

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

ANA PAULA GOMES MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopiã langsdorffiana* St. Hil. & Tul.
(ANNONACEAE)**

JOÃO PESSOA - PB

2012

ANA PAULA GOMES MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul.
(ANNONACEAE)**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, para obtenção do grau de
MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
concentração: FARMACOLOGIA.**

ORIENTADORA:

PROFa. DRa. MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

JOÃO PESSOA - PB

2012

M929a Moura, Ana Paula Gomes.

Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica do óleo essencial dos frutos de Xylopia langsdorffiana St. Hil. & Tul. (Annonaceae) / Ana Paula Gomes Moura.-- João Pessoa, 2012.

117f. : il.

Orientadora: Marianna Vieira Sobral Castello Branco
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Xylopia langsdorffiana. 3.
Óleo essencial. 4. Atividade antitumoral. 5. Toxicidade.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ANAPAULA GOMES MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopi* *langsdorffiana* St. Hil. & Tul.
(ANNONACEAE)**

APROVADA EM 29 / Fevereiro /2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco

Orientadora – UFPB

Profo. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Examinador Interno – UFPB

Profa. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes

Examinador Externo – UFPB

Dedico esta dissertação aos que dedicaram a vida a me oferecerem o melhor: meus pais, *João Amilcar de Moura Alexandre* e *Darcy Gomes Alexandre*.

E ao meu amado esposo *Daniel Arruda de Farias*, assim como ao fruto de nosso amor “o pequeno” *João Lucas* ainda em meu ventre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu fiel escudeiro, aquele que ilumina meus passos, que me cobre de bênçãos e me ama incondicionalmente: **Deus!**

A Universidade Federal da Paraíba, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho assim como à coordenadora prafa. Dra. Maria de Fátima Agra

À minha orientadora **Marianna Vieira Sobral**, que além de todos os ensinamentos científicos, de toda sabedoria compartilhada com tanta humildade, tornou-se uma amiga, um exemplo de mulher, de cidadã, de mãe...Sou grata a Deus por ter cruzado nossos caminhos! E ao fofíssimo Paulo Mariano por ter compartilhado sua mãezinha até nas horas da mamada!

Às professoras **Leônia Maria Batista** e **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, minhas tutoras durante todo o curso de farmácia, quem me ensinaram o “B-A-BÁ” da vida acadêmica, me mostraram os caminhos certos a serem seguidos dentro da Universidade e assim consegui trilhar a pesquisa, o ensino e a extensão! Dessa forma agradeço também ao PET-Farmácia que possibilitou essa vivência e à funcionária e amiga **Ivoneide** por toda dedicação!

À Professora **Teresinha Gonçalves da Silva** (UFPE), por sua parceria tão valiosa na realização de todo esse trabalho, abrindo as portas de seu laboratório, fornecendo linhagens celulares, compreensiva com nossas dificuldades, demonstrando sempre o espírito de companheirismo!

Ao professor **Reinaldo Nóbrega de Almeida** que aceitou participar da avaliação deste trabalho mesmo sendo tão ocupado o que me deixa lisonjeada pois o admiro como profissional e como pessoa desde da graduação.

À professora **Liana Clébia** por sua imensa compreensão e valiosa colaboração para o resultado final deste trabalho, demonstrando mais uma vez a pessoa maravilhosa que temos como colaboradora de nosso laboratório.

Aos professores colaboradores **Marcelo Sobral** e **Josean Fachine**, por terem me concedido o óleo, objeto do meu trabalho, além das informações sempre precisas.

À professora **Salete Trigueiro**, pela sua rica sabedoria e extrema dedicação no auxílio ao meu trabalho no histopatológico. Seus ensinamentos foram essenciais. Agradeço também ao **Sr. Pachelli**, cuja experiência foi essencial para que o meu trabalho desse certo, com toda a sua dedicação e presteza. O mesmo digo para Profa. **Karina Medeiros** (UFRN), por seus conhecimentos na histopatologia.

À professora **Hilzeth Pessôa**, que nos ensinou e auxiliou na realização dos experimentos toxicidade *in vitro* e genotoxicidade. É uma parceira de nosso LABETOX muito competente e sempre pronta a nos ajudar.

Aos meus pais, **João Amilcar de Moura Alexandre** e **Darcy Gomes Alexandre**, por todo o amor, dedicação, ensinamentos de caráter, humildade... tantas palavras sábias proferidas em meus ouvidos que jamais serão esquecidas! Vocês sempre foram os maiores incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional... Essa é mais uma etapa conquistada!

Ao meu amando esposo **Daniel Arruda de Farias**, que admiro tanto, pelo companheirismo e compreensão prestada não só nesta etapa, como também em nosso dia-dia. A minha sogra **Lizete Arruda de Farias** (*in memorian*) e meu sogro **João Bosco** (*in memorian*) que lá do céu intercedem por nós e iluminam nossa família.

De forma muito especial agradeço ao nosso “pequeno” **João Lucas**, que ainda em meu ventre participou da fase final desse trabalho, tão comportado, sem promover grandes transtornos... Uma gestação saudável!

As minhas queridíssimas irmãs, **Gláucia Gomes Moura**, **Kenya Gomes Moura** e **Jussara Gomes Moura**, cada uma de forma peculiar, ajudou a construir minha personalidade, a escolher meus caminhos e me passam até hoje suas experiências de vida para facilitar minhas escolhas. Certamente eu não seria a mesma sem vocês! Ao meu irmão **Emídio Moura** pela torcida sempre constante em cada desafio da minha vida, até por que, comemorar é com ele mesmo (*risos*)!

A todos sem exceção da família **Gomes**...impossível citar todos, família grande, exemplo de união, família alegre, festeira... quem conhece quer fazer parte e quem entra não sai mais...obrigada por tudo!

À família **Moura-Alexandre**, não tão numerosa quanto os Gomes, mas tão amada quanto, de forma especial a minha avó **Maria Moura** (*in memorian*), um exemplo de mulher forte, organizada e vaidosa.

A todos os alunos de iniciação científica (IC's) do LABETOX: **Tatianna Mota, Waleska, Viviane, Madson, Beatriz** que estiveram presente em cada experimento sem hora para terminar, final de semana, férias, além do companheirismo e amizade! De forma especial a "minha IC" **Tatyanna Kelvia** que tenho certeza foi um presente de Deus pra mim, uma pessoa meiga, responsável, inteligente, disponível 24h e sempre muito disposta! Desejo que todos sigam o exemplo de nossa exemplar ex-IC **Débora**, hoje mestranda!

Aos meus amigos **João Carlos Pita** e **Aline Xavier**, doutorandos do LABETOX, os quais devo tanto favor que não sei se os quatro anos de doutorado vai dar tempo (risos)! Pessoas incrivelmente prestativas e inteligentes! Saibam que podem contar sempre comigo também! A doutoranda **Carol Uchôa** pela experiência acadêmica e de vida compartilhada e a mais nova doutora do LABETOX, Dra. **Igara Lima**, me diga os caminhos das pedras (risos).

A todos os amigos da minha turma de mestrado que compartilharam as disciplinas, um ajudando aos outros, sem competição, uma turma amiga e unida até na tão concorrida seleção de doutorado...Guardo uma lembrança especial de cada um...não é a toa que estaremos todos juntos novamente! Em especial aos amigos **Ítalo** e **Jacqueline** (essa dormiu sentada me ajudando), um casal que admiro e torço demais, assim como **Paula, Fagner, Abraão, Patrícia, Sarah...** que me ajudaram tanto a desvendar os misteriosos papers! E como não agradecer a minha amiga, parceira de sala do primeiro ao último seminário, noites em branco compartilhadas, no começo duas estranhas estressadas numa terra desconhecida (risos), hoje duas amigas confiantes que juntas a gente consegue! Temos muitas histórias para contar (risos), obrigada Day (**Daiene Lunguinho**) por tudo! E a nossa sábia Mona (**Monalisa Brito**) amigona, com tanta sabedoria e tanta humildade para repassar seus

conhecimentos. Você é um exemplo pra mim, amiga! Sinto-me orgulhosa quando consigo lhe ajudar nas suas dúvidas pessoais! Obrigada por toda sua disponibilidade e compaixão!

A **todos os professores das disciplinas do mestrado**, muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados!

As secretárias da pós-graduação, **Tânia Maria Araújo, Caroline Medeiros Manguiera e Francis-Mary Nogueira** pelos serviços prestados. A todos os funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica em especial **Crispim Duarte**, pelo apoio e prestatividade em todos os assuntos relacionados com experimentação animal.

Aos amigos da graduação de Farmácia de forma especial à amiga querida **Ana Silvia Suassuna** que é uma pessoa ímpar, talentosa, que tanto me apoiou na seleção do mestrado e que faz parte do meu quinteto (**Ritta, Mayrielle, Igor e George**) os quais também agradeço muito pela amizade ao longo desses anos. Ao amigo **Vitor Lorenzo** que compartilhou seus conhecimentos de química com tanta paciência para a seleção do mestrado.

Aos **amigos do Centro de Atenção Psicossocial (CAPS)** que compreenderam minha vida corrida, dedicada a esta pós-graduação e me apoiaram em cada etapa, em especial a coordenadora **Eliane Mendes** que possibilitou a flexibilidade de horário para realização deste sonho.

Aos **meus companheiros de trabalho do Curso Técnico em Hemoterapia**, com os quais divido minha primeira experiência como professora, aprendendo diariamente com eles, obrigada pela compreensão nessa fase final deste trabalho!

A muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seu estimável apoio em distintos momentos, o meu reconhecimento e carinhoso muito obrigada!

Senhor!

“Fazei de mim um instrumento da vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor.

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve a união.

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.

Onde houver erro, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre,

fazei que eu procure mais:

consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois é dando que se recebe.

É perdoando que se é perdoado.

E é morrendo que se vive para a vida eterna”.

São Francisco de Assís

“Dê a quem você ama:

Asas para voar...

Raízes para voltar...

Motivos para ficar...”

Dalai Lama

MOURA, A. P. G. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE).** 2012. 117f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CBioTec/ CCS, João Pessoa.

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. *Xylopia langsdorffiana* é uma árvore conhecida popularmente como “pimenteira-da-terra”. O estudo fitoquímico caracterizou alguns óleos essenciais com atividades biológicas importantes, dentre eles, o óleo essencial obtido dos frutos, que tem como constituintes majoritários o α -pineno e o limoneno já descrito na literatura com atividade antitumoral. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial dos frutos de *X. langsdorffiana* (O.E.X.), através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. O valor de CL_{50} obtido no bioensaio com *Artemia salina* foi 459,0 $\mu\text{g/mL}$. O valor de CH_{50} obtido no experimento de citotoxicidade em eritrócitos (hemólise) foi 293,6 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação citotoxicidade com ensaio da sulfarrodamina com diferentes linhagens tumorais o O.E.X apresentou-se mais seletivo para a linhagem de leucemia (K562), com $TGI = 1,78 \mu\text{g/mL}$ e apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos $TGI = 45, 38$. O valor de CI_{50} obtido através do ensaio de redução do MTT em células Sarcoma 180 foi 145,1 $\mu\text{g/mL}$. O valor de DL_{50} obtido no ensaio pré-clínico de toxicidade aguda foi 351,09 mg/kg, havendo diminuição significativa no ganho de massa corpórea nas fêmeas tratadas com 250 mg/kg e em ambos os sexos tratados com 375 mg/kg, quando comparados ao grupo controle. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente sarcoma 180, as taxas de inibição do crescimento tumoral foram, 38,67 e 54,32 % após tratamento com 50 e 100 mg/kg do O.E.X., respectivamente. As análises toxicológicas demonstram que não houve alteração significativa no índice de timo após os tratamentos com O.E.X., apenas um aumento do baço foi verificada. Porém foi demonstrado uma leve hepatotoxicidade para ambas as doses no estudo anatomopatológico, mas sem alterações nos parâmetros de AST e ALT. E ainda o O.E.X. não apresentou genotoxicidade. Portanto, as alterações são consideradas reversíveis e não substanciais quando comparados àquelas produzidas por diversos antineoplásicos largamente utilizados na clínica médica. Sendo assim, é possível inferir que o O.E.X. apresenta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* com moderada toxicidade, o que não representa um fator limitante para sua aplicabilidade terapêutica.

Palavras-chave: *Xylopia langsdorffiana*. Óleo essencial. Atividade antitumoral. Toxicidade.

MOURA, A. P. G. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE).** 2012. 117f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CBioTec/ CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

The cancer is a complex genetic disorder, which results from concurrent changes in genes generally related to proliferation, differentiation and cell death. Natural products are widely used in the treatment of cancer. *Xylopia langsdorffiana* is a tree known popularly as "pimenteira-da-terra". The phytochemical study featured some essential oils with important biological activities, among them, the essential oil obtained from the fruits, which has as major constituents the α -pinene and limonene. This work aimed to evaluate the toxicity and antitumoral activity of the essential oil of fruits of *X. langsdorffiana* (O.E.X.), through *in vitro* and *in vivo* assays. The LC₅₀ value obtained in the bioassay with *A. salina* was 459.0 μ g/mL. The CH₅₀ value obtained in experiment of cytotoxicity in red blood cells (hemolysis) was 293.6 μ g/mL. Cytotoxicity test of O.E.X. with sulfarrodamina cell viability assessment in different tumor cell lines presented citotoxicity activity for the lineage of leukemia (K562), with TGI = 178 μ g/mL. In addition the O.E.X presented significant cytotoxicity activity against cell lineage NCI/ADR-RES – multiple-resistant ovarian with TGI = 45,38. The IC₅₀ value obtained through the MTT assay in 180 Sarcoma cells was 145.1 μ g/mL. The LD₅₀ value obtained in acute toxicity pre-clinical test was 351.09 mg/kg. In this study there was significant decrease in gain body mass in females treated with 250 mg/kg and in both sexes treated with 375 mg/kg, when compared with the control group. On the evaluation of *in vivo* antitumor activity, the tumor growth inhibition rates were, 38,7 and 54,3 % after treatment with 50 and 100 mg/kg of O.E.X. respectively. The toxicological analyses demonstrated no significant changes in the index of thymus after treatment with O.E.X., only an increase of spleen was verified. No changes was evidenced in the parameters of AST and ALT but it was demonstrated a slight hepatotoxicity in histopathological study for both treated groups with the O.E.X. The treatment with the O.E.X. not presented genotoxicity. In general, the changes are considered reversible and non-substantial when compared to those produced by several anticancer agents. Thus, it is possible to infer that O.E.X presented *in vitro* and *in vivo* antitumoral activity with moderate toxicity, which does not represent a limiting factor for its therapeutic applicability.

Key-words: *Xylopia langsdorffiana*. Essential oil. Antitumor activity. Toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micronúcleo em eritrócito de sangue periférico.....	34
Figura 2	Foto de <i>Xylopia langsdorffiana</i> em seu habitat.....	37
Figura 3	Camundongos Swiss provenientes do biotério da UFPE.....	42
Figura 4	Aspecto geral do experimento com <i>Artemia salina</i>	44
Figura 5	Camundongo com tumor na região subaxilar.....	51
Figura 6	(A) Analisador bioquímico automático <i>Cobas Mira Plus®</i> ; (B) Analisador hematológico celular automático <i>Animal Blood Counter Vet®</i>	52
Figura 7	Tumores dos camundongos transplantados com sarcoma 180 dos grupos.....	64
Figura 8	Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais.....	71
Figura 9	Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais.....	73
Figura 9	(Continuação) Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais.....	74
Figura 10	Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais.....	76
Figura 11	Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais.....	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Viabilidade das larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após tratamento com O.E.X. (µg/mL).....	56
Gráfico 2	Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos <i>Swiss</i> após tratamento com O.E.X. (µg/mL).....	55
Gráfico 3	Atividade antitumoral do quimioterápico doxorrubicina relacionando porcentagem de crescimento <i>versus</i> concentração da amostra	58
Gráfico 4	Atividade antitumoral do O.E.X. em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento <i>versus</i> concentração do óleo essencial.....	59
Gráfico 5	Viabilidade celular após tratamento com o O.E.X. (µg/mL).....	60
Gráfico 6	Efeito do O.E.X. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.....	29
Tabela 2	Constituintes químicos do óleo essencial dos frutos de <i>Xylopia langsdorffiana</i>	37
Tabela 3	Densidade de inoculação das linhagens celulares nos ensaios de atividade antitumoral.....	46
Tabela 4	Valores de TGI do quimioterápico doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas ($\mu\text{g/mL}$).....	58
Tabela 5	Valores do TGI do O.E.X. e da doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas ($\mu\text{g/mL}$).....	59
Tabela 6	Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas (250, 375 e 500 mg/kg) do O.E.X. em camundongos.....	61
Tabela 7	Efeitos do óleo O.E.X. (250, 375 e 500 mg/kg) sobre o consumo de água e ração e ganho de massa corpórea dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.....	62
Tabela 8	Consumo de água e ração e avaliação do ganho de massa corpórea dos animais (n=6) dos diferentes grupos experimentais.....	65
Tabela 9	Efeitos do O.E.X. (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com sarcoma 180.....	66
Tabela 10	Efeitos do O.E.X. (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos	

	parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantedos com sarcoma 180.....	67
Tabela 11	Efeitos do O.E.X. (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantedos com sarcoma 180.....	67
Tabela 12	Efeitos do O.E.X. (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantedos com sarcoma 180.....	69
Tabela 13	Efeitos do O.E.X. (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos transplantedos com tumor sarcoma 180.....	70
Tabela 14	Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.X. e ciclofosfamida.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CH₅₀	Concentração que produz 50 % de hemólise
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CI₅₀	Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular
CL₅₀	Concentração que produz 50 % de letalidade
CPQBA	Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LABETOX	Laboratório de Ensaios Toxicológicos
LDH	Lactato desidrogenase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-Oxidase
O.E.X.	Óleo essencial dos frutos de <i>Xylopia Langsdoffiana</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos

	Bioativos
SBF	Soro Fetal Bovino
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Inibição de Crescimento Total
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VCM	Volume Corpuscular Médio
VHT	Veia Hepática Terminal
VP	Veia porta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1 Câncer.....	23
2.1.1 Modelos experimentais no estudo do câncer	25
2.2 Produtos Naturais e o câncer	28
2.3 Toxicologia de produtos naturais.....	31
2.4 <i>Xylopia langsdorffiana</i> : família, gênero e espécie	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Local da pesquisa	42
4.2 Material.....	42
4.2.1 Óleo essencial dos frutos de <i>Xylopia Langsdorffiana</i>	42
4.2.2 Animais.....	42
4.2.3 Células	43
4.2.4 Cistos de <i>Artemia salina</i> Leach	44
4.3 Métodos.....	44
4.3.1 Ensaio <i>in vitro</i>	44
4.3.1.1 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	44
4.3.1.2 Citotoxicidade em eritrócitos	45
4.3.1.3 Citotoxicidade frente células tumorais	46
□ Ensaio da sulforrodamina B	46
□ Redução do sal de tetrazólio (MTT)	49
4.3.2 Ensaios <i>In vivo</i>	50
4.3.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo	50

4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células da linhagem sarcoma 180	51
4.3.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração	52
4.3.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	52
4.3.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos	53
4.3.2.2.4 Análises anatomopatológicas	54
4.3.2.3 Genotoxicidade: teste do micronúcleo em sangue periférico	54
4.4 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	57
5.1 Ensaios <i>In vitro</i>	57
5.1.1 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	57
5.1.2 Citotoxicidade frente eritrócitos	57
5.1.3 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	58
5.2 Ensaios <i>In vivo</i>	61
5.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo	61
5.2.1.2 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração	62
5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células tumorais da linhagem sarcoma 180	63
5.2.2.1 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração no ensaio de atividade antitumoral <i>in vivo</i>	66
5.2.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos no ensaio de atividade antitumoral <i>in vivo</i>	67
5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos	70
5.2.2.4 Análises anatomopatológicas	71
5.2.3 Genotoxicidade	79
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

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).

Estima-se que 40 % dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25 % de plantas, 13 % de microrganismos e 3 % de animais. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. No caso das drogas antitumorais e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70 %. O mercado mundial desse grupo de drogas atinge vários bilhões de dólares (CRAGG, 2005).

No cenário mundial apenas 17 % das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (FOGLIO, 2006). No Brasil, 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).

O interesse pela biodiversidade para a produção de medicamentos aumentou sensivelmente com a conclusão do genoma humano, uma vez que o número de possíveis alvos terapêuticos aumentou de cerca de 500 para mais de 6 mil (CALIXTO, 2003).

