **Almeida RN. Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; POLARI, R. M. P.; FILHO, J. M. B.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C. D.; FERREIRA, D. F.; ANTONIOLLI, A.; ARAÚJO, C. A. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A. & DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANDERSON, J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 107-111, 1991.
- APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 1063-1067, 2005.
- APTSIAURI, N. et al. Role of altered expression. of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 601, p. 123-131, 2007.
- ARAUJO, D.; ONOFRE, S. Ação do extrato hidroalcolico de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt. (Amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, América do Norte, 61 04 2011.

ARAVINDARAM, K.; YANG, N. Anti-Inflammatory plant natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1103-1117, 2010.

ASSEF, M. L. M. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an α -d-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. **Braz. J. morphol. Sci**, v. 19, n. 2, p. 49-54, 2002.

ATCC – “American Type Culture Collection”. **MTT Cell Proliferation Assay. Instructions**. 2001. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/2273.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2012. 15:45:10.

BADER, G. et al. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, v. 51, p. 414-417, 1996.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, A. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. **Viçosa: Imprensa Universitária**, v. 2, 1991.

BERRY, P. (2006) Croton Research Network. Madison, University of Wisconsin Board of Regents. Disponível em: <http://www.botany.wisc.edu/croton>. Acesso em: jun de 2012.

BEZERRA, D. P. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.

BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. Screening of indian plants for biological activity. Part II. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 7, p. 250-262, 1969.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste: especialmente do Ceará**. (Coleção Mossoroense, 42). Natal: Fundação Guimarães Duque, p.509, 1976.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para Avaliação e Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília, DF 2003.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o "Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos"**. Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília, DF 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 1829, 2010.

BRITO, M. A.; SILVA, R. F. M.; BRITES, D. Bilirubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v.18, p. 181-192, 2002.

BRITTO, A. et al. In Vitro and In Vivo Antitumor Effects of the Essential Oil from the Leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta medica**, 2012

BEZERRA, D. P. *In Vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta medica**, v. 78, p. 409-414, 2012.

BROWN, J.M.; ATTARDI, L. D. The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. **Nature Reviews: Cancer**, v.5, p. 231- 237, 2005.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce pre-hemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, v. 152, p.73-84, 2004.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 155-163, 1998.

CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology**. Blackwell, Oxford, UK, v. 1, 1993.

CAO, D. X. et al. Comparison of burst of reactive oxygen species and activation of caspase-3 in apoptosis of K562 and HL-60 cells induced by docetaxel. **Cancer Letters**, v. 214, n. 1, p. 103-113, 2004.

CARBALLO, J. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 17, 2002.

CAVALCANTE, M. F. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia Salina*. **Química Nova**, v. 23, n.1, p. 20-22, 2000.

CAVALCANTI, B. C. Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados Nor- β -lapachônicos: Estudos de mecanismo de ação. 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal da Ceará, Fortaleza, 2010.

CAVALCANTI, B. C.; ROSA, R. M.; MOURA, D. J.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BURBANO, R. R.; RAO, V. S. N.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388-392, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G. M. A., FARIAS, P. A. M., VIANA, G. S. B., CUNHA, K.M.A., PESSOA, C., MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R., GRAMOSA, N.V., RAO, V.S.N., The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon** v. 40, p.1231–1234. 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 21–30, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRONQUIST, A. **An integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, v. 55, 1981.

DASH, P. Apoptosis. Disponível em: <<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/index.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

DAVIS, P. **Aromaterapia**, Ed. Martins Fontes: São Paulo, 1996.

DEANGELIS, L. M. Brain tumors. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 2, p. 114-123, 2001.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DUARTE, M. C. Novos diterpenos dos frutos de *Xylopia langsdorffiana*. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2010.

DUNCAN, J. S.; TUROWEC, J. P.; VILK, G.; LI, S. S. C.; GLOOR, G. B.; LITCHFIELD, D. W. Regulation of cell proliferation and survival: Convergence of protein kinases and caspases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, p. 505-510, 2010.

