

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

DAIENE MARTINS LUNGUINHO

ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS E TOXICOLÓGICOS
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Xylopia frutescens* Aubl.
(ANNONACEAE)

JOÃO PESSOA - PB

2012

DAIENE MARTINS LUNGUINHO

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS E TOXICOLÓGICOS
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Xylopia frutescens* Aubl.
(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 título de MESTRE EM
PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOLOGIA.**

ORIENTADORA 1:

PROFa. DRa. MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

ORIENTADORA 2:

PROFa. DRa. MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ

JOÃO PESSOA - PB

2012

DAIENE MARTINS LUNGUINHO

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS E TOXICOLÓGICOS
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Xylopia frutescens* Aubl.
(ANNONACEAE)**

APROVADA EM ____/____/2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco

Orientadora 1 – UFPB

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Orientadora 2 – UFPB

Prof. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Examinador Interno – UFPB

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Examinador Externo – UFPE

*“Ter a consciência de que tudo que fizemos nunca ficou aquém de nossa capacidade e ter a certeza de que tudo que foi feito ainda pode ser melhorado, talvez seja uma das maneiras de dizer:
Obrigada Senhor, pelo dom da vida”.*

Sérgio Rosseto

Aos meus pais, Agamenon Martins de Sousa (in memoriam) e Geralda Martins Lunguinho pelo amor e desprendimento, bem como pela sabedoria com que sempre me aconselharam e acima de tudo pelos exemplos de família, otimismo e testemunho de vida cristã. Aqui deixo meu respeito, amor e eterna admiração. Vocês são meu tesouro mais precioso!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, a quem nunca terei palavras para agradecer, pois não existe expressão maior que possa ser usada para exprimir o que sente o coração e o espírito quando estes se enchem de alegria.

À minhas irmãs **Kargian, Karlane, Ana e Adaíles Martins** pelo carinho, compreensão, apoio e torcida sempre. **Amo incondicionalmente.**

Aos meus sobrinhos, **Thaylles Yara, Thávio Yansen, Karinielly Queiroga, Rayanne Martins** (em especial, por todos os estresses compartilhados), **Trícia Hanna, Paulo Víctor** pela amizade sincera, ajuda e companheirismo constantes.

À minha querida avó **Maria Hermínia Martins**, pelo exemplo de vida, perseverança e incentivo.

Ao meu melhor amigo e amado noivo **Fernando Beltrão de Miranda Júnior**, pela presença constante, incentivo, amor, companheirismo e paciência em todos os momentos, sempre de prontidão para me ajudar. És meu grande incentivador. **Admiro e Amo muito!**

À minha família de Coração: **Maria da Conceição de Farias, Fernando Antônio, Alice Miranda, Livia Miranda, Anna Karla de Farias, Diomar Neto, Armênia Nery, Gabryel Aires, Elaine Rodrigues** por terem me adotado, acreditado em mim e sempre me incentivado. São exemplos de otimismo e perseverança. **Obrigada por tudo!**

A Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral Castello Branco** pela orientação e principalmente pela inteira dedicação e ensinamentos transmitidos. Agradeço pela amizade, apoio e pelos momentos de aprendizado mútuo. Sua prestatividade, inteligência e constante alegria servirão de referência para minha vida pessoal e profissional. Agradeço pelo grande exemplo de vida, competência, profissionalismo, perseverança e amor. **Admiro muito!**

A Profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz** admirável pela pessoa que é e pelo conhecimento que detém. És um exemplo de coragem, determinação, amor ao próximo e inteligência que levarei sempre comigo.

A Profa. Dra. **Teresinha Gonçalves da Silva** por toda atenção e receptividade, bem como, pela valiosa colaboração na realização de todo esse trabalho.

Aos Professores Dr. **Marcelo Sobral da Silva** e Dr. **Josean Fechine**, pela colaboração no fornecimento do material vegetal.

A Profa. Dra. **Hilzeth de Luna Freire Pessoa** pelos ensinamentos e pela gentileza de participar na avaliação desse trabalho.

A Profa. Dra. **Liana Clébia Lima de Moraes** pelos ensinamentos, incentivo, alegria contagiante e pela gentileza de participar na avaliação desse trabalho.

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

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao LIKA, nas pessoas de **Maria Helena e Felipe** pelo auxílio na realização de parte desse trabalho.

A todos que fazem a **família Facene**, pelo apoio, compreensão e torcida.

Aos amigos e alunos de pós-graduação do Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), **Déborah Pessoa, Igara Lima, Thaísa Rolim, Carolina Uchôa** pela ajuda, incentivo e torcida durante toda essa caminhada.

Em especial aos alunos **João Carlos Pita e Aline Lira Xavier**, pela imensurável ajuda em todos os momentos e principalmente pela paciência que sempre foi demonstrado, os quais foram de grande importância para enfrentar todas as dificuldades, bem como pela estimada amizade, com a qual fico feliz em contar sempre. Vocês representam um exemplo vivo de dedicação e altruísmo que sempre procurarei seguir.

Às super amigas, **Raline dos Anjos, Ana Paula Moura, Monalisa Brito** agradeço todos os dias pela amizade duradoura, pelo ombro a ombro de todas as horas, força, palavras de conforto, orações, incentivo e torcida durante essa caminhada. Vocês sempre deixavam as dificuldades inerentes ao desenvolvimento deste trabalho, mais fáceis de superar.

Aos alunos de iniciação científica do LABETOX, **Waleska Viana, Tatyanna Kelvia, Tatianne Mota, Viviane Medeiros, Madson Moreira** assim como **Beatriz Macêdo** pela ajuda, incentivo e torcida.

A todos os **amigos do mestrado** pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

A Profa. Dra. **Maria Salete Trigueiro de Araújo** pela disposição, paciência e boa vontade para sempre nos atender e tirar nossas dúvidas. Agradeço em especial pelo exemplo e testemunho de vida emocionante.

A coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Profa. Dra. **Maria de Fátima Agra**, pela atenção concedida sempre que necessário.

A todos os professores ministrantes das disciplinas do mestrado, pelos ensinamentos científicos e exemplos de profissionalismo.

As secretárias da pós-graduação, **Tânia Maria Araújo**, **Caroline Medeiros Manguiera** e **Francis-Mary Nogueira** por toda atenção e prestatividade.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia - CBiotec, em especial a **Crispim Duarte** e **Sócrates Golzio**, pelo apoio, prestatividade, exemplo de competência e imensurável ajuda.

Ao técnico do Laboratório de Patologia Experimental **Eugenio Pacelli Sitonio Trigueiro** pela prestatividade e colaboração para realização desse trabalho.

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

Muito obrigada!

Daiene Martins Lunguinho

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa que a prata e rende mais que o ouro. É mais preciosa que rubis; nada que você possa desejar se compara com ela.”

Provérbios 3.13-15

*Tem calma contigo mesmo e olha aonde vais
Espera um minuto, pensa no que farás
No meio da tormenta é duro navegar
E uma escolha incerta pode caro custar*

*Nem todo mau momento te faz fracassar
E em caminhos de pedras haverás de passar
Pois nem tudo na vida é como a gente quer
Mesmo em sombras na terra o sol brilha no céu*

*Segue adiante, sem olhar atrás
Vive cada dia e nada mais
E o que vier tu vencerás
Só tu tens a chave: abres ou fecharás*

*Tem calma na vida o jogo é de verdade
Pra ganhar a partida vai com força e coragem
São as regras do jogo é bom sempre lembrar
Diante dos desafios é preciso tentar*

...

*E assim como o ouro pelo fogo vais passar
E o que tens de melhor o fogo vai revelar*

*Ainda que chores, tu vencerás
Só aquele que perde sabe também ganhar
Segue adiante, sem olhar atrás
Vive cada dia e nada mais
E o que vier tu vencerás
Só tu tens a chave: abres ou fecharás*

Tem calma... tem calma... tem calma...

Pe Fábio de Melo - Tem Calma

LUNGUINHO, D. M. ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS E TOXICOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Xylopia frutescens* AUBL. (ANNONACEAE). 2012. 136f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é uma doença do material genético de nossas células, cuja iniciação e progressão envolvem passos nos quais o DNA acumula uma série de mutações. Esta enfermidade é responsável por mais de 7,6 milhões de óbitos por ano, o que representa 13 % de todas as causas de morte do mundo. Muitas drogas usadas atualmente na quimioterapia foram isoladas de espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural. Todavia, agentes antineoplásicos, naturais ou sintéticos, podem ocasionar sérios danos ao organismo, justificando a necessidade de avaliação de sua toxicidade. O gênero *Xylopia* é considerado um dos maiores entre as Annonaceae, com cerca de 160 espécies, com distribuição pantropical. As espécies desse gênero são conhecidas por seus usos etnomedicinais e atividades farmacológicas. *Xylopia frutescens* Aubl., conhecida popularmente por “embira”, “semente-de-embira” e “embira-vermelha”, é pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico. Estudos relatam que espécies de *Xylopia* e diferentes constituintes delas isolados apresentam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* por diferentes mecanismos de ação, fato que despertou interesse para a investigação de uma possível atividade antitumoral de *Xylopia frutescens*. Adicionalmente, óleos essenciais isolados de diferentes espécies, são conhecidos por apresentarem diferentes atividades biológicas, dentre elas atividade antitumoral. Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *X. frutescens* (O.E.X.), por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente foi avaliada a bioatividade do óleo frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. O valor de CL₅₀ obtido foi de 180,7 µg/mL, demonstrando ser este óleo bioativo. Foi realizada avaliação da atividade antitumoral *in vitro* frente células da linhagem sarcoma 180, cujo valor de CI₅₀ obtido por meio do ensaio de redução do MTT foi de 216,6 µg/mL. O valor de CH₅₀ obtido no experimento de citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos foi 63,87 µg/mL, demonstrando a toxicidade do produto frente eritrócitos. Durante o ensaio de toxicidade aguda não houve registro de alterações comportamentais e morte dos animais tratados com a dose de 250 mg/kg, entretanto, com as doses de 375 e 500 mg/kg tais efeitos foram observados. Com base nesses resultados, NOAEL (nível de efeito adverso não observado) do O.E.X. foi de 250 mg/kg e LOAEL (nível de menor efeito adverso observado) foi de 375 mg/kg. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* as taxas de inibição do crescimento tumoral (Sarcoma 180) foram de 45,1 % e 65,9 % para a dose de 100 e 150 mg/kg do O.E.X, respectivamente. As análises toxicológicas demonstraram toxicidade hematológica, gastrointestinal (evidenciada pelo efeito anoréxico) e bioquímica, esta última, demonstrada por alteração significativa na função hepática (aumento de AST), e corroborada com a análise histopatológica, para ambos os grupos tratados com o O.E.X. No entanto, as alterações são consideradas reversíveis e não substanciais quando comparados àquelas produzidas por diversos antineoplásicos largamente utilizados na clínica médica, dentre eles o 5-FU, usado com droga padrão. O óleo em estudo não apresentou potencial genotóxico. Portanto, é possível inferir que o O.E.X. possui significativa atividade antitumoral e toxicidade moderada nos modelos experimentais avaliados, o que não representa um fator limitante para sua possível aplicabilidade terapêutica. Entretanto, são necessários estudos controlados, que possam contribuir para elucidar mais precisamente possíveis riscos do seu uso, pela população, com fins terapêuticos.

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

LUNGUINHO, D. M. ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS E TOXICOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Xylopia frutescens* AUBL. (ANNONACEAE). 2012. 136f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is a disease of genetic material of our cells, whose initiation and progression involve steps in which the DNA accumulates a series of mutations. This disease is responsible for over 7.6 million deaths per year, representing 13% of all causes of death in the world. Many drugs currently used in chemotherapy have been isolated from plant species or derived from a natural prototype. However, antineoplastic agents, natural or synthetic, can cause serious damage to the organism, justifying the need for its toxicity. The genus *Xylopia* is considered one of the largest among the Annonaceae, with about 160 species, pantropical distribution. The species of this genus are known for their pharmacological activities and uses ethnomedicine. *Xylopia frutescens* Aubl., popularly known as "twine", "seed-to-twine" and "red-twine" is seldom reported in the literature both in aspects of phytochemical and pharmacological. Studies report that species of *Xylopia* and different constituents of these isolates have antitumor activity *in vitro* and *in vivo* by different mechanisms of action, a fact that arouses interest for the investigation of a possible antitumor activity of *Xylopia frutescens*. Additionally, essential oils isolated from different species are known to have different biological activities, among them anti-tumor activity. Given the above, this study aimed to evaluate the antitumor activity and toxicity of essential oil from leaves of *X. frutescens* (O.E.X.p) by means of *in vitro* and *in vivo*. Initially we evaluated the bioactivity of the oil against the brine shrimp *Artemia salina*. The LC₅₀ value obtained was 180.7 mg / mL, demonstrating that this bioactive oil. The assessment of *in vitro* antitumor activity against sarcoma 180 cell line, the value of IC₅₀ obtained by reduction of the MTT assay was 216.6 mg / mL. The CH₅₀ value obtained in the experiment of cytotoxicity against erythrocytes of mice was 63.87 mg / mL, demonstrating the toxicity of the product front erythrocytes. During the acute toxicity test was no record of changes in behavior and death of the animals treated with 250 mg / kg, however at doses of 375 and 500 mg / kg these effects were observed. Based on these results, the no observed effect adverse level - NOAEL of O.E.X. was 250 mg/ kg and lowest observed effect adverse level - LOAEL was 375 mg / kg. In the evaluation of antitumor activity *in vivo* inhibition rates of tumor growth (sarcoma 180) was 45.1% and 65.9% for the 100 mg / kg and 150 mg / kg O.E.X. respectively. The toxicological analyzes showed hematologic, gastrointestinal (evidenced by the anorexic effect) and biochemistry toxicity, the latter demonstrated by significant changes in liver function (increased AST), and corroborated with histopathological tests, for both treated groups O.E.X. However, the changes are considered reversible and not substantial when compared to those produced by several widely used anticancer drugs in clinical medicine, including 5-FU, used with standard drug. The oil under study has not genotoxic. Therefore, it is possible to infer that O.E.X. has significant antitumor activity and moderate toxicity in experimental models evaluated, which is not a limiting factor for its possible therapeutic applicability. However, controlled studies are needed, which may help to elucidate more precisely the possible risks of their use by the population for therapeutic purposes.

Keywords: *Xylopia frutescens*. Essential oil. Antitumor activity. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Xylopia frutescens</i> Aubl.	48
Figura 2.	Camundongos Swiss provenientes do biotério da UFPE.....	53
Figura 3.	Células tumorais da linhagem sarcoma 180. (A) Tumor ascítico; (B) Aumento de 400x.....	53
Figura 4.	Aparelho de Clevenger.....	54
Figura 5.	Aspecto geral do experimento com <i>Artemia salina</i> . (A) Recipiente retangular com divisória contendo furos; (B) Parte coberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz.....	56
Figura 6.	Camundongos com tumor na região subaxilar.....	60
Figura 7.	(A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus®; (B) Analisador hematológico automático <i>Animal Blood Counter Vet</i> ®	61
Figura 8.	Fotomicrografia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) e (H) Controle transplantado; (I) e (J) O.E.X. (100 mg/kg); (K) e (L) O.E.X. (150 mg/kg); (M) e (N) 5-FU (25 mg/kg). Hematoxilina-eosina (100 e 400 x); Tricrômico de Masson (100 e 400 x) e método de Gordon e Sweet para reticulina (D) (400 x).....	76
Figura 9.	Fotomicrografia dos rins dos diferentes grupos experimentais: (A) e (B) Controle transplantado; (C) e (D) O.E.X. (100 mg/kg); (E) O.E.X. (150 mg/kg); (F) 5-FU (25 mg/kg). Hematoxilina-eosina (100 x e 400 x).....	79
Figura 10.	Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais: (A), (B), (C), (D), (E) Controle transplantado; (F), (G) e (H) O.E.X. (100 mg/kg); (I), (J) e (K) O.E.X. (150 mg/kg); (L) 5-FU (25 mg/kg). Hematoxilina-eosina (25 x, 100x e 400x).....	81

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Viabilidade dos náuplios do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com O.E.X. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em três replicatas, com intervalo de confiança de 95 %..... 66
- Gráfico 2.** Viabilidade de células Sarcoma 180 após tratamento com o O.E.X. ($\mu\text{g/mL}$). Concentração-resposta através do ensaio de redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %..... 67
- Gráfico 3.** Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.X. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em triplicata, com intervalo de confiança de 95 %..... 67
- Gráfico 4.** 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 após os diferentes tratamentos. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais. * 0,05 comparado com grupo controle transplantado (5 % Tween-80) por ANOVA seguido por Tukey..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>X. frutescens</i> Aubl.....	65
Tabela 2.	Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas do óleo essencial das folhas de <i>X. frutescens</i> em camundongos (n = 6).....	68
Tabela 3.	Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) dos diferentes grupos experimentais.....	70
Tabela 4.	Avaliação do índice e percentual de variação ponderal dos animais (n = 6) dos diferentes grupos experimentais.....	71
Tabela 5.	Efeitos do O.E.X. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais.....	72
Tabela 6.	Efeitos do O.E.X. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais.....	72
Tabela 7.	Efeitos do O.E.X. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos dos diferentes grupos experimentais.....	75
Tabela 8.	Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.X. e ciclofosfamida.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
AIF	Fator Indutor de Apoptose
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF-1	Fator de Ativação de Protease Associada à Apoptose 1
AST	Aspartato aminotransferase
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
CDK	Quinase dependente de ciclina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
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
COX	Ciclooxigenase
CPQBA	Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas
CSF	Fator estimulante de colônia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO₂	Oferta de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECGC	Epigallocatequina galato
EPO	Eritropoetina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
FuRD	5-fluorouridina
FNkB	Fator nuclear kB
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina-eosina

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INBio	Instituto Nacional de Biodiversidade
LABETOX	Laboratório de Ensaaios Toxicológicos
LDH	Lactato desidrogenase
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MethHba	Metemoglobinemia
MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NPN	Nitrogenado não protéico
NUCAL	Núcleo de Caracterização e Análise-Central Analítica
O.E.X.	Óleo essencial de <i>Xylopia frutescens</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
O₂	Oxigênio
PBS	Solução Tampão Fosfato
PMN	Polimorfonucleares
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RE	Resolução específica
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro bovino fetal
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VCM	Volume Corpuscular Médio
VHT	Veia hepática terminal
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VP	Veia porta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1	Câncer.....	24
2.1.1	Modelos experimentais no estudo do câncer.....	26
2.2	Produtos naturais e o câncer.....	33
2.3	Óleos essenciais biologicamente ativos.....	35
2.4	Toxicologia de produtos naturais.....	38
2.5	<i>Xylopia frutescens</i> Aubl: família, gênero e espécie.....	44
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	Objetivo geral.....	50
3.2	Objetivos específicos.....	50
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1	Local da pesquisa.....	52
4.2	Material.....	52
4.2.1	Animais.....	52
4.2.2	Linhagens de células tumorais.....	53
4.2.3	Cistos de <i>Artemia salina</i> Leach.....	53
4.3	Métodos.....	54
4.3.1	Caracterização do óleo essencial de <i>Xylopia frutescens</i>	54
4.3.2	Ensaio <i>In vitro</i>	55
4.3.2.1	Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	55
4.3.2.2	Citotoxicidade frente células tumorais.....	56
4.3.2.3	Citotoxicidade frente eritrócitos.....	57
4.3.3	Ensaio <i>In vivo</i>	58
4.3.3.1	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	58
4.3.3.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células da linhagem sarcoma 180.....	59
4.3.3.3	Avaliação da toxicidade sistêmica.....	60
4.3.3.3.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e ração.....	60
4.3.3.3.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	60
4.3.3.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos.....	61

4.3.3.3.4	Análises anatomopatológicas.....	61
4.3.3.4	Genotoxicidade.....	62
4.4	Análise estatística.....	62
5	RESULTADOS.....	65
5.1	Caracterização do óleo essencial de <i>Xylopia frutescens</i> Aubl.....	65
5.2	Ensaio <i>In vitro</i>	66
5.2.1	Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	66
5.2.2	Citotoxicidade frente células tumorais.....	66
5.2.3	Citotoxicidade frente eritrócitos.....	67
5.3	Ensaio <i>In vivo</i>	68
5.3.1	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	68
5.3.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células da linhagem sarcoma 180.....	69
5.3.3	Avaliação da toxicidade sistêmica.....	70
5.3.3.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e ração.....	70
5.3.3.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	71
5.3.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos.....	74
5.3.3.4	Análises anatomopatológicas.....	75
5.3.3.4.1	Análise macroscópica.....	75
5.3.3.4.2	Análise microscópica.....	75
5.3.4	Genotoxicidade.....	82
6	DISCUSSÃO.....	85
7	CONCLUSÕES.....	112
	REFERÊNCIAS.....	114

Introdução

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

Nesse contexto, as plantas superiores aparecem como uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Além disso, elas fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (BRAZ FILHO, 2010).

Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma das alternativas de sucesso, historicamente privilegiada. Muitos metabólitos secundários se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, comprovando que a parceria entre químicos medicinais e químicos de produtos naturais é estratégica para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (BOLZANI et al., 2002). Segundo estimativas da Convenção da

Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20 % de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (BARREIRO e BOLZANI, 2009). A biodiversidade do Brasil é, portanto, considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (GALEMBECK et al., 2007).

No Brasil, as pesquisas de descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitofármacos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta que a diversidade micromolecular dos inúmeros biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada como uma fonte de substâncias de interesse farmacológico (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos. Do analgésico morfina (obtido de *Papaver somniferum*), ao antibiótico penicilina (obtido de *Penicillium chrysogenum*), passando pelo anticâncer paclitaxel (Taxol®), estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

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

O uso da Fitoterapia na prática médica vem demonstrando crescimento visível ao longo dos anos na tentativa de encontro de novas alternativas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças de grande impacto, tal qual o câncer, tendo em vista que a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo (BRANDÃO et al., 2010). Frente a este crescimento, é perceptível em nosso país que não somente a população, mas também profissionais de saúde carecem de informações seguras sobre os recursos fitoterápicos. Baseadas apenas na chamada sabedoria popular, inúmeras pessoas utilizam as plantas para o tratamento de doenças desconhecendo seus riscos e benefícios, o que torna os estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos indispensáveis para a proteção

à saúde da população, bem como para comprovar cientificamente a eficácia terapêutica desses produtos (VEIGA-JUNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

Considerando-se a alta incidência e mortalidade associados ao câncer, 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).

Diante do exposto, é evidente a importância do estudo de plantas medicinais para a obtenção de novas moléculas bioativas, que servem como protótipos para a síntese de novas moléculas ou para adaptar as moléculas já existentes, tornando-as mais potentes e ativas e menos tóxicas.

Desse modo, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação fitoquímica e farmacológica do óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens* Aubl., na perspectiva de encontrar um produto natural com possível atividade antitumoral.

*Fundamentação
teórica*

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

O câncer tem sido tradicionalmente considerado uma doença de defeitos genéticos, tais como mutações e deleções do gene, bem como anormalidades cromossômicas, que resultam na perda da função dos genes supressores de tumores e/ou ganho de função ou hiperativação de oncogenes. No entanto, há evidências crescentes de que a expressão do gene regulado por alterações epigenéticas também é crucial para o aparecimento e progressão da doença (BOLDEN, 2006). As evidências do envolvimento de mutações em casos de câncer surgiram inicialmente da observação de alterações genéticas recorrentes e específicas em determinados tipos tumorais. Hoje, se sabe que estas alterações afetam diferentes passos nas vias que regulam os processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares (CAVENEY e WHITE, 1995; FERREIRA e ROCHA, 2004).

Devido à complexidade e à existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação de um tumor. No processo de progressão tumoral, algumas células tumorais perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos, são as denominadas metástases (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010). A capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de formar as metástases é responsável, em última análise, pela morte de dois a cada três pacientes com o diagnóstico de câncer (OTAKE; CHAMMAS e ZATZ, 2006).

O processo de transformação de uma célula normal em célula tumoral geralmente é resultado de um processo multifatorial, que inclui a interação de fatores genéticos e três categorias de agentes externos: carcinógenos físicos (como ultravioleta e radiação ionizante), carcinógenos químicos (como vários constituintes da fumaça do cigarro ou contaminantes de água e alimentos) e carcinógenos biológicos (como infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas) (WHO, 2011). Desse modo, define-se câncer como uma enfermidade caracterizada pelo crescimento celular descontrolado capaz de ignorar os limites normais (FERREIRA e ROCHA, 2004), apresentando como causa principal a alta mudança genética, ou seja, a alta taxa de mutações no DNA (ácido desoxirribonucleico) celular ou também chamada de instabilidade genética, a qual é um estado transitório ou persistente que leva a uma série de eventos mutacionais (LOU et al., 2007). Distúrbios na mitose e mudanças

quantitativas dos cromossomos são os aspectos típicos das neoplasias malignas e são consideradas as principais forças que dirigem os múltiplos passos da carcinogênese (KLEIN et al., 2006). As mudanças citogenéticas são marcos do câncer, particularmente nos estágios mais avançados do desenvolvimento do tumor. Uma vasta gama de anomalias citogenéticas é vista em todos os tipos de cânceres (NUSSBAUM; MCINNES e WILLARD, 2002). Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas estão frequentemente correlacionadas ao desenvolvimento progressivo do tumor, à agressividade tumoral e ao prognóstico ruim da doença (BOREL et al., 2002).

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

O câncer é um importante problema de saúde pública para países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que nestes últimos são diagnosticados 55 % dos 10 milhões de novos casos por ano. Desde 1930, a análise de dados relativos ao índice de mortalidade no Brasil mostra que, os tumores malignos e as doenças do aparelho circulatório, são responsáveis por um número cada vez maior de óbitos (PISANI et al., 2002; GUEMBAROVSKI e CÓLUS, 2008; BRANDÃO et al., 2010).

Esta enfermidade é responsável por mais de 7,6 milhões de óbitos por ano, o que representa 13 % de todas as causas de morte do mundo. Os principais tipos de câncer relacionados com mortalidade são de pulmão (1,3 milhões mortes/ano), estômago (aproximadamente 1,0 milhão mortes/ano), fígado (662 mil mortes/ano), cólon (655 mil mortes/ano) e mama (502 mortes/ano). Estimativas sugerem que a mortalidade por câncer continua aumentando, chegando a 9,0 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030 (BRANDÃO, 2010).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são esperados para 2012 um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (BRASIL, 2011).

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, possibilitando um conhecimento maior da etiologia da doença e o desenho de novas e eficazes estratégias terapêuticas, menos tóxicas e mais específicas para cada paciente e para cada tipo específico de tumor (FERREIRA e ROCHA, 2004). Nesse ínterim, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar drogas com interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de fármacos encontra-se em fase de testes clínicos, principalmente para o tratamento do câncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Porém a preocupação com a toxicidade deve ser uma premissa, uma vez que distinguirá o real custo benefício da potencial droga.

2.1.1 Modelos experimentais no estudo do câncer

Modelos experimentais em pesquisa podem ser definidos como a materialização de uma parte da realidade, por meio da representação simples de uma ocorrência recente ou antiga. Para tanto, deve apresentar uma precisão adequada, por meio de comprovação prévia e também pela demonstração das limitações em relação à realidade que irá representar. O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. Na ciência médica permitem o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas (FERREIRA; HOCHMAN e BARBOSA, 2005).

A cancerologia experimental, por sua vez, é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos (QI e XU, 2006).

Existem diversos modelos experimentais descritos. Os mais utilizados são as culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), os animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) e os estudos anatômicos, geralmente em cadáveres de seres humanos (FERREIRA e FERREIRA, 2003).

Os modelos *in vitro*, são modelos experimentais utilizados nos casos em que se deseja avaliar o comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico de tecidos normais ou patológicos (FERREIRA; HOCHMAN e BARBOSA, 2005).

Nesse contexto, a cultura de células surge como uma ferramenta importante no estudo de um fenômeno biológico, pois consiste em um sistema que permite a experimentação de uma única condição, tendo em vista que, uma das principais preocupações numa abordagem experimental é encontrar um sistema limpo e livre de outras variáveis que não àquela a qual

se está investigando (PERES e CURI, 2005). A capacidade de estudar as células em nível molecular relaciona-se, portanto, com a forma como as células podem crescer e ser manipuladas em laboratório. Desse modo, a cultura de células *in vitro* permite estudar crescimento, diferenciação e morte celular e efetuar manipulações genéticas necessárias ao perfeito conhecimento da estrutura e funções dos genes (FERREIRA; HOCHMAN e BARBOSA, 2005).

A contribuição de vários estudos utilizando a cultura de células tem sido uma ferramenta importante, ou pelo menos complementar, na clínica oncológica. De fato, este modelo experimental tem permitido o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e a identificação de marcadores de diagnóstico e prognóstico, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos, dirigidos especificamente às vias de transdução de sinal intracelular, relacionadas com a proliferação, a diferenciação e a morte celular das células cancerosas (CRUZ et al., 2009).

Linhagens de células tumorais podem ser utilizadas em estudos *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade/atividade antitumoral de diferentes drogas. Geralmente são realizados antes dos estudos *in vivo*, e consistem em um meio de predizer uma atividade citotóxica/antitumoral significativa.

A quimioterapia antineoplásica é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento do câncer, e é o método mais comumente empregado para combater a progressão desta doença. A maioria dos agentes antineoplásicos tem sido identificada em virtude de sua citotoxicidade contra células tumorais. Para usá-los de modo efetivo e seguro, um conhecimento aprofundado de seu mecanismo de ação, particularmente em níveis celular e molecular é de grande importância (MESHKINI e YAZDANPARAST, 2010).

Vários tumores humanos compartilham uma série de alterações fisiológicas relacionadas ao crescimento maligno como auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, resistência a apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese auto-sustentada, invasão tissular e metástase (BROWN e ATTARDI, 2005; FADEEL e ORRENIUS, 2005).

Os agentes terapêuticos hoje conhecidos são de dois tipos: os agentes bloqueadores (quimiopreventivos), que inibem a iniciação do processo carcinogênico e os agentes supressores, que inibem a proliferação de células malignas durante as fases de promoção e progressão tumoral. O mecanismo anticâncer mais procurado atualmente é o de indução seletiva à apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI et al., 2005).

Grande parte dos fármacos antineoplásicos exerce seus efeitos citotóxicos por meio da indução desse processo. Desse modo, ao considerar que a resistência à apoptose é uma marca registrada de células cancerígenas, a abordagem fundamental para a descoberta de drogas anticâncer é a ativação da cascata de sinalização que culmine na apoptose (KONDOH et al., 2004).

Por definição, apoptose é um processo de morte celular programada 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) (ARAVINDARAM et al., 2010). Caracteriza-se por um conjunto de mudanças morfológicas e bioquímicas que inclui a formação de protusões na membrana plasmática, diminuição do volume da célula, condensação cromatínica, fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, múltiplos de 200 pares de base (LY; GRUBB e LAWEN, 2003), bem como, formação de corpos apoptóticos, que por sua vez, impedem o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular, não ocorrendo, portanto, resposta inflamatória, fato importante na reciclagem dos tecidos adultos e na embriogênese (FADEEL e ORRENIUS, 2005) e um dos aspectos que a distingue da necrose (GRIVICICH; REGNER e ROCHA, 2007). Em nível bioquímico, as alterações celulares incluem ativação de caspases, acompanhada por subsequente proteólise de seus substratos, externalização de fosfatidilserina 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 (ARAVINDARAM et al., 2010).

O estudo dos mecanismos de morte programada ganhou importância em muitos aspectos da biologia, incluindo estudos do desenvolvimento embrionário, patogênese e a resposta à terapias celulares. A detecção da apoptose, conseqüentemente, tornou-se crucial para esses estudos, variando desde observações de alterações morfológicas que diferenciam as células apoptóticas de necróticas até conhecimento dos fatores bioquímicos e genéticos que levam a este processo (SILVA, 2007).

O mecanismo de apoptose ao levar à célula a morte, impede que danos permanentes ao DNA sejam transmitidos às células descendentes. Durante o processo de carcinogênese, mutações ou deleções podem afetar genes que regulam a apoptose, impedindo que este mecanismo atue na proteção celular (PIERCE, 2004). Defeitos nesse processo, por sua vez, contribuem para a progressão tumoral e expressão do fenótipo de malignidade por permitir a

sobrevivência das células mutadas, levando ao acúmulo de mutações e à instabilidade genética (IBUKI e GOTO, 2004). A ação de um conjunto de proteínas com função anti-apoptótica selecionam as células malignas por conferir-lhes sobrevida, favorecendo sua exposição a agentes genotóxicos e a incorporação de alterações genéticas com reflexos no fenótipo tumoral de crescimento e agressividade (La THANGUE, 2005). Muitos mecanismos celulares que monitoram os danos genéticos têm sido identificados, direcionando as células para uma morte celular programada quando esses danos tornam-se demasiadamente grandes. Superexpressão de proteínas antiapoptóticas, como a bcl-2 e bcl-x, foram encontradas em linhagens celulares de leucemia e aumentaram a instabilidade genética em células de câncer de mama, enquanto que a expressão de proteínas apoptóticas como Bax, Bak e Apaf-1 se encontrava diminuída no câncer de colo e melanoma (RAMPINO et al., 1997; SOENGAS et al., 2001; CORY e ADAMS, 2002).

Portanto, 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 espécies reativas de oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (ou de receptores de morte) e via intrínseca (ou mitocondrial) (DASH, 2011).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana chamados receptores de morte. Esta ligação é capaz de ativar uma cascata de enzimas denominadas caspases (GRIVICICH; REGNER e ROCHA, 2007).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem a família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. São sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios e uma vez ativadas (por clivagem proteolítica), essas moléculas clivam componentes celulares chaves, que são indispensáveis para o funcionamento celular normal, incluindo proteínas estruturais do citoesqueleto e proteínas nucleares, como enzimas de reparo do DNA, levando à fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana (que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos) e condensação celular (MALAGUARNERA, 2004).

A outra maneira pela qual a apoptose pode ocorrer é por meio da via intrínseca ou mitocondrial. Esta via é ativada por estresse intra ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, estresse oxidativo, hipóxia ou ativação de oncogenes (DASH, 2011).

A via intrínseca é iniciada por um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial interna a solutos com massa molecular menor que 1500 Da, por meio da formação de megaporos, os chamados Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP), resultando em perda do potencial de membrana, *swelling* (inchaço) mitocondrial e ruptura da membrana mitocondrial externa, com liberação de várias proteínas do espaço intermembrana para o citoplasma da célula, dentre elas várias moléculas pró-apoptóticas tais como o citocromo c, SMAC/Diablo e o Fator Indutor de Apoptose (AIF), dentre outras. No citossol o citocromo C forma um complexo com a APAF-1 (Fator de Ativação de Protease Associada à Apoptose 1) e a pró-caspase-9, complexo este denominado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 e outras caspases efetoras, que por sua vez dará início a apoptose (TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2007).

Além da apoptose via caspases, no câncer diversas vias de transdução de sinais são bloqueadas por fármacos, resultando no seu controle e combate (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

O estresse oxidativo é aceito como um mecanismo patofisiológico crítico (VALKO et al., 2007), em diferentes doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, artrite reumatóide ou alterações neurológicas tais como doença de Alzheimer ou Parkinson (DALLE-DONNE et al., 2006).

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente produzidos por células como parte de seu metabolismo, todavia, o aumento nos níveis de EROs por sua vez levam à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso celular. Sendo assim, a superprodução de EROs resulta no estresse oxidativo, uma combinação do aumento na formação de radicais derivados de oxigênio e nitrogênio e redução da capacidade antioxidante, causando um desequilíbrio que culmina com o ataque de componentes celulares. Além disso, é sabido que as EROs induzem a ativação das caspases -9 e -3 (GRIVICICH; REGNER e ROCHA, 2007). Estudos relatam a geração de EROs após o tratamento das células com vários tipos de agentes, incluindo quimioterápicos (KANNAN e JAIN, 2000; SILVA, 2007).

Fatores de crescimento e seus receptores também estão envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além disso, são super-expressos em células tumorais humanas. A família dos receptores de fatores de crescimento endotelial é a mais estudada por serem encontrados em estágios avançados de câncer com baixo prognóstico. Por esse motivo,

o bloqueio desses receptores com anticorpos monoclonais, por exemplo, aparece como adjuvante no tratamento tumoral (SALOMON et al, 1995; BIANCO et al, 2006).

A cascata de transdução de sinais ativada por fatores de crescimento, citocinas e hormônios é mediada através de uma proteína codificada pelo oncogene Ras, cuja ativação media a proliferação celular e a supressão da apoptose. Diversos antagonistas às proteínas Ras são usados no tratamento de câncer e o mais comum deles é o Sorafenib, ativo principalmente em estágios avançados de câncer renal (BIANCO et al, 2006).