Assim, é notório que os produtos naturais desempenham um importante papel no processo de descoberta de fármacos, entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Por isso a utilização de plantas medicinais está em contínua expansão no âmbito mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado, e

pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitofármacos, como importantes alternativas terapêuticas (GUARRERA, 2005).

O câncer entra neste cenário, uma vez que não só a população isoladamente como os pesquisadores, buscam na fitoterapia novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento desta enfermidade, 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).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20 % do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). Portanto, a flora brasileira é promissora fonte de inovações terapêuticas e farmacológicas para as mais diversas áreas da saúde humana.

Desta forma, ratifica-se a importância e necessidade dos estudos com produtos naturais, e vislumbrando o potencial farmacológico da família Annonaceae e reconhecendo a importância do gênero *Xylopia* optamos por enveredar os estudos da espécie *Xylopia Langsdoffiana* St. Hil. & Tul., mais especificamente do óleo essencial dos frutos 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.

*FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA*



2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

Após a segunda metade do século XX, tornou-se evidente que o desenvolvimento de tumores em seres humanos é um processo diretamente relacionado a alterações no genoma, levando à transformação de células saudáveis em células malignas. 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).

O câncer é então resultante do crescimento de sucessivas populações celulares nas quais as mutações se acumularam em um processo denominado de expansão monoclonal. Este processo culmina na formação de uma massa tumoral com células contendo diferentes padrões de alterações genéticas e com extensa heterogeneidade intra-tumoral e de organismo para organismo, mesmo para subtipos histologicamente idênticos (GUEMBAROVSKI e CÓLUS, 2008).

Portanto, esse fenômeno resulta de alterações estruturais e/ou funcionais em genes cuja função é controlar o crescimento normal e a diferenciação das células que compõem o organismo e, ainda, estas alterações envolvem tanto a ativação de proto-oncogenes quanto à inativação de genes supressores de tumor (CHANG et al., 1995; HANAHAN e WEINBERG, 2000). Genes associados aos mecanismos de reparo aos danos do DNA são considerados como um terceiro grupo que pode atuar direta ou indiretamente no processo de carcinogênese (HOEIJMAKERS, 2001).

Sabe-se que os fatores ambientais possuem um importante papel na etiologia do câncer e dentre os principais fatores para o surgimento dos tumores malignos estão os carcinógenos químicos e físicos, agentes infecciosos e o estilo de vida do indivíduo (SILVA, 2011).

É importante destacar que o progressivo aumento das doenças crônicas e degenerativas no Brasil é evidente. Assim as alterações demográficas por que passa

a população trarão como consequência maior quantidade de casos de doenças crônicas dentre as quais se enquadra o câncer. O aumento da vida média, as modificações no estilo de vida e a maior exposição a determinados riscos ambientais são fatores que interferem diretamente no aparecimento de um maior número de neoplasias malignas (CERVI, 2005). A esperança de vida da população brasileira, que era de 62 anos em 1980, será de 76 anos, no ano de 2020 (BRASIL, 2009).

O problema do câncer no Brasil ganha relevância por essa mudança no perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, com isso, o tema tem conquistado espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo. O conhecimento sobre a situação dessa doença permite estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação positiva desse cenário na população brasileira (BRASIL, 2011).

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. Assim, 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, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e aponta a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (BRASIL, 2011).

A prevenção e o controle do câncer precisam adquirir o mesmo foco e a mesma atenção que a área de serviços assistenciais, pois, quando o número de casos novos aumentarem de forma rápida, não haverá recursos suficientes para dar

conta das necessidades de diagnóstico, tratamento e acompanhamento. Então mais e mais pessoas terão câncer e correrão o risco de morrer prematuramente por causa da doença. As consequências poderão ser devastadoras nos aspectos sociais e econômicos. O câncer pode se tornar um grande obstáculo para o desenvolvimento socioeconômico de países emergentes como o Brasil (VALE et al., 2010).

Para controlar as doenças malignas há a necessidade de conhecimentos científicos e experiências que vão desde o conhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular às escolhas do estilo de vida do indivíduo. Também se exige uma gestão competente e o melhor uso dos recursos disponíveis para o planejamento, execução e avaliação das estratégias de controle da doença. A prevenção e o controle do câncer estão entre os mais importantes desafios científicos e de saúde pública, da nossa época (BRASIL, 2009).

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.

2.1.1 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).

Neste cenário, o sucesso do desenvolvimento de novas drogas depende fundamentalmente de um esforço multidisciplinar na descoberta de novas moléculas naturais e da otimização molecular através da aplicação de técnicas de síntese, química combinatória e bioquímica, aliadas a estudos biológicos de alta qualidade (CRAGG, 2009).

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).

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 um processo de morte celular que auxilia na regulação da homeostase tecidual (promovendo um equilíbrio entre a taxa de proliferação celular e a taxa de morte celular), assim como, participa do processo de eliminação de células potencialmente deletérias (como por exemplo, células que sofreram lesão no DNA) (PLAS e THOMPSON, 2002).

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, 2002) 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).

Investigações genéticas e bioquímicas da apoptose em células de vários organismos têm identificado como principais fatores atuantes as caspases, 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). Evidências atuais sugerem que há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo que desencadeia a maquinaria de morte, porém, existem duas vias principais para a morte celular por apoptose: uma delas envolve a estimulação dos receptores de morte por ligantes externos, via extrínseca, enquanto a outra surge no interior das células, envolvendo a liberação de fatores apoptogênicos das mitocôndrias, via intrínseca ou mitocondrial (GHOBRIAL, et al., 2005).

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).

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* esses dados não podem ser obtidos. 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).

O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI e XU, 2006).

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. 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). 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).

2.2 Produtos Naturais e o câncer

Os produtos naturais têm sido uma importante fonte de componentes antitumorais. Existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1000 plantas apresentam propriedades antitumorais significantes (FERRAZ et al, 2005). Infelizmente, muitas das suposições quanto à eficácia dos produtos naturais utilizados pela medicina tradicional ainda são vistas com certo ceticismo (CRAGG, 2005).

Entretanto 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 a vimblastina (Velban[®]) e a vincristina (Oncovin[®]) e os análogos vindesina (Eldisine[®]) e vinorelbina (Navelbine[®]); o paclitaxel (Taxol[®]) e o análogo docetaxel (Taxotere[®]); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (topophos[®]) e teniposídeo (Vumon[®]); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin[®]) e irinotecano (Camptosar[®]) (Figura 1). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares.

A tabela 1 resume as principais classes desses fitoquímicos e seus derivados que atualmente são utilizados na quimioterapia do câncer, seus alvos moleculares e indicações terapêuticas.

Tabela 1: Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.

FÁRMACO	FONTE	ALVO MOLECULAR	INDICAÇÃO TERAPEÚTICA
Vimblastina vincristina vindesina vinorelbina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Paclitaxel docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina Etoposídeo teniposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda;
Camptotecina Topotecano irinotecano	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon

(COSTA-LOTUFO et al., 2010)

Assim, 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.

Com a aprovação, em 2007, dos medicamentos Ixempra® (ixabepilona), derivado da epotilona com ação em microtúbulos, Yondelis® (trabectedina), primeiro medicamento antineoplásico verdadeiramente de origem marinha, alquilante de DNA, e Torisel® (temsirolimus), inibidor de proteína quinase mTOR, os produtos naturais estão definitivamente de volta ao cenário da pesquisa em oncologia (BAILLY, 2009).

Óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, são concentrados de produtos naturais que possuem aroma e compostos voláteis, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, etc., podendo exercer diferentes atividades biológicas nos seres humanos, animais e outras plantas. São utilizados em perfumes, cosméticos, produtos de limpeza doméstica, além de serem bastante utilizados no tratamento de diversas enfermidades, como câncer, inflamação, dor, além de apresentar propriedade antioxidativa (ADORJAN e BUCHAUER, 2010).

Óleo essencial preparado por destilação da resina das árvores da família Burseraceae (*Boswellia* sp.) tradicionalmente utilizado para terapia aromática tem mostrado 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).

Estudos recentes também demonstraram que o óleo essencial de *Ocimum basilicum* Linn. (Lamiaceae), popularmente conhecido como manjeriço, possui potente atividade citotóxica contra células de câncer de colo de útero humano (HeLa) e células de câncer de laringe humano (HEp-2) (KATHIRVEL e RAVI, 2011).

O óleo essencial das folhas de *Schinus molle* possui atividade citotóxica em várias linhagens de células tumorais, sendo mais eficaz em células de câncer de mama e em células leucêmicas (K562). O estudo dos constituintes químicos deste óleo revelou como composto majoritário o α -pineno e β -pineno. Importante aqui ressaltar a presença desses dois constituintes no óleo dos frutos de *Xylopia langsdorffiana*, sendo o α -pineno o componente majoritário. Diferentes mecanismos de ação têm sido propostos relacionados à atividade antitumoral de óleos essenciais, já estando evidenciada a participação de vias apoptóticas nos efeitos tóxicos contra células tumorais (DÍAZ et al., 2008).

Adicionalmente, monoterpenos isolados de diferentes espécies e que são amplamente encontrados em óleos essenciais, também são conhecidos na literatura por seus potentes efeitos antitumorais (BASER, 2008; EFFENBERGER et al., 2010; HIRASAWA et al., 2009; HUANG et al., 2010; RAVIZZA et al., 2008).

Além dos efeitos *in vitro*, óleos essenciais obtidos de diferentes espécies, tem demonstrado efeitos antitumorais *in vivo*, como é o caso, por exemplo, do óleo essencial das folhas de *Croton regelianus* e de *Cymbopogon flexuosus* (BEZERRA et al., 2009; SHARMA, 2009).

Estes achados, certamente têm estimulado a busca por novos agentes com potencial atividade antitumoral a partir de fontes naturais, como os óleos essenciais, com a finalidade de obter novos protótipos, com mecanismos de ação mais seletivos, eficaz contra tumores resistentes e menor toxicidade, buscando uma melhor terapêutica.

2.3 Toxicologia de produtos naturais

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 exemplo de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas, pode ser citado os efeitos hepatotóxicos do apiol, safrol, lignanas e alcalóides 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).

Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial, assim como, diversas substâncias isoladas de plantas medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (ROMERO-JIMÉNEZ et al., 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 conhecimento acurado da toxicidade do óleo em estudo requer o claro conhecimento a respeito dos mecanismos de toxicidade e dos fatores de risco correspondentes (LI, 2004).

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. No Brasil os estudos de toxicidade pré-clínica são normatizados pela Resolução Específica Nº 90/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina o "Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos" (BRASIL, 2004). Esta resolução foi elaborada em conformidade com as normas da OMS, e recomenda estudos de toxicidade aguda, de doses repetidas e quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos, estudos de genotoxicidade (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

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 (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008). 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) parasitocida (SAHPAZ et al., 1994),

tripanossomicida (ZANI et al., 1995), entre outras. Há, também, correlação com a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas (MacLAUGHLIN, 1991).

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. A membrana eritrocítica é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas (AKI e YAMAMOTO, 1991). O teste de hemólise *in vitro* é usado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos do organismo (APARICIO, 2005).

Atualmente existe também um forte interesse em caracterizar o potencial genotóxico dos compostos vegetais utilizados na saúde humana, uma vez que a maioria dos vegetais possuem substâncias genotóxicas. Essas podem atuar como agentes mutagênicos e carcinogênicos naturais ou como agente anti-mutagênicos (CHACON et al., 2002).

A genotoxicidade é um campo de conhecimento relativamente recente, e se situa na interface entre toxicologia e genética, por isso denominada, frequentemente, também de genética toxicológica. Esta visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucleico), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético em níveis celulares ou orgânicos, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (PEGAS HENRIQUE, 2003).

Dentre os testes disponíveis para avaliação do dano genético está o teste do micronúcleo com eritrócitos. Micronúcleos são estruturas cromatídicas delimitadas por membrana, separados do núcleo principal e visíveis em células interfásicas. Podem ser resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal devido à ação de substâncias clastogênicas ou aneugênicas (RIBEIRO et al., 2003).

O teste do micronúcleo baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há

a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Consequentemente, na telófase (fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre a formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos), tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células. Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ela interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina, ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, os micronúcleos (COSTA E SILVA e NEPOMUCENO, 2010).

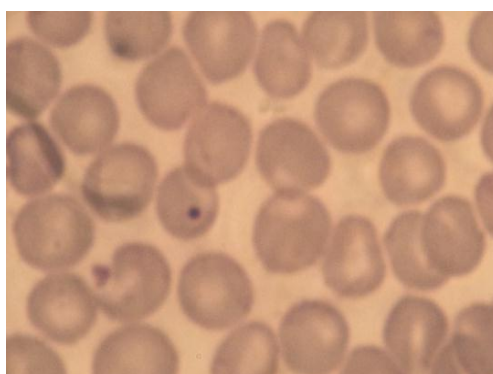


Figura 1: Micronúcleo em eritrócito de sangue periférico (Foto: Monalisa Brito)

Para avaliação de efeitos tóxicos vários trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam a avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos (MAGALHÃES et al., 2010). Nesses estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como uréia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Adicionalmente, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular (BEZERRA et al., 2009).

Existem ainda os estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas (subcrônico e crônico). Os ensaios agudos 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, permitindo dessa forma, conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste, os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (LARINI, 1999).

2.4 *Xylopia langsdorffiana*: família, gênero e espécie

A família Annonaceae compreende 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros (HUTCHINSON, 1973; MAAS et al., 2001). Sua distribuição geográfica ocorre quase que exclusivamente em regiões tropicais (HEYWOOD, 1985), sendo que no neotrópico está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies (CHATROU et al., 2004). No Brasil, a família encontra-se bem representada com 29 gêneros e aproximadamente 260 espécies distribuídas nas florestas atlântica e amazônica (BARROSO et al., 1978). Na Paraíba, um levantamento no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) registrou sete gêneros e 12 espécies dessa família (PONTES et al., 2004). Essa família é caracterizada pela presença de terpenoides (especialmente diterpenos), alcaloides (especialmente derivados isoquinolínicos), além de óleos essenciais cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (LEBOEUF et al., 1982; SILVA et al., 2009).

O gênero *Xylopia* é constituído por cerca de 150 espécies (BRUMMIT, 1992), sendo algumas conhecidas por seus usos etnomedicinais e atividade farmacológica. *X. aromatica* é um agente diurético e utilizada para tratamento de edema de pele (TAKARASHI et al., 2006), é citotóxica frente a linhagem leucêmica RPMI-8226 (SUFFREDINI et al., 2007), possui atividade contra *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* (OSORIO et al., 2007), larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006) e, assim como *X. emarginata*, inibe o crescimento de *Plasmodium falciparum* (DE MESQUITA et al., 2007). Esse gênero demonstrou também atividade antitumoral frente diversas linhagens tumorais humanas (SUFFREDINI et al., 2007; LEVERRIER et al., 2010).

Algumas espécies do gênero *Xylopi* são usadas na medicina popular para uma variedade de indicações, como por exemplo, contra distúrbios estomacais e biliares, para o tratamento de bronquite e disenteria, como antimicrobiano e no tratamento do reumatismo. Além disso, algumas espécies são usadas como agente diurético, contra edema de pele, como anti-inflamatório e contra transtornos cardiovasculares (MACÊDO e FERREIRA, 2004; NASCIMENTO et al., 2006).

Óleos essenciais extraídos de diversas partes de *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich. possuem significativa atividade antioxidante (KARIOTI et al., 2004), antibacteriana e antifúngica (TATSADJIEU et al., 2003).

Xylopi langsdorffiana St.-Hil. & Tul. (Fig. 2) conhecida popularmente como “pimenteira-da-terra”, é uma árvore de 5 – 7m de altura (CORREA, 1984). É pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas.

Em estudos fitoquímicos anteriores foram isolados dessa espécie alguns diterpenos: o ácido *ent*-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico (trachylobano-360), o ácido *ent*-7 α -hidroxitrachylobano-18-óico (trachylobano-318), o *ent*-atisano-7 α , 16 α -diol (xylodiol), o ácido 8(17), 12*E*, 14-labdatrieno-18-óico (labdano-302), o ácido 13-epicuprêssico, dentre outros (TAVARES et al., 2006). Muitos desses diterpenos foram avaliados em relação à sua atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se efetivos contra linhagens de células de leucemia humana *in vitro* e linhagem murina de sarcoma 180 *in vivo* (PITA, 2010).

Em levantamento bibliográfico realizado no Chemical abstract e no NAPRALERT (Natural Products ALERT), para o período de 1907 até os dias atuais, foram encontrados apenas seis trabalhos com essa espécie, sendo quatro deles relatando constituintes químicos (TAVARES et al., 2006; 2007; SILVA et al., 2009), um relatando atividade espasmolítica em músculo liso de traquéia de cobaia (RIBEIRO et al., 2007) e um relatando atividade moluscida (TAVARES et al., 2007).

O óleo essencial obtido dos frutos de *X. langsdorffiana* foi estudado e identificado através de técnicas específicas. Pela análise em CG-EM (Cromatografia Gasosa em Espectrometria de Massa) e CG-FID (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama) do óleo essencial dos frutos de *X. langsdorffiana* foi possível identificar nove componentes, correspondendo a 100 % do total do óleo em uma mistura de monoterpenos (66,6 %), sesquiterpenos (22,2 %) e diterpeno (11,2 %). O α -pineno (37,73

%) e o limoneno (31,42 %) foram os constituintes majoritários (Tabela 2) (DUARTE, 2009).

Tabela 2: Constituintes químicos do óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana*

COMPOSTOS	% RELATIVA
α - pineno	37,73
Limoneno	31,42
Canfeno	12,82
Sclareno	7,72
β -pineno	4,12
Óxido de cariofileno	3,20
Espetulenol	1,59
α - terpineol	0,95
1,8- cineol	0,91

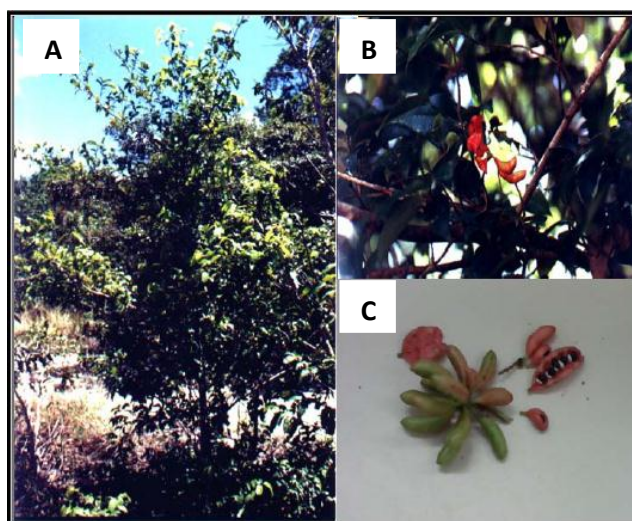


Figura 2 – Fotos de *Xylopia langsdorffiana* em seu habitat. **(A)** árvore completa, **(B)** detalhe das flores e **(C)** detalhe dos frutos (Foto: Josean Fachine Tavares).

Diante do conhecimento das diferentes atividades biológicas que os óleos essenciais possuem, inclusive com potente atividade antitumoral e ainda sabendo que o óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana* possuem como constituintes majoritários o limoneno e o α - pineno ambos com relato na literatura de

atividade antitumoral como descrito anteriormente, fica clara a importância e necessidade de investigar o potencial antitumoral do óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana* afim de elucidar um novo composto com potente atividade antitumoral e menos efeitos tóxico como alternativa para o tratamento do câncer.

OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdoffiana* (O.E.X.) através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a bioatividade do O.E.X. frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a citotoxicidade do O.E.X. em eritrócitos de camundongos *Swiss*, através da avaliação da atividade hemolítica;
- Avaliar a possível atividade antitumoral *in vitro* do O.E.X. frente diferentes linhagens de células tumorais humanas;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do O.E.X. 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.X. frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180 e sua toxicidade através da avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos, análise anatomopatológica de órgãos vitais, consumo de água e ração, e evolução ponderal;
- Avaliar o efeito imunomodulador do O.E.X., através da determinação dos índices de baço e timo;
- Avaliar a atividade genotóxica do O.E.X. através do Teste do Micronúcleo em sangue periférico.

MATERIAL E MÉTODOS



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), no biotério Prof. Thomas George, Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia do Departamento de Biologia Molecular (DBM) e no Laboratório de Histopatologia, todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB). Assim como no Laboratório da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP).