EATON, D. L.; GILBERT S. G. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**, 7.ed. New York: MacGraw-Hill, cap. 2, p. 11-43, 2008.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

EICHHORST, S. T. et al. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95 (APO-1/Fas) system. **Cancer Research**, v. 61, n. 1, p. 243, 2001.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, p. 479-517, 2005.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo Celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal Health Science Institute**, v. 30, n. 2, p.107- 111, 2012.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FISCHER, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 187-215, 2005.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products - a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 382-391, 2003.

FONTENELLE, R. O. S. Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. E de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. isolados de cães. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

FRESHNEY, R. I. In: **Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique**. 3 ed. New York: Wiley-Liss, p. 486, 1994.

GANDHI, V.M.; CHERIAN, K.M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p. 513-516, 2000.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GRINBERG, L. N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIM, E.; CHEVION, M.; RACHMILEWITZ, E. A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 973-978, 1997.

HADNAGY, W.; MARSETZ, B.; IDEL, H. Hemolytic activity of crystalline silica-separated erythrocytes versus whole blood. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 206, n. 2, p. 103-107, 2003.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HARZALLAH, J. H.; KOUIDHI, B.; FLAMINI, G.; BAKHROUF, A.; MAHJOUB, T. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1469–1474, 2011.

HEINZMANN, B. T.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde, Santa Maria**, v. 33, n 1, p 43-48, 2007.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 239-249, 2006.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. Manole. ISBN 8520415113, 2008.

HIGUCHI, Y. Glutathione Depletion-induced Chromosomal DNA Fragmentation Associated with Apoptosis and Necrosis. **Journal Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 455-464, 2004.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 65, p. 325-330, 1999.

HOLBECK S. L. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 785-793, 2004.

HUANG, G. D.; YANG, Y. J.; WU, W. S.; ZHU, Y. Terpenoids from the aerial parts of *Parasenecio deltophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1954-1957, 2010.

ITO, H. et al. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101)" Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer research**, v. 17, n. 1A, p. 277, 1997.

JAAFARI, A.; MOUSE, H. A.; M'BARK, L. A.; TILAOUI, M.; ELHANSALI, M.; LEPOIVRE, M.; ABOUFATIMA, R.; MELHAOUI, A.; CHAIT, A.; ZYAD, A. Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonettii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction. **Herba polonica**, v. 55, n. 2, p. 36-49, 2009.
JO, J. R.; PARK, J. S.; PARK, Y. K.; CHAE, Y. Z.; LEE, G. H.; PARK, G. Y.; JANG, B. C. *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. **International Journal of Oncology**, 2011.

KALYANASUNDARAM, M.; DAS, P. K. Larvicidal & Synergistic activity of plant extracts for mosquito control. **Indian Journal Medical Research**, v. 82, p. 19-23, 1985.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comp. Biochem. and Physiol.**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KATZUNG, B. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9 ed. USA: McGraw-Hill Medical, 2003.

KAWAKUBO, Y.; KOMIYAMA, K.; UMEZAWA, I.; NISHIYAMA, Y. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. Cancer **Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, p. 113-118, 1980.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **ROBBINS: Patologia Básica**. Editora Guanabara Koogan. 8.ed, 2010.

KINTZIOS, S. E. What do we know about cancer and its therapy. In: KINTZIOS, S. E. B., M. G. (Ed.). **Plants That Fight Cancer**. Boca Raton / Florida: CRC Press LLC, 2004. p.1-14.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v. 73, p. 85-90, 1982.

LAHLOU, M. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 435-448, 2004.

LAM, K. L. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p. 31, 1999.

LEE, Y. L. et al. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental animals**, v. 52, n. 5, p. 371-375, 2003.

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -Lipoic Acid Enhance the Erythrocyte Antioxidant Defence in Cyclosporine A-Treated Rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 98, n. 1, p. 68-73, 2006.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. Simplified method of evaluations dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, p. 99-113, 1949.

LONGATO, G. B.; RIZZO, L. Y.; SOUSA, I. M. de O.; TINTI, S. V.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA G. M.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. **Planta Médica**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1270889>>. Acesso em: 03 Out 2011.

LUO, J.; SOLIMINI, L.; ELLERDGE, S. J. Principles of câncer therapy: Oncogene and Non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p. 823-837, 2009.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MACHADO, V. et al. O Carvedilol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas Antraciclinas (Doxorrubicina). **Revista portuguesa de cardiologia**, v. 27, n. 10, p. 1277-1296, 2008.

MAcBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N.; Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143 - 172, 1988.

McLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: DEY P. M.; HARBONE J. B. (ed.): **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, p. 1-32, 1991.

MacRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-72, 1988.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 372-378, 2006.

MATA-GREENWOOD, E.; ITO, A.; WESTENBURG, H.; GUL, B.; MEHTA, R. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. **Anticancer Research**, v. 21, p. 1763-1770, 2001.

MATSUO, A. L.; TANAKA, A. S.; JULIANO, M. A.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. A novel melanoma-targeting peptide screened by phage display exhibits antitumor activity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 12, p. 1255-1264, 2010.

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135-141, 2001.

MESHKINI, A.; YAZDANPARAST, R. Involvement of oxidative stress in taxol-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MONTENEGRO, R. C.; FARIAS, R. A. F.; PEREIRA, M. R. P.; ALVES, A. P. N. N.; BEZERRA, F. S.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-7, 2008.

MOSHI, M. J. et al. Brine shrimp toxicity evaluation of some tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **African Journal of Traditional. CAM**, v. 4, n. 2, p. 219 – 225, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA, A. P. G. **Avaliação da atividade e toxicológica do óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. 2012 (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R. *et al.* Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicology letters**, v. 160, n. 3, p. 196-203, 2006.

NASCIMENTO, I. A.; ARAÚJO, M. M. S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicol. and Envir. Rest.**, v. 2, p. 41-47, 1999.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. 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.

NG, T. B.; LI, W. W.; YEUNG, H. W. A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 55-61, 1986.

NOGUEIRA, R. C., CERQUEIRA, H.F., SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion Ther. Patents**, v. 20, n. 2, p.1-13, 2010.

NOLDIN, V.F. *et al.* Gênero *Calophyllum*: importância clínica e farmacológica. **Química Nova**, v.29, p.549-54, 2006.

NOORDHUIS, P. *et al.* 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of oncology**, v. 15, n. 7, p. 1025, 2004.

OLIVEIRA JUNIOR, R. J. **Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180**. 2008. (Dissertação de Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

OLIVEIRA, T. A importância da alimentação durante o tratamento do câncer. 27/09/2011 2010. Disponível em: <
<http://www.oncoguia.com.br/site/interna.php?cat=75&id=344&menu=54>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2012.

O'PESSOA, C. Testes *in vivo* e *in vitro* para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro. 1992. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1992.

ORTEGA, T.; CARRETERO, M. E.; PASCUAL, E.; VILLAR, A. M.; CHIRIBOGA, X. Anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of plants used in traditional medicine in ecuador. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 121-122, 1996.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combination chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 271-280, 2004.

OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Câncer. Novos alvos para tratamento. **Ciência hoje**, v. 38, n. 223, p. 28-33, 2006.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.4, p. 439-445, 2010.

PEREZ-AMADOR, M. C.; MONROY, M. A.; BUSTAMANTE, G. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C. suberosus* (Euphorbiaceae) species. **Phyton.**, v. 53, p. 109 - 112, 2003.

PETERS, G.; KÖHNE, C. **Fluoropyrimidines as antifolate drugs**: Humana Press: Totowa, NJ: 101-145 p. 1999.

PIACENTE, S; BELISARIO, M. A.; DEL CASTILLO, H.; PIZZA, C.; DE FEO, V. *Croton ruizianus*: platelet proaggregating activity of two new pregnane glycoides. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 318-322, 1998.

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. 2010. 105f (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, p. 432-444, 2004.

PORTUGAL, L. M. Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. 2012. 97 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Ministério da Saúde, Belo Horizonte, 2012.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, Nov/Dec, 2007.

QUIGNARD, E.L.J. et al. Screening of plants found in Amazonas State for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazonica**, v.33, p. 93-104, 2003.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global prespective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

RIBAROV, S. R.; BEMOV, L.C. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 640, p. 721-726, 1981.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUNOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicine herbs. **Mutation Research**, v. 585, p. 147-155, 2005.