O bloqueio da ciclooxygenase (COX) e da cascata de prostaglandinas pode ter importante impacto no crescimento e no desenvolvimento neoplásico através da inibição da proliferação, angiogênese e metástase (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006). A degradação seletiva de proteínas também é fundamental para regulação dos processos celulares vitais e a via ubiquitina-proteossomo é o principal regulador desse processo. A inibição proteossômica é uma das características das células tumorais que estimulam a liberação de fatores anti-apoptóticos, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) (ADAMS, 2004; BIANCO et al., 2006). A via de ativação do NF- κ B apresenta importante função na patogênese de diversas doenças inflamatórias como o câncer, diabetes, artrite reumatóide e aterosclerose (BALDWIN, 2001). O NF- κ B se liga a sítios específicos κ B na região promotora de diversos genes, como ciclina D1, proteínas supressoras de apoptose como a Bcl-2 e Bcl-X e aquelas requeridas na metástase e na angiogênese, tornando-se um alvo ideal no desenvolvimento de fármacos anticâncer (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

O ciclo celular é completamente regulado para encadear o processo normal de divisão celular. Os pontos de verificação nas fases G1 e G2 são responsáveis pelo prosseguimento do ciclo celular e são regulados por uma série de proteínas quinases como as CDK (quinases dependentes de ciclina) (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006). Quando algum tipo de anormalidade é reconhecida, o ciclo celular pára até a completa reparação celular. Caso essa reparação não seja eficiente, a célula é encaminhada para a morte celular programada (ALBERTS et al, 2002). No câncer, as células são incapazes de pausar em ambos os pontos de verificação, resultando em desregulação do ciclo celular (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

Inúmeros esforços foram empregados nas últimas décadas para a compreensão do processo de tumorigênese. A maior parte do conhecimento a respeito de carcinogênese provém da análise *in vitro* de tecidos tumorais em estágios avançados de desenvolvimento, removidos a partir de pacientes. Os testes de citotoxicidade *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células neoplásicas em cultura são os mais

amplamente utilizados (SKEHAN et al., 1990; HOLBECK, 2004). Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, aumenta a possibilidade para descoberta de novas drogas anticâncer. Além disso, é uma técnica relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, providencia um provável mecanismo de ação da droga (SUGGITT et al, 2005). Essa prática elucidou muitas questões referentes a mudanças genômicas apresentadas pelas células tumorais, mas pouco contribuiu na obtenção de informações sobre os fatores que influenciam os estágios iniciais do seu desenvolvimento *in vivo* (PANTALEÃO e LUCHS, 2010).

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 anticâncer (SMITH et al, 2005).

Sendo assim, vários modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando elucidar diversas questões referentes ao câncer *in vivo*. A utilização de camundongos como instrumentos de estudos biológicos ocorrem de modo intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. Essa prática ocorre por diversas razões, dentre elas, o fato das linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, além do fato de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos (HANN e BALMAIN, 2001).

Existem critérios fundamentais para que um modelo tumoral murino possa ser utilizado no esclarecimento da tumorigênese: origem e progressão clonal do tumor; evidências da progressão tumoral; patologia e histologia tumoral semelhantes à doença em humanos; possibilidade de estudar aspectos de invasão tecidual e o papel da resposta imune contra tumores; padrões de expressão gênica e a possibilidade de estudo de terapias antitumorais (HANN e BALMAIN, 2001).

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

Sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, foi originado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo. 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 (ZUCKERBERG, 1973). Essa linhagem celular é amplamente utilizada em todo mundo, tanto para estudos de atividade antitumoral *in vitro*, como para estudos de atividade antitumoral *in vivo*. 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: por meio da inoculação na cavidade intraperitoneal, onde elas se desenvolvem formando um tumor ascítico (“líquido”) ou por meio de inoculação subcutânea promovendo a formação de tumores sólidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982). A forma sólida é pouco hemorrágica e se caracteriza pelo rápido crescimento, atingindo aproximadamente 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias após o transplante (Ó PESSOA, 1992).

2.2 Produtos naturais e o câncer

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de fontes naturais, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente e que desempenham um importante papel no tratamento de várias doenças. Especificamente na terapia de enfermidades infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60 %, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados são derivados de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG e SNADER, 2003; CRAGG; KINGSTON e NEWMAN, 2005).

Atualmente, a biologia do câncer tem sido muito estudada e uma das principais linhas de pesquisas nesta área é o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Partindo do princípio que plantas e drogas derivadas de plantas têm uma impressionante variedade de estruturas e funções, está claro que podem ser a fonte de novas drogas para a quimioterapia do câncer (CRAGG e NEWMAN, 2005).

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

Grande número de fitofármacos tem demonstrado ação anticâncer em diversos modelos experimentais através de alterações na via de transdução de sinais que modula a

expressão gênica, a progressão do ciclo celular, a proliferação, a morte celular, o metabolismo e a apoptose (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

Entre os medicamentos antitumorais de origem vegetal, destacam-se os produtos naturais produzidos pelas espécies *Catharanthus roseus* ou *Vinca rosea* (Apocynaceae) - os alcaloides binsidólicos vimblastina e vincristina, *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) - o alcaloide camptotecina que deu origem ao irinotecano e topotecano, e *Podophyllum peltatum* e *P. emodi* (Berberidaceae). A partir da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica, foram obtidos o etoposídeo e o teniposídeo. Outra substância obtida de plantas que se mostrou ativa contra vários tipos de leucemia é a homoarringtonina, isolada de *Cephalotaxus harringtonia* Var. Nana (Cephalotaxaceae) (ITOKAWA, WANG e LEE, 2005; EFFERTH, 2010). Todas estas substâncias naturais e seus derivados atuam em diferentes tipos de câncer, revelando espectro de atividade e toxicidade diferentes, ampliando a utilidade medicinal em benefício da saúde (BRAZ FILHO, 2010).

Entre 1960 e 1982 foram avaliadas 35.000 amostras vegetais e o resultado mais importante foi a descoberta do taxol (paclitaxel), isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt.) em 1971. Durante os primeiros estudos sobre sua potencialidade como um novo agente antineoplásico, foi questionada a viabilidade de seu futuro emprego face à complexidade de sua estrutura e à relativa escassez da fonte natural. A semi-síntese do taxol já foi otimizada e representa eficiente método de sua obtenção em escala industrial, sendo a rota de acesso do taxol disponível no mercado (WALL et al., 1966; BRAZ FILHO, 2010).

Extratos brutos de plantas nativas testadas, *in vitro* e *in vivo*, têm, portanto, contribuído favoravelmente no processo antineoplásico podendo ser utilizado como biomateriais de ação farmacológica eficiente ou servindo de base para triagem de importantes precursores de drogas anticâncer (SENEL e MCCLURE, 2004).

Acredita-se que os efeitos benéficos de drogas brutas sejam atribuídos à fitoquímicos da planta como os carotenóides, vitaminas, antioxidantes, compostos fenólicos, terpenóides, esteróides, indóis, e fibras. Portanto, em virtude da ampla gama de efeitos sobre oncogenes, sinalização celular e apoptose, paclitaxel, curcumina, β -caroteno, astaxantina, pectina cítrica, cogumelo, epigallocatequina galato (EGCG), resveratrol, *Scutellaria baicalensis*, *Artemisia asiatica*, extratos de ginseng, isoliquiritigenina e capsaicina, representam elementos naturais promissores para tratamento do câncer (MOU et al., 2011).

Todavia, devido ao complexo sistema de inter-relação e cruzamento de sinais e vias na célula, há dificuldades em estabelecer fármacos que ajam em um único alvo celular

promovendo seu efeito terapêutico (SEBOLT-LEOPOLD e ENGLISH, 2006). Muitas vezes o desenvolvimento de mecanismos de resistência a fármacos (ou *multidrug resistance* – MDR) é o principal obstáculo para o tratamento. Para tentar driblar esse problema, a quimioterapia combinada é usada tanto para matar células resistentes quanto para retardar o desenvolvimento de células resistente a fármacos. O sucesso atribuído a esse tipo de tratamento ocorre por diferentes fármacos apresentarem diferentes mecanismos de ação, diferentes níveis de toxicidade e por serem capazes de bloquear dois ou mais pontos da via bioquímica (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

Considerando esses aspectos, é óbvio o espaço e a importância que os produtos naturais ocupam na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos para o tratamento do câncer. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade (VIEIRA et al., 2010).

Diante do exposto, evidenciamos a importância e a necessidade do estudo das plantas medicinais para a obtenção de novas moléculas bioativas, produzindo-se, portanto, protótipos para a síntese de novas moléculas ou para adaptar as moléculas já existentes, tornando-as mais potentes ou ativas.

2.3 Óleos essenciais biologicamente ativos

Sabendo-se que há um esforço contínuo para a descoberta de novos tratamentos para o câncer, e que o conhecimento sobre o assunto tem aumentado dramaticamente ao longo das últimas três décadas, o estudo de produtos naturais e terapias à base de plantas torna-se um próspero campo de pesquisa, particularmente em países como Brasil, que possuem uma rica biodiversidade de fontes naturais associado a uma alta prevalência e variedade da doença (VIEIRA et al., 2010).

No entanto, o ressurgimento do interesse nas terapias naturais e o crescimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem mais dados científicos relacionados aos óleos essenciais e extratos de plantas (DE-SOUZA et al., 2006).

Por definição, óleos essenciais são produtos originados do metabolismo secundário das plantas e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas geralmente odoríferas e

líquidas, destacando-se a presença de terpenos (mono e sesquiterpenos), benzoides e fenilpropanóides, que exercem diferentes ações biológicas em humanos (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003; SANTURIO, 2007; BAKKALI et al., 2008).

Eles são muito úteis no tratamento de diferentes doenças, com aplicação medicinal se tornando popular ao longo dos tempos (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

A principal característica dos óleos essenciais é a volatilidade, porém outros aspectos também os caracterizam, como por exemplo: apresentam aparência oleosa à temperatura ambiente; aroma agradável e intenso, na maioria dos casos; solubilidade em solventes orgânicos apolares; sabor geralmente ácido e picante; incolores (na maioria dos casos) ou ligeiramente amarelados; em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais; a maioria possui índice de refração e são opticamente ativos; e seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou traços (SIMÕES et al., 2003; LUPE, 2007).

Vários estudos têm apontado algumas propriedades biológicas de óleos essenciais, destacando-se as atividades: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e anti-inflamatória (HALCON e MILKUS, 2004; COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2006; OYEDJI e AFOLAYAN, 2006; ADORJAN e BUCHBAUER, 2010). Alguns compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de plantas como o α -curcumeno e o β -bisaboleno, por exemplo, demonstraram as atividades antiviral (DENYER et al., 1992). O bisabolol é conhecido por ser responsável pelas propriedades antiinflamatória e analgésica da camomila (*Matricaria chamomilla*) (ZEKOVIC et al., 1994).

Óleos essenciais e seus componentes aromáticos individuais já mostraram atividade supressora tumoral quando testadas em um significativo número de linhagens tumorais humanas, incluindo glioma, câncer de cólon, câncer gástrico, tumor hepático, tumores pulmonares, câncer de mama, leucemia e outros (DEANGELIS, 2001; EDRIS, 2007).

O óleo essencial obtido de *Bupleurum marginatum*, por exemplo, mostrou significativa atividade antitumoral *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais (HepG2, Caco-2, CCRF-CEM, HeLa, MiaPaCa-2 e MCF-7) (ASHOUR et al., 2009). Esse efeito é também evidenciado em outras linhagens para outros óleos essenciais obtidos de diferentes espécies

como, por exemplo, *Oreopanax nubigenus* e *Schefflera rodrigueziana* que mostraram potente atividade antitumoral *in vitro* contra células MDA-MB-231 (RICHMOND et al., 2009) e *Laurus nobilis*, cujo óleo essencial produziu inibição significativa da proliferação de células C32 e ACHN (LOIZZO et al., 2007). 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 produzidos por alguns óleos como, por exemplo, o óleo obtido de *Schinus molle* em células K562 (DÍAZ et al., 2008) e àquele obtido de *Cymbopogon flexuosus* em células HL60 (SHARMA et al., 2009). Óleos essenciais obtidos de *Platycladus orientalis*, *Prangos asperula* e *Cupressus sempervirens* também apresentam atividade antitumoral *in vitro* em células C32 (LOIZZO et al., 2008). Além de efeitos *in vitro*, óleos essenciais obtidos de diferentes espécies, bem como seus constituintes majoritários, apresentam efeitos antitumorais *in vivo*, como é o caso do óleo essencial das folhas de *Croton regelianus* e o monoterpene ascaridole, respectivamente (BEZERRA et al., 2009). Adicionalmente, monoterpene isolados de diferentes espécies e que são amplamente encontrados em óleos essenciais, também são conhecidos na literatura por seus potentes efeitos antitumorais (BASER, 2008; RAVIZZA et al., 2008; HIRASAWA et al., 2009; EFFENBERGER; BREYER e SCHOBERT, 2010; HUANG et al., 2010).

O óleo essencial de *Croton flavens* mostrou atividade antitumoral *in vitro* em células A-549 e DLD-1, assim como constituintes dele isolados, como o α -cadinol, β -elemeno e α -humuleno também se mostraram ativos, apesar de não serem seus componentes majoritários (SYLVESTRE et al., 2006). O β -cariofileno, constituinte majoritário dos óleos de *A. panurensis* e *L. martiniana*, possui diversas atividades biológicas, dentre elas atividade anticarcinogênica. O espatulenol, obtido do caule de *L. martiniana*, apresenta, por sua vez, moderada atividade citotóxica contra células do tipo kB (ALCÂNTARA et al., 2010).

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

Portanto, óleos essenciais obtidos de plantas são considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas contra o câncer.

2.4 Toxicologia de produtos naturais

As plantas consideradas medicinais beneficiaram, e continuam beneficiando a humanidade. Não precisaram dos testes clínicos como os fármacos sintéticos, credenciaram-se pelo seu uso tradicional ao longo de séculos. Ainda hoje muitas são utilizadas para tratamento de enfermidades, mesmo havendo medicamentos sintéticos no mercado para o tratamento das mesmas doenças. Entretanto, plantas medicinais são consumidas em todo o mundo com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Adicionalmente, comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pode parecer trivial, porém representa sério problema de saúde pública (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005; FERREIRA e PINTO, 2010).

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

A sociedade tem a percepção de que todo produto natural é seguro e desprovido de efeitos colaterais. Em alguns casos, os efeitos dos produtos naturais são apenas psicológicos e, em outros, causam danos irreversíveis à saúde. A falta de informação do público sobre os fitoterápicos tem sido explorada por muitos, em busca de curas milagrosas e lucros fáceis. Outros com intenções duvidosas, ao invés de esclarecerem os seus benefícios, lançam dúvidas e emitem opiniões sem levar em consideração os milênios que as plantas medicinais estão a serviço da humanidade (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Dentro desse contexto, várias plantas medicinais podem produzir efeitos indesejáveis nos mais diversos sistemas, e, assim, serem perigosas para a saúde humana. Existem plantas que são venenos por conterem toxinas poderosas que podem levar à morte. Algumas plantas medicinais são, inclusive, incompatíveis com o uso de certos medicamentos (FERREIRA e PINTO, 2010). A jurubeba (*Solanum paniculatum*), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) e arnica (*Arnica montana*) são exemplos de plantas que podem causar irritação gastrointestinal; o mastruço (*Chenopodium ambrosioides*) e a trombetaireira (*Datura suaveolens*), podem lesionar o sistema nervoso central; o cambará (*Lantana camara*), é conhecido por sua hepatotoxicidade; a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana*), por sua vez, causa distúrbios gastrointestinais (como diarreia grave) e a arruda (*Ruta graveolens*), pode provocar aborto,

fortes hemorragias, irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

Os grupos das plantas medicinais e tóxicas ocasionalmente são tomados indistintamente, já que se tem o pressuposto de conterem princípios ativos, que dependendo da dose, podem ser benéficos ou tóxicos para o organismo. O grau de toxicidade, capaz de alterar o conjunto funcional orgânico, depende da dosagem e do indivíduo. Há substâncias altamente tóxicas que, em dosagens mínimas, entram na composição de vários remédios. E, há ainda, aquelas que só fazem efeito cumulativamente, mas a maioria entra em ação ao primeiro contato. Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (SILVA et al., 2009b).

Outros efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas dignos de nota são os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL 2005).

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

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

Entre as plantas medicinais que podem causar riscos para mulheres grávidas, por estimular a motilidade uterina e provocar aborto, encontram-se alho (*Allium sativum*), aloe (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphitum officinalis*), eucalipto (*Eucaliptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinalis*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*) (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

Diante do exposto, é evidente a importância da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais através de estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade, a qual não é tão econômica quanto se pensa, visto que exige um razoável investimento para o desenvolvimento das pesquisas (PUPO; GALLO e VIEIRA, 2007).

No Brasil, a legislação atual que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 48 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essa Resolução determina que um dos critérios na avaliação da aplicação terapêutica é a apresentação da comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica e clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução Específica (RE) n. 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004).

De acordo com esse guia, devem ser realizados ensaios para avaliação de toxicidade aguda (avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas), ensaios para avaliação de toxicidade de doses repetidas (avalia a toxicidade após exposição a doses repetidas, 28 dias - subcrônico - ou 13 semanas - crônico) e estudos sobre genotoxicidade, que devem ser efetuados quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos (BRASIL, 2004).

Considerações de segurança também podem ser baseadas nos parâmetros no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) e lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL). NOAEL é definido como a maior concentração ou quantidade de uma substância, encontrada por experimento ou observação, que não causa nenhuma alteração adversa detectável da morfologia, capacidade funcional, crescimento, desenvolvimento ou tempo de vida do organismo-alvo sob condições definidas de exposição. LOAEL, por sua vez, é a menor concentração ou quantidade de uma substância, encontrada por experimento ou observação,

que provoca alteração adversa da morfologia, capacidade funcional, crescimento, desenvolvimento ou tempo de vida do organismo-alvo sob condições definidas de exposição (IUPAC, 1993).

A relação entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto é, portanto, um importante parâmetro quando sua aplicabilidade farmacológica está em estudo. Modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são, portanto, importantes para a obtenção de informações sobre a toxicidade de uma droga (PAILARD et al., 1999; TALMADGE et al., 2007).

Uma grande conquista na área da pesquisa de novos fármacos, nos últimos 30 anos, foi a introdução de sistemas biológicos *in vitro* em grande escala, os quais podem testar atividades de várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo executar facilmente as repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística dos resultados. Os sistemas de ensaio *in vitro* são, freqüentemente, baseados na utilização de culturas de células, de sistemas enzimáticos ou de receptores clonados (HOUGHTON, 2000).

Culturas de células de mamíferos fornecem ferramentas importantes para a avaliação da citotoxicidade de compostos com potencial atividade farmacológica. Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas a fim de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* em eritrócitos do organismo (SCHREIER et al., 1997; APARICIO, 2005).

Atualmente, a utilização de bioensaios na avaliação da toxicidade de extratos de plantas tem sido incorporada à pesquisa científica (NIERO et al., 2000). Dentre esses bioensaios, encontra-se o ensaio de toxicidade 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 (NASCIMENTO et al., 2008).

Numerosos trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA 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. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular. Sendo assim, a avaliação desses parâmetros é de extrema importância na determinação de possíveis efeitos tóxicos de qualquer droga analisada.

Adicionalmente, devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento de cânceres, seja com produtos naturais ou sintéticos, é a distinção entre essas células, a fim de minimizar a toxicidade sobre células não tumorais do organismo. O tratamento da maioria dos casos de câncer consiste na combinação de diferentes técnicas como, por exemplo, cirurgia e quimioterapia. Esta última baseia-se na busca da destruição de células neoplásicas, que têm como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Contudo, podem ocorrer efeitos secundários importantes naquelas células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010). A avaliação desses parâmetros é, portanto, de extrema importância na determinação de possíveis efeitos tóxicos de drogas antineoplásicas.