4.2 Material

4.2.1 Óleo essencial dos frutos de *Xylopia Langsdoffiana*

Os frutos de *Xylopia Langsdoffiana* foram coletados no município de Santa Rita, Estado da Paraíba, em julho de 2008. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Setor de Botânica do LTF/UFPB; uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB sob número de coleta AGRA 5541. Os frutos frescos de *Xylopia Langsdoffiana* (200 g) foram submetidos à hidrodestilação durante 4h, em aparelho do tipo Clevenger à temperatura de 100 °C, obtendo-se 140 mg de óleo essencial (DUARTE, 2009). Este óleo foi gentilmente fornecido pelos Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e Prof. Dr. Josean Fechine Tavares do PPgPNSB da UFPB.

4.2.2 Animais

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária próxima de 60 dias, obtidos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)/ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para os experimentos de atividade antitumoral *in vivo* e do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/ UFPB) para os demais experimentos. Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo pellets de ração da

marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, com bicos, colocadas nas grades metálicas das gaiolas na 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 cuidados foram considerados no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos animais. A execução do projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do PPgPNSB sob Nº 0706/11.



Figura 3 – Camundongos Swiss provenientes do biotério da UFPE (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).

Para os ensaios *in vitro*, além da linhagem sarcoma 180 foram utilizadas ainda, células tumorais das seguintes linhagens: U251 – glioma; MCF-7 – mama; NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0 – renal; NCI-H460 – pulmão; PC-3 – próstata; OVCAR – ovário; HT29 – cólon; e K-562 – leucemia. E ainda uma linhagem de célula não tumoral: HCAT – pele (linhagem de células não-tumorais). Todas são originárias de humanos e foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos e mantidas no CPQBA/UNICAMP.

4.2.4 Cistos de *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram obtidos da San Francisco Bay Brand® (Figura 4).

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.X. 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*. O O.E.X. foi solubilizado em DMSO (5 %) e água salina artificial (Marinex®), a fim de se obter a solução mãe de 10 mg/mL. A partir destas, foram efetuadas diluições para concentrações de intervalo 0 - 1800 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.

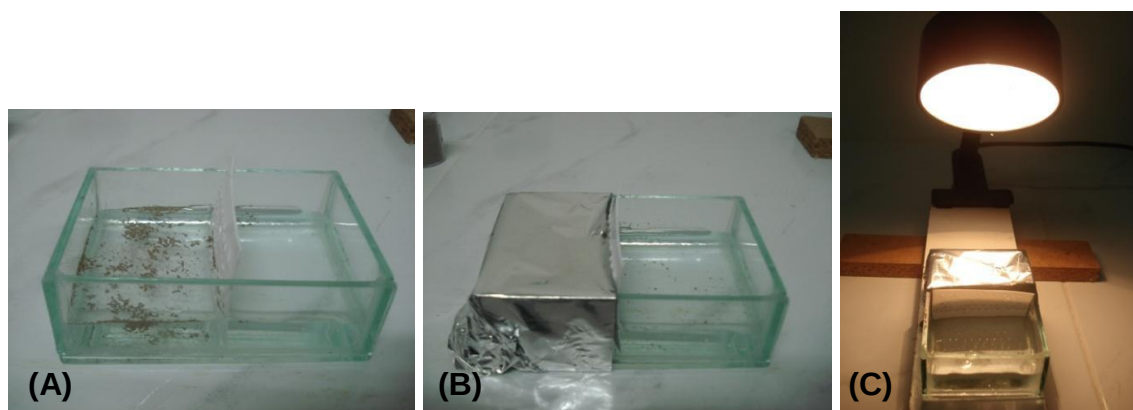


Figura 4 – Aspecto geral do experimento com *Artemia salina*. **(A)** Recipiente retangular com divisória contendo furos; **(B)** Parte coberta do sistema contendo os cistos; **(C)** Exposição à luz. (Fotos: João Carlos Pita).

4.3.1.2 Citotoxicidade em eritrócitos

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 eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) 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 PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5 % (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O O.E.X. foi solubilizado em DMSO (5 %) e preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL 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 PBS (2 mL) e DMSO (5 %) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave em um agitador por 60 minutos. Após

esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção foi adicionado, a cada poço, 200µL de solução do Triton X-100 (0,1%) e cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm. Determinou-se a % de hemólise para determinar a CH₅₀ (concentração que produz 50 % de hemólise), utilizando a seguinte fórmula:

$$\%Hemólise = \left(\frac{A_{Tx} - A_{óleo}}{A_{Tx}} \right) \times 100$$

Onde:

A_{Tx} = Absorbância do poço contendo controle positivo com Triton-X

A_{óleo} = Absorbância do poço contendo a concentração do óleo

4.3.1.3 Citotoxicidade frente células tumorais

▪ Ensaio da sulforrodamina B

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* pelo método da sulforrodamina, as células foram mantidas em frascos de 25 cm³, com 5 mL de meio RPMI/SFB e para células aderidas, cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessária a tripsinização, ou seja, o desprendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática quando atingia cerca de 80 % de confluência (ou seja, uma vez por semana) em meio RPMI/SFB.

A avaliação da atividade anticâncer foi realizada em nove linhagens tumorais humanas, sendo plaqueados 100 µL de células, em placas de 96 poços, em meio RPMI/Soro Bovino Fetal (SFB)/ gentamicina (50 µg/mL), nas suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 3), determinadas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP. Antes da adição do óleo, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ em ambiente úmido.

Tabela 3 - Densidade de inoculação das linhagens celulares nos ensaios de atividade antitumoral *in vitro*.

Linhagem Celular	Nome	Densidade de Inoculação
Glioma	U251	$5,0 \times 10^4$ células/mL
Mama	MCF-7	$6,0 \times 10^4$ células/mL
Ovário com Fenótipo Resistente a Multifármacos	NCI-ADR/ RES	$5,0 \times 10^4$ células/mL
Renal	786-O	$4,5 \times 10^4$ células/mL
Pulmão	NCI-H460	$4,0 \times 10^4$ células/mL
Próstata	PC-3	$5,0 \times 10^4$ células/mL
Ovário	OVCAR-3	$7,0 \times 10^4$ células/mL
Cólon	HT-29	$4,0 \times 10^4$ células/mL
Leucemia	K-562	$4,0 \times 10^4$ células/mL
Pele (linhagem de células não tumorais)	HaCat	$4,0 \times 10^4$ células/mL

DI: densidade de inoculação, * Linhagem que expressa fenótipo de resistência a múltiplos fármacos.

Apos este período, uma placa controle (T_0) foi fixada através da adição de 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético a 50 % (p/v) para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição do óleo. O.E.X foi diluído em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/penicilina-estreptomicina, evitando-se assim a toxicidade do DMSO.

Nas demais placas, a amostra foi adicionada nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 μ g/mL, (100 μ L/poço) em triplicata, e a seguir foram incubadas por 48 horas.

Para todas as linhagens celulares foi usada a doxorubicina (Tecnofarma® International, Uruguai), como controle positivo, uma vez que é um quimioterápico que demonstra elevada potência e seletividade em baixas concentrações para a maioria das linhagens. Em todos os experimentos, o tratamento isolado com a

doxorrubicina foi utilizado para avaliar se houve alteração na sensibilidade das linhagens durante o cultivo. A doxorrubicina foi utilizada nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/poço) em triplicata. Após este período, as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50 %. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C e, em seguida, submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

As placas foram então coradas pela adição de 50 µL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 % e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1 %. Após secagem a temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de Trizma Base (10 µM, pH 10,5). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas (SACOMAN et al., 2008). A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (SKEHAN et al., 1990).

Para avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do O.E.X. foi realizado o ensaio da sulforrodamina, em diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais.

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias dos compartimentos contendo células + amostras, descontando-se seus respectivos brancos, que são compartimentos contendo apenas amostra. Já a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada de acordo com as seguintes formulas:

Se $TA > T1$: estímulo de crescimento celular

Se $TA \geq T0 < T1$: atividade citostática: $\%C = 100 \times [(TA - T0)/(T1 - T0)]$

Se $TA < T0$: atividade citocida: $\%C = 100 \times [(TA - T0)/T0]$

Onde:

TA = media da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T1 = absorbância do branco de células

T0 = absorbância do controle de células na placa T0.

Com esses valores, foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra teste. Os valores abaixo de 50 e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática), sendo que os valores que atingem o zero representam inibição total de crescimento (TGI – *total growth inhibition*).

▪ Redução do sal de tetrazólio (MTT)

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* também foi realizada com células da linhagem sarcoma 180, pelo ensaio do MTT. As células foram coletadas da cavidade peritoneal do camundongo com 7-10 dias de inoculação, solubilizadas com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e em seguida centrifugadas à 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 µg/mL) do O.E.X. por 24 h (37 °C e 5 % CO₂). O óleo essencial foi solubilizado em DMSO (Mallinckrodt CHEMICALS®) e então em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,5 %. 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®).

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER et al., 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 espectroscopicamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT e LANG, 1986).

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 µL 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 µL 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 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

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.X.,

intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo. O número de animais mortos foram contabilizado para determinação da dose responsável pela morte de 50 % dos animais experimentais (DL₅₀), 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.X. por via intraperitoneal (i.p.), 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 elaborado pelo Setor de Psicofarmacologia PPgPNSB /UFPB e descrito por Almeida e colaboradores (1999). Desde a 24^a hora e até 14 dias após administração da dose, foram observados a variação de peso e o consumo de água e alimentos pelos animais experimentais.

Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados.

4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* 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 O.E.X. foi solubilizado em Tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5 %) e administrado por via intraperitoneal durante sete dias, nas doses de 50 e 100 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). Foi utilizado ainda um quinto grupo (controle sadio), cujos animais (n = 6) permaneceram nas mesmas condições experimentais dos grupos tratados e controle, porém não foram transplantados com as células tumorais (sarcoma 180). No nono dia, todos os animais foram eutanasiados e os tumores extirpados,

pesados e fixados em formaldeído (10 %). A inibição tumoral foi calculada seguindo a fórmula abaixo:

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

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



Figura 5 – Camundongo com tumor na região subaxilar (Foto: Aline Xavier)

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.X., 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 de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No nono dia do experimento, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com 0,02 mL de uma solução a 0,1 g/mL de tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália) e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina, AST e ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e para o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente (Figura 6). As extensões sanguíneas foram coradas automaticamente no HEMATEL 200® e analisadas em microscópio óptico TAIMIN®, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

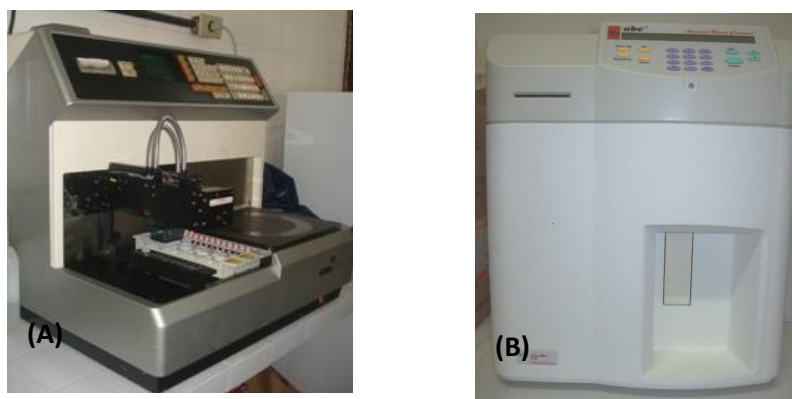


Figura 6 – (A) Analisador bioquímico automático *Cobas Mira Plus*®; **(B)** Analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet*® (Foto: Aline Xavier)

4.3.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado e rins) extirpados, pesados, examinados macroscopicamente, para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações, e em seguida foram fixados em formaldeído (10 %). O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula abaixo:

$$ÍNDICE = \frac{\text{peso do órgão}(mg)}{\text{peso do animal}(g)}$$

4.3.2.2.4 Análises anatomopatológicas

Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) e tumor, os mesmos foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10 %) tamponada e após 24 horas, foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, (LEIKA[®]), os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e ao método de Gordon e Sweet para reticulina, estes dois últimos destinados ao estudo do tecido hepático, em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). A contagem de mitoses é realizada pela média do número de mitoses em 10 campos, com aumento de 400 X. Os procedimentos descritos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo, no Laboratório de Histopatologia/UFPB, sendo o registro fotomicrográfico realizado em colaboração com o Laboratório Virchow[®] - Laboratório Médico de Patologia Celular, sediado em João Pessoa/PB, em microscópio triocular Leica ATC 2000[®], acoplado a um sistema de transmissão de vídeo-imagem com placa de captura Wonder.

4.3.2.3 Genotoxicidade: teste do micronúcleo em sangue periférico

Para o ensaio do micronúcleo, grupos de seis camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos foram intraperitonealmente tratados com três diferentes doses do O.E.X. (88,00 mg/kg, 176,00 mg/kg e 281,00 mg/kg), doses essas calculadas a partir da DL₅₀ (25%, 50% e 80 % do seu valor) (RIBEIRO et al., 2003). Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 5 %) foram incluídos. Após 24 horas os animais foram anestesiados com 0,02 mL de uma solução a 0,1g/mL de tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália) e amostras de sangue periférico foram coletadas pelo plexo orbital, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov[®]) para posterior análise em microscópio óptico. Para

cada animal três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (HAYASHI et al., 2007).

4.4 Análise estatística

Para os ensaios *in vitro* com células tumorais, foram realizados pelo menos três experimentos em quatro replicatas. 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 %.

Para a curva concentração dose resposta para cada linhagem celular, a Taxa de Inibição Total de Crescimento (*Total Growth Inhibition*, TGI) foi determinada através de regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando software específico, Graphpad Prism 5.0.

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 duas colunas. Ambos para os dados que seguiam a distribuição gaussiana (paramétricos). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *In vitro*

5.1.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

A viabilidade dos náuplios de *Artemia salina* foi reduzida de maneira dependente de concentração após tratamento com O.E.X. em concentrações até 1000 µg/mL. O valor de CL₅₀ obtido no bioensaio com *A. salina* foi de 459,0 (450,6 – 467,6) µg/mL (Gráfico 1).

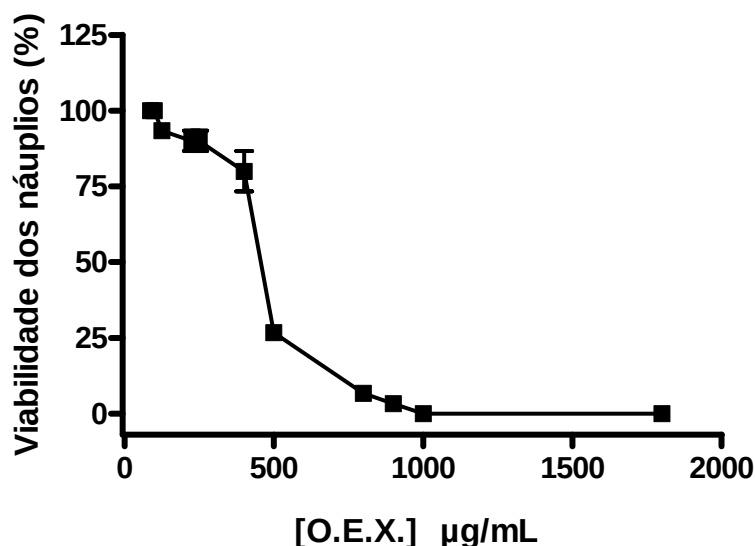


Gráfico 1 – Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com O.E.X. (µg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas. Curva concentração-resposta por regressão não linear, com intervalo de confiança de 95 %.

5.1.2 Citotoxicidade frente eritrócitos

A citotoxicidade do O.E.X. foi avaliada frente eritrócitos de camundongos *Swiss*. A percentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com O.E.X., produzindo 100 % de hemólise em concentrações a partir de 700 µg/mL. O valor de CH₅₀ obtido foi de 293,6 (281,6 – 306,1) µg/mL (Gráfico 2).

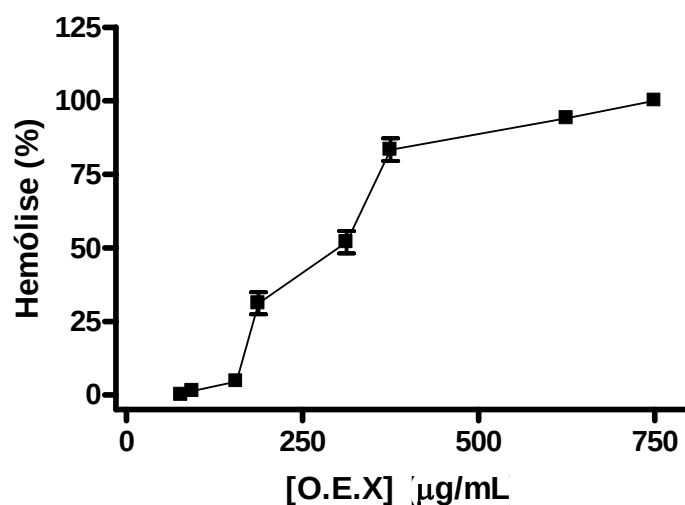


Gráfico 2 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos *Swiss* após tratamento com [O.E.X.] $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.1.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

5.1.3.1 Ensaio da sulforrodamina

Neste experimento, a linhagem NCI/ADR-RES (linhagem de ovário, resistente a múltiplos fármacos) apresenta-se mais resistente a este quimioterápico, enquanto a linhagem NCI-H460 (pulmão) é a mais sensível. A partir do gráfico, foi construída uma tabela (Tabela 4) com os valores de TGI de cada amostra.

Os resultados foram analisados segundo Fouche et al. (2008) e divididos em quatro categorias: inativos ($\text{TGI} > 50 \mu\text{g/mL}$), fraca atividade ($15 \mu\text{g/mL} < \text{TGI} < 50 \mu\text{g/mL}$), moderada atividade ($6,25 \mu\text{g/mL} < \text{TGI} < 15 \mu\text{g/mL}$) e potente atividade ($\text{TGI} < 6,25 \mu\text{g/mL}$).

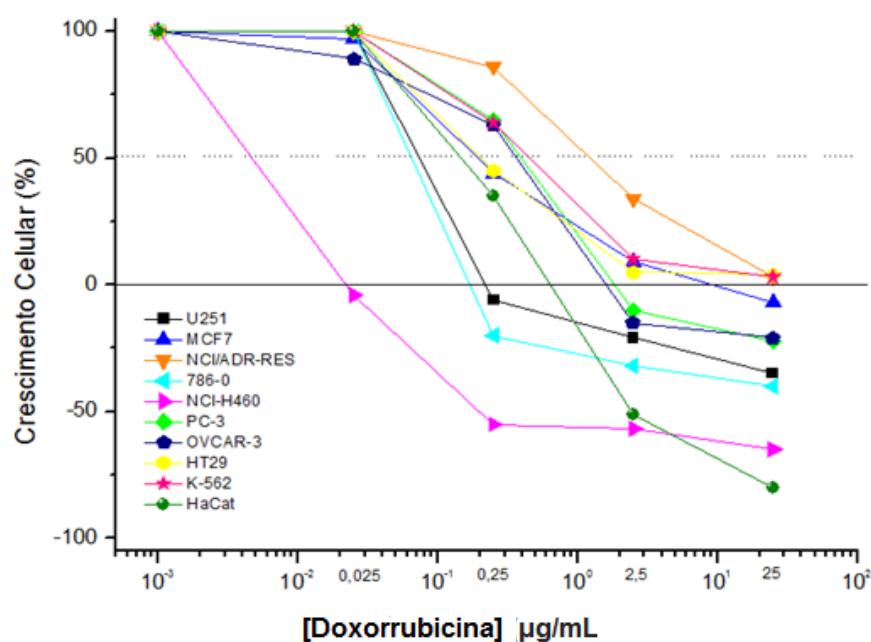


Gráfico 3. Atividade antitumoral do quimioterápico doxorubicina relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra.

Legenda: U251 – glioma; MCF-7 – mama; NCI/ADR-RES- ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0 – rim; NCI-H460 – pulmão; PC-3 – próstata; OVCAR – ovário; HT29 – cólon; K-562 – leucemia; HaCat – pele (linhagem de células não-tumorais).

Os valores de TGI (inibição de crescimento total) para cada linhagem celular quando tratado com o quimioterápico doxorubicina foi organizado na tabela 4.