ROUQUAYROL, M. Z.; FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. E.; JOSE DE ABREU MATOS, F.; CRAVEIRO, A. A. Molluscicidal activity of essential oils from northeastern

brazilian plants. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 135-143, 1980.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y-H.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SAHPAZ, S.; BORIS, C. H.; LOIEAU, P. M.; CORTES, D.; HACQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, p. 538-40, 1994.

SCHREIER, H.; GAGNÉ, L.; BOCK, T.; ERDOS, G. W.; DRUZGALA, P.; CONARY, J. T.; MULLER, B. W. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 215-223, 1997.

SILVA, J. F. S. Padrão de distribuição do câncer em cidade da zona de fronteira: tendência da mortalidade por câncer em Corumbá, Mato Grosso do Sul, no período 1980-2006. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 1, p. 65-74, 2011.

SILVA, M. S. *et al.* Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.

SILVA, M. V. B. Avaliação da citotoxicidade e indução de diferenciação e apoptose por diterpenos de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul (Annonaceae). 2007. 104. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007.

SILVA, S.A.S. *et al.* Estudo da atividade mutagênica das plantas, *Euphorbia milii* Des Moulins & *Ricinus communis* L. através do teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2^a, p. 418-422, 2009b.

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**, v. 18, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2004.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four tetrazolium salts. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.

SMITH, J. A.; NGO, H.; MARTIN, M. C.; WOLF, J. K. An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. **Gynecologic Oncology**, v. 98, p. 141-145, 2005.

SOEUR, J.; MARROT, L.; PEREZ, P.; IRAQUI, I.; KIENDA, G.; DARDALHON, M.; MEUNIER, J. R.; AVERBECK, D.; HUANG, M. E. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. **Mutation Research**, v. 718, p. 24-32, 2011.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 224, p. 31-43, 2005.

SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 971-981, 2005.

SUHAIL, M. M.; WU, W.; CAO, A.; MONDALEK, F. G.; FUNG, K. M.; SHIH, P. T.; FANG, Y. T.; WOOLLEY, C.; YOUNG, G.; LIN, H. K. *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. **BMC Complement Altern Med.**, v. 11, p. 129, 2011.

TALMADGE, J. E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 3, p. 793, 2007.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 289-306, 2006.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERÇOSA JUNIOR, D. et al. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos; Influence of *Agaricus blazei* Murrill in solid Ehrlich tumor and popliteal lymph nodes in mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 150-154, 2007.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, P. M.; PAULA, J. R.; CHEN-CHEN, L. *Solanum paniculatum* L. Leaf and Fruit Extracts: assessment of modulation of cytotoxicity and genotoxicity by micronucleus test in mice. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.6, p.1-7, 2010.

WHO. **Câncer**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 12 set. 2012. 22:25:12.

XAVIER, A. L. **Estudo do Potencial Antitumoral do Óleo Essencial das Folhas de *Lippia microphylla* (Verbenaceae) e sua Toxicidade**. 2011. (Dissertação Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa

YAMAMOTO, T. et al. *In vitro* method for prediction of the phototoxic potentials of fluoroquinolones. **Toxicology In Vitro**, v. 15, p.721-727, 2001.

YOKOZI, K. Men-eki No Byori. **Edited. by MIHASHI, S**, 1973.

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, p. 47-50, 1995.

ZHANG, A.; ZHU, Q. Y.; LUK, Y. S.; HO, K. Y.; FUNG, K. P.; CHEN, Z. Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, p. 383-394, 1997.

ZHANG, J.; XU, M. Apoptotic DNA Fragmentation and Tissue Homeostasis. **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 84-89, 2006.

ZHANG, S.; ZHENG, L.; XU, L.; SUN, H.; LI, H.; YAO, J.; LIU, K.; PENG, J. Subchronic toxicity study of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 221–230, 2012.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of sarcoma 180. **Cancer Res**, v. 33, n. 10, p. 2278-82, 1973.

S725a *Sousa, Tatyanna Kélvia Gomes de.*

Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de
**Croton grewioides* *(*Euphorbiaceae*) / Tatyanna Kélvia Gomes de Sousa. - - João
Pessoa: [s.n.], 2013 .

65 f.: il. -

Orientadora : Marianna Vieira Sobral .

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. *Croton grewioides*. 2. *Óleo essencial*. 3. *Atividade antitumoral*. 4. *Toxicidade*.