Em âmbito mundial, tem-se encontrado forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde. É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida, pelo fato de que a ação mutagênica por vezes se manifesta somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas, caracterizando os chamados efeitos cumulativos, o que tem contribuído para que a exposição a agentes genotóxicos seja um dos principais problemas de saúde pública (FLORES e YAMAGUCHI, 2008). Os estudos de genotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse de comprovação da eficácia das mesmas nas mais diversas finalidades farmacológicas. Isso se deve ao fato de muitas das plantas utilizadas por um grande número de pessoas, apesar de possuírem propriedades farmacológicas, também podem causar alterações no DNA. Os riscos são ainda maiores quando o uso de tratamentos clínicos alternativos dá-se de forma não controlada, sem a devida atenção quanto a identificação correta da planta, a parte do vegetal a ser utilizada e a forma de preparo e administração (VARANDA, 2006).

Efeitos genotóxicos de medicamentos antineoplásicos em células não tumorais são de especial significância devido à possibilidade dos mesmos induzirem tumores secundários nos pacientes em tratamento (CAVALCANTI, 2010). É bem documentado que mutações gênicas

atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos (VARANDA, 2006). Tendo em vista esse fato, testes genéticos têm sido utilizados com sucesso para a detecção de mutágenos/carcinógenos e antimutágenos/anticarcinógenos. Além disso, a avaliação do potencial genotóxico é um dos mais importantes estudos de segurança pré-clínicos necessários para a aprovação e registro de medicamentos (VIEIRA; PAULA e CHEN-CHEN, 2010).

Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste de micronúcleo, realizado em roedores, tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA et al., 2006). Ele é muito utilizado em pesquisa e avaliações de segurança para investigação do potencial de agentes físicos e químicos de causar danos genéticos. Esse teste baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos (DERTINGER, 2006). 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 (COSTA E SILVA e NEPOMUCENO, 2010). Os micronúcleos podem ser visualizados tanto em amostras de medula óssea, quanto em amostras de sangue periférico. Estudos demonstram que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (DERTINGER et al., 2006). O teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico se torna mais vantajoso, uma vez que: dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais, utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio, facilitando a integração do mesmo na rotina de estudos toxicológicos e/ou farmacológicos, sem a necessidade da realização de um ensaio em separado para avaliação de efeitos genotóxicos (HAMADA et al., 2001; DERTINGER et al., 2006), e ainda permite uma contagem das células micronucleadas mais satisfatória, devido à uniformidade das células do sangue periférico quando comparadas às da medula óssea (HOOFTMAN; RAAT, 1982; COSTA E SILVA e NEPOMUCENO, 2010).

O teste de micronúcleo só é apropriado para linhagens celulares com estabilidade cromossômica, pois a instabilidade dificultaria a distinção entre danos intrínsecos ou provocados por um tratamento experimental (CAMPOS DA PAZ, 2005).

De modo geral, o estudo da toxicidade de drogas candidatas a agentes farmacológicos, principalmente àquelas derivadas de produtos naturais, torna-se de fundamental importância, principalmente na área da quimioterapia antineoplásica.

2.5 *Xylopia frutescens* Albl.: família, gênero e espécie

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

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

A família Annonaceae foi catalogada em 1789 por Jussieu (HUTCHINSON, 1973). Constitui uma família primitiva e pertencente à ordem Magnoliales (CRONQUIST, 1981), compreendendo 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros (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.

Em termos taxonômicos, a família Annonaceae constitui um grupo muito uniforme, seja do ponto de vista anatômico, estrutural, de hábito e habitat, distinguindo-se por apresentarem uma combinação de características bem marcantes (SCHULTZ, 1984). No Brasil, foram registrados 29 gêneros compreendendo cerca de 260 espécies (BARROSO, 1978). Na Paraíba, um levantamento das Annonaceae no Herbário JPB registrou sete gêneros e 12 espécies (PONTES; BARBOSA e MAAS, 2004). As plantas dessa família são arbóreas, sendo as trepadeiras também bastante frequentes. Além de seus frutos, na maioria dos casos, serem comestíveis também são muito usados na terapêutica popular (CHATROU; RAINER e MAAS, 2004).

Do ponto de vista da constituição química, a família Annonaceae é caracterizada pela presença de acetogeninas biologicamente ativas (COLMAN-SAZARITORIA; GU e

MacLAUGHLIN, 1994), terpenoides (principalmente diterpenos), alcaloides (principalmente derivados isoquinolínicos), lignoides, além de óleos essenciais cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (LEBOEUF et al., 1982; SILVA et al., 2009a). Segundo Martins (1998) e Moreira et al., (2003), os estudos químicos de espécies pertencentes a essa família demonstram que as mesmas acumulam diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas tais como: citotóxicas (flavanonas), antitumoral (diterpenos, alcaloides), bactericida (alcaloides), antifúngica (terpenos). Dentre os óleos essenciais estudados, alguns apresentam atividade antimicrobiana e citotóxica (ASEKUN e ADENIYI, 2004), além de serem utilizados na cosmetologia e perfumaria (MAIA et al., 2005).

O gênero *Xylopi*a é considerado um dos maiores entre as Annonaceae, com cerca de 160 espécies, com distribuição pantropical (ALMEIDA, 2008). As espécies desse gênero são encontradas principalmente na forma de arbustos e árvores de até 35m, sendo algumas conhecidas por seus usos etnomedicinais e atividade farmacológica, por exemplo, *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). *X. discreta* possui atividade antileishmania e imunomodulatória (LÓPEZ; CUCA e DELGADO, 2009), enquanto que *X. parviflora* é um agente antinociceptivo (NISHIYAMA et al., 2009). *X. aethiopica* apresentou atividade citotóxica em linhagem HEp-2 e antimicrobiana (ASEKUN; ADENIYI, 2004), antibacteriana e antifúngica (TATSADJIEU et al., 2003), possuindo ainda, atividade antioxidante (KARIOTI et al., 2004), antiparasitária em *Leishmania donovani* (FALL et al., 2003), atividade frente ao *Plasmodium falciparum* (BOYOM et al., 2003), capacidade de diminuir a pressão intraocular em pacientes voluntários (IGWE; AFONNE e GHASI, 2003), bem como para tratamento de bronquite e disenteria (MELO, 2009). *X. cayennensis* mostrou atividade hipotensora (NASCIMENTO et al., 2006).

Um grande número de componentes químicos tem sido isolado do gênero *Xylopi*a, dentre eles, diterpenos (ANDRADE et al., 2003), sesquiterpenos (MOREIRA et al., 2007), alcaloides (HARRIGAN et al., 1994) e flavonoides (VEGA et al., 2007). Quatro alcaloides bisbenziltetrahydroisoquinolinas isolados de *X. columbiana* atuam como inibidores seletivos do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (GRANELL et al., 2004). Um diterpeno kaurano isolado de *X. aethiopica* apresentou significativa atividade hipotensora sistêmica e

efeito vasodilatador coronário, acompanhado com bradicardia em ratos Wistar (SOMOVA et al., 2001) e o ácido xilópico isolado dos seus frutos mostrou ser antimicrobiano (BOAKYE-YIADOM; FIAGBE e AYIM, 1977). Acetogeninas isoladas de *X. aromatica* apresentaram citotoxicidade frente linhagem tumoral sólida humana (COLMAN-SAIZARBITORIA; GU e MacLAUGHLIN, 1994). Alcaloides totais das raízes de *X. quintasii* possuem propriedade antiespasmódica (QUEVAUVILLER e FOUSSARD-BLANPIN, 1976). Trabalhos realizados por grupos de pesquisas no Brasil com o gênero *Xylopi*a reportaram vários tipos de metabólitos secundários, dentre eles, sesquiterpenos aromadendranos com atividade antifúngica de *X. brasiliensis* (MOREIRA et al., 2003), diterpenos diméricos de *X. emarginata* (MOREIRA et al., 2006) e *X. frutescens* (TAKAHASHI et al., 1995), sesquiterpenos diméricos de *X. aromatica* (MARTINS et al., 1998), diterpenos trachylobanos e óleos essenciais com atividade acaricida de *X. sericea* (TAKAHASHI et al., 2001; PONTES et al., 2007).

*Xylopi*a *frutescens* Aubl., conhecida popularmente por “embira”, “semente-de-embira” e “embira-vermelha”, tem como características gerais de identificação botânica: árvore de pequeno porte, alcançando até 8m de altura, e copa alongada; tronco ereto e cilíndrico, com casca fibrosa, aromática; folhas alternas, simples, oblongolanceoladas, curto-pecioladas, lineares, agudas no ápice, coriáceas, glabras na face superior e pubescentes na face inferior; inflorescência e glomérulos axilares com flores regulares, hermafroditas; cálice gamossépalo, pétalas lineares; fruto do tipo baga ovóide, deiscente, vermelho, com duas a seis sementes (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). É uma espécie arbórea nativa das Américas Central e Sul, África e Ásia. Distribui-se por quase todo o Brasil, ocorrendo em Minas Gerais e dispersando-se desde a Amazônia até os estados centrais. De acordo com Maas et al. (2001), aparece na Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro.

X. frutescens é uma planta perenifólia, heliófita, seletiva xerófita, pioneira, característica e exclusiva da floresta pluvial Amazônica de terra firme. Apresenta elevada frequência, com dispersão mais ou menos contínua, mas irregular ao longo de sua região de distribuição. Ocorre preferencialmente em formações secundárias (capoeiras e capoeirões) de terrenos arenosos de baixa fertilidade, produzindo por ano abundante quantidade de sementes viáveis, largamente disseminadas pela avifauna. Possui usos de cordoaria, medicinais, ornamentais, além do seu emprego como condimento e na indústria de perfumaria (LORENZI, 1998; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), todavia, ainda é considerada pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como farmacológicos (Figura 1).

No Brasil, suas sementes são usadas na medicina popular como agente antimicrobiano e contra reumatismo, entre outros usos. Na região amazônica, a decocção da casca, na forma de inalação, serve para combater resfriados e dores de cabeça (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). As folhas são usadas pelos índios Guaymí (oeste do Panamá) como anti-helmíntico e antipirético (JOLY et al., 1987), cuja infusão serve como um potente analgésico e antiinflamatório. Na parte colombiana da Amazônia, os índios utilizam com cautela o chá das folhas como diurético e antiedematogênico (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Os frutos detêm sabor aromático e dissipam os flatos. Moídos, são aplicados contra mordidas de serpentes. As sementes possuem propriedades organolépticas e são tidas como estimulantes da bexiga, digestivas e úteis contra catarro, leucorréia, cólicas estomacais (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), reumatismo, mau hálito e cáries (CORRÊA, 1984). Há relatos que essas sementes, as quais encerram óleo volátil e aromático, possuem uma destinação mais nobre: postas a macerar numa bebida alcoólica são tomadas como afrodisíaco.

Di Stasi e Hiruma-Lima (2002) citam o isolamento de diterpenos da espécie e relatam que foram caracterizados alguns constituintes que apresentaram atividade biológica, como ácido caurenóico (abundante nas sementes), que apresentou atividade tripanossomicida e contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina; além dos compostos caurool e os ácidos xilópico e acutiflórico, que também apresentaram atividade tripanossomicida. Este ácido ainda mostrou atividade antimicrobiana (MACÊDO e FERREIRA, 2004), anti-inflamatória; inibitória da 5-lipoxigenase (BRAGA et al., 2000), justificando o uso de *X. frutescens* na medicina popular (JENNET-SIEMS et al., 1999; MELO et al., 2001). Adicionalmente, o óleo essencial de *X. frutescens* apresentou atividade antifúngica em espécies de dermatófitos (LIMA et al., 1992) e o extrato etanólico seco da casca do seu caule apresentou boa atividade moluscida contra o caramujo *B. glabrata* (SANTOS et al., 1998).

Figura 1 – *Xylopia frutescens* Aubl.



(Fonte: INBio)

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar os efeitos antitumorais e toxicológicos do óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens* (O.E.X.) através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar a caracterização dos constituintes químicos do O.E.X., a fim de contribuir com os estudos quimiotaxonômicos do gênero *Xylopia* e da família Annonaceae;
- Avaliar a bioatividade do O.E.X., frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a possível atividade antitumoral *in vitro* do O.E.X. frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180;
- Avaliar a citotoxicidade do O.E.X. frente eritrócitos de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*);
- 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;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do O.E.X. através da determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, análise anatomopatológica de órgãos vitais, consumo de água e ração, e avaliação ponderal;
- Avaliar o possível efeito imunomodulador do O.E.X. através da determinação dos índices do baço e timo;
- Avaliar o efeito genotóxico *in vivo* do O.E.X. através do ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

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, como também no Núcleo de Caracterização e Análise-Central Analítica (NUCAL), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB). As atividades relativas à histopatologia foram desenvolvidas no Laboratório de Patologia Experimental/UFPB em colaboração com o Laboratório Virchow[®] - Laboratório Médico de Patologia Celular, sediado em João Pessoa/PB.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 35 e 40 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/UFPB) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Figura 2). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida (pellets de ração da marca Purina[®]) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

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

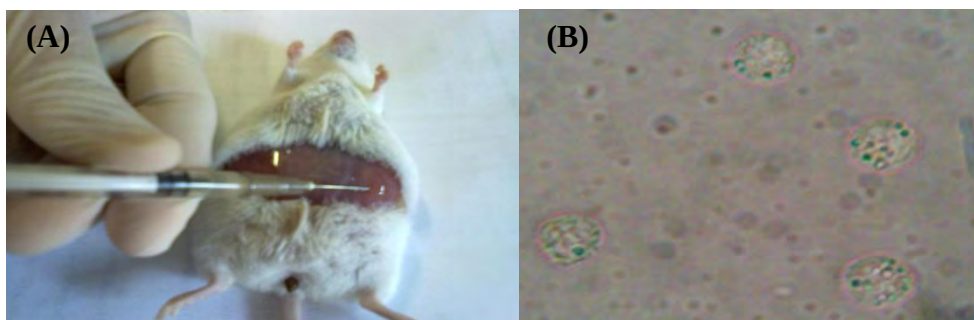
Figura 2 – Camundongos Swiss provenientes do biotério da UFPE

(Foto: Aline Xavier)

4.2.2 Linhagens de células tumorais

Para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram utilizadas células tumorais da linhagem sarcoma 180 (linhagem murina) gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Figura 3).

As mesmas são mantidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos em meio de cultura, sendo realizado repique a cada dois dias.

Figura 3 – Células tumorais da linhagem sarcoma 180

(A) tumor ascítico (Foto: Daiene Martins); (B) (Aumento 400x) (Foto: João Carlos Pita)

4.2.3 Cistos de *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram adquiridos da San Francisco Bay Brand®, EUA.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Caracterização do óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens* Aubl.

✓ Obtenção do O.E.X.

A espécie vegetal (folhas frescas de *Xylopia frutescens* Aubl.), imediatamente após a coleta, foi triturada e submetida à extração pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger utilizando seis litros de água destilada em balão de vidro (capacidade 12,0 L), aquecida em manta aquecedora, mantendo-se temperatura de ebulição por quatro horas. O material resultante foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar, e mantido em temperatura inferior a 4,0 °C (Figura 4).

Figura 4. Aparelho de Clevenger



(Foto: Thaísa Rolim)

✓ Identificação dos constituintes presentes no O.E.X.

As análises qualitativas para identificação dos constituintes do óleo essencial foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM).

A análise em Cromatografia gasosa (CG) foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu GC17-A, usando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme). O Hélio foi utilizado como gás carreador, a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 60° a 240° a 3 °C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 230 °C, respectivamente.

A análise por Cromatografia a Gás - Espectrometria de Massas (CG-EM) foi realizada em um sistema Shimadzu QP-5000-Quadrupole MS, operando com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme); Hélio como gás carreador, fluxo de 1 mL/min com split. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 230 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 60 °C a 240 °C a 3 °C/min.

A porcentagem de cada componente do óleo foi analisada a partir da área do pico no CG-EM e a identificação química de cada substância que compõe o óleo foi determinada pelo tempo de retenção, pelos índices de Kovats e por comparação com dados disponíveis no banco de dados espectrais do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.). Análise dos espectros de massas e comparação com os dados da literatura foram usados para confirmar os resultados.

4.3.2 Ensaio *In vitro*

4.3.2.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

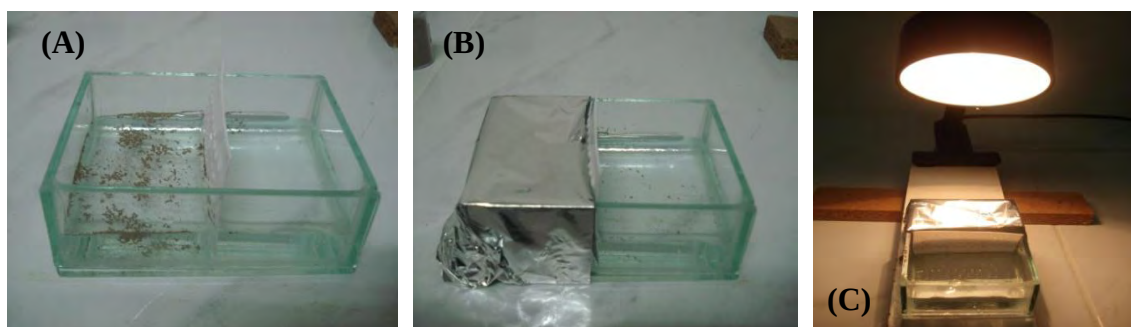
A toxicidade do O.E.X. foi avaliada utilizando-se o teste de letalidade com *Artemia salina* Leach, segundo Meyer et al. (1982), Nascimento e Araújo (1999). Os cistos de *A. salina* foram armazenados sob resfriamento a 5 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., 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 do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo coletadas com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (Figura 5).

O O.E.X. foi solubilizado em dimetilsulfóxido - DMSO (5 %) e água salina artificial, separadamente, a fim de se obter uma solução mãe de 10 mg/mL. A partir desta, foram efetuadas diluições para concentrações de intervalo 0 – 1000 µg/mL. Colocou-se 5 mL de

cada uma dessas soluções em tubos de ensaio aos quais foram adicionados 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 CL_{50} (concentração que produz 50 % de letalidade).

Figura 5– 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).

4.3.2.2 Citotoxicidade frente células tumorais

Células da linhagem sarcoma 180 foram utilizadas para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. 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 % de soro bovino fetal (SBF) (Nutricell[®]). As células tumorais foram então semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware[®]) e incubadas com concentrações de até 500 µg/mL do O.E.X. por 24 h (37 °C e 5 % CO_2). O óleo essencial foi solubilizado em dimetilsulfóxido (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; SAWYER e STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado 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

4.3.2.3 Citotoxicidade frente 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 eritócitos, 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 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

4.3.3 Ensaios *In vivo*

4.3.3.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda em camundongos

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado de acordo com o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” (RE n. 90/2004 – ANVISA).

Para tal ensaio, foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus mulus*), obtidos do Biotério Prof. Thomas George (ANVISA/UFPB), seis machos e seis fêmeas, por grupo (LARINI, 1999). Os animais foram submetidos a doses de 250, 375 e 500 mg/kg, via intraperitoneal, e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo contendo 5 % Tween 80 (Sigma-Aldrich®) em salina. O número de animais mortos foi contabilizado para determinação da DL₅₀ (dose letal 50 %), por regressão não linear.