Tabela 4. Valores de TGI do quimioterápico doxorubicina em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

Linhagem	U251	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR	HT29	K-562	HaCat
Doxorubicina	0,06	0,2	1,3	0,04	0,01	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2

As mesmas linhagens celulares foram tratadas com o O.E.X. obtendo-se os resultados plotados no gráfico 4.

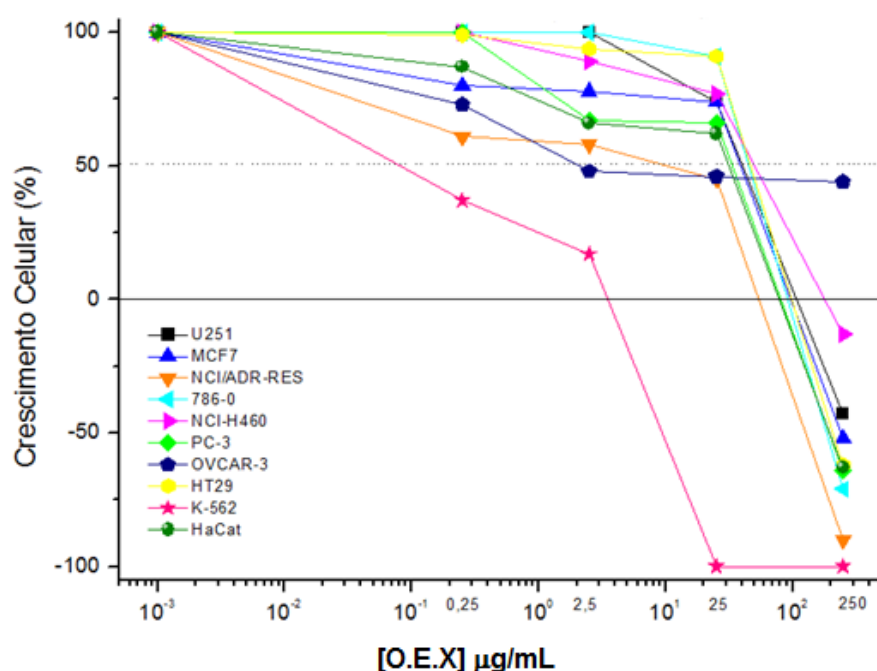


Gráfico 4 - Atividade antitumoral do O.E.X. em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração do óleo essencial.

Legenda:

U251 – glioma; **MCF-7** – mama; **NCI/ADR-RES** – ovário resistente a múltiplos fármacos; **786-0** – rim; **NCI-H460** – pulmão; **PC-3** – próstata; **OVCAR** – ovário; **HT29** – cólon; **K-562** – leucemia; **HaCat** – pele (linhagem de células não-tumorais).

A partir dos valores dos gráficos 3 e 4, foi construída a tabela (Tabela 5) com os valores de TGI para o O.E.X. e doxorrubicina.

Tabela 5. Valores de TGI (inibição de crescimento total) do O.E.X. e da doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

Linhagem	U251	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR	HT29	K-562	HaCat
O.E.X	118, 2	102,1	45,4	107,3	191,9	78,4	>250	118,8	1,8	74,5
Doxorrubicina	0,06	0,2	1,3	0,04	0,01	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2

O O.E.X apresentou-se mais seletivo para a linhagem de leucemia (K562), com TGI de 1,78 $\mu\text{g/mL}$ para esta linhagem testada. Um dado relevante é o de que o O.E.X., neste experimento, apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos TGI= 45, 38 (Tabela 5).

5.1.3.2 Redução do sal de tetrazólio (MTT)

Células da linhagem sarcoma 180 foram tratadas com diferentes concentrações do O.E.X. O valor de Cl_{50} obtido através do ensaio de redução do MTT foi 145,1 (136,7 – 153,9) $\mu\text{g/mL}$.

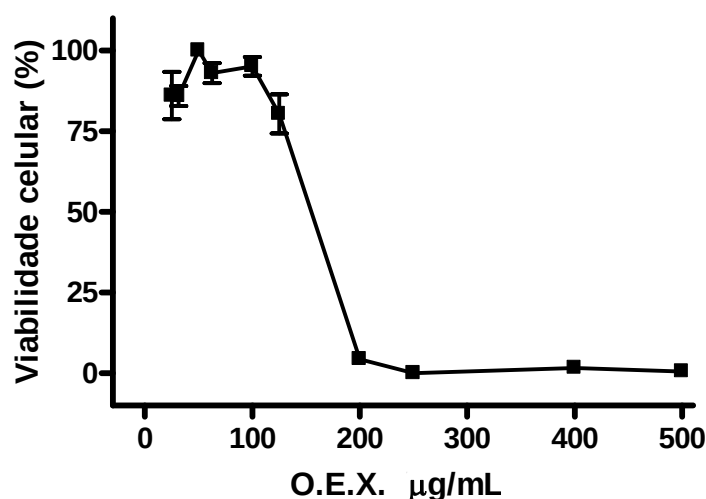


Gráfico 5 – Viabilidade celular após tratamento com o óleo essencial dos frutos de *Xylopi langsdorffiana* ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.2 Ensaios *In vivo*

5.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

Após o tratamento agudo com doses de 250, 375 e 500 mg/kg do O.E.X. em camundongos *Swiss*, foi evidenciada morte nos animais de forma dose-dependente (nenhuma morte na dose de 250 mg/kg, 7 mortes na dose de 375 mg/kg e 11 mortes na dose de 500 mg/kg), obtendo um valor de DL_{50} em torno de 351,09 mg/kg. Além

disso, foram observados alguns efeitos característicos de alterações SNC, sendo nos primeiros minutos da administração do óleo observado efeito estimulante como agressividade e hiperatividade e, logo em seguida, surgiam os efeitos depressores do SNC como resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, catatonia, sedação, anestesia dentre outros. Foi também observado efeitos como respiração forçada e aumento da micção, característicos da ativação do SNA. Os efeitos foram mais exacerbados nas doses mais elevadas tanto em machos como em fêmeas (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas (250, 375 e 500 mg/kg) do O.E.X. em camundongos.

DOSE (mg/kg)	SEXO	M/T*	SINTOMAS
0	Machos	0/6	Nenhum
	Fêmeas	0/6	Nenhum
250	Machos	0/6	Agressividade
	Fêmeas	0/6	Hiperatividade, resposta ao toque diminuído
375	Machos	3/6	Hiperatividade, perda do reflexo corneal e auricular, ambulação diminuída, catatonia.
	Fêmeas	4/6	Hiperatividade, resposta ao toque diminuído, catatonia, perda do reflexo corneal e auricular
500	Machos	5/6	Hiperatividade, agressividade, perda do reflexo corneal e auricular, sedação, aumento de micção, respiração forçada
	Fêmeas	6/6	Hiperatividade, ptose, sedação, anestesia, analgesia, perda do reflexo corneal e auricular

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

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

Na Tabela 7 estão expressos os valores referentes ao ganho de massa corpórea dos animais, experimentais.

Houve uma diminuição significativa nos consumos de água e ração em ambos os sexos tratados com O.E.X. (375 mg/kg), o que levou a uma diminuição significativa no ganho de massa corpórea desses animais, quando comparados ao grupo controle. Uma diminuição significativa no ganho de massa nas fêmeas tratadas com 250 mg/kg foi percebida, sem diminuição dos parâmetros de consumo de água e ração. Esses parâmetros (água, ração e avaliação ponderal) não puderam ser avaliados na dose de 500 mg/kg devido a morte dos animais experimentais.

Tabela 7: Efeitos do óleo O.E.X. (250, 375 e 500 mg/kg) sobre o consumo de água e ração e ganho de massa corpórea dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	SEXO	DOSE (mg/kg)	CONSUMO DE ÁGUA (mL)	CONSUMO DE RAÇÃO (g)	GANHO DE MASSA CORPÓREA (g)
Controle	Macho	---	55,3 ± 1,8	35,96 ± 0,7	9,70 ± 0,5
	Fêmea		57,3 ± 1,2	38,29 ± 0,5	11,50 ± 1,1
O.E.X.	Macho	250	59,2 ± 2,0	38,38 ± 1,8	6,81 ± 1,1
	Fêmea		58,0 ± 2,5	34,92 ± 1,2	2,98 ± 0,8*
O.E.X.	Macho	375	33,75 ± 1,6*	18,19 ± 0,8*	4,73 ± 0,9*
	Fêmea		24,1 ± 0,8*	13,03 ± 0,8*	2,55 ± 0,7*
O.E.X.	Macho	500	----	----	----
	Fêmea				

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; * $p < 0,05$ comparado com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais da linhagem sarcoma 180

Para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais da linhagem sarcoma 180, o O.E.X. foi utilizado nas doses de 50 e 100 mg/kg.

Os efeitos inibitórios do O.E.X. no crescimento do tumor, em camundongos transplantados com sarcoma 180, estão mostrados no Gráfico 6.

Houve redução significativa do peso do tumor dos animais tratados com o O.E.X., bem como nos tratados com 5-FU em relação ao controle transplantado. No 9º dia, a média do peso do tumor do grupo controle transplantado foi $2,49 \pm 0,10$ g. Na presença do O.E.X. (50 e 100 mg/kg) as médias dos pesos dos tumores reduziram para $1,52 \pm 0,13$ e $1,13 \pm 0,12$ g, respectivamente. Para o grupo tratado com 5-FU, a média do peso do tumor foi $0,74 \pm 0,05$ g. As taxas de inibição do crescimento tumoral foram 38,67 e 54,32 % para o tratamento com o O.E.X., 50 e 100 mg/kg respectivamente e 5-FU reduziu o peso do tumor em 70,16 %.

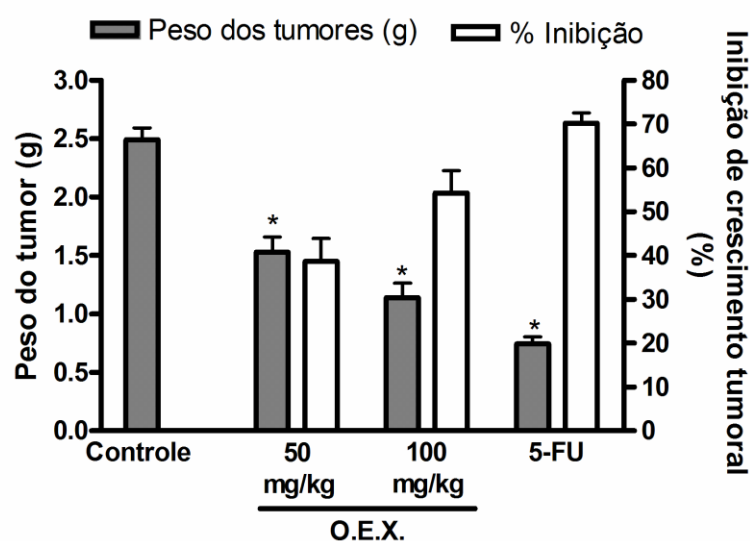


Gráfico 6 – Efeito do O.E.X. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor dos diferentes grupos experimentais. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 6 animais. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido por Tukey.

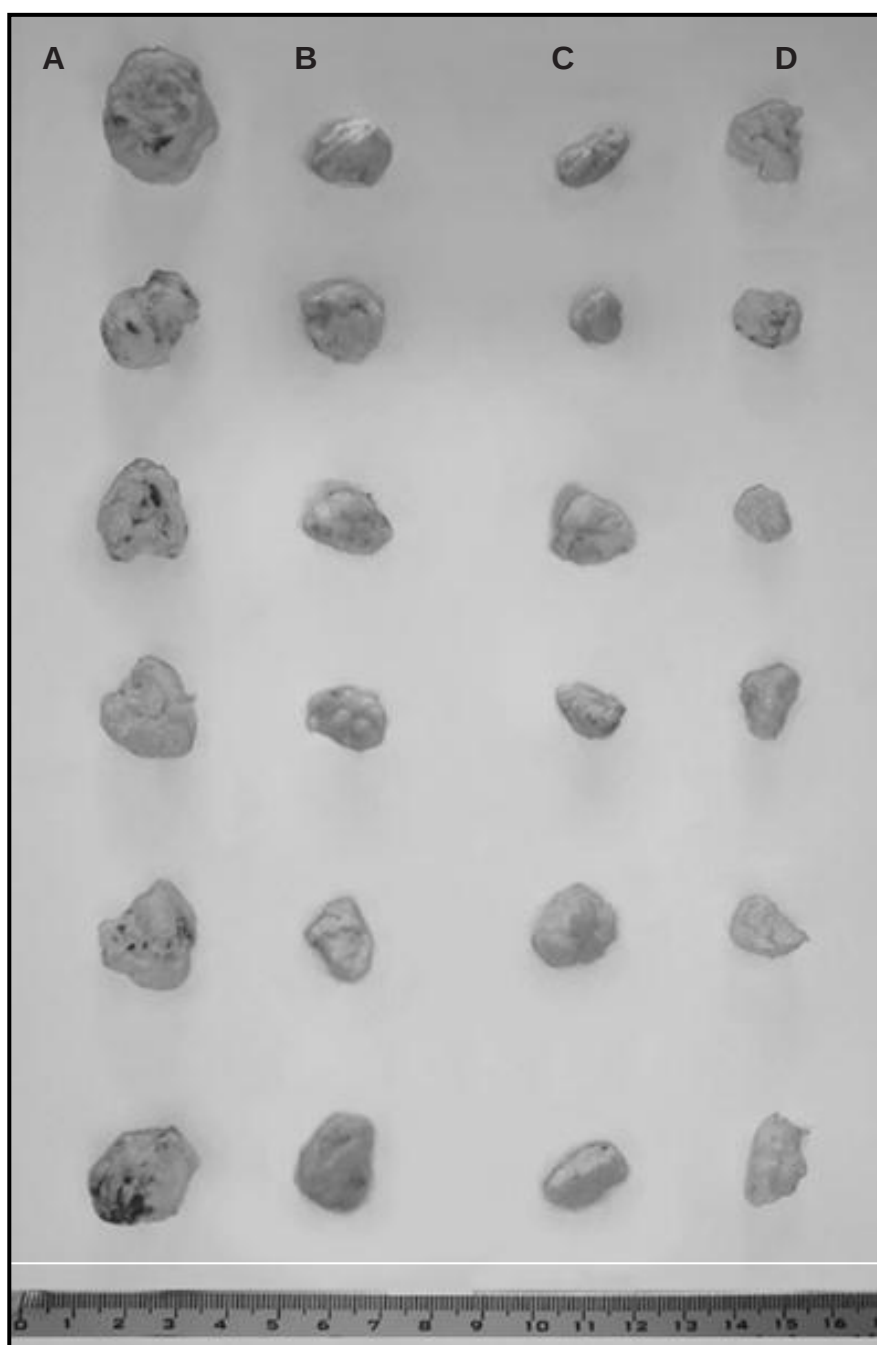


Figura 7: Tumores dos camundongos transplantados com sarcoma 180 dos grupos ($n = 6$): (A) Controle transplantado; (B) O.E.X. (50 mg/kg); (C) O.E.X. (100 mg/kg); (D) 5-FU (25 mg/kg). Os grupos estão dispostos em suas respectivas colunas (Foto: Ana Paula Moura).

5.2.2.1 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração no ensaio de atividade antitumoral *in vivo*

Na Tabela 8 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e a evolução ponderal avaliados durante os sete dias de tratamento. De acordo com os resultados obtidos observa-se que houve redução significativa no consumo de água apenas do grupo que recebeu a maior dose do óleo em estudo (O.E.X. 100mg/kg) em relação ao grupo experimental tratado com 5-FU. No consumo de ração, no entanto, houve uma redução significativa em todos os animais experimentais em relação ao grupo controle sadio, sendo o grupo O.E.X. 100 mg/kg significativamente diferente também em relação ao grupo transplantado e ao grupo experimental 5-FU.

A diminuição do consumo de ração por parte dos grupos tratados com O.E.X. 100 mg/kg e 5-FU resultou em uma diminuição significativa do ganho de peso desses animais, visível ao verificar as respectivas diminuições no percentual de variação de massa corpórea, em relação ao controle transplantado.

Tabela 8 – 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)	% DE VARIAÇÃO DE MASSA CORPÓREA
Controle sadio	---	35,0 ± 1,0	31,7 ± 0,8	+ 3,4 ± 0,5	+ 9,3 ± 1,4
Controle – S180	---	35,3 ± 1,6	26,7 ± 0,6 ^c	+ 8,9 ± 1,0 ^c	+ 25,9 ± 3,5 ^c
5-FU	25	43,8 ± 3,5	26,9 ± 1,3 ^c	+ 0,03 ± 1,1 ^a	+ 0,5 ± 3,1 ^a
O.E.X.	50	38,9 ± 3,2	23,4 ± 1,1 ^c	+ 6,7 ± 0,7 ^{b,c}	+ 24,1 ± 2,6 ^{b,c}
O.E.X.	100	30,7 ± 2,7 ^b	19,9 ± 1,7 ^{a,b,c}	+ 1,9 ± 0,5 ^a	+ 5,2 ± 1,3 ^a

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

^b $p < 0,05$ comparado com grupo experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo Controle sadio (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey

5.2.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos no ensaio de atividade antitumoral *in vivo*

A investigação dos efeitos toxicológicos do O.E.X. incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nos parâmetros renais, em se tratando dos níveis de uréia e creatinina nenhuma alteração significativa foi observada em ambos os grupos tratados com o O.E.X., quando comparado com os controles do experimento. Já em relação às enzimas hepáticas, pôde-se observar um aumento significativo da atividade enzimática da AST nos grupos tratados com as doses de 50 mg/kg em relação ao grupo experimental 5-FU, assim como um aumento significativo na atividade enzimática da ALT no grupo tratado com a dose de 100 mg/kg do óleo essencial quando comparado ao grupo experimental 5-FU (Tabela 09).

Tabela 9 – Efeitos do O.E.X (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	URÉIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)
Controle sadio	---	264,0 ± 22,9	63,4 ± 2,7	41,2 ± 2,2	0,3 ± 0,04
Controle-S180	---	336,7 ± 30,4	62,0 ± 5,2	43,6 ± 4,5	0,4 ± 0,05
5-FU	25	237,3 ± 23,3	44,0 ± 12,0	36,5 ± 1,6	0,4 ± 0,03
O.E.X.	50	382,4 ± 30,7 ^b	70,0 ± 6,0	39,7 ± 2,7	0,4 ± 0,04
O.E.X.	100	324,2 ± 32,8	74,8 ± 4,2 ^b	36,0 ± 3,3	0,6 ± 0,05

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^b $p < 0,05$ comparado com grupo experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

Em relação à avaliação hematológica, houve um aumento significativo na contagem de hemácias do grupo tratado com a dose de 100 mg/kg do óleo essencial e do grupo experimental 5-FU quando comparados ao controle transplantado. E os animais tratados com 50 mg/kg do O.E.X., tiveram sua contagem de hemácias reduzida quando comparadas com o grupo experimental 5-FU. Para a concentração de hemoglobina ocorreu aumento significativo nos grupos tratados as duas doses do o óleo em relação ao grupo experimental 5-FU, este último grupo, por sua vez, aumentou a concentração de hemoglobina em relação ao controle transplantado.

Nenhuma mudança significativa nos níveis de hematócrito foi observada em nenhum animal dos grupos avaliados (Tabela 10).

Tabela 10 – Efeitos do O.E.X (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	HEMÁCIAS (10 ⁶ /mm ³)	HEMOGLOBINA (g/dL)	HEMATÓCRITO (%)
Controle sadio	---	9,8 ± 0,2	14,4 ± 0,2	42,9 ± 0,6
Controle-S180	---	6,8 ± 1,4	13,2 ± 0,3	45,4 ± 1,1
5-FU	25	12,4 ± 0,4 ^a	15,6 ± 0,4 ^a	52,7 ± 1,5
O.E.X.	50	7,0 ± 0,7 ^b	13,3 ± 0,3 ^b	43,5 ± 4,9
O.E.X.	100	10,9 ± 0,1 ^a	13,9 ± 0,1 ^b	46,6 ± 0,5

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

^b $p < 0,05$ comparado com grupo experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

Em relação tanto ao Volume Corpuscular Médio (VCM) quanto a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), ocorreu aumento destes parâmetros no grupo tratado com 50 mg/kg do O.E.X. em relação ao grupo experimental 5-FU e ao controle sadio, já o grupo que recebeu 100 mg/kg do O.E.X. teve seus valores reduzidos em relação ao controle transplantado, semelhante ao grupo experimental 5-FU que também reduziu seus valores de VCM e HCM em relação ao controle transplantado.

Em relação à Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), não houve alteração significativa em nenhum grupo do experimento (Tabela 11).

Tabela 11 – Efeitos do O.E.X (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Controle sadio	---	46,2 ± 2,3	14,6 ± 0,3	29,4 ± 0,09
Controle-S180	---	53,3 ± 4,6	15,6 ± 1,1	29,4 ± 0,6
5-FU	25	42,5 ± 0,6 ^a	12,6 ± 0,2 ^a	29,6 ± 0,2
O.E.X.	50	61,9 ± 2,4 ^{b,c}	17,5 ± 0,2 ^{b,c}	28,5 ± 1,0
O.E.X.	100	42,8 ± 0,4 ^a	12,7 ± 0,2 ^a	29,8 ± 0,3

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

^b $p < 0,05$ comparado com grupo experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo Controle sadio (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey.

No que se refere à contagem total de leucócitos, foi observado aumento significativo nos animais tratados com o óleo essencial em ambas as doses em relação ao grupo experimental 5-FU, nos animais que receberam a maior dose, 100 mg/kg do O.E.X. esse aumento foi significativo também em relação ao controle sadio. Já os animais que foram tratados com o quimioterápico 5-FU tiveram os níveis de leucócitos totais circulantes reduzidos significativamente em relação ao controle sadio e ao controle transplantado. Observa-se que ocorreu aumento de leucócitos no próprio grupo transplantado em relação ao controle sadio.

Na contagem diferencial de leucócitos ocorreu redução significativa de linfócitos nos grupos tratados com as duas doses do O.E.X. em relação ao controle sadio e ao grupo tratado com 5-FU. Redução esta observada no próprio grupo transplantado em relação ao sadio. Ao contrário do grupo experimental tratado com o 5-FU que teve seu índice de linfócitos bastante aumentado em relação ao controle transplantado e ao sadio.

O nível de neutrófilos estava aumentado nos dois grupos tratados com o óleo em relação ao grupo sadio e ao grupo tratado com o 5-FU. Esse aumento foi observado no próprio grupo transplantado em relação ao sadio. Já grupo o experimental 5-FU teve seu nível de neutrófilo reduzido em relação ao controle sadio e ao transplantado.

Em relação ao nível de monócito só ocorreu alteração significativa no grupo tratado com a maior dose do O.E.X. e no transplantado que tiveram seus índices aumentados em relação ao controle sadio.

Nenhuma alteração significativa ocorreu nos índices de eosinófilos nos animais dos grupos experimentais.

Tabela 12 – Efeitos do O.E.X (50 e 100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	LEUCÓCITOS TOTAIS (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Controle sadio	---	7,9 ± 0,6	76,0 ± 1,4	27,8 ± 1,6	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Controle-S180	---	14,5 ± 1,1 ^c	39,2 ± 4,9 ^c	53,6 ± 5,9 ^c	5,0 ± 0,6 ^c	0,6 ± 0,3
5-FU	25	2,0 ± 0,3 ^{a,c}	92,6 ± 1,5 ^{a,c}	6,1 ± 1,6 ^{a,c}	1,7 ± 0,2	0,6 ± 0,3
O.E.X.	50	9,7 ± 2,3 ^b	49,4 ± 2,8 ^{b,c}	49,8 ± 3,2 ^{b,c}	4,1 ± 1,0	1,2 ± 0,4
O.E.X.	100	1,8 ± 0,3 ^{b,c}	33,6 ± 1,9 ^{b,c}	64,8 ± 3,1 ^{b,c}	4,3 ± 0,8 ^c	0,6 ± 0,5

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

^b $p < 0,05$ comparado com grupo experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo Controle sadio (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos, pesados 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 O.E.X. com as diferentes doses não resultou em alteração significativa nos índices de rins e coração em relação aos demais grupos do experimento (Tabela 13). Quanto ao índice de fígado ocorreu aumento significativo no grupo que foi tratado com 50 mg/kg do O.E.X em relação aos controles do experimento, o grupo transplantado, o sadio e o positivo (tratado com 5-FU). Em relação ao índice de timo, foi observado um aumento significativo nos grupos tratados com o O.E.X nas duas doses em estudo em relação ao grupo experimental 5-FU, que este, entretanto teve seu índice de timo reduzido quando comparado ao controle transplantado e ao sadio. Um perfil semelhante foi observado no índice de baço, onde os grupos de animais tratados com o as duas doses do O.E.X. tiveram seu índice aumentando em relação ao controle sadio e ao grupo tratado com o 5-FU, este grupo, por sua vez, teve o índice de baço reduzido quando comparado ao controle transplantado (Tabela 13).

Tabela 13 – Efeitos do O.E.X. (50 e 100 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 sadio	----	3,6 ± 0,09	56,3 ± 0,4	10,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1	5,2 ± 0,2
Controle-S180	----	3,8 ± 0,06	53,7 ± 1,9	10,1 ± 0,4	1,9 ± 0,1	6,8 ± 0,3
5-FU	25	3,2 ± 0,1	49,2 ± 1,8	10,3 ± 0,2	1,08 ± 0,1 ^{a,c}	3,3 ± 0,2 ^a
O.E.X.	50	3,7 ± 0,2	69,2 ± 1,7 ^{a,b,c}	11,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2 ^b	9,7 ± 0,7 ^{a,b,c}
O.E.X.	100	3,8 ± 0,2	51,2 ± 3,8	11,3 ± 0,9	2,10 ± 0,2 ^b	7,6 ± 0,5 ^{b,c}

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

^b $p < 0,05$ comparado com grupo experimental 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

^c $p < 0,05$ comparado com grupo Controle sadio (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2.4 Análises anatomopatológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do O.E.X. sobre os órgãos dos animais tratados, uma avaliação histopatológica dos mesmos foi realizada.

Os rins removidos do grupo controle transplantado S180, grupo experimental tratado com 5-FU e tratados com O.E.X. nas doses de 50 e 100 mg/kg apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade morfológica. Em consonância, os lobos apresentavam-se bem definidos e com raios medulares, representados pela pirâmide medular e tecido cortical recobrindo a sua base e lados. As artérias e veias interlobares apresentavam-se regularmente distribuídas.

A análise de microscopia óptica demonstrou regiões cortical e medular conservadas e bem distribuídas. Os glomérulos pertencentes aos animais do grupo controle transplantado, 5-FU, O.E.X. 50 e 100 mg/kg encontravam-se envolvidos por fina cápsula de Bowman, sendo o espaço de Bowman e tufo capilar sustentados por delicado mesângio. Os túbulos contorcidos proximais, túbulos coletores e alças de Henle estavam sustentados por escasso tecido fibroconjuntivo e revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a pavimentoso, típico do tecido renal. A região medular demonstrava ainda túbulos coletores direcionados para as papilas,

delineados por células altas, com citoplasmas claros (anfofílicos). Tecido fibroconjuntivo interveniente delicado (Figura 8).

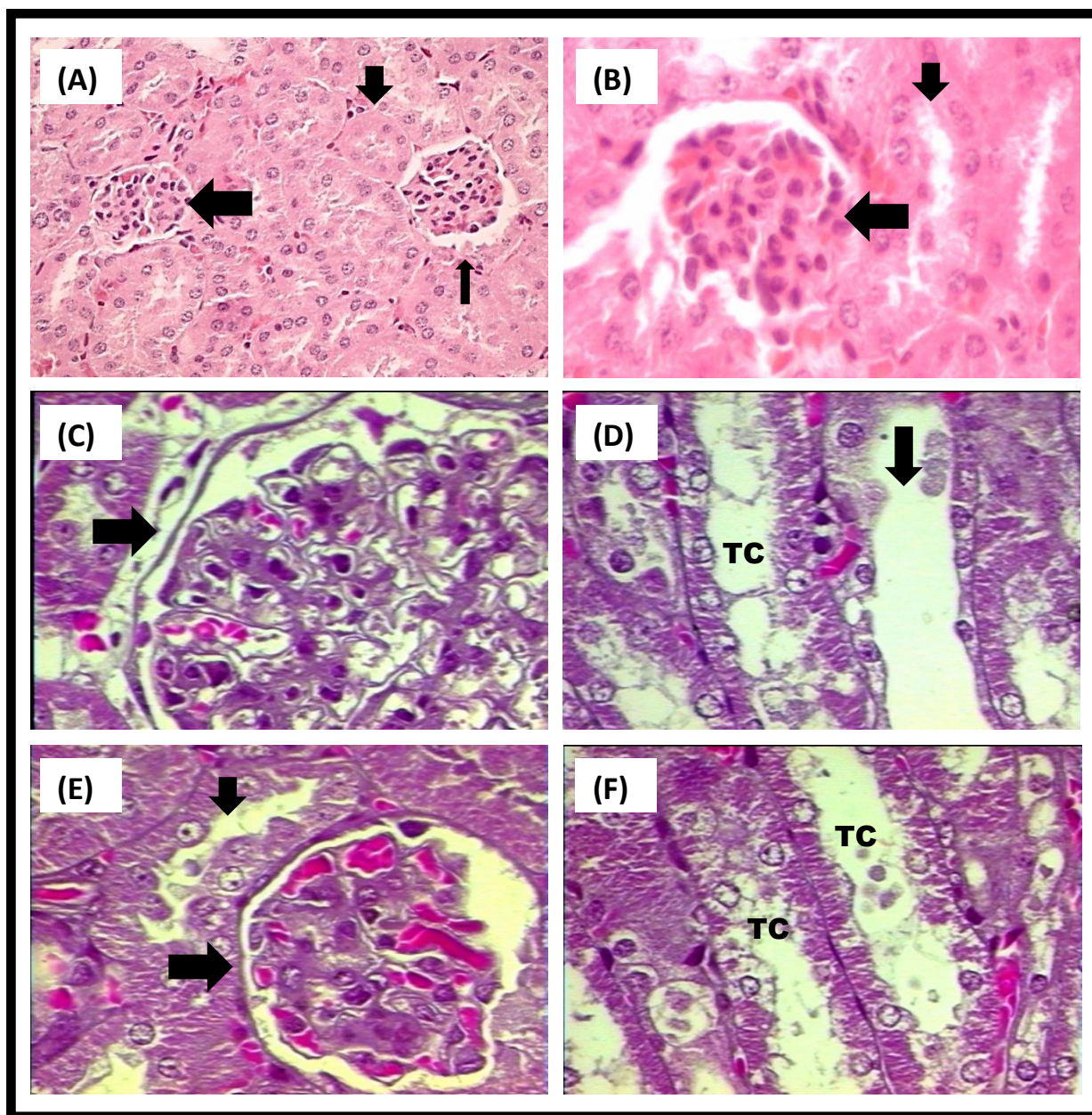


Figura 8 – Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado: TCG (seta grossa), espaço de Bowman (seta fina) e margeados por túbulos contorcidos proximais (seta curta); **(B)** 5-FU (25 mg/kg): TCG (seta grossa) e túbulos contorcidos proximais (seta curta), preservados; **(C)** e **(E)** O.E.X. (50 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente), cápsulas de Bowman e TCG, preservados (setas grossas); **(D)** e **(F)** O.E.X. (50 e 100 mg/kg, respectivamente): porções delgadas das alças de Henle (seta) revestidas por células cuboides ou achatadas, margeadas de túbulos coletores (TC), sem alterações. **TCG** – Tufo capilar de glomérulo, **TC** – Túbulo coletor. **A** – H.E. x100, **B,C,D,E** – H.E. x400.

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle transplantado apresentaram arquitetura do tipo lobular, com veias hepáticas terminais de paredes finas, equidistantes, espaços portais, regularmente distribuídos e pequenos, com matriz laxa comportando tríades vículo-biliares (ductos biliares, ramo da veia porta e ramos da artéria hepática sem particularidades histológicas). Nos espaços portais, hepatócitos normais, isomorfos, com retração acidofílica de hepatócitos (acidofilia citoplasmática, cariorrexe e cariólise) focal, acompanhados de focos pequenos e esparsos de hepatocitólise e de discreto infiltrado inflamatório linfocitário, no seio do lóbulo. As atividades periportal e perisseptal foram ausentes. Nos animais do grupo 5-FU identificam-se poucos linfócitos periportais (população residente) (Figura 9).

Nos animais tratados com 5-FU, e com as duas doses do O.E.X., houve a presença de sobrecarga hepatocelular lipídica (esteatose macrovesicular e microvesicular), discreta, com disposição azonal (aleatória), ainda mais rara nos animais de maior dose do O.E.X., apresentando-se em focos nos animais do grupo transplantado. Os macrófagos sinusoidais (células de Kupffer) apresentaram-se hipertróficos (Figura 9).

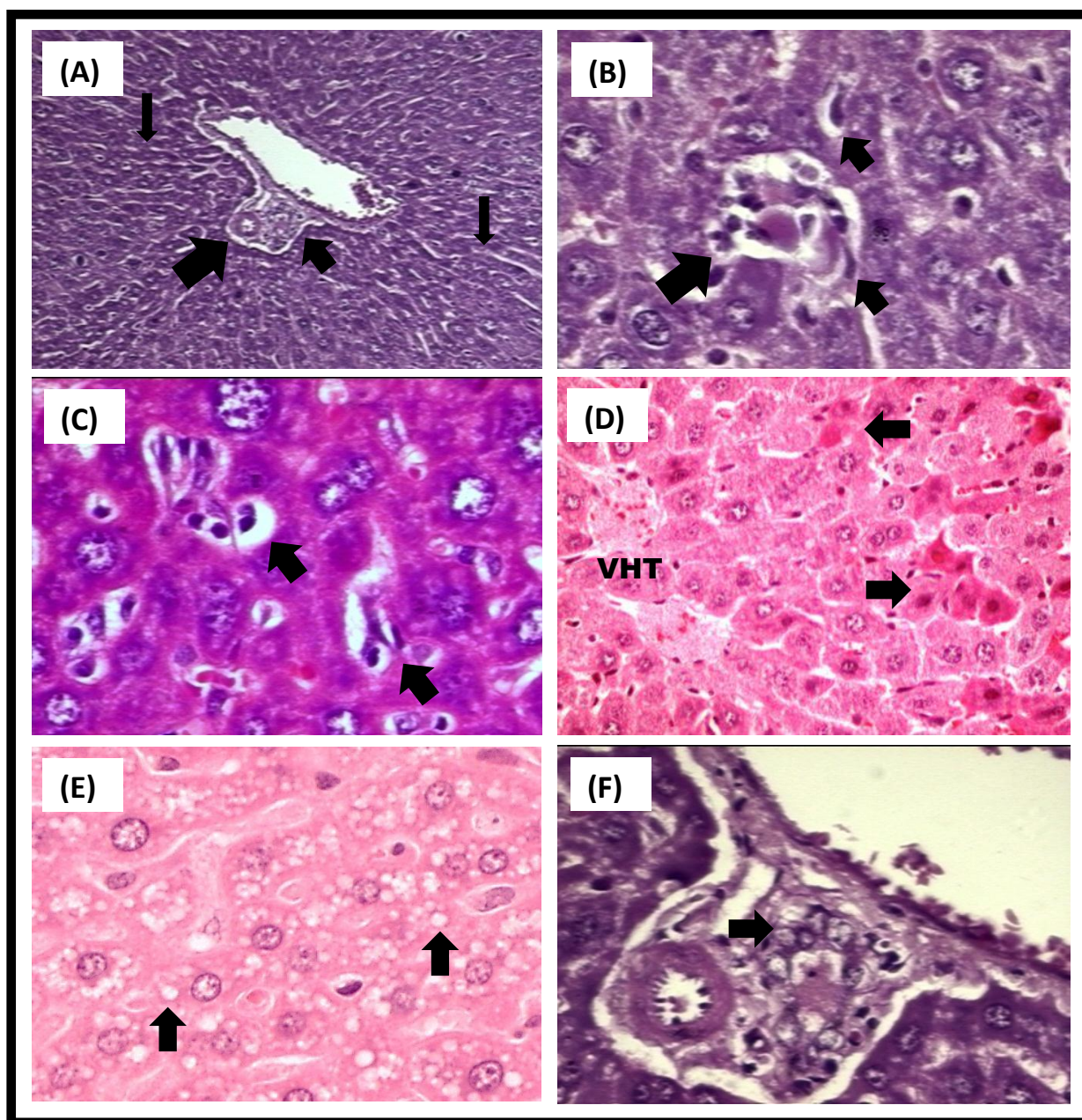


Figura 9 – Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: **(A) Controle transplantado**: tríade vâsculo-biliar habitual, em matriz escassa; ducto biliar (seta curta), ramo artéria hepática (seta grossa), traves hepatocitárias de Remak radialmente distribuídas, em zonas I (setas finas); **(B)**: corpos apoptóticos (seta grossa) intra-sinusoidais envolvidos por células macrofágicas de Kupffer (seta curta), em zona II; **(C)** células macrofágicas de Kupffer hiperplásicas, intrasinusoidais (setas); **(D)** Ramo da VHT e retração acidofílica citoplasmática focal (setas curtas), comum a todos os grupos; **(E) 5-FU (25 mg/kg)**, esteatose macrovesicular e microvesicular em zona II do ácino hepático (setas curtas); **(F)** espaço porta com matriz conjuntiva laxa, contendo escassos linfócitos residentes (seta curta); VHT – Veia Hepática Terminal. **A** – H.E. x100; **B, C, D, E, F** – H.E. x400.

Em alguns espaços portais, identifica-se infiltrado de linfo-histiocítico, em focos. O quadro de portite, embora igualmente focal, é mais pronunciado nos animais tratados com de 100 mg do óleo. Em relação aos aspectos citológicos, os hepatócitos apresentaram-se normais, isomorfos, observando-se algumas mitoses isoladas. Focos pequenos e esparsos de hepatocitólise acompanhados de discreto infiltrado inflamatório linfoistiocítico, no seio do lóbulo, em zona I, II e III, foram presentes. Essas lesões hepatocitolíticas e inflamatórias, embora esparsas, são maiores nos animais tratados com a maior dose do O.E.X. (100 mg/kg). Atividade periportal e perisseptal ausente. A trama lobular de reticulina, por sua vez, apresenta-se delicada, com eventual desorganização da trama nos maiores focos de hepatocitólise, associados a O.E.X. 100 mg/kg (Figura 9).

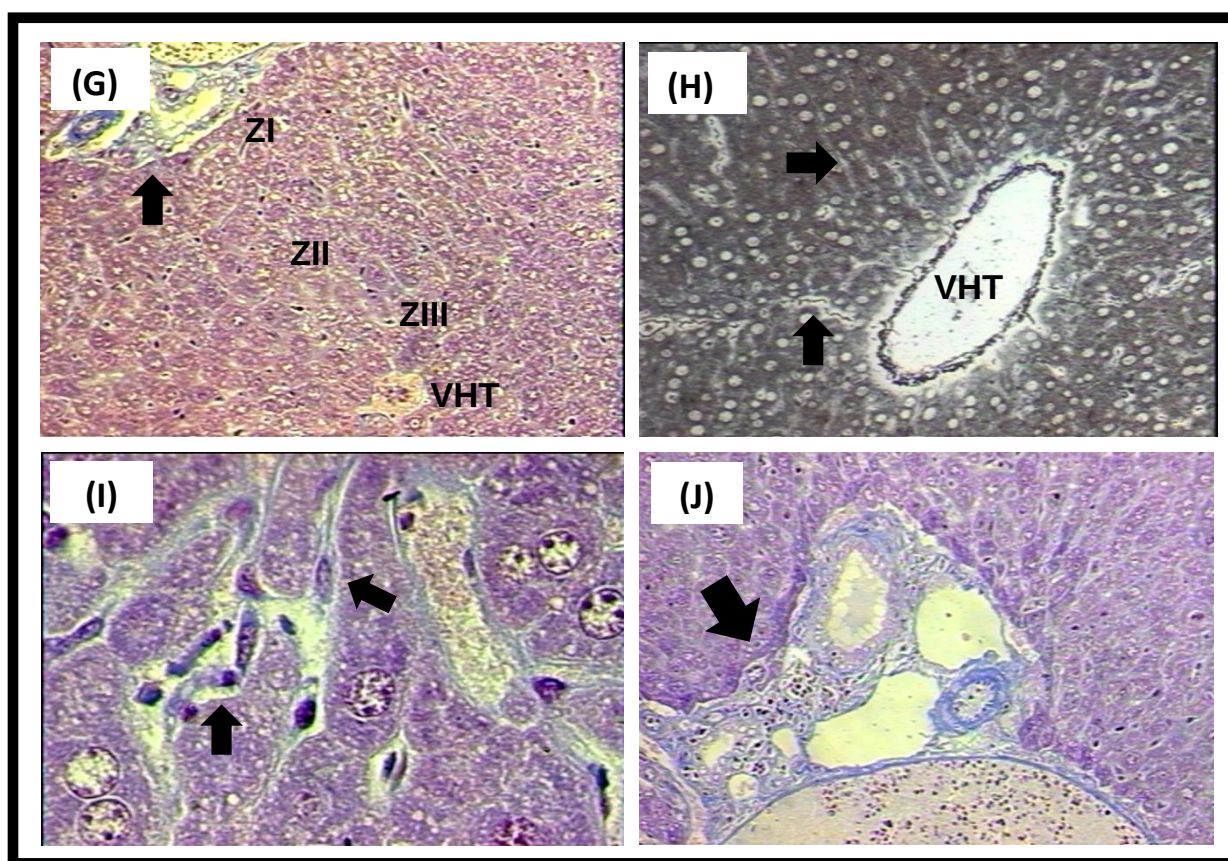


Figura 9 – (Continuação) Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: **(G)** O.E.X. (50 mg/kg), arquitetura lobular preservada com destaque para a distribuição zonal dos hepatócitos (**zona I, zona II e zona III**) entre o espaço porta (seta) e a **VHT**. Presença de discreta esteatose; **(H)** **VHT** de paredes finas, trama reticular de sustentação hepatocitária bem distribuída (setas); **(I)** hipertrofia das células de Kupffer (setas curtas) intrasinusoidais, na zona II; **(J)** afluxo celular mononuclear em espaço porta.