Após a administração do O.E.X. por via intraperitoneal (i.p.), os animais foram observados cuidadosamente para detecção de 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, sob a coordenação do Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida e colaboradores (1999).

Ao final dos 14 dias todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por deslocamento cervical e autopsiados para observação de alterações macro e microscópicas dos órgãos acometidos (BRASIL, 2004).

4.3.3.2 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 ($v = 0,2$ mL; concentração de 25×10^6 células/mL) por via subcutânea, na região subaxilar dos animais experimentais ($n = 6$) (Figura 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 100 e 150 mg/kg. 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®) (25 mg/kg) foi usado como droga padrão. 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:

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

Onde:

PI % = percentual de inibição do peso tumoral

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

B = média dos pesos dos tumores de cada grupo tratado

Figura 6 – Camundongo com tumor na região subaxilar



(Foto: Aline Xavier)

4.3.3.3 Avaliação da Toxicidade Sistêmica

4.3.3.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos com o tratamento 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.

4.3.3.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No nono dia do experimento, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg - 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 7). As extensões sanguíneas foram

coradas automaticamente no HEMATEL 200[®] e analisadas em microscópio óptico TAIMIN[®], para realização da contagem diferencial de leucócitos.

Figura 7 – Analisadores bioquímico e hematológico



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

4.3.3.3 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:

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

4.3.3.4 Análises anatomopatológicas

Após a pesagem dos órgãos 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 Patologia Experimental/LABETOX/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.

4.3.3.4 Genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo, grupos de seis camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos foram intraperitonealmente tratados com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.X. Um grupo tratado com a droga padrão (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 5 %) foram incluídos. Após 24 horas os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg - 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 o ensaio de citotoxicidade frente células tumorais, bioensaio com *Artemia salina* e citotoxicidade em eritrócitos, foram realizados três experimentos com quatro, três e quatro replicatas, respectivamente. Os valores de CI₅₀, CL₅₀ e CH₅₀ foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95 %.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se o teste análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de *Tukey*, para a comparação

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do óleo essencial das folhas de *Xylopi frutescens* Aubl.

O O.E.X. mostrou-se como uma mistura complexa de mono e sesquiterpenos, incolor e de odor característico. Um total de 44 compostos foi identificado através de CG-EM, onde 18 % são representados por monoterpenos e 67,5 % por sesquiterpenos. O componente majoritário foi o cariofileno (23,91 %), seguido do γ -cadineno (12,48 %), β -ocimeno (8,19 %), cadin-4-en-10-ol (5,78 %), viridiflorol (4,83 %), γ -elemeno (4,55 %). Outros componentes presentes no referido óleo em menor percentual estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *X. frutescens* Aubl.

SUBSTÂNCIAS	(% relativa)
Cariofileno	23,91
γ -cadineno	12,48
β -ocimeno	8,19
Cadin-4-en-10-ol	5,78
Viridiflorol	4,83
γ -elemeno	4,55
β -elemeno	4,31
α -selineno	4,29
Espatulanol	3,97
Delta-cadineno	3,02
α -humuleno	2,48
α -pineno	2,30
γ -muuroleno	2,23
β -selineno	2,11
α -cubebeno	1,31
Germacreno A	1,25
Aromadendreno	0,99
Campheno	0,94
Mirceno	0,92
Acetato de bornila	0,34
Total identificado	90,20

5.2 Ensaios *In vitro*

5.2.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade com o microcrustáceo *A. salina* foi utilizado para avaliar a toxicidade do O.E.X., utilizando a CL_{50} como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

A viabilidade dos náuplios de *A. salina* foi reduzida de maneira dependente de concentração após tratamento com o O.E.X. em concentrações até 1.000 $\mu\text{g/mL}$, produzindo 100 % de mortalidade na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. O valor de CL_{50} do referido óleo foi de 180,7 (163,9 – 199,2) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

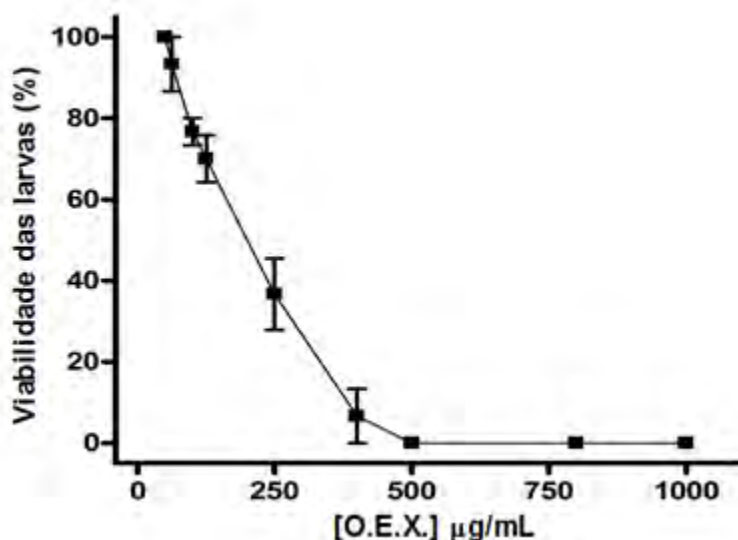


Gráfico 1 – Viabilidade dos náuplios do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com O.E.X. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em triplicata, com intervalo de confiança de 95 %.

5.2.2 Citotoxicidade frente células tumorais

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

Os resultados mostram que o O.E.X. reduziu a viabilidade celular de maneira dependente de concentração, com valor de CI_{50} de 216,6 (211,8 - 221,5) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2).

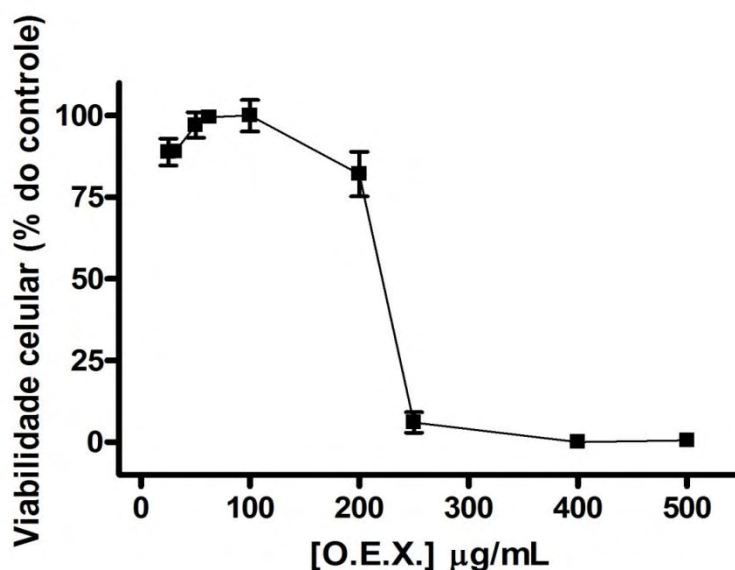


Gráfico 2 – Viabilidade de células sarcoma 180 após tratamento com o O.E.X. (µg/mL). Concentração-resposta através do ensaio de redução do MTT. Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.2.3 Citotoxicidade frente eritrócitos

A citotoxicidade do O.E.X. também foi avaliada frente eritrócitos de camundongos Swiss. A percentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com o óleo essencial, o qual produziu 100 % de hemólise em concentrações a partir de 375 µg/mL. O valor de CH_{50} obtido foi de 63,87 (57,22 – 71,30) µg/mL (Gráfico 3).

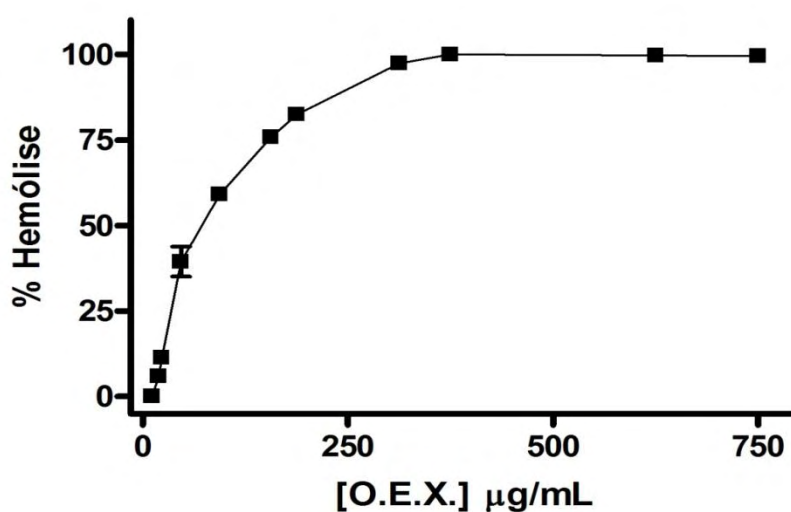


Gráfico 3 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.X. (µg/mL). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.3 Ensaio *In vivo*

5.3.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda em camundongos

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 (08 mortes na dose de 375 mg/kg e 11 mortes na dose de 500 mg/kg). Adicionalmente, foram observados alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA), sendo mais pronunciados nas doses mais elevadas em ambos os sexos (Tabela 2). Foram observados efeitos excitatórios sobre o SNC (hiperatividade), efeito esse que se manifestou até a primeira hora de observação. Efeitos sobre o SNA também foram observados, dentre eles, diarreia, cianose e força para agarrar diminuída (Tabela 2).

Nenhuma morte foi registrada nos camundongos tratados com a dose de 250mg/kg do O.E.X., nem tampouco foram observados efeitos característicos de alterações no SNC e SNA.

Com base nos resultados apresentados, NOAEL (maior dose administrada num estudo de toxicidade na qual não se observa nenhum efeito adverso) do O.E.X. foi de 250 mg/kg e LOAEL (menor dose administrada num estudo de toxicidade na qual se observa um efeito adverso), por sua vez, foi de 375 mg/kg, para os animais experimentais de ambos os sexos, nas condições do presente estudo.

Tabela 2 - Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas do O.E.X. em camundongos (n = 6).

Dose (mg/kg)	Sexo	M/T*	Sintomas
0	Machos	0/6	Nenhum
	Fêmeas	0/6	Nenhum
250	Machos	0/6	Nenhum
	Fêmeas	0/6	Nenhum
375	Machos	5/6	Hiperatividade, ataxia, tônus muscular e força para agarrar diminuídos
	Fêmeas	3/6	Hiperatividade, ataxia, diarreia, tônus muscular e força para agarrar diminuídos
500	Machos	5/6	Hiperatividade, ataxia, ambulação aumentada, escalar, respiração forçada, tônus muscular e força para agarrar diminuídos, cianose
	Fêmeas	6/6	Hiperatividade, ataxia, ambulação aumentada, escalar, respiração forçada, tônus muscular e força para agarrar diminuídos, cianose

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

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

Para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, camundongos transplantados com sarcoma 180 foram tratados intraperitonealmente com o O.E.X. (100 e 150 mg/kg), por sete dias. Os efeitos inibitórios do O.E.X. sobre o crescimento do tumor, estão mostrados no gráfico 4. Houve redução significativa do peso dos tumores dos animais tratados com o O.E.X., bem como nos animais tratados com 5-FU (droga padrão). Após oito dias do implante, a média do peso dos tumores foi de $1,23 \pm 0,11$ g para o grupo controle transplantado, $0,67 \pm 0,04$ g e $0,41 \pm 0,04$ g, para os grupos tratados com o O.E.X. nas doses de 100 e 150 mg/kg, respectivamente. Os camundongos tratados com 5-FU (25 mg/kg) também apresentaram uma significativa redução no peso dos tumores ($0,34 \pm 0,02$ g) quando comparados com o grupo controle transplantado. As taxas de inibição do crescimento tumoral foram de 45,1 % e 65,9 % para os camundongos tratados com o O.E.X. nas doses de 100 e 150 mg/kg, respectivamente, e 72,1 % para os camundongos tratados com 5-FU (25 mg/kg). A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre a inibição do crescimento tumoral produzida pela maior dose do óleo (150 mg/kg) e àquela produzida pelo 5-FU.

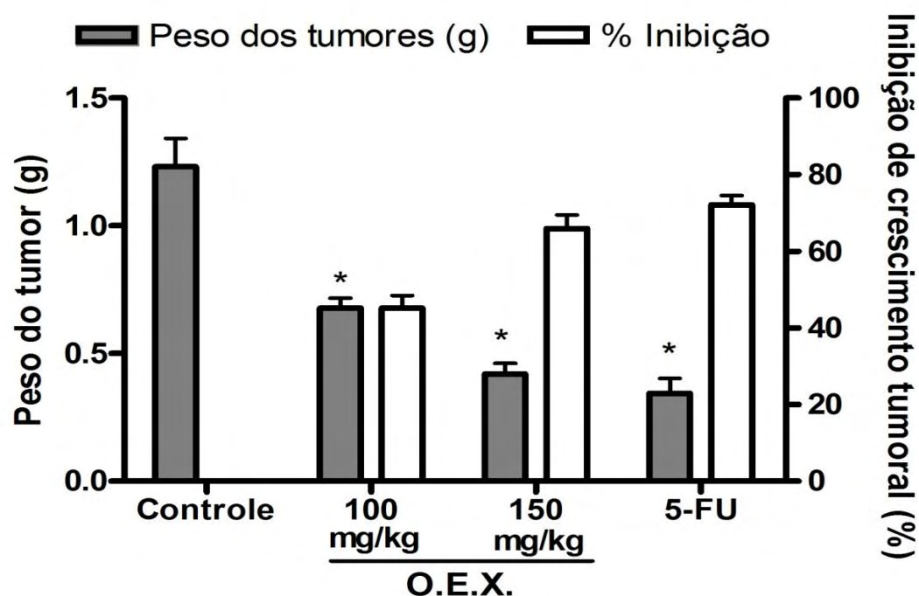


Gráfico 4 – Efeito do O.E.X. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor (%) dos diferentes grupos experimentais. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais. * $p < 0,05$ comparado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

5.3.3 Avaliação da Toxicidade Sistêmica

5.3.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Na tabela 3 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração após os tratamentos com o O.E.X. e 5-FU.

Conforme os resultados obtidos observa-se que não houve diferenças significativas no consumo de água entre os grupos experimentais. Todavia, houve uma diminuição significativa no consumo de ração nos animais tratados com o O.E.X. em ambas as doses, quando comparados ao grupo controle transplantado e ao grupo controle sadio. O grupo tratado com o 5-FU também apresentou redução do consumo de ração quando comparado ao grupo controle transplantado.

A diminuição do consumo de alimentos por parte desses grupos resultou em uma diminuição significativa do peso desses animais quando comparados ao grupo controle transplantado e ao grupo controle sadio.

Tal fato pode ser verificado a partir dos índices de variação de peso corporal dos animais, que se mostrou positiva para os animais do grupo tratado com o 5-FU e negativa para os animais dos grupos tratados como O.E.X., conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 3 – Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle sadio	-	33,7±4,4	30,9±1,5	36,8±0,7	40,2±0,8
Controle – S180	-	40,0±4,9	28,1±0,9	37,7±0,9	43,5±1,3
5-Fluorouracil	25	46,7±4,2	19,1±0,6 ^{a,b}	39,8±1,7	37,8±0,2 ^a
O.E.X.	100	30,4±4,3	19,9±2,3 ^{a,b}	36,0±0,8	34,7±0,9 ^{a,b}
O.E.X.	150	32,7±4,4	18,4±2,8 ^{a,b}	37,7±1,7	32,5±1,4 ^{a,b}

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado-S180 (5 % Tween-80) por ANOVA seguido de Tukey

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

Tabela 4 – Avaliação do índice e percentual de variação ponderal dos animais (n = 6) dos diferentes grupos experimentais

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de variação ponderal (com tumor)	Índice de variação ponderal (sem tumor)	% de variação (inclui tumor)	% de variação (sem tumor)
Controle sadio	-	3,42 ± 0,51	3,42 ± 0,51	+ 9,30 ± 1,39	+ 9,30 ± 1,39
Controle S180	-	5,78 ± 0,61	4,52 ± 0,51	+ 15,32 ± 1,57	+ 11,95 ± 1,32
5-FU	25	0,03 ± 1,14 ^a	-0,71 ± 1,14 ^{a,b}	+ 0,55 ± 3,07 ^a	- 1,33 ± 3,01 ^{a,b}
O.E.X.	100	-1,27 ± 0,97 ^{a,b}	-1,98 ± 0,97 ^{a,b}	- 3,4 ± 2,69 ^{a,b}	-5,40 ± 2,70 ^{a,b}
O.E.X.	150	-3,06 ± 1,00 ^{a,b}	-3,52 ± 0,96 ^{a,b}	- 8,50 ± 2,84 ^{a,b}	- 9,78 ± 2,76 ^{a,b}

Dados apresentados como média ± erro padrão da média da variação do peso corporal (peso final menos peso inicial) de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado S180 (5 % Tween-80); ^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio (5 % Tween-80). % - em relação ao peso inicial respectivo de cada grupo.

5.3.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Dando continuidade ao estudo analítico da toxicidade do O.E.X., foram avaliados também, parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de uréia e creatinina em ambos os grupos tratados com o O.E.X. e no grupo tratado com 5-FU, quando comparados com o controle transplantado, todavia, foi demonstrada redução significativa desses parâmetros quando comparados com o grupo controle sadio. Em relação às enzimas hepáticas, não foram evidenciadas alterações significativas nos níveis de ALT em ambos os grupos tratados com o O.E.X. e no grupo tratado com 5-FU, quando comparados com os controles transplantado e sadio, no entanto, pode-se observar um aumento significativo da atividade enzimática da AST nos grupos tratados com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.X., quando comparados ao controle sadio e ao 5-FU. O grupo tratado com 5-FU, por sua vez, apresentou alterações na atividade da AST quando comparado com o controle transplantado.

Observou-se ainda que o implante do tumor por si só foi capaz de aumentar a atividade da AST nos animais do grupo controle transplantado quando estes foram comparados ao grupo controle sadio (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeitos do O.E.X. (100 e 150 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	-	205,8±23,8	88,5±2,5	53,5±2,5	1,0±0,1
Controle-S180	-	324,2±24,9 ^c	69,8 ±3,8	39,0±1,3 ^c	0,7±0,1 ^c
5-Fluorouracil	25	198,0±11,8 ^a	44,0±12,0	38,4±2,2 ^c	0,4±0,0 ^c
O.E.X.	100	404,5±28,1 ^{b,c}	63,4 ±4,6	34,0±1,9 ^c	0,6±0,1 ^c
O.E.X.	150	417,0±10,8 ^{b,c}	80,2±12,4	41,7±4,8 ^c	0,6±0,0 ^c

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado- S180 (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 tocante à avaliação dos parâmetros hematológicos, não foram observadas alterações significativas na contagem total de hemácias, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito nos grupos tratados em relação ao controle transplantado. Em contrapartida, alterações nos parâmetros supracitados foram evidenciadas quando comparadas aos grupos controle sadio e tratado com o 5-FU (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeitos do O.E.X. (100 e 150 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 ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Controle sadio	-	10,24±0,05	13,68 ±0,11	53,57 ±0,42
Controle-S180	-	8,41 ±0,24	12,17±0,36	48,62±1,40
5-Fluorouracil	25	10,61±0,31	13,55 ±0,05	52,72±1,53
O.E.X.	100	7,97±0,49 ^{b,c}	12,25 ±0,44	47,10 ±1,87 ^c
O.E.X.	150	8,26 ±0,48 ^{b,c}	12,40±0,23	46,93 ±1,41 ^c

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado- S180 (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

Quando o parâmetro avaliado foi a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) das hemácias, não foram observadas alterações nos grupos tratados com o óleo, todavia, quando o índice hematimétrico avaliado foi o Volume Corpuscular Médio (VCM) foi observada alteração nos grupos tratados com o O.E.X. comparados ao 5-FU, bem como, alteração deste último quando comparado ao controle sadio. No entanto, a Concentração Hemoglobínica

Corpuscular Média (CHCM) teve um aumento significativo no grupo tratado com a dose de 150 mg/kg do O.E.X., assim como no grupo tratado com o 5-FU quando comparados ao grupo controle transplantado. O grupo tratado com o 5-FU, por sua vez, também apresentou um aumento no valor do CHCM quando comparado ao grupo controle sadio (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeitos do O.E.X. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais (Continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Controle sadio	-	52,50 ± 0,34	13,45 ± 0,10	25,57 ± 0,24
Controle-S180	-	54,60 ± 0,74	13,77 ± 0,18	24,98 ± 0,10
5-Fluorouracil	25	42,50 ± 0,61 ^{a,c}	12,93 ± 0,10	29,63 ± 0,22 ^{a,c}
O.E.X.	100	54,00 ± 0,44 ^b	14,02 ± 0,13	26,02 ± 0,08
O.E.X.	150	52,60 ± 0,67 ^b	13,75 ± 0,13	26,32 ± 0,12 ^a

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado-S180 (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 diz respeito à contagem total de leucócitos, os animais transplantados com as células sarcoma 180 mostraram um significativo aumento no número de leucócitos totais circulantes quando comparados com os animais sadios. A mesma alteração foi observada nos grupos tratados com o O.E.X. quando comparados ao 5-FU e ao controle sadio. O grupo tratado com a droga padrão, por sua vez, demonstrou uma redução significativa no número de leucócitos totais quando comparado aos grupos controle transplantado e sadio (Tabela 6).

Na contagem diferencial de leucócitos, não foram demonstradas alterações significativas nos tipos leucocitários após os tratamentos com o óleo essencial quando comparados ao grupo controle transplantado. Entretanto, houve um aumento na porcentagem de neutrófilos no sangue periférico quando os grupos tratados com ambas as doses do óleo foram comparadas ao grupo controle sadio e ao grupo tratado com o 5-FU. O mesmo aumento ocorreu com a porcentagem de monócitos quando comparada ao 5-FU. Por outro lado, quando os tipos leucocitários analisados foram os linfócitos e os eosinófilos, pôde-se observar uma diminuição na porcentagem dos mesmos quando os grupos tratados com ambas as doses do O.E.X. foram comparados com o grupo controle sadio. O tratamento com 5-FU levou a um aumento significativo na porcentagem de linfócitos e diminuições significativas na porcentagem de neutrófilos e eosinófilos, quando comparados ao grupo controle sadio.

Adicionalmente, observou-se um aumento na percentagem de neutrófilos e diminuição na percentagem de linfócitos e eosinófilos no sangue periférico dos animais transplantados com sarcoma 180, quando comparados ao grupo sadio tratado apenas com 5 % de Tween-80 (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeitos do O.E.X. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos dos diferentes grupos experimentais (Continuação)

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Controle sadio	-	7,06±0,87	82,83±2,28	14,20±1,31	2,83±0,54	1,33±0,21
Controle-S180	-	12,16±0,46 ^c	36,25±1,54 ^c	67,50±3,77 ^c	5,20 ±1,15	0,00±0,00 ^c
5-Fluorouracil	25	2,45±0,36 ^{a,c}	92,67±1,52 ^{a,c}	3,75±0,85 ^{a,c}	1,16±0,40 ^a	0,16±0,16 ^c
O.E.X.	100	14,37±1,83 ^{b,c}	45,50±4,57 ^{b,c}	59,25±4,02 ^{b,c}	5,75±1,43 ^b	0,00±0,00 ^c
O.E.X.	150	13,25±0,15 ^{b,c}	44,00±2,06 ^{b,c}	62,00±1,30 ^{b,c}	5,66±0,91 ^b	0,16±0,16 ^c

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado -S180 (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

5.3.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

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

Quanto ao parâmetro índice dos órgãos, nenhuma alteração significativa no índice dos rins foi observada entre os grupos de animais saudáveis e transplantados (Tabela 7).

O índice de fígado dos animais tratados com 5-FU e com ambas as doses do O.E.X. reduziu significativamente quando comparado ao grupo controle transplantado. Entretanto, esse mesmo índice foi significativamente aumentado em animais do grupo controle transplantado com células sarcoma 180, quando comparado com o grupo de camundongos sadios (Tabela 7).

O índice de baço foi significativamente aumentado em animais do grupo controle transplantado com sarcoma 180, quando comparados com o grupo controle sadio. Após o

tratamento com o 5-FU, houve diminuição do índice de baço, quando comparado ao grupo controle transplantado. O mesmo efeito foi observado com o O.E.X., independente da dose, tendo em vista que, o índice esplênico diminuiu significativamente em relação ao grupo controle transplantado (Tabela 7).

Após o tratamento com o 5-FU e com ambas as doses do O.E.X. houve diminuição do índice de timo, quando comparado ao grupo controle sadio (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeitos do O.E.X. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos órgãos de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle sadio	-	3,21±0,25	3,62±0,19	53,48±1,88	11,01±0,57
Controle-S180	-	2,43 ±0,38	7,02±0,14 ^c	61,43±1,03 ^c	11,33±0,31
5-Fluorouracil	25	1,42±0,23 ^c	3,42±0,19 ^a	49,22±1,85 ^a	10,36±0,24
O.E.X.	100	1,19±0,12 ^c	4,84±0,75 ^a	51,30±1,39 ^a	11,23±0,51
O.E.X.	150	1,54 ±0,32 ^c	4,80±0,56 ^a	50,11±1,76 ^a	11,85±0,44

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle transplantado-S180 (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

5.3.3.4 Análises Anatomopatológicas

5.3.3.4.1 Análise Macroscópica

Em geral, nenhuma alteração macroscópica foi observada nos órgãos (fígado e rins) e tumores, dos animais dos grupos tratados com ambas as doses do O.E.X.

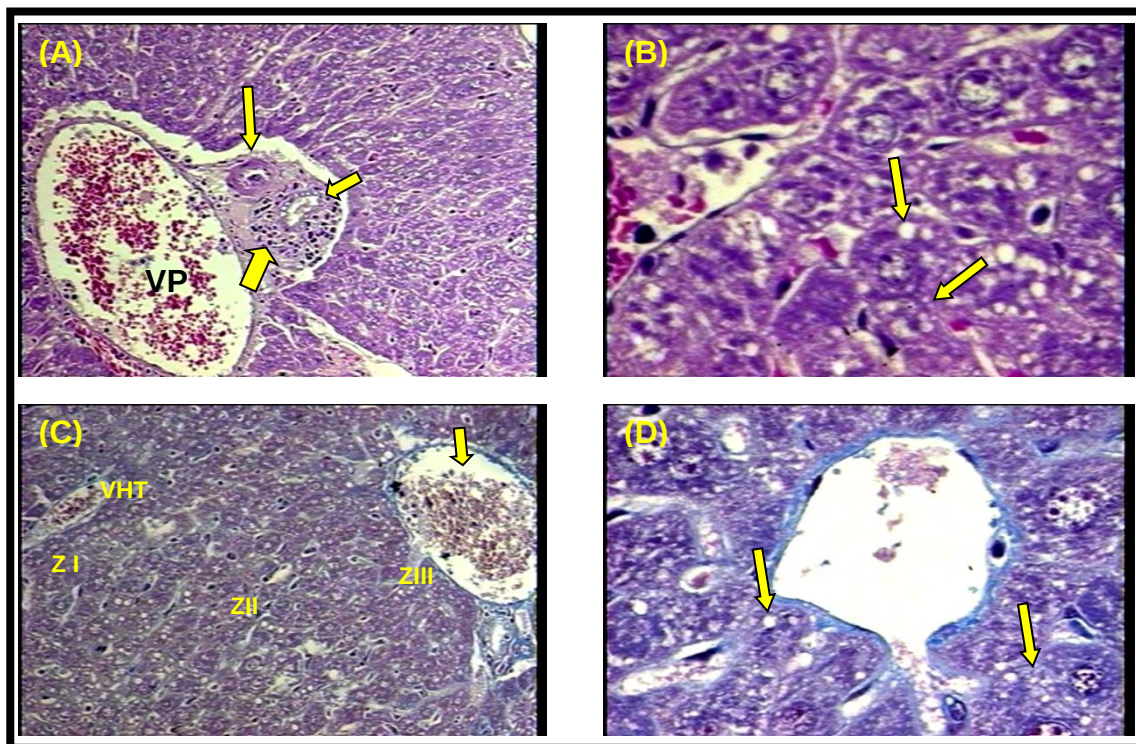
5.3.3.4.2 Análise Microscópica

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

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle transplantado S180 apresentaram alterações histológicas reacionais, focais, discretas, sem atipias celulares. Apresentaram arquitetura do tipo lobular, com veias hepáticas terminais de paredes finas, equidistantes, espaços portais, regularmente distribuídos e pequenos, com matriz laxa

comportando tríades vâsculo-biliares (ductos biliares, ramo da veia porta e ramos da artéria hepática) sem particularidades histológicas. Nos espaços portais foram encontrados hepatócitos normais, isomorfos, todavia, foram observadas algumas mitoses isoladas. Identificaram-se ainda focos pequenos e esparsos de hepatocitólise e discreto infiltrado inflamatório linfoistiocítico, no seio do lóbulo. Observou-se trama lobular de reticulina delicada, com raros focos de colapso, correspondentes às imagens de hepatocitólise, bem como sobrecarga hepatocelular lipídica (esteatose macrovesicular e microvesicular), discreta e panlobular e presença de macrófagos sinusoidais hipertróficos (células de Kupffer). As atividades periportal e perisseptal foram ausentes. Nos animais do grupo 5-FU identificaram-se poucos linfócitos periportais (população residente). Os fígados dos animais tratados com o O.E.X. nas doses de 100 e 150 mg/kg apresentaram arquitetura lobular preservada, verificando-se, contudo, focos esparsos e pequenos de necrose hepatocelular, associados a infiltrado linfoistiocítico. Tais focos foram considerados mínimos e/ou raros. Esse quadro histológico reacional do parênquima, por sua vez, foi acompanhado por hipertrofia de macrófagos sinusoidais (células de Kupffer) (Figura 8).

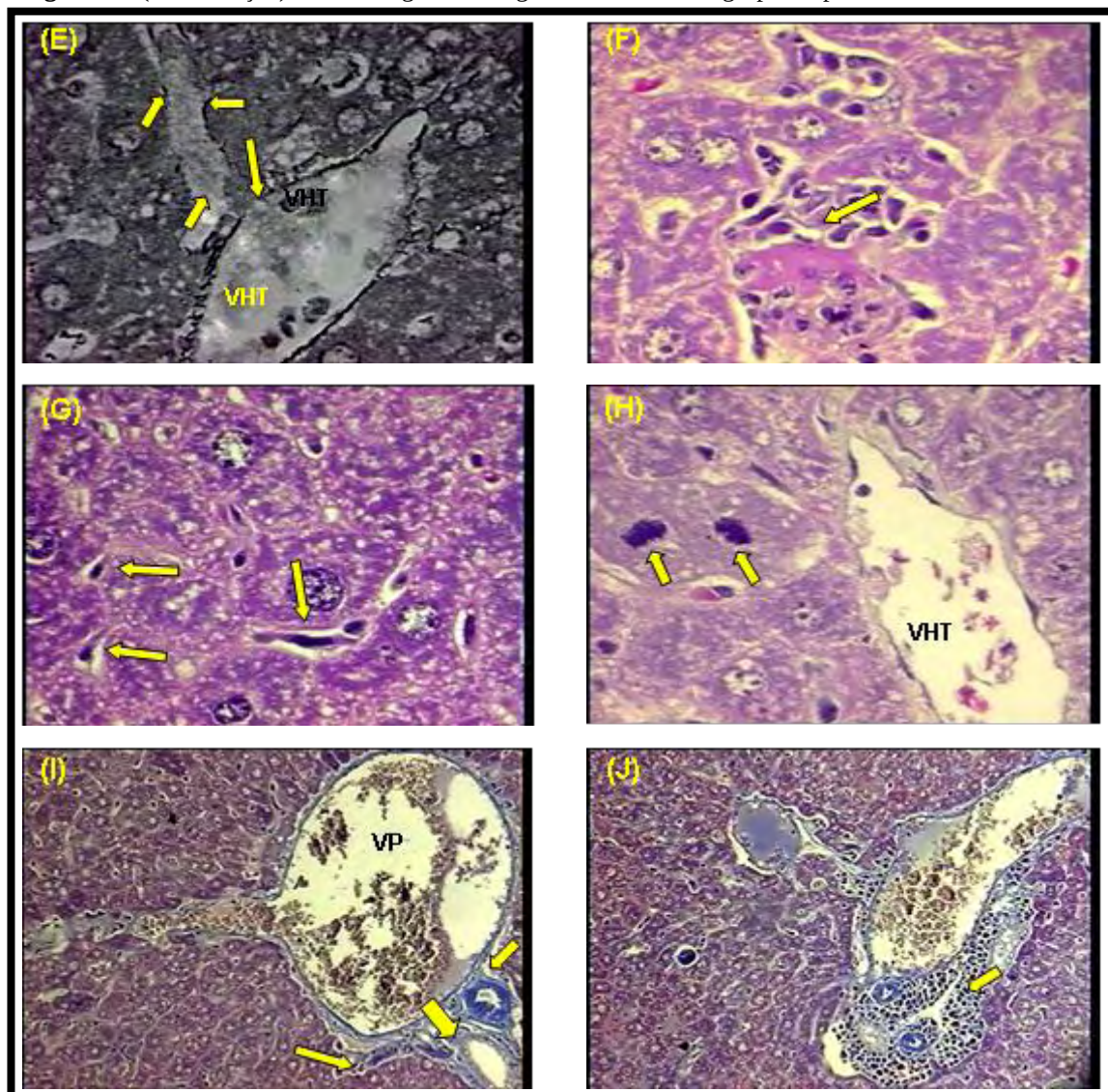
Figura 8 – Fotomicrografia do fígado dos diferentes grupos experimentais.



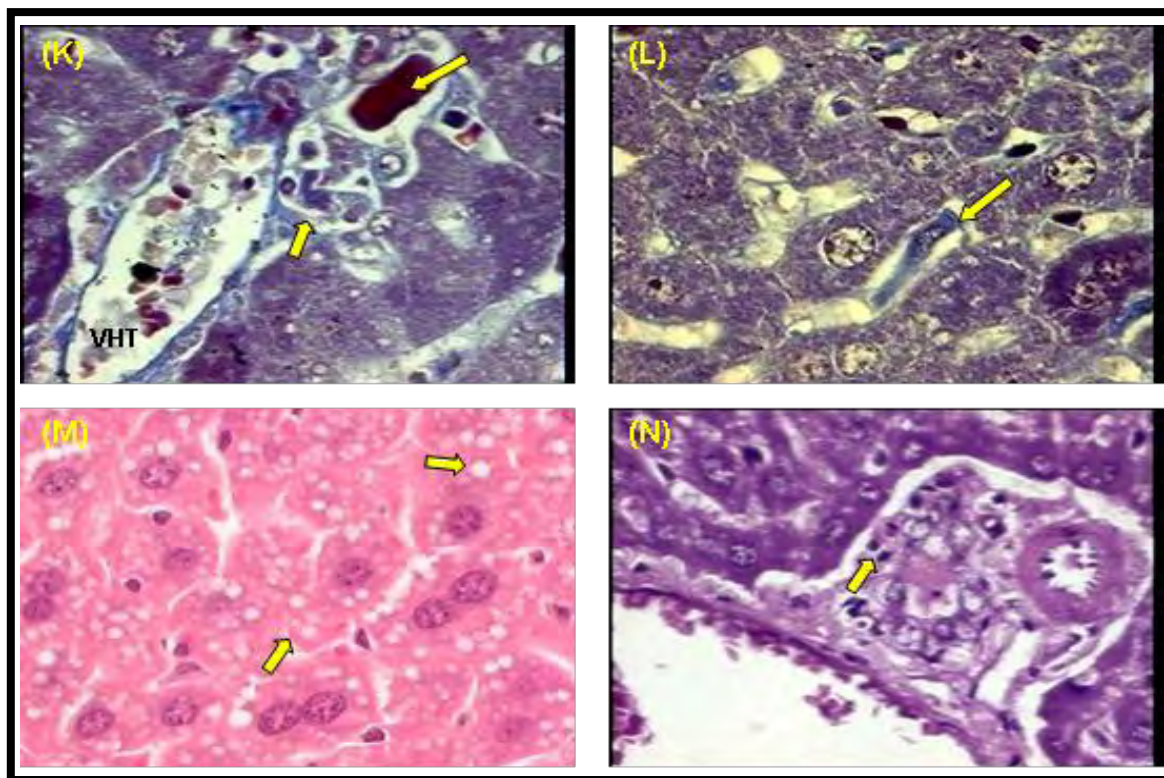
(A) Controle transplantado: Espaço portal com ramo da veia porta (VP), ramo da artéria hepática (seta longa), ducto biliar (seta curta) e sinais de portite (seta grossa) representados por infiltração linfomonocitária; **(B)** Parênquima hepático com sobrecarga lipídica macrovesicular e microvesicular (setas

longas) em zona III (ZIII) do ácino hepático; **(C)** Arquitetura lobular preservada, apresentando veia hepática terminal (VHT) e espaço portal (seta curta) regularmente distribuídos. Sobrecarga lipídica em hepatócitos na zona I (ZI), zona II (ZII), zona III (ZIII); **(D)** Sobrecarga lipídica macrovesicular e microvesicular (setas longas) em zona III do ácino hepático. **A** – H.E. x100; **B** – H.E. x400; **C** – Tricrômico de Masson x 100; **D** -Tricrômico de Masson x 400.

Figura 8 – (Continuação) Fotomicrografia do fígado dos diferentes grupos experimentais.