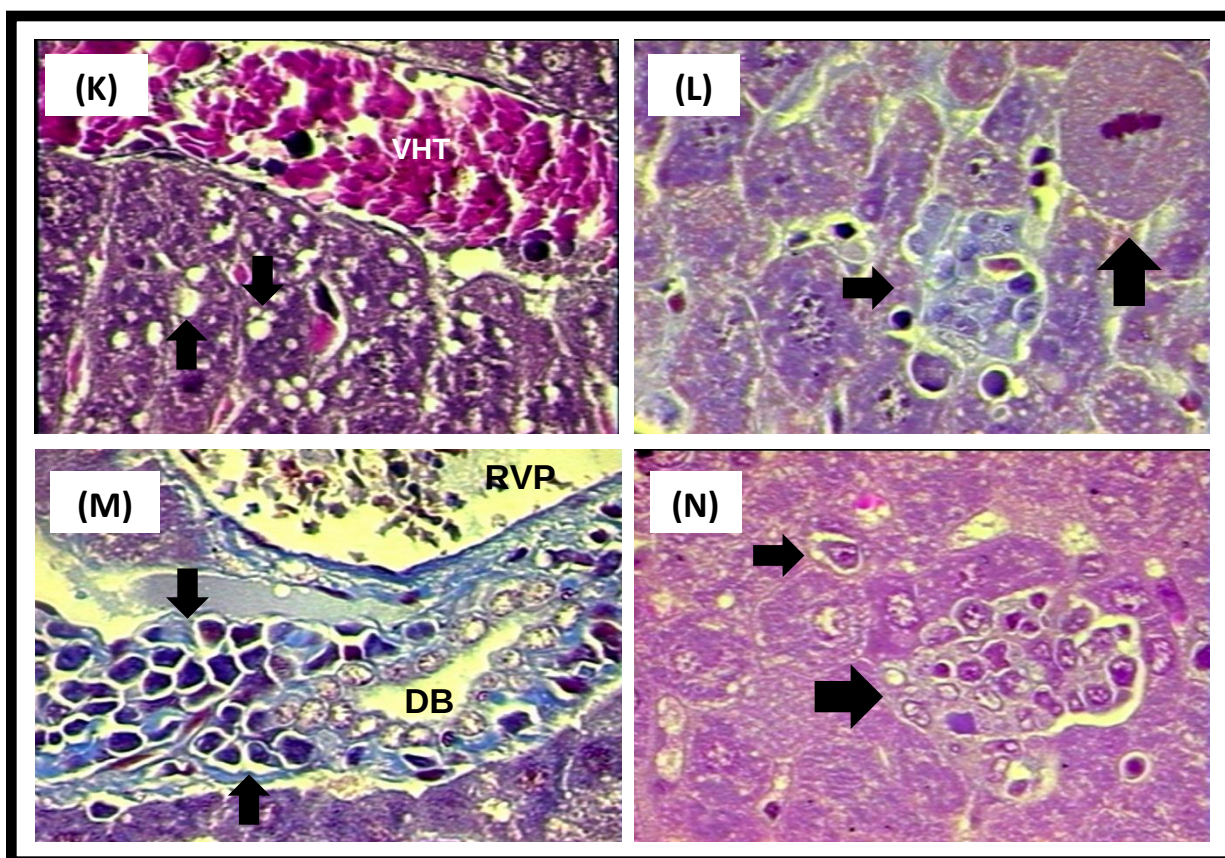


Figura 9 – (Continuação) Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: **(K)** O.E.X. (100 mg/kg) Esteatose macrovesicular (seta) na zona III, destacada pela presença da VHT; **(L)** Foco necroinflamatório (seta curta) zona II, margeando hepatócito em divisão mitótica (atividade regenerativa hepatocelular) (seta grossa); **(M)** Afluxo celular mononuclear em espaço porta; **(N)** fluxo linfo-histiocítico em zona II (seta grossa), acompanhada de hipertrofia das células de Kupffer (seta curta). RVP - Ramo da Veia Porta, VHT – Veia Hepática de Terminal, DB – Ducto biliar. G (x25), J (x100), I, L, M (x400) - Tricrômico de Masson; H – Método de Gordon e Sweet, x100; K, N – H.E., x400.

Na microscopia, os tumores dos animais transplantados foram identificados como neoplasia maligna de limites marginais irregulares e infiltrativos, de alto grau citológico, com invasão para o tecido adiposo circunjacente, alcançando e divulsionando tecido muscular esquelético. O mesmo foi válido para as fibras nervosas, e o perineuro – sem invasão. Configuração sólida, lobulada, com septos finos de tecido fibrocolagênico, estroma intratumoral escasso, proliferação de células imaturas, pequenas ou de tamanhos medianos, de formatos irregulares, sendo algumas bizarras, multinucleadas e gigantes. Exibem citoplasmas eosinofílicos, de limites nítidos, núcleos hipercromáticos ou vesiculares com cromatina grosseira, ovalados ou pleomórficos, com nucléolos proeminentes (Figura 10).

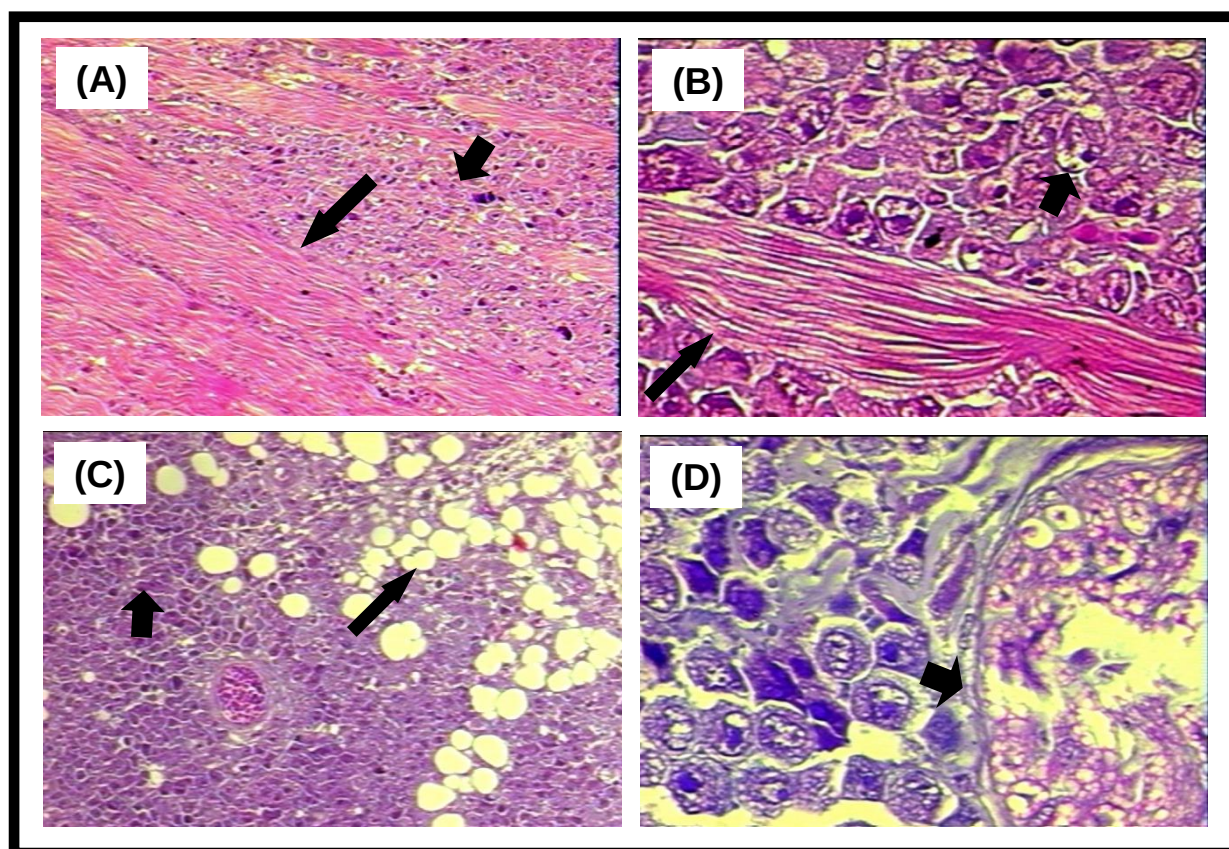


Figura 10 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais. Proliferação de células neoplásicas malignas (setas curtas) em camundongos tratados com **O.E.X. 50mg/kg (A,C)** e **O.E.X. 100mg/kg (B,D)**. **(A)** e **(B)** Células neoplásicas dissecando grupo de fibras de tecido muscular esquelético (seta longa); **(C)** Extensão da infiltração tumoral sobre o tecido adiposo (seta longa.; **(D)** Crescimento tumoral avançando o filete neural, sem infiltração do nervo (seta grossa). **A ,C-** H.E. x25; **B-** H.E, x400, **D-** Tricrômico de Masson x400.

Infiltração tecidual, áreas de necrose tumoral coagulativa, com variações quantitativas entre os grupos. Mitoses assimétricas também foram observadas. Nos animais do grupo tratado com 5-FU, os tumores apresentavam infiltração do tecido adiposo e muscular limitada, com filetes neurais, envolvidos pelo crescimento neoplásico, com comprometimento apenas do tecido conjuntivo perineural, um linfonodo de diminuta dimensão, localizado em uma de margens cirúrgicas do espécime tumoral analisado, envolvido pela neoplasia. Tal linfonodo mostrou-se íntegro, com características hiporreativas (folículos linfóides, esparsos, pequenos), não havendo transgressão de sua cápsula, nem invasão do parênquima. Áreas de necrose correspondentes a cerca de 60 % do crescimento neoplásico. (Figura 11).

Os tumores tratados com o O.E.X. 50 mg/kg e 100 mg/kg apresentaram aspectos arquiteturais e citológicos da neoplasia similares aos descritos no grupo dos animais transplantados. A particularidade do grupo tratado com o O.E.X. 50 mg/kg foi apresentar extensão de área de necrose coagulativa semelhante à basal visualizada no controle transplantado (30%), enquanto que em 100 mg/kg a extensão de necrose tumoral foi correspondente a 40 % do crescimento neoplásico (Figura 11).

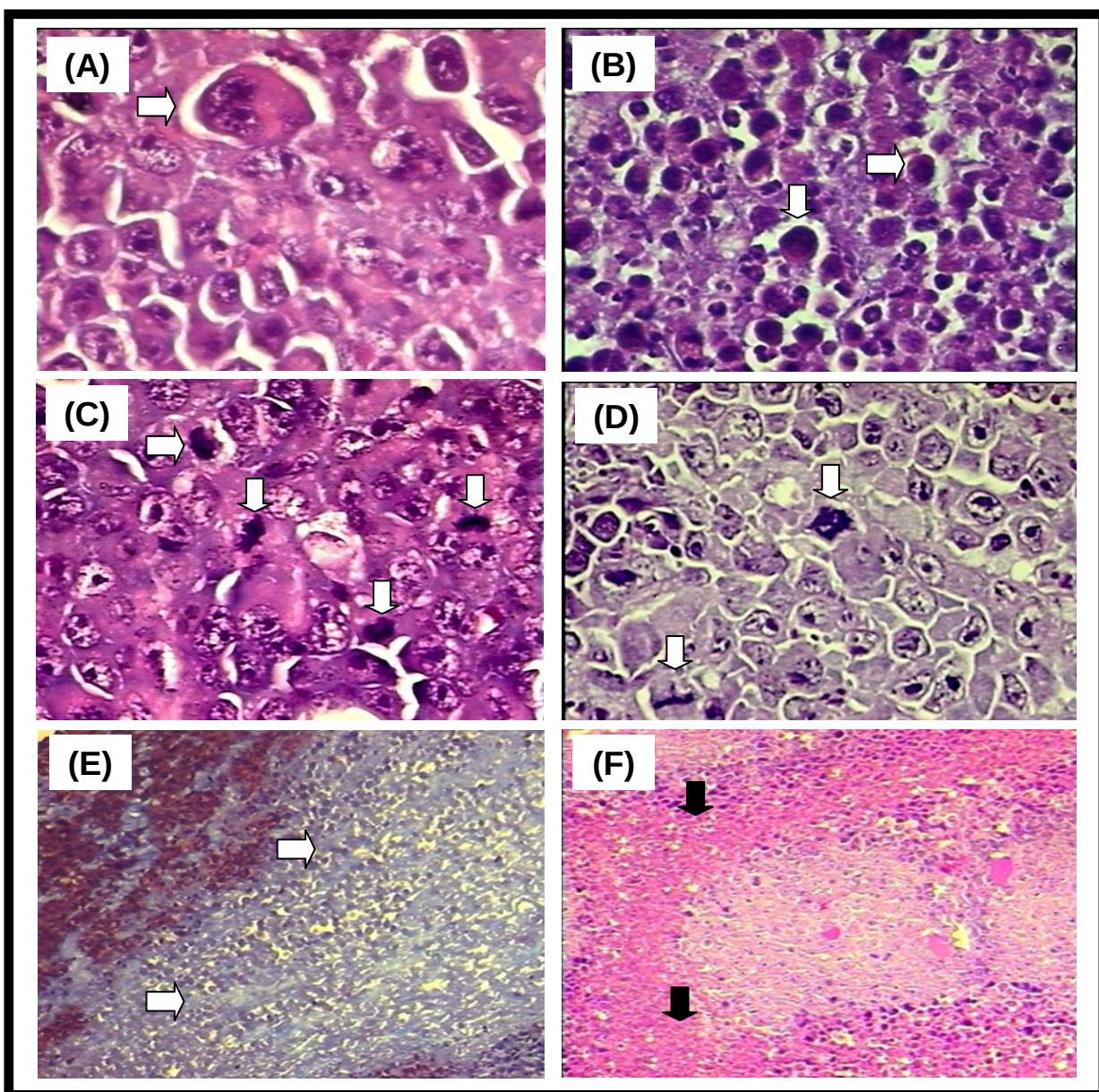


Figura 11 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais: **(A)** e **(B)** Controle transplantado, sarcoma pleomórfico: intensa anaplasia (anisocitose, anisonucleose,

gigantismo, nucléolos proeminentes e cromatina grosseira). **(C)** Atividade mitótica: Controle transplantado; **(D)** O.E.X. 100 mg/kg; Áreas de necrose coagulativa associada ao tratamento em **(E)** 5-FU e **(F)** O.E.X. (100 mg/kg). **A-D** – H.E. x400; **E** - Tricrômico de Masson, x100, **F** - H.E. x100

5.2.3 Genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do O.E.X. foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado é apresentado na Tabela 14. O tratamento dos animais com diferentes doses do O.E.X., não induziu um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico de camundongos quando comparados ao grupo controle (5% de Tween 80).

Tabela 14 – Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.X. e ciclofosfamida.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Nº DE ANIMAIS	TOTAL DE CÉLULAS	CÉLULAS MICRONUCLEADAS
5 % Tween 80	-	6	2000	4,3 ± 0,6
Ciclofosfamida	50	6	2000	26,0 ± 5,0 ^a
O.E.X	88	6	2000	2,8 ± 0,3
O.E.X	176	6	2000	4,3 ± 0,2
O.E.X	281	6	2000	3,5 ± 0,4

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a*p* < 0,05 comparado ao controle (5 % Tween 80).

DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

A importância crescente das neoplasias malignas no quadro sanitário do Brasil tem ampliado a discussão sobre o controle desse grupo de doenças, incluindo-as como uma das prioridades no setor da saúde. Apesar de ainda existirem áreas obscuras na compreensão da etiologia do câncer, hoje, já se tem conhecimento suficiente para afirmar que a quimioterapia utilizada no tratamento do câncer é primordialmente oriunda de recursos naturais (MAGALHÃES, 2006).

Dentre as 250 mil espécies vegetais estimadas no planeta, somente uma pequena porcentagem foi estudada quanto a sua composição micromolecular. Quando se considera o número de plantas submetidas a ensaios biológicos ou farmacológicos esse percentual é ainda menor. Produtos naturais continuam sendo a principal fonte de novos compostos para o desenvolvimento de agentes antitumorais mais eficientes (NEWMAN et al., 2003).

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.

O estudo dos óleos essenciais e os seus componentes, uma vez que há relatos na literatura de sua grande variedade de atividades biológicas, inclusive com elevada potência, traz um cenário propício para a obtenção de novos produtos com atividade antitumoral (BEZERRA et al., 2008).

Para investigar o potencial papel do O.E.X. na terapia anticâncer o presente trabalho avaliou primeiramente sua atividade frente *Artemia salina*. O teste frente *A. 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 repostas biológicas, onde as variáveis morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982). 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).

Na avaliação do bioensaio com *A. salina*, valores de CL₅₀ menores que 1.000 µg/mL representam produtos bioativos (MEYER et al., 1982). Dessa forma, pode-se sugerir que O.E.X. é bioativo frente *A. salina*, uma vez que o valor de CL₅₀ obtido para o O.E.X. foi menor que 1.000 µg/mL, apresentando CL₅₀ de 459,0 (450,6 – 467,6) µg/mL, indicando assim que o composto é um possível candidato a droga antitumoral.

Sabendo que o O.E.X. possui bioatividade, prosseguiu-se o estudo para avaliar a atividade antitumoral frente a um painel de nove linhagens de células tumorais humanas. Por meio do ensaio da sulforrodamina B, o O.E.X. apresentou valor baixo de TGI para a linhagem de leucemia K-562 (TGI = 1,78 µg/mL) indicando uma potente atividade para esta linhagem.

Com esse resultado, percebeu-se que o óleo possui uma boa seletividade para a linhagem de leucemia mielóide crônica (K-562). Esse dado torna-se mais importante, uma vez que a descoberta de um quimioterápico específico para uma determinada linhagem tumoral irá, provavelmente, reduzir os efeitos colaterais provenientes da ação do quimioterápico em outras células.

A leucemia mielóide crônica é uma doença clonal maligna caracterizada por uma excessiva proliferação da linhagem mielóide (Fase Crônica - FC), seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular (Fase Acelerada - FA) e terminando num quadro de leucemia aguda (Fase Blástica - FB). Atualmente, a leucemia

mielóide crônica não é uma doença curável com a terapia medicamentosa, nas fases FA e FB, sendo o transplante de medula óssea alogênico (aparentado ou não aparentado) a única modalidade curativa de tratamento (PEGGS et al., 2003; DOBBIN et al., 2002). Estimam-se em 2012 para o Brasil 4.570 casos novos de leucemia em homens e 3.940 em mulheres (BRASIL, 2011).

O outro resultado promissor do ensaio da sulforrodamina B, foi a boa atividade frente à linhagem de células de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI-ADR/RES que é uma linhagem resistente a múltiplas drogas, o que torna o seu tratamento difícil. O desenvolvimento de uma nova droga efetiva para essa linhagem contribuiria muito para o tratamento do câncer (LISCOVITCH et al, 2007).