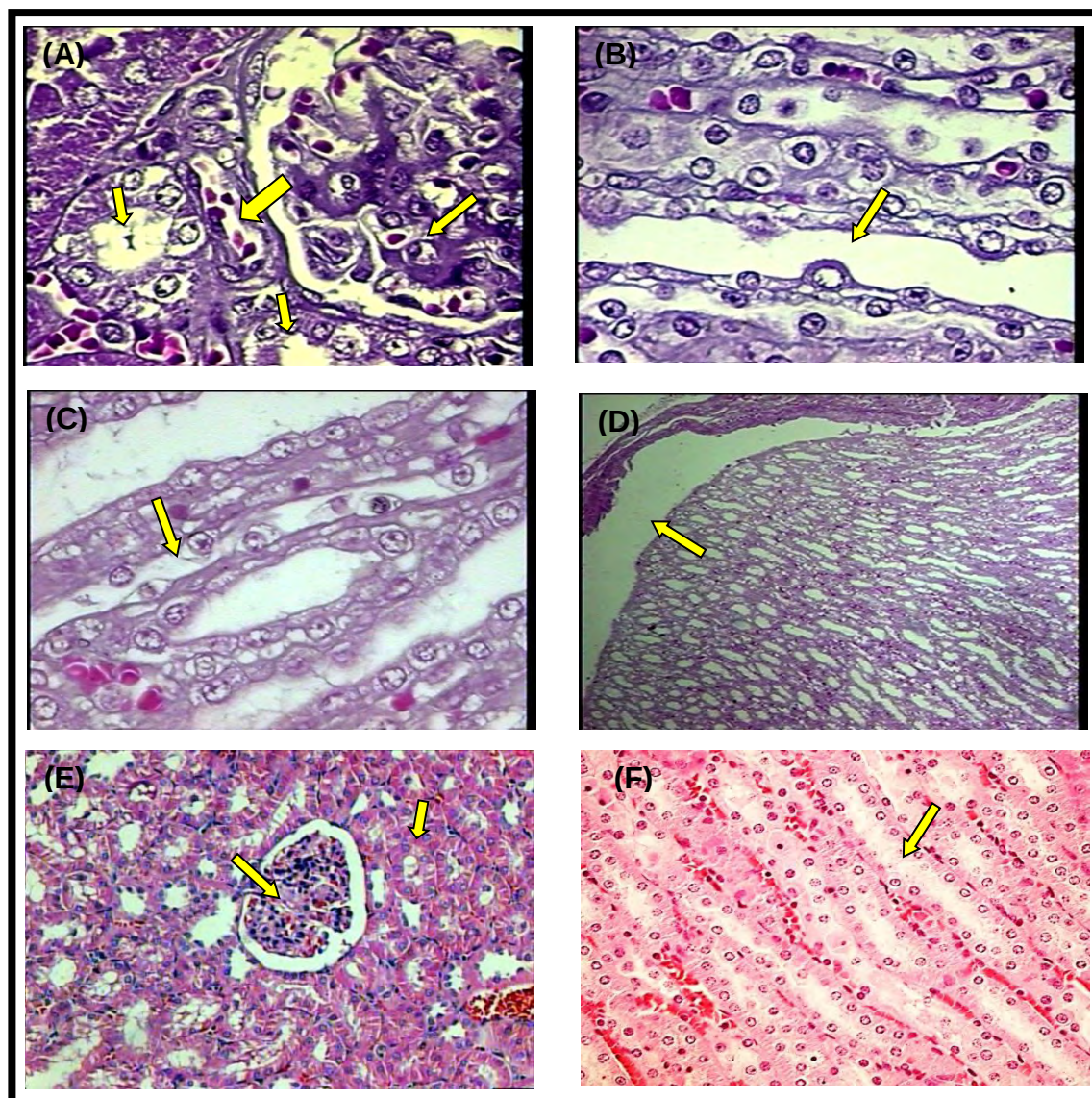


(E) Controle transplantado: Veia hepática terminal (VHT) permeável ao sinusóide (seta longa) apresentando trama reticulínica bem distribuída (setas curta); **(F)** Foco de necrose hepatocelular, destacando-se corpo apoptótico (seta longa). **(G)** Hipertrofia de células de Kupffer (seta longa); **(H)** Veia hepática terminal (VHT), destacando-se atividade mitótica (setas curtas); **(I) O.E.X. (100mg/kg):** tríade vasculobiliar habitual: (VP), ramo da artéria hepática (seta curta), ducto biliar (seta grossa) com escassos linfócitos matriciais residentes (seta longa); **(J)** Espaço portal com exsudação linfomonocitária matricial (seta longa). **F, G, H**– H.E. x400; **E** - Método de Gordon e Sweet, x100; **I, J** - Tricrômico de Masson x 100.

Figura 8 – (Continuação) Fotomicrografia do fígado dos diferentes grupos experimentais.

(K) O.E.X. (150mg/kg): Foco de necrose lobular com destaque para corpo apoptótico (seta longa) associado a exsudação inflamatória (seta curta) em zona III, margeando a veia hepática terminal; **(L)** Hipertrofia de célula de Kupffer em zona II do ácino hepático (seta longa); **(M) 5-FU (25mg/kg):** Esteatose macrovesicular e microvesicular em zona II do ácino hepático (setas curtas); **(N)** Espaço porta com matriz conjuntiva laxa, contendo escassos linfócitos residentes (seta curta). **K, L** -Tricrômico de Masson x 400; **M, N** – H.E. x400.

Os rins removidos dos animais dos grupos controle transplantado e tratados com 5-FU e O.E.X., nas doses de 100 e 150 mg/kg, apresentaram-se dentro dos limites da normalidade histológica, demonstrando lobos bem definidos pela pirâmide medular e tecido cortical recobrendo a sua base e lados. Artérias e veias interlobares regularmente distribuídas, com lóbulos contendo raios medulares, tecido cortical adjacente e arteríolas interlobulares. Glomérulos (corpúsculo de Malpighi) preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowman e o tufo capilar sustentado por delicado mesângio. A região medular foi representada por túbulos contorcidos proximais e túbulos contorcidos distais em continuidade com as alças de Henle, sendo revestidos por epitélio cilíndrico simples, sem particularidades histológicas. Partes delgadas e curvilíneas das alças de Henle estavam revestidas por células achatadas. Túbulos coletores direcionados para as papilas, delineados por células altas, com citoplasmas claros (anfófilicos), tendo tecido fibroconjuntivo interveniente delicado (Figura 9).

Figura 9: Fotomicrografia dos rins dos diferentes grupos experimentais.

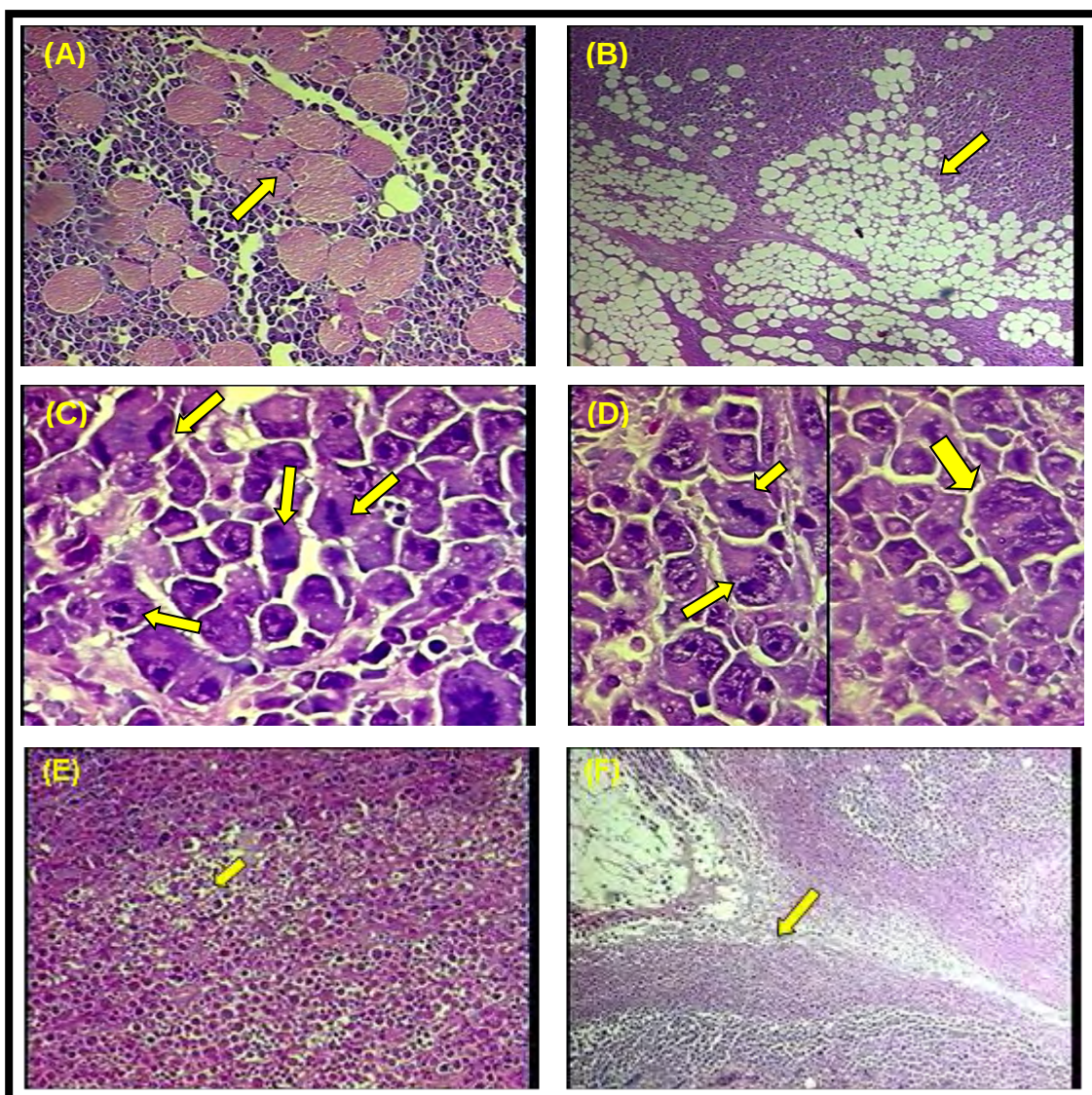
(A) Controle transplantado: Glomérulo renal com cápsula de Bowman fina e tufo capilar sustentado por mesângio delicado (seta longa), margeado por arteríola (seta grossa) e túbulos contorcidos proximais (seta curta); **(B)** Alças de Henle revestidas por epitélio cubóide simples cujas células mostram núcleos vesiculares e citoplasma anfofílicos (seta); **(C) O.E.X. (100mg/kg):** Alças de Henle preservadas (seta); **(D)** Sistema pielocalicial com pirâmide medular direcionada para o cálice (seta); **(E) O.E.X. (150mg/kg):** Glomérulo renal com cápsula de Bowman fina (seta longa) e tufo capilar sustentado por mesângio delicado e túbulos contorcidos preservados (seta curta); **(F) 5-FU (25mg/kg):** Túbulos coletores preservados (seta). **A, B, C e F** – H.E. x 400; **E** – H.E. x 100; **D** – H.E. x 25.

Na microscopia, as formações teciduais (tumoriais) dos animais transplantados S180 foram identificadas como neoplasia maligna de limites marginais irregulares e infiltrativos, com ampla invasão para o tecido adiposo circunjacente, alcançando e dissecando grupos de fibras do tecido muscular esquelético. Apresenta configuração sólida, lobulada, com septos

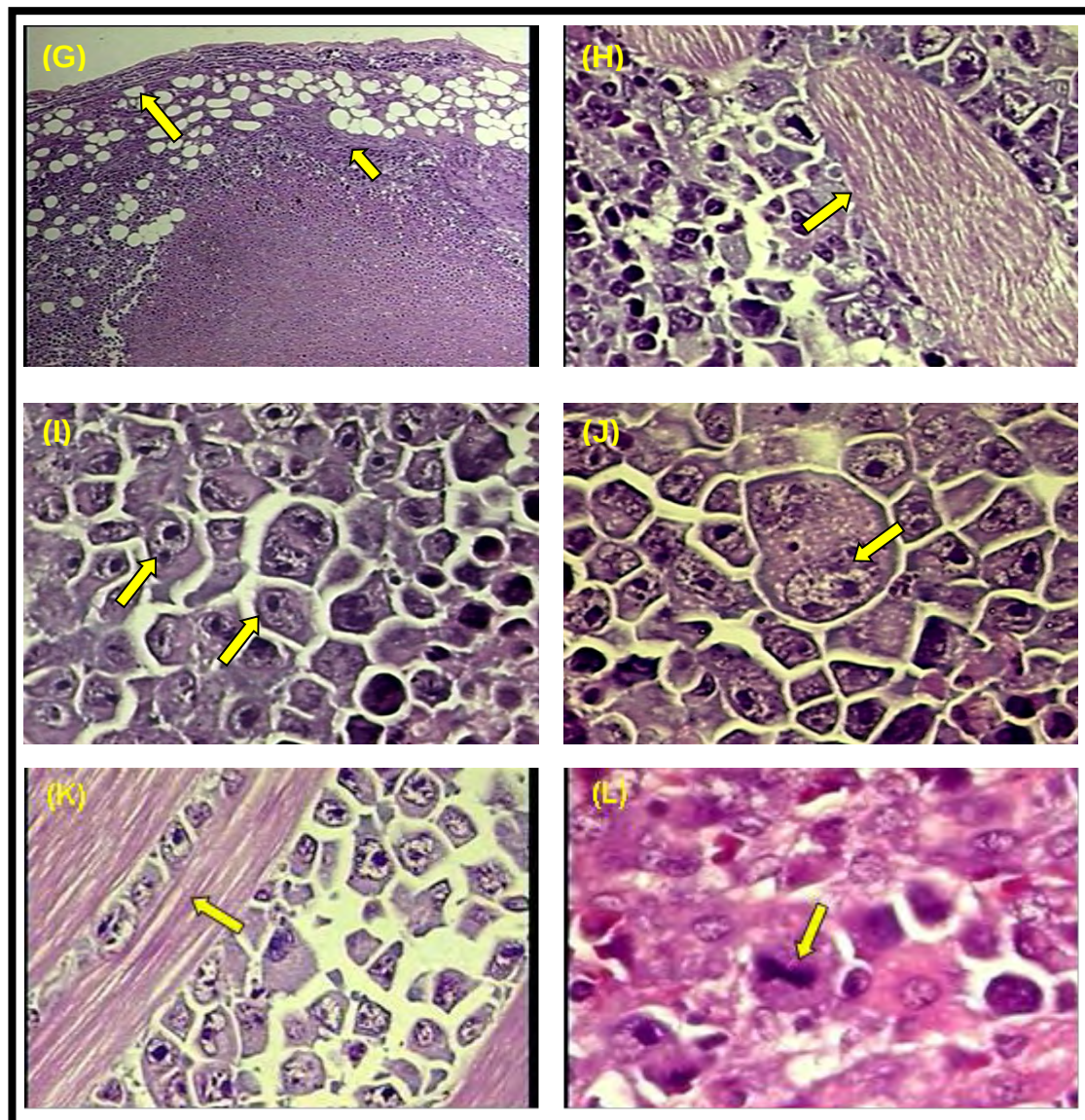
finos de tecido fibrocolagênico, estroma intratumoral escasso, observando-se áreas de desmoplasia discreta, principalmente em áreas próximas à necrose tumoral, proliferação de células imaturas, pequenas ou de tamanhos medianos, de formatos irregulares, sendo algumas bizarras, multinucleadas e gigantes. Identificou-se também a presença de células neoplásicas, isoladas, com formatos em girino. Essas células exibem citoplasmas eosinofílicos, de limites nítidos, núcleos hipercromáticos ou vesiculares com cromatina grosseira, ovalados ou pleomórficos, com nucléolos proeminentes. Ainda foi observado infiltração tecidual, áreas de necrose tumoral coagulativa (cerca de 40 %), distribuição da desmoplasia e mitoses assimétricas (cerca de cinco por campo de grande aumento) (Figura 10).

Nos animais do grupo tratado com 5-FU, os tumores apresentaram 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 das margens cirúrgicas do espécime tumoral analisado, envolvido pela neoplasia. Tal linfonodo mostrou-se íntegro, com características hiporreativas (folículos linfóides, esparsos e pequenos), não havendo transgressão de sua cápsula, nem invasão do parênquima. A reação desmoplásica apresentou-se em nível moderado, com áreas de necrose correspondentes a cerca de 60 % do crescimento neoplásico. As mitoses assimétricas, por sua vez, contabilizavam cerca de três por campo de grande aumento (Figura 10).

Os tumores tratados com o O.E.X. nas doses de 100 e 150 mg/kg apresentaram aspectos arquiteturais e citológicos da neoplasia similares aos descritos no grupo dos animais transplantados. As particularidades do grupo tratado com o O.E.X. na dose de 100 mg/kg foram infiltração do tecido adiposo e muscular bem limitada/ diminuídas em relação ao grupo controle transplantado, áreas de necrose tumoral coagulativa - cerca de 30 %, mitoses assimétricas - cerca de três por campo de grande aumento e desmoplasia discreta nas áreas próximas à necrose tumoral. Nesses animais foi demonstrado envolvimento tumoral do tecido conjuntivo perineural, de filetes isolados, cuja estrutura fibroneural mostrou-se preservada. Já os tumores tratados com o O.E.X. na dose de 150 mg/kg, tiveram como particularidades a infiltração do tecido adiposo e muscular bem limitada, semelhante ao O.E.X. 100 mg/kg, áreas de necrose tumoral coagulativa - cerca de 40 %, mitoses assimétricas - cerca de três por campo de grande aumento, além de desmoplasia discreta nas proximidades das áreas necróticas (Figura 10).

Figura 10: Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais.

(A) Controle transplantado: sarcoma pleomórfico – invasão do tecido muscular esquelético (seta); **(B)** Extensa infiltração tumoral do tecido adiposo (seta); **(C)** Intenso pleomorfismo celular e múltiplas mitoses atípicas (setas longas); **(D)** Anaplasia celular incluindo formas girinóides (seta longa), mitose (seta curta) e gigantismo celular (seta grossa); **(E)** Extensa área de necrose coagulativa tumoral (seta curta); **(F)** **O.E.X. (100mg/kg):** Faixas de necrose tumoral (seta). **A, B, E**– H.E. x 400; **C, D** - H.E. x 100; **F**- H.E. x 25.

Figura 10: (Continuação) Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais.

G) O.E.X. (100mg/kg): Neoplasia com delimitação periférica (seta longa), infiltração limitada de tecido adiposo (seta curta); **(H)** Infiltração perineural (seta) e mitose; **(I) O.E.X. (150mg/kg):** Pleomorfismo celular - anisocitose, núcleos volumosos com nucléolos proeminentes (setas); **(J)** Pleomorfismo celular (gigantismo); **(K)** Células neoplásicas dissecando fibras do tecido muscular esquelético (seta); **(L) 5-FU (25mg/kg):** Atividade mitótica (seta). **G** - H.E. x 25; **H, I, J, K, L** - H.E. x 400.

5.3.4 Genotoxicidade

Para avaliar em sangue periférico de camundongos, o possível efeito genotóxico *in vivo* do O.E.X. foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado está apresentado na Tabela 8. O tratamento dos animais com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.X. não induziu

um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico quando comparados ao grupo controle (5 % Tween 80).