O câncer de ovário é a sétima causa mais comum de morte por câncer em mulheres em todo o mundo. O tratamento consiste de uma combinação de cirurgia de redução do volume e quimioterapia baseada em platina isoladamente ou combinada com paclitaxel. Entre 55 % e 75 % das mulheres que respondem a terapia de primeira linha têm a recidiva dentro de dois anos. A segunda linha é paliativa e corresponde à quimioterapia e visa reduzir os sintomas e prolongar a sobrevivência (HALDAR, 2011). Quando o câncer é da linhagem de células de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI-ADR/RES, o tratamento é ainda mais delicado, ficando a equipe de saúde sem opção para terapêutica medicamentosa.

O óleo em estudo foi testado ainda frente células da linhagem celular HaCat (queratinócitos humanos- células não tumorais), apresentando TGI > 50 µg/mL (TGI= 74,53 µg/mL), sendo portando inativo em células não tumorais, com TGI bem maior que do fármaco utilizado como controle positivo no experimento, a doxorrubicina (TGI= 0,23 µg/mL). A investigação da citotoxicidade em linhagens não tumorais é importante, tendo em vista que, se o tecido normal e o tumoral exibirem sensibilidade similar ao medicamento, não haverá janela terapêutica e, na concentração em que o tumor responder, a célula normal responderá também e o tecido será danificado (HOFMANN, 2008).

Uma vez demonstrado bioatividade do produto natural frente *Artemia salina* e atividade antitumoral *in vitro* frente células tumorais humanas, passamos a investigar a atividade do O.E.X. frente células tumorais murinas *in vitro*. Sarcoma 180 é um tumor de origem murina e é uma das linhagens utilizadas em pesquisas de avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (ITO et al., 1997; LEE et al., 2003). Foi

então verificada, através do ensaio do MTT que o O.E.X. reduziu o crescimento de células sarcoma 180, de forma dependente de concentração, apresentando CI_{50} de 145,1 (136,7 – 153,9) $\mu\text{g/mL}$, o que caracteriza uma fraca atividade citotóxica para o referido óleo na linhagem utilizada.

O componente majoritário do óleo essencial do presente estudo foi o d-limoneno, também conhecido como R-(+)-limoneno, que é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia, sendo a prevenção da desidratação e a inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais (MARÓSTICA JÚNIOR e PASTORE, 2007).

Ensaio clínicos tem demonstrado que fármacos já utilizados na clínica, como o docetaxel, combinados como novos agentes, podem aumentar a sobrevida de pacientes com câncer. Este estudo demonstrou ainda que o d-limoneno, uma vez associado com o docetaxel, pode potencializar sua atividade antitumoral em células de próstata, sem mostrar-se tóxico para as células de próstata normais (RABI e BISHAYEE, 2009).

O d-limoneno é capaz de inibir o crescimento de diversas linhagens de células tumorais sem produzir toxicidade, apresentando ainda efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos frente tumores murinos mamários, hepáticos e pancreáticos (ELEGBEDE et al., 1984, KAJI et al., 2001; NAKAIZUME et al., 2007).

Atividade citostática *in vitro* contra diversas linhagens tumorais humanas já foi verificada inclusive para derivado do d-limoneno, alguns presentes no O.E.X., a exemplo do alfa-terpineol que apresentou seletividade no estudo citado para adenocarcinoma (MCF-7) e leucemia mielóide (K-562) (BICAS et al, 2011).

O d-limoneno apresenta, assim como muitos compostos que ocorrem naturalmente, atividade anticâncer através da indução de espécies reativas do oxigênio. Rabi e Bishayee (2009) demonstraram que seus efeitos foram capazes de aumentar os efeitos citotóxicos do docetaxel através da indução de H_2O_2 intracelular. Segundo os autores, os efeitos benéficos combinados poderiam ser através da modulação de proteínas envolvidas na via mitocondrial da apoptose (RABI; BISHAYEE, 2009).

Portanto, o efeito antitumoral *in vitro* observado para o O.E.X. deve ser, pelo menos parcialmente, produzido pela presença do d-limoneno em sua composição.

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 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). Um produto natural para não apresentar atividade hemolítica deve apresentar CH_{50} maior que 1250 $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS JÚNIOR et al., 2010), observando o resultado obtido no ensaio com eritrócitos de camundongos *Swiss* com o O.E.X., onde a CH_{50} foi 293,6 (281,6 – 306,1) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2) podemos inferir que o óleo apresenta moderada toxicidade frente eritrócitos, células estas comumente afetadas nos tratamentos com agentes antineoplásicos.

A investigação dos efeitos *in vivo* do O.E.X. 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 (DL_{50}), 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.X., em camundongos submetidos às doses de 250, 375 e 500 mg/kg, pela via intraperitoneal, obtendo-se uma DL_{50} de 351,09 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.

A triagem farmacológica comportamental detecta, qualitativamente, algumas ações centrais importantes, sendo um teste preliminar de fácil execução (ALMEIDA, 1999). Na observação dos parâmetros descritos no protocolo foram evidenciadas que as alterações/ efeitos foram tanto mais frequentes e intensos quanto maior a dose. Foi também possível observar que nos primeiros instantes após a administração do óleo (0; 15; 30 minutos) os animais apresentaram intensos efeitos estimulantes do SNC como agressividade e hiperatividade, e contraditoriamente nos momentos seguintes, até 4 horas da administração foi observado efeitos depressores do SNC como resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, ambulação diminuída, sedação, ptose, anestesia, analgesia e catatonía.

Sabe-se que o limoneno, um dos componentes majoritários do O.E.X., possui como um de seus derivados oxigenados o álcool perílico (BICAS, 2011), derivação esta que pode ser obtida pela conversão do limoneno pela NADPH (EXPLORENZ, 2012). O álcool perílico, por conseguinte, promove efeito depressor do SNC (BENEDITO, 2009), o que nos permite sugerir que a substituição dos efeitos iniciais estimulantes por efeitos depressores possa ser devido ao álcool perílico produzido pela metabolização do limoneno.

O registro da ambulação diminuída é, talvez, a maneira mais comum de se verificar se uma substância analisada apresenta efeito depressor do SNC, entretanto, a classificação de uma droga como psicodpressora, utilizando-se apenas este parâmetro, é algo muito precoce, uma vez que algumas drogas consideradas depressoras do SNC (opióides, por exemplo) provocam um aumento na ambulação dos animais tratados. 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.X. sobre o SNA que sugerem estímulo parassimpático pelo aumento da micção, e inibição parassimpática, uma vez que foram registrados em destaque a respiração forçada (Tabela 6) (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 sugerem-se 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.

Em relação aos parâmetros metabólicos avaliados diariamente após o tratamento de toxicidade aguda com o O.E.X., foi possível verificar uma redução significativa no peso das fêmeas na dose de 250 mg/kg, porém curiosamente não ocorreu redução de consumo de ração e água, permitindo sugerir a ocorrência de uma possível alteração metabólica. Isso associado à diminuição significativa no consumo de água e ração, que foi significativa para ambos os sexos na dose de 375 mg/ kg, sendo mais pronunciado nas fêmeas, o que levou a uma redução no peso corporal dos animais em estudo, mais significativa para as fêmeas, na dose de 375 mg/kg. Isso permite sugerir a existência de uma possível toxicidade sobre o sistema gastrointestinal desses animais, além de efeitos tóxicos mais pronunciados nas fêmeas, o que permitiria inferir uma possível influência hormonal na toxicidade aguda do produto natural.

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.X. *in vivo*.

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.X., houve redução significativa do peso do tumor dos animais tratados, bem como nos tratados com 5-FU em relação ao controle transplantado. Sendo (38,67 % e 54,32 % para as doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente) e inibição de 70,16 % para o padrão 5-FU), portanto, pode-se afirmar que existe uma atividade antitumoral *in vivo* significativa para o produto natural estudado (Gráfico 6).

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.X. durante o experimento de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, que foi caracterizado por doses repetidas ao longo de 7 dias.

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).

Praticamente todas as drogas antineoplásicas causam alterações gastrointestinais, 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 gastrointestinal, são o consumo de alimentos e a evolução ponderal (XAVIER, 2011).

No que diz respeito ao consumo de água e ração, os animais tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg do O.E.X. apresentaram uma redução significativa no consumo de ração (em relação ao sadio e ao transplantado, respectivamente). Porém, apenas na maior dose os animais perderam peso, o que nos leva a inferir que a perda de peso relacionada com o aumento da dose esteja relacionada com uma possível toxicidade sobre o sistema gastrointestinal, corroborando com o verificado nas maiores doses no ensaio de toxicidade aguda.

Como dito anteriormente, esses efeitos sobre o trato gastrointestinal podem ser observados no tratamento com a maioria dos antineoplásicos atualmente utilizados na clínica médica, inclusive o mesmo resultado de diminuição significativa no consumo de água e ração pode ser visto nos animais tratados com o 5-FU, logo, não se trata de uma característica negativa específica desse produto natural, e assim não representa um fator limitante para sua aplicação terapêutica.

Os diferentes efeitos observados sobre o ganho de massa corpórea dos animais tratados com menores doses do O.E.X. a saber: perda de massa sem alteração nos parâmetros de consumo de água e ração no ensaio agudo, e ganho de massa sem alteração de consumo no ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, permitem inferir um efeito de alteração no metabolismo nesses animais tratados com o produto natural. Tal hipótese é reforçada pela esteatose hepática verificada em ambas as doses nos animais tratados no experimento no ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*.

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o órgão excretor mais importante, e ambos são susceptíveis a drogas quimioterápicas. Como exemplos, pode-se citar disfunções hepáticas induzidas por mitramicina e toxicidade renal causada por docetaxel (KATZUNG, 2003; BEZERRA, et al., 2008).

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.

Os principais marcadores de lesão celular hepática são as enzimas citoplasmáticas e mitocondriais, que não são específicas dos hepatócitos, e podem estar aumentadas com lesão em outros órgãos; todavia, as hepatopatias são a causa mais comum de elevação. As enzimas citoplasmáticas incluem a lactato desidrogenase (LDH), a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As enzimas mitocondriais, como a isoenzima mitocondrial da AST, são liberadas mediante o dano mitocondrial. As enzimas são liberadas pelos hepatócitos por meio de uma variedade de mecanismos, os quais determinam o padrão de elevação enzimática. O padrão mais comum de elevação na lesão é o dano irreversível à membrana celular seguido de morte da célula, levando ao extravasamento das enzimas citoplasmáticas (HENRY, 2008).

A enzima AST é encontrada em ordem decrescente no fígado, músculos do coração e esqueléticos, rim, cérebro, pâncreas, pulmão, células brancas (leucócitos) e vermelhas (eritrócitos). Torna-se patente que a AST não é uma enzima específica do fígado. Quando órgãos são lesados (necrose do tecido), há liberação da AST para o soro, sendo ela quantificada através de exames bioquímicos. Por sua vez, a enzima ALT apresenta maior concentração no fígado, sendo a sua avaliação a mais útil na investigação das doenças do órgão. A enzima é liberada pelo fígado após a destruição do tecido hepático e encontrada rapidamente no sangue (FONSECA, 2009). Como os resultados obtidos não mostraram alteração significativa nos níveis de AST e ALT, não há indício de comprometimento das enzimas hepáticas.

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de uréia e creatinina. A uréia é um produto de degradação do metabolismo dos aminoácidos, constitui a forma como o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, e sua eliminação se dá principalmente através dos rins. Já a creatinina, por sua vez, é um produto da degradação da

creatina muscular. Essa substância não é utilizada pelo organismo, é totalmente inativa, sendo também excretada pelos rins (PEREIRA, 1998).

Quando ocorre falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, particularmente substâncias nitrogenadas como a uréia e a creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos (HENRY, 2008). Como os resultados obtidos não mostraram nenhuma alteração significativa nos níveis de uréia e creatinina entre os grupos experimentais, podemos sugerir que não houve alteração significativa nos parâmetros renais avaliados, inferindo ausência de toxicidade renal.

E ainda, uma vez que a uréia é sintetizada no fígado, e a hepatopatia avançada frequentemente está associada com uréia plasmática reduzida (LUM e LEAL-KHOURI, 1989), então sugere-se que os danos hepáticos encontrados no exame histopatológico, não caracterizam hepatopatia avançada, podendo ser considerados reversíveis (BEZERRA et al., 2008).

De forma diferente da maioria dos agentes antineoplásicos, o O.E.X. provocou alterações apenas sutis nos parâmetros hematológicos dos animais tratados. Observou-se um aumento significativo na contagem de hemácias dos animais tratados com 100 mg/kg do O.E.X. e em relação ao controle transplantado e diminuição significativa no hemoglobina do O.E.X. 100 mg/kg em relação ao 5-FU, porém sem diferença em relação ao transplantado.

Em complemento, houve uma diminuição do Volume Corpuscular Médio (VCM) e na Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), em comparação com o controle transplantado, para o grupo O.E.X. 100 mg/kg. Esses dados permitem inferir que ocorreu um efeito tóxico sobre a medula óssea com subsequente rápida resposta eritropoiética, porém ineficiente (PROGRAM, 2008), no sentido de que a medula promoveu a produção de um maior número de eritrócitos seguida a exposição aos tratamentos com o O.E.X. na maior dose, de forma que ocorreu uma microcitose (diminuição VCM e HCM) normocrômica (Hemoglobina normal e Hematócrito sem alteração). É possível inferir, neste ponto, que houve uma adaptação dos animais, com o tempo, à exposição da droga/ produto natural, fato também observado, por exemplo, na exposição a diidrato dicrômico de sódio, em água potável (PROGRAM, 2008).

A inoculação do tumor, por si só, causa uma reação leucemóide nos animais transplantados, caracterizada por granulocitose e esplenomegalia, sendo o fato da última, verificada em alguns animais com a doença maligna, sido interpretado como ativação das defesas do hospedeiro (KODAMA et al., 1974; OKAWA et al., 1992; SATO et al., 2005; LINS et al., 2009). Além disso, o fator estimulante de colônia (CSF) produzido por células tumorais no sarcoma 180, aumenta o número de células polimorfonucleares (PMN) periféricas circulantes (OKAWA et al., 1992). Esses resultados demonstraram que o tumor sarcoma 180 modifica significativamente o parâmetro leucocitário.

O aumento da porcentagem de neutrófilos, alteração característica de casos de necrose tecidual e presença de tumores (LOPES et al., 2007) foi observado em todos os grupos transplantados independente do tratamento, menos o 5-FU, quando comparados ao grupo controle sadio. Foi possível evidenciar uma leucopenia acentuada (diminuição do número de leucócitos) com porcentagem de linfócitos aumentada e redução da porcentagem de neutrófilos, além de redução na quantidade de monócitos, no tratamento com 5-FU, efeito colateral já conhecido deste antineoplásico (LINS et al., 2009; PITA, 2010).

Na contagem diferencial de leucócitos, nenhum dos grupos tratados com o O.E.X., em nenhum dos tipos leucocitários, apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle transplantado, sugerindo que, diferentemente de muitos quimioterápicos, este óleo essencial não altera o número células hematopoiéticas. Isso é positivo, no sentido de que um dos riscos da quimioterapia e radioterapia no tratamento de pacientes com câncer é o desenvolvimento de leucopenia, a qual substancialmente aumenta o risco de infecções (TAKIGUCHI et al., 2001; BEZERRA et al., 2008).

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.

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). Agentes antitumorais, como o 5-FU, causam significativa involução do baço e timo (BEZERRA et al., 2008). Esse efeito é observado imediatamente após a administração, sugerindo alterações tissulares devido à inibição da síntese de RNA e DNA (OGISO et al., 1976).

Neste experimento, os animais tratados com 5-FU apresentaram reduções significativas nos índices do timo, baço e fígado (Tabela 12), de acordo com o relatado por (EICHHORST et al., 2001), que mostraram que 5-FU causa apoptose em diferentes tipos celulares como hepatócitos e células do sistema imune. 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).

Geralmente, de acordo com a literatura, os animais inoculados com sarcoma 180 no experimento antitumoral *in vivo*, mostram um aumento no índice de baço e timo, acompanhado por supra regulação de granulócitos (LINS et al., 2009).

O índice do timo nos animais tratados com O.E.X. 50 e 100 mg/kg foi significativamente maior em relação ao grupo experimental 5-FU. Este efeito de aumento, porém, não foi observado em comparação como o controle transplantado e sadio, permitindo uma conclusão parcial de ausência de uma possível imunomodulação pelo produto natural estudado.

Foi observado um aumento do índice de baço em relação ao controle transplantado e sadio nos grupos tratados com O.E.X. 50 e 100 mg/kg, respectivamente, para tal, são apresentadas duas interpretações possíveis. A hipertrofia do baço e aumento de linfonodos em alguns animais com doença maligna tem sido interpretado como ativação de defesas do hospedeiro (JONES, 1949). Em colaboração a isso, no estudo de Lins e colaboradores (2009), foi demonstrado que o produto natural de seu estudo, o Cf-PLS (um polissacarídeo de *C. feldmannii*) aumentou o peso do baço relativamente em relação ao controle transplantado e reverteu a leucopenia induzida por 5-FU nos animais tratados, corroborando a hipótese de que ele atua com a estimulação imunológica, fato que poderia ter ocorrido na utilização do O.E.X. Entretanto, não houve aumento dos leucócitos totais nos grupos tratados em relação ao grupo transplantado, nem alteração do perfil

neutrofílico, típico do crescimento tumoral, para um perfil linfocítico, que uma vez ocorrendo traduzir-se-ia numa imunomodulação positiva no sentido de ajudar o organismo no combate ao tumor, sendo descartada portanto a hipótese de imunomodulação pelo O.E.X.

Resta, portanto, a hipótese de uma consequência de um efeito tóxico, não sobre o baço, mas sobre os eritrócitos: a literatura correlaciona o alargamento do baço, com a possibilidade de estar associada a expansão da polpa vermelha, sendo produto de uma sequência de dano eritrocitário, seguida por hemólise e posterior esplenomegalia (PATHAK e KHANDELWAL, 2007). Esta possível toxicidade, entretanto, apresenta-se reduzida quando do aumento da dose, no experimento avaliado. Pondera-se sobre uma adaptação à toxicidade do O.E.X., com reversibilidade dos possíveis efeitos tóxicos, por parte dos indivíduos estudados.

Este dano eritrocitário, ainda segundo Pathak e Khandelwal (2007), teria correlação com uma possível ação de espécies reativas de oxigênio, que tiriam sua produção induzida pelo produto natural. Sendo assim, maiores estudos no sentido da investigação da participação do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade do O.E.X. são necessários para a conclusão sobre o seu real efeito sobre o baço.

Quanto à análise histopatológica dos órgãos estudados, não foi evidenciada alterações nos rins dos animais tratados com O.E.X. (Figura 8) nem no 5-FU, demonstrando uma baixa toxicidade do óleo sobre esse órgão e corroborando com os resultados dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, nos quais não houve alteração nos parâmetros avaliados, quando comparados ao controle transplantado.

O ácino hepático é a unidade funcional do fígado. Ele compreende massa de parênquima dependente do suprimento sanguíneo a partir do trato portal. Circundando o espaço porta, os hepatócitos estão dispostos em traves, constituindo zonas concêntricas, que cercam os vasos aferentes terminais. Zona 1 (periportal) – mais próxima ao espaço porta, é a primeira a receber sangue com alto conteúdo de oxigênio, insulina, glucagon e outros nutrientes. Esta zona tem alta taxa metabólica e é a última a sofrer necrose e a primeira a mostrar sinais de regeneração. A Zona 3 (centrilobular) – mais próxima às veias hepáticas terminais, recebe sangue por último. Aqui estão muitas das enzimas que participam do processo de biotransformação, como o NADPH citocromo P450- redutase. Já a Zona 2

(mediolobular) – recebe sangue com conteúdo intermediário de oxigênio (JORGE, 2011).

Por ser o órgão central de metabolização de drogas o fígado é, portanto, um alvo privilegiado de enfermidades relacionadas com as mesmas. Xenobióticos são compostos biotransformados no fígado predominantemente pela ação das enzimas metabolizadoras de fármacos e enzimas do citocromo P450 microsomais, incluindo, de função mista mono-oxigenases, glutathione-S-transferases, sulfotransferases e UDP-glucuronosiltransferases. Algumas delas podem ser induzidas através de variáveis mecanismos que podem levar a grande variabilidade interindividual na susceptibilidade para danos ao fígado causados por drogas (CHITTURI e FARREL, 2000).

Danos hepáticos de drogas convencionais são largamente conhecidos e a maioria dos médicos estão bem esclarecidos acerca desses danos. Porém, medicamentos fitoterápicos tem sido reconhecidos como também causadores desses efeitos ao passo que o seu uso tem sido mais generalizado (STICKELA et al., 2005).

Alguns padrões incomuns de lesões observadas em biópsias hepáticas devem despertar suspeita imediata. Estes incluem necrose zonal, lesões necróticas com esteatose ou lesão da via biliar e lesão vascular, especialmente a doença veno-oclusiva, que é comumente causada por alcalóides pirrolizidínicos. Infelizmente, as aparências histológicas usuais na maioria dos casos são indistinguíveis de outras formas de doença hepática (CHITTURI e FARREL, 2000).

Devido aos estudos histológicos em casos de hepatotoxicidade com fitoterápicos serem relativamente poucos, a natureza da lesão hepática nem sempre é conhecida. Dos casos relatados, um amplo espectro de patologias hepáticas tem sido notado. Isto inclui a hepatite aguda com ou sem esteatose, e crônica com fibrose, colestase e autoimunidade induzida, lesões vasculares, cirrose e insuficiência hepática aguda com necessidade de transplante de fígado (FARREL, 1994; DE SMET, 1996). Existe também uma relação clara entre a ingestão prolongada e / ou a exposição repetida no confrei, óleo de cravo, Germander® Jin Bu Huan® e o desenvolvimento de formas crônicas de doença do fígado. Isto implica que a toxicidade de ervas/ fitoterápicos não deve ser excluída, na maioria dos padrões de doença do fígado, em humanos.

Uma das características da hepatite aguda causada por medicamentos, incluindo lesões hepáticas causadas por fitoterápicos, é a presença de infiltrado inflamatório portal, hiperplasia das células de Kupffer, corpos apoptóticos dispersos, e necrose periportal, onde, nesta última, geralmente se observa nas áreas de desaparecimento de células hepáticas, desorganização da trama de reticulina, causando desorganização dos ácinos (CHITTURI e FARREL, 2000). Fenômenos similares foram observados no anatomopatológico do fígado nas duas doses do O.E.X. porém em focos pontuais e discretos.

A esteatose, outro possível efeito deletério hepático, em si não é uma doença, mas reflete uma doença metabólica, caracterizada, pelo excesso de depósito de triglicerídeos. Ela pode aparecer junto com uma infecção no fígado (a hepatite), gerando a esteato-hepatite. Infelizmente, por motivos ainda em investigação, o organismo desencadeia uma inflamação contra os hepatócitos com acúmulo de gordura, que são gradualmente destruídos. Em alguns casos, pode ocorrer o contrário, uma agressão à mitocôndria ou ao hepatócito levando ao acúmulo de gordura por interromper o metabolismo da mesma. Dependendo da intensidade desta destruição, isso pode levar à formação de fibrose (cicatrizes) que vão se acumulando e progredindo até a formação de nódulos, o que caracteriza a cirrose (CHITTURI e FARREL, 2000).

Um dos modelos fisiopatológicos para explicar a esteato hepatite não alcoólica (EHNA) seria a produção de fatores metabólicos que ocasionassem um aumento na entrada de ácidos graxos livres (AGLs) no fígado, causando um desequilíbrio entre a oxidação e exportação dos AGLs e sua captação e síntese, resultando em acúmulo hepático de gordura. Isto resultaria em produção de EROS pela metabolização pelas vias do citocromo microssomal P450, lipo-oxigenases, peroxisomais e de beta-oxidação mitocondrial. Estas EROs causam apoptose e necrose dos hepatócitos, desencadeiam lesão inflamatória e imunomediada (JORGE, 2011). A esteatose é nesse caso tanto causa quanto resultado da formação de EROS, peroxidação lipídica e stress oxidativo, redução na função da cadeia respiratória mitocondrial, depleção de ATPs e produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (CHITTURI e FARREL, 2000).

Foi observada, em pequena magnitude, nos fígados dos animais tratados com O.E.X. 50 e 100 mg/kg alterações hepáticas características de hepatite aguda como as descritas, associadas a focos de esteatose azonal, esta última com maior intensidade na dose de 100 mg/kg, sugerindo, portanto, uma esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), sendo, entretanto, necessário uma investigação mais acurada destes efeitos para chegarmos a uma conclusão definitiva.

É sabido que efeitos hepatotóxicos podem ser reversíveis como no caso do tratamento com outros produtos naturais com ação semelhante, como por exemplo a reversão da esteato-hepatite aguda na utilização do fitoterápico Venencapsan® onde interrupção do tratamento após 3 meses promove esta reversão (DE SMET, 1996). Esta hipótese é reforçada, no presente estudo como O.E.X., pela ausência de alterações significativas nos níveis de AST e ALT.

A neoplasia de região axilar desenvolvida nos animais revelou suas características malignas, enquadrando-a no contexto de um sarcoma pleomórfico, com intensa celularidade caracterizada por intensa anaplasia, anisocitose, anisonucleose, gigantismo, nucléolos proeminentes e cromatina grosseira (Figuras 10). O seu comportamento local agressivo foi demonstrado por invasão de tecido esquelético, adiposo e perineuro, não havendo, no contexto, infiltração de feixes neurais (Figura 11). Proliferação de células imaturas, pequenas ou de tamanhos medianos, de formatos irregulares, sendo algumas bizarras, multinucleadas e gigantes e ainda presença de células neoplásicas, isoladas, com formatos em girino, exibindo citoplasmas eosinofílicos, de limites nítidos. Esses achados corroboram com a ideia de que a neoplasia em foco tem agressividade local, com não existência de metástase à distância (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982).

Em relação às distintas particularidades do tumor nos grupos experimentais, foi verificada mitoses assimétricas em ambas doses do O.E.X. (50 e 100 mg/kg). Outra vantagem apresentada pelo tratamento com o O.E.X. traduziu-se na diminuída infiltração de tecido adiposo, em comparação com o controle transplantado e 5-FU, que reflete um crescimento tumoral menor e autolimitado, diminuindo a agressividade deste tumor maligno com redução de áreas de necrose tumoral coagulativa do tecido tumoral (cerca de 40 %).

As plantas produzem uma grande diversidade de substâncias que podem ter importância terapêutica, no entanto muitas delas podem apresentar efeitos

mutagênicos. Vários estudos demonstram a correlação entre compostos mutagênicos e efeitos carcinogênicos. Adicionalmente, a terapia anticâncer pode causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais (VIEIRA et al., 2010). Tendo em vista esse fato, no presente trabalho foi investigado o potencial mutagênico *in vivo* do O.E.X. por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico. Este ensaio é útil para a investigação de compostos com atividade clastogênica (indução de quebra cromossômica) ou aneugênica (indução de perda de cromossomos inteiros). O tratamento com o O.E.X. não provocou um aumento significativo na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico dos animais tratados, sugerindo que o mesmo não possui efeito genotóxico (clastogênico e/ou aneugênico) *in vivo*, característica importante para sua aplicabilidade na terapêutica.

Trata-se, portanto, de um dado bastante relevante na análise das propriedades desta substância, servindo de estímulo para a realização de testes mais detalhados que avaliam outras propriedades genotóxicas e também preconizados pelas agências regulatórias nacionais e internacionais, a exemplo do teste de Ames (RIBEIRO et al., 2003).

CONCLUSÕES



7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, é possível concluir que o óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana*:

- Mostrou ser bioativo frente *Artemia salina*;
- Apresentou moderada toxicidade frente eritrócitos de camundongos *Swiss*;
- Apresentou baixa toxicidade aguda quando administrado a camundongos *Swiss*;
- Apresentou alta atividade antiproliferativa *in vitro* frente células tumorais humanas K-562 (leucemia) e moderada frente NCI/ADR-RES (ovário resistente a múltiplos fármacos);
- Apresentou atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais murinas da linhagem sarcoma 180;
- Apresentou moderada toxicidade no antitumoral *in vivo*, nas doses utilizadas, no entanto com sugestão de possível reversibilidades dos efeitos após suspensão da terapia.
- 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;
- Não apresentou potencial genotóxico no modelo experimental avaliado;
- Portanto, é possível inferir que o O.E.X. possui significativa atividade antitumoral nos parâmetros avaliados e moderada toxicidade, o que credencia a continuidade do estudo para aplicabilidade deste óleo como alternativa terapêutica para o câncer.

REFERÊNCIAS



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**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.
- 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.
- 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, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1566-70, 2009.
- 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.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos: Ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. 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.
- 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.
- BAILLY, C. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 1447, 2009.

BARROSO, G. M. Sistemática das angiospermas do Brasil. **LTC – Livros Técnicos e Científicos**. São Paulo: Ed. S. A./ Ed. Da Universidade de São Paulo, v. 1, p. 28-33, 1978.

BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 29, p. 3106-19, 2008.

BENEDITO, R. B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (S)-(-)-álcool perílico em camundongos**. (Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 156-163, 2008.

BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224-31, 2009

BICAS, J. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610–1615, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 maio 2006.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “**Guia para a realização de estudos de toxicidade**”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

_____. Ministério da Saúde. DAF/SCTIE/MS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS – **RENISUS**, Brasília, DF, fevereiro. 2009.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.

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

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRUMMITT, R. K. Vascular Plant - Families and Genera. Royal Botanic Gardens: Kew, 1992.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, 2003. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252003000300022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 Maio 2011.

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

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.; 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.

CERVI, A. *et al.* Tendência da mortalidade por doenças neoplásicas em 10 capitais brasileiras, de 1980 a 2000. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 8, n. 4, p. 407-418, 2005.

CHACON, D. R.; CINTRA, D. E. C.; CARVALHO, J. C. T.; OLIVEIRA, G. A.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic and anti-genotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of Wister rats. **Cytologia**, v. 67, p. 417-422, 2002.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, p. 1009-1022, 1995.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, p. 315, 1984.

CHITTURI, S.; FARRELL, G.C. Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined problem. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 15, n. 10, p. 1093-1099, 2000.

COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 1, p. 167-179, 2010.

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., 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.; 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 Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

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

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 165-70, 2007.

DE SMET P. A. G. M. ,VAN DEN EERTWEGH A. J. M., Hepatotoxicity associated with herbal tablets. **BMJ: British Medical Journal**; v. **313**, n.7049,p. 92. 1996

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DÍAZ, C.; QUESADA, S.; BRENES, O.; AGUILAR, G.; CICCÍO, J. F. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumor cell lines. **Natural Product Research**, v. 22, n. 17, p. 1521-34, 2008.

DOBBIN, J. A.; GADELHA, M. I. P. Mesilato de imatinibe para tratamento da leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 429-38, 2002.

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. 2009.

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.

EFFENBERGER, K.; BREYER, S.; SCHOBERT, R. Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 129-39, 2010.

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.

ELEGBEDE, J. et al. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 5, p. 661, 1984.

EXPLORENZ. EXPLORENZ - The Enzyme Database. Disponível em: <<http://www.enzyme-database.org/reaction/terp/perillyl.html>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2012.

FARRELL, G. C. *Drug-Induced Liver Disease*. Edinburgh:Churchill **Livingstone**,513–18. 1994

FERRAZ, A.; FARIA, D. H.; BENNETI, M. N.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.; VON POSER, G. L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*.*Phytomedicine*. v. 12, p. 112-115, 2005.

FERREIRA, V. F. A Fitoterapia no Mundo Atual. **Química Nova**, Vol. 33, No. 9, 1829, 2010.

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

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência (UNICAMP)**, v. 7, 2006.

FONSECA, J. C. F. D. O fígado e suas doenças: o que você precisa saber. Manaus, BR, 2009. Disponível em: < <http://drjcfonsecaeofigado.blogspot.com/2009/03/o-figado-e-as-transaminases.html> >. Acesso em: 31 de janeiro de 2012.

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

GHOBRAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **CA Cancer Journal of Clinicians**, v. 55, p. 178-194, 2005.

GUARRERA, M. P. Traditional phytotherapy in central Italia. **Fitoterapia**, v. 76, p. 1-25, 2005.

GUEMBAROVSKI R. L.; CÓLUS I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Genética na Escola**, v. 03, n. 1, p. 4-7, 2008.

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.

HALDAR, K.; GAITSKELL, K.; BRYANT, A.; NICUM, S.; KEHOE, S.; MORRISON, J. Epidermal growth factor receptor blockers for the treatment of ovarian cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2011.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-100, 2000.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMAI, W.; GIBSON, D. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**, v. 627, p. 10-30, 2007.

HEDDLE, J. A. A.; HUTE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronucleus as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 124, p. 61-118, 1983.

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

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Oxford University Press: Oxford, 1985.

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.

HIRASAWA, Y.; MIYAMA, S.; HOSOYA, T. Alasmontamine A, A first tetrakis monoterpene indole alkaloid from *Tabernaemontana elegans*. **Organic letters**, v. 11, n. 24, p. 5718-21, 2009.

HOEIJMAKERS, H. J. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366-374, 2001.

HOFMANN, J. Resistance to chemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 8, p. 1368, 2008.

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. 1954-7, 2010.

HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1147–1154, 2009.

HUTCHINSON, J. The families of flowering plants. **Clarendon Press: Oxford**, p. 22-168, 1973.

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

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.

JONES, L. O. In vitro Studies on the Effect of Spleen, Striated Muscle, and Kidney upon the Growth of Sarcoma 180 and Mammary Carcinoma of Mice. **Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 27, 1949.

JORGE, S. G. Histopatologia Médica. 2011. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/cirroze.htm>>. Acesso em 18 de Fevereiro de 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAJI, I. et al. Inhibition by D-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21ras plasma membrane association. **International journal of cancer**, v. 93, n. 3, p. 441-444, 2001.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T.; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Citotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (scyphozoan: rhizostomeae) venom. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopia aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8094-8, 2004.

KATHIRVEL, P.; RAVI, S. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa and HEp-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. **Natural Product Research**, 2011.

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.

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.

KODAMA, T.; SENDO, F.; KOBAYASHI, H. Leukemoid reaction in BALB/c mice bearing transplanted tumors. **Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 176, 1974.

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

- LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p. 31, 1999.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982.
- 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.
- LEVERRIER, A.; MARTIN, M. T.; SERVY, C.; OUAZZANI, J.; RETAILLEAU, P.; AWANG, K.; MUKHTAR, M. R.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Rearranged diterpenoids from the biotransformation of ent-trachyloban-18-oic acid by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1121-1125, 2010.
- 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.
- LI, A. P. A comprehensive approach for drug assessment. **Chemico-Biological Interactinos**, v. 150, p. 27-33, 2004.
- LINS, K. O. A. L. et al. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2009.
- LISCOVITCH, M.; RAVID D. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 245, p. 350–352, 2007.
- 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.
- LOPES, S.; BIONDO, A.; SANTOS, A. **Manual de patologia clínica veterinária**. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- LU, B.; FINN, O. T-cell death and cancer immune tolerance. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 70-79, 2008.
- LUM, G.; LEAL-KHOURI, S. Significance of low serum urea nitrogen concentrations. **Clinical Chemistry**, v. 35, p. 639-40, 1989.

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.

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

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. D.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 65-98, 2001.

MACÊDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso - Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 45-47, 2004.

MACHADO, M. C. F. P.; MELO-JUNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2009.

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.

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.

MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 235-241, 2006.

MAGALHÃES, H. I.; FERREIRA, P. M.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

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.

MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

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.

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.

MELO, P. S. et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology letters**, v. 142, n. 1-2, p. 143-151, 2003.

MENDONÇA, G. A. S. Câncer na população feminina brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 1, 1993. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101993000100011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 Julho 2011.

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.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUNOZ-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.

NAKAIZUMI, A. et al. d-Limonene inhibits N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine induced hamster pancreatic carcinogenesis. **Cancer letters**, v. 117, n. 1, p. 99-103, 1997.

NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, E. A. N.; OLIVEIRA, J. M.; MEDEIROS, F. A.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopia cayennensis* in rats. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 17-21, 2006.

NASCIMENTO, I. A.; ARAÚJO, M. M. S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental**, 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.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

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.

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.

OGISO, T. et al. Antitumor agents. I. Effect of 5-fluorouracil and cyclophosphamide on liver microsomes and thymus of rat. **Japanese journal of pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 445, 1976.

OKAWA, Y. et al. Augmentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascites tumor-bearing mice. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 5, p. 517, 1992.

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: 31 de Janeiro de 2012.

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.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. **Toxicology letters**, v. 169, n. 2, p. 95-108, 2007.

PEGAS HEENRIQUES, H. J. A.; ERDTMANN, B.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Porto Alegre: Alcance, 2003.

PEGGS, K.; MACKINNON, S. Imatinib Mesylate: the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 348, n. 11, p. 1048-50, 2003.

PEREIRA, J. V. **Bioquímica clínica**. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 1998.

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

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

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

PLAS, D. R.; THOMPSON, C. B. Cell Metabolism in the Regulation of Programmed Cell Death. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 74 –78, 2002.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.

PROGRAM, N. T. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dihydrate (Cas No. 7789-12-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). **National Toxicology Program**, v. 546, p. 1-192, 2008.

QI, L.; XU, Z. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p. 4243-4245, 2006.

RABELLO-GAY, M. N. Teste do micronúcleo em medula óssea. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: método e critérios de avaliação**. São Paulo: FCA, 1991.

RABI, T.; BISHAYEE, A. d-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. **Journal of carcinogenesis**, v. 8, n. 1, p. 9, 2009.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning'sweet'on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 338-352, 2009.

RAVIZZA, R.; GARIBOLDI, M. B.; MOLTENI, R.; MONTI, E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncology reports**, v. 20, n. 3, p. 625-30, 2008.

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

RIBEIRO, L. A.; TAVARES, F. A.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S. SILVA, B. A. The (8)17, 12E, 14- labdatrien-18-oic (labdane 302), a labdane-type diterpene isolated from *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae), relaxes the guinea pig trachea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(2), p. 197-203, 2007.

RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.; SALVADORI, D., *et al* (ed.): **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Canoas: Ulbra, p. 173-176, 2003.

RODRIGUES, A. M.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314-7, 2006.

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.

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

SACOMAN, J. et al. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 5, p. 411-415, 2008.

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.

SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

SATO, D. et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p. 26-32, 2005.

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLAENDER, A. **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum, v. 4, p. 31-43, 1976.

SHARMA, P. R.; MONDHE, D. M.; MUTHIAH, S.; PAL, H. C.; SHAHI, A. K.; SAXENA, A. K.; Qazi, G. N. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 160-168, 2009.

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. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. Um panorama atual da química, da farmacologia e de naftoquinonas, com ênfase no d,β-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

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.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening, **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1118, 1990.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four tetrazolium salts. **Biochimica et Biophysica 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.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 175-184, 2003.

STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Annonaceae (Soursop Family)**. New Jersey: Princeton University Press, p. 18, 2004.

STICKELA, F., ELEONORA P., DETLEF S. Hepatotoxicidade Herbal. Journal of Hepatology Harvard Medical School, USA. Disponível em <http://www.natap.org/2005/HCV/101105_01.htm> Acessado em 18 de Fevereiro de 2012.

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.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 223-6, 2007.

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.

TAKARASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. E. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, p. 21-26, 2006.

TAKIGUCHI, N. et al. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 11-14, 2001.

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.

TATSADJIEU, L. N.; ESSIA NGANG, J. J.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 469-72, 2003.

TAVARES, J. F. QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F.F.M.; BARBOSA FILHO, J. M. DA-CUNHA, E. V.L.; ALBERTO, S. C.; DE JUNIOR, J. X.; MELO, P. S.;

HAUN, M.; SOBRAL, S. M. ent Trachylobane diterpenoids from *Xylopia lagsdorffiana*. **Journal of Natural Products**. v.69(6), p. 960-962. 2006.

TAVARES, J. F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; HAUN, M.; MELO, P. S.; SILVA, M. S. Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Z Naturforsch**, v. 62b, p. 742-744, 2007.

TAVARES, J.F. Estudo fitoquímico de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul e *Fusea longifolia* (Aubl.) Saff.: Isolamento, Caracterização Estrutural e Atividade Biológica. Tese de doutorado, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), UFPB, João Pessoa, 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.

VALE, D. B. A. P.; MORAIS, S. S.; PIMENTA, A. L.; ZEFERINO, L. C. Avaliação do rastreamento do câncer do colo do útero na Estratégia Saúde da Família no Município de Amparo, São Paulo, Brasil. ISSN 0102-311X. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 2, p. 383-390, 2010.

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

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.; 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.; SANTOS, S.; CHEN-CHEN, L. Assessment of mutagenicity and cytotoxicity of *Solanum paniculatum* L. extracts using in vivo micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 601-606, 2010.

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

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

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v. 33, p. 2278-2282, 1973.