Tabela 8 – 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
Controle	-	6	2000	4,33 ± 0,61
Ciclofosfamida	50	6	2000	26,00 ± 5,01 ^a
O.E.X.	100	6	2000	2,67 ± 0,21
O.E.X.	150	6	2000	4,17 ± 0,48

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

No campo da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, a especialidade oncológica tem despertado o interesse de muitos, devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente e eficaz. No contexto atual, o câncer é uma das maiores causas de morte no mundo, configurando-se como um dos principais problemas de saúde pública. É uma doença crônico-degenerativa que afeta várias dimensões da vida humana e causa importante impacto econômico na sociedade, necessitando de tratamento especializado prolongado e oneroso. Além disso, é responsável pela redução do potencial de trabalho humano e perda de muitas vidas (TONON; SECOLI e CAPONERO, 2007).

As doenças tumorais neoplásicas vêm sendo indicadas como a terceira causa *mortis* mais frequente no Brasil. Assim, as doenças cardiovasculares, o câncer e as causas externas são, conjuntamente, responsáveis por 73% dos óbitos (MACHADO e MELO-JUNIOR, 2009). No nosso país, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam para 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 (BRASIL, 2011).

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

Estudos recentes demonstram que uma variedade de substâncias químicas isoladas de plantas apresenta alguma atividade terapêutica. E muitas dessas substâncias tiveram como base para sua descoberta estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos (RODRIGUES, 2001; TREVISAN et al., 2006).

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

et al., 2008). O estudo dos óleos essenciais e os seus componentes, uma vez verificada na literatura sua vasta variedade de atividades biológicas, inclusive com elevada potência, traz um cenário propício para a obtenção de novos produtos com atividade antitumoral (BEZERRA, 2009).

O óleo essencial das folhas de *X. frutescens* foi obtido por hidrodestilação. Pela análise em CG-EM foi possível identificar 44 componentes em uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos. Cariofileno (23,91 %) foi o constituinte majoritário, seguido do γ -cadineno (12,87 %). Foi detectada a presença do espatulenol (3,97 %) que é considerado um marcador de óleos essenciais do gênero *Xylopi*a (MAIA et al., 2005). A composição química apresentada na tabela 1 é compatível com dados da literatura para constituintes voláteis de espécies de *Xylopi*a que é caracteristicamente de monoterpenos e sesquiterpenos (MAIA et al., 2005). Silva e Grotta (1975) encontraram a porcentagem (volume/massa) de 0,80 de óleo essencial da amostra do pó das folhas de *X. frutescens*, e dentre os 13 componentes identificados em análise cromatográfica, destacam-se o cariofileno, limoneno, linalol e geraniol (substâncias utilizadas na indústria de perfumaria), além do alfa e beta pinenos, corroborando com nossos achados.

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

Um balanço entre a atividade biológica *versus* a toxicidade de uma determinada substância é um parâmetro fundamental para verificar sua aplicação farmacológica. Toxicidade é um evento complexo expresso em um largo espectro de efeitos, que variam desde simples morte celular até mudanças metabólicas complexas como neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade, onde não há morte celular necessariamente, mas sim alterações funcionais. Além da eficácia, a segurança de medicamentos fitoterápicos é de suma importância, pois pouco se sabe sobre o potencial tóxico de muitas plantas que são usadas na medicina tradicional (EISENBRAND et al., 2002).

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

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

Uma correlação muito positiva entre o teste de letalidade com *Artemia salina* e citotoxicidade foi estabelecida por pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos obtidos de plantas no Instituto Nacional de Câncer nos Estados Unidos (ANDERSON et al. 1991). Essa correlação é considerada tão boa que a triagem frente ao microcrustáceo é recomendada pelos pesquisadores como um *pré-screen* eficaz para existência de citotoxicidade *in vitro* (ANDERSON et al., 1991; QUIGNARD et al., 2003).

McLaughlin (1991) também tem utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais (MEYER et al., 1982; RUPPRECHT; HUI e MCLAUGHLIN, 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 reforça a idéia de que esse método pode ser uma ferramenta útil para triagem na pesquisa de drogas antitumorais (ANDERSON et al., 1991, DA COSTA et al., 2010).

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

Segundo Meyer e colaboradores (1982) substâncias que apresentam valores de Concentração Letal Média - CL₅₀ menores que 1.000 µg/mL são consideradas bioativas. O valor de CL₅₀ obtido para o O.E.X. no bioensaio com *A. salina* foi menor que 1.000 µg/mL

($CL_{50} = 180,7 \mu\text{g/mL}$), indicando que esse produto é um possível candidato a agente antitumoral, tendo em vista a boa correlação entre este bioensaio e a citotoxicidade *in vitro* (Gráfico 1).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou investigar a possível atividade anticâncer do O.E.X. Para tanto, avaliou-se sua atividade citotóxica, frente células da linhagem murina sarcoma 180. A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. O sistema MTT, usado para medir a atividade metabólica de células viáveis, é quantitativo e sensível. Por causa da relação linear entre atividade celular e absorbância, o crescimento ou taxa de morte de células pode ser mensurado (ATCC, 2001). O resultado do ensaio mostrou que o O.E.X. reduziu o crescimento de células sarcoma 180, de forma dependente de concentração, apresentando um valor de CI_{50} de $216,6 \mu\text{g/mL}$, o que caracteriza uma fraca atividade citotóxica para o referido óleo na linhagem utilizada. Entretanto, outras linhagens de células, incluindo linhagens humanas, bem como outros ensaios de citotoxicidade devem ser realizados para melhor definir esse efeito (Gráfico 2).

Trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Laboratório da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP, utilizando o óleo essencial da casca da raiz de *X. frutescens*, demonstrou que o mesmo apresentou atividade citotóxica bastante pronunciada frente diferentes linhagens tumorais humanas: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); PC-3 (próstata); HT-29 (colorretal); K562 (leucemia mielóide crônica), cujos valores de TGI (*Total Growth Inhibition*) - concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento foram, respectivamente, $67,5 \mu\text{g/mL}$, $73,0 \mu\text{g/mL}$, $109,2 \mu\text{g/mL}$, $89,3 \mu\text{g/mL}$, $68,3 \mu\text{g/mL}$, $87,5 \mu\text{g/mL}$, $66,8 \mu\text{g/mL}$ (dados não publicados). Considerando que o óleo essencial obtido da casca da raiz da mesma espécie do nosso estudo demonstrou citotoxicidade significativa frente linhagens tumorais humanas, é possível que o O.E.X., também venha a demonstrar atividade citotóxica frente às linhagens supracitadas, haja vista a possível semelhança entre os óleos no tocante a quimiotaxonomia, ou seja, é possível o encontro dos mesmos constituintes químicos nos óleos, mesmo que em proporções diferentes. Entretanto, estudos para caracterização do óleo essencial da casca da raiz de *Xylopia frutescens* estão sendo realizados pelos colaboradores da fitoquímica, os professores doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares, para que possamos proceder a uma comparação acurada entre os constituintes químicos presentes nos referidos óleos.

Esse resultado vem corroborar com o valor de CL_{50} obtido no bioensaio com *A. salina*, já que substâncias que possuem CL_{50} inferiores a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ são possíveis candidatas à droga antitumoral, o que reforça a necessidade de estudos utilizando linhagens tumorais humanas.

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).

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

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

A partir deste fato, é possível inferir que a estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um indicador para avaliação da citotoxicidade de uma droga em estudo frente células não tumorais do organismo, fornecendo por meio de seus resultados indícios para uma possível toxicidade *in vivo* (AKI e YAMAMOTO, 1991; SHARMA e SHARMA, 2001; SILVA, 2007). Eritrócitos também fornecem um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou situações associadas ao estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células não tumorais *in vivo* (APARICIO et al., 2005; LEXIS; FASSETT e COOMBES, 2006; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2006).

Partindo dessas premissas, avaliou-se a citotoxicidade do O.E.X. em células não tumorais por meio do ensaio de citotoxicidade com eritrócitos de camundongos *Swiss*.

O valor de CH_{50} obtido (63, 87 $\mu\text{g/mL}$) demonstra que o O.E.X. foi muito ativo contra eritrócitos, células estas comumente afetadas nos tratamentos com agentes antineoplásicos (Gráfico 3). Desse modo, O.E.X. pode ser caracterizado como um produto hemolítico, propriedade essa confirmada por Medeiros (1982), que realizou testes hemolíticos com o extrato do caule dessa espécie observando hemólise em 2-3 minutos e com o extrato das folhas, observando hemólise em 6 minutos a 1 hora. Tal efeito foi relacionado a presença de

esteroides, alcaloides e taninos no extrato do caule e esteroides, flavonoides e taninos no extrato das folhas.

Magalhães (2010), Costa-lotufo e colaboradores (2005), demonstraram que o mecanismo de citotoxicidade de compostos com capacidade de induzir lise de eritrócitos em concentrações abaixo de 200 µg/mL, está relacionado a danos na membrana eritrocitária.

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

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

É evidente que para que se possa precisar uma possível atividade oxidativa do O.E.X. sobre eritrócitos murinos, são necessários outros experimentos que investiguem esta atividade em especial, não realizados neste trabalho. Contudo, recentes estudos mostram que em células eucarióticas, óleos essenciais podem agir como prooxidantes afetando as membranas internas e organelas como a mitocôndria. Dependendo do tipo e concentração, eles exibem efeitos citotóxicos nas células vivas, mas são geralmente não-genotóxicos (BAKKALI et al., 2008).

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

Apesar de alguns trabalhos destacarem atividades biológicas de *X. frutescens*, dentre as quais, atividade antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária, estudos do potencial

antitumoral *in vitro* em diferentes linhagens celulares, bem como estudos de atividade antitumoral *in vivo* não são relatados na literatura para o óleo essencial obtido das folhas dessa espécie. Assim, partiu-se para a investigação da atividade antitumoral *in vivo* do O.E.X.

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

Após sete dias de tratamento, o O.E.X. inibiu o crescimento tumoral *in vivo*, reduzindo o peso do tumor de forma significativa. Adicionalmente, não houve diferença significativa entre a inibição causada pela maior dose (150 mg/kg) e àquela provocada pelo tratamento com o quimioterápico 5-FU (Gráfico 4). Tal resultado evidencia, portanto, uma potente atividade antitumoral *in vivo* para o produto natural testado.

A ação de um fármaco, quando administrado a humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica. Nota-se que a fase farmacocinética pode ter profundo impacto sobre o efeito farmacológico, uma vez que os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção determinam a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco no seu local de ação (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Tradicionalmente, a pesquisa de fármacos concentra seus esforços iniciais na fase farmacodinâmica. Triagens preliminares usam modelos *in vitro*, tais como enzimas, receptores ou tecidos, para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista. A partir destes estudos, triagens secundárias e terciárias frequentemente são dirigidas à administração do composto a animais, por via oral ou intravenosa, com observação do efeito farmacológico. Entretanto, muitos dos compostos que se mostram promissores nos testes *in vitro* podem não apresentar boa atividade em animais, todavia, efeito inverso também pode ocorrer. Esta falha de correlação, muitas vezes pode está associada a problemas farmacocinéticos dos compostos, como baixa biodisponibilidade, duração de ação (muito curta ou muito longa), ou a presença de metabólitos ativos, podendo levar a programas clínicos de sucesso ou mesmo mal-sucedidos (PEREIRA, 2007).

O conhecimento da cinética da formação dos metabólitos ativos é importante não apenas para previsão do resultado terapêutico, mas também para explicar a toxicidade de um dado fármaco. Podemos imaginar que, durante o curso de um tratamento, uma variedade de metabólitos circulantes, ativos ou inativos, bioformados em diferentes quantidades e velocidades relativas, estará presente em indivíduos que fazem uso de medicamentos. Fica

claro que a capacidade metabólica de cada indivíduo influencia grandemente esta complexa cinética e pode resultar em diferentes respostas terapêuticas (SILVA, 2006; PEREIRA, 2007).

Diante do exposto, podemos afirmar que o fraco efeito citotóxico do O.E.X. frente a linhagem tumoral sarcoma 180 em ensaio *in vitro* não indica que o mesmo venha a ser ineficaz quando avaliado em modelos *in vivo*. Prova disso são os resultados encontrados em nosso estudo, onde o óleo apresentou atividade antitumoral *in vivo* significativa e potente, sugerindo que alguns metabólitos podem estar sendo biotransformados em compostos ativos.

O O.E.X. mostrou-se como uma mistura complexa de constituintes voláteis do tipo mono e sesquiterpenos, o que pode estar ligado ao potencial efeito supressor de tumor dessa espécie, uma vez que, constituintes presentes no óleo em estudo são descritos na literatura por apresentarem significativa atividade antitumoral, a saber, o constituinte majoritário cariofileno, cuja atividade pode ser conferida também ao seu óxido-derivado, que exibiu citotoxicidade considerável frente células tumorais humanas (H1299 e HepG2). A referida substância, constituinte majoritário dos óleos de *A. panurensis* e *L. martiniana* também demonstrou atividade anticarcinogênica, corroborando com nossos achados (XYAO et al., 2006; ALCÂNTARA et al., 2010). Em estudo realizado com o extrato bruto das folhas de *C. verbenacea* foi verificada a presença dos sesquiterpenos α -humuleno e beta-cariofileno, que por sua vez, demonstraram efeito antiproliferativo e indução de apoptose em células tumorais além de exibir significativa inibição da expressão da enzima COX-2 em células MCF-7. Vários estudos já demonstraram clara correlação positiva entre a inibição da expressão da COX-2 e apoptose (SMITH et al., 2000). Tais coconstituintes também demonstraram capacidade citotóxica em células A-549, DLD-1, M4BEU, HeLa, Bel-7402 e CT-26 (LEGAULT et al., 2003; SYLVESTRE et al., 2005; SYLVESTRE et al., 2006). Silva; Figueiredo e Yano (2007) obtiveram efeito antiproliferativo do β -cariofileno isolado do óleo volátil de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam quando testados em cultura de células de tumor ascítico de Ehrlich. Alguns estudos reforçam o envolvimento de sesquiterpenos no efeito antiproliferativo, uma vez que estes trabalhos demonstraram que o α -humuleno inibe a proliferação de células A-549, DLD-1 e LNCaP (LEGAULT et al., 2003; LOIZZO et al., 2007) e que o β -cariofileno exerce efeito antiproliferativo sobre células K562. Outros estudos relacionam a presença de sesquiterpenos com a atividade pró-apoptótica, como por exemplo um estudo realizado em células de melanoma humano (SK-MEL-28), onde o β -cariofileno isolado das folhas de *Ricinus communis* exerceu efeito pró-apoptótico (DARMANIN et al., 2009). Outros sesquiterpenos, como o elemeno e o cadineno também são relatados por suas propriedades anticarcinogênicas (DUH et al., 2002; MACIEL et al., 2002). β -elemeno

mostrou-se eficaz contra uma vasta gama de tumores, tendo apresentado supressão de células HL-60 e parada do ciclo celular na fase G2M e S, reduzindo a atividade proliferativa de células tumorais ao induzir apoptose. Além disso, é também responsável por antagonizar células de glioblastoma e células A549 pela indução de apoptose (ZHAO et al., 2011; LIU et al., 2012). O monoterpene mirceno, por sua vez, presente no óleo essencial de *Pituranthos tortuosus* demonstrou atividade citotóxica frente linhagens tumorais humanas como a HepG2, HCT116 e MCF-7 (ABDALLAH e EZZAT, 2011). Outros monoterpenos como o alfa-pineno e o espatulenol, também encontrados no O.E.X. são relatados na literatura por demonstrarem atividade citotóxica frente células de adenocarcinoma renal e células do tipo kB (ALCÂNTARA et al., 2010; RIGANO et al., 2011).

Sendo assim, as plantas contêm inúmeros constituintes, e seus óleos essenciais e/ou extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL et al., 2002). Diante desse fato, o O.E.X. pode ser considerado uma fonte em potencial de substâncias biologicamente ativas contra o câncer, permitindo sugerir que o efeito antitumoral demonstrado tenha decorrido da mistura de constituintes químicos presentes, em especial, ao cariofileno, seu componente majoritário.

Dentre os tratamentos usados para o combate das neoplasias encontra-se a quimioterapia, que tem por função principal eliminar as células malignas que formam o tumor. Seu tratamento atua de forma sistêmica, em que os medicamentos agem indiscriminadamente nas células do paciente, estejam elas normais ou cancerosas, produzindo efeitos adversos bastante desagradáveis e comprometedores. Resultado disso é o aparecimento de efeitos colaterais, os quais dependem do agente quimioterápico, da dosagem, da duração do tratamento e das drogas que acompanham a resposta individual. O conhecimento dessas reações se faz necessário afim de que seja possível ter subsídios para prestar assistência nutricional adequada a esses pacientes, muitas vezes, prevenindo possíveis complicações decorrentes do tratamento (SCHEIN et al., 2006).

A partir dessas colocações, objetivou-se também a investigação de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos do O.E.X. em estudo.

Sinais de toxicidade sistêmica podem ser definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais. Além da redução do desenvolvimento ponderal, a toxicidade sistêmica se manifesta através da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pelos

arrepiados. Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (CUNHA et al., 2009).

O estudo toxicológico pré-clínico de um produto é uma etapa inicial importante para seu uso seguro na saúde humana e ambiental, pois visa a caracterização dos efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações para os pesquisadores clínicos sobre as doses capazes de provocar efeitos tóxicos em animais de laboratório (ALMEIDA, 2006). O ensaio toxicológico agudo permite conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte, além de avaliar as lesões em órgãos específicos através dos exames anatomopatológicos. 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 (LARINI, 1999, BARROS e DAVINO, 2003).

Desse modo, na avaliação de alterações comportamentais, observou-se que o O.E.X. apresentou efeito estimulante central, demonstrado pela observação de intensa hiperatividade nos animais tratados com as doses (375 e 500 mg/kg). Tal achado é corroborado por estudos que demonstram que a casca aromática de *X. frutescens* é usada popularmente com várias atividades, como carminativa, afrodisíaca e estimulante (REVILLA, 2002).

Outra alteração digna de nota se refere ao quadro de cianose apresentado pelos animais tratados com a maior dose (500 mg/kg). É provável que o efeito cianótico observado tenha decorrido do quadro de hipóxia produzido pelo produto natural, uma vez que o mesmo apresentou acentuado efeito hemolítico. Segundo Bukowska e Kowalska (2004), pode ocorrer hemólise devido a oxidação da hemoglobina, formando metahemoglobina. A principal característica da metemoglobinemia (MetHba) é a cianose central, que não responde à oxigenoterapia, podendo levar à diminuição da oferta de oxigênio (DO₂). A hipóxia tecidual provocada pela MetHba é consequência da diminuição da hemoglobina livre para transportar O₂ (anemia relativa), bem como da dificuldade de liberação de O₂ para os tecidos (NASCIMENTO et al., 2008). Conforme dito anteriormente, experimentos adicionais são necessários para descobrir o exato mecanismo responsável pelo efeito hemolítico do óleo em estudo.

Dentre os parâmetros utilizados para avaliação da segurança de um produto, merece destaque a avaliação de risco, que é um processo científico que define os componentes do risco com precisão, geralmente em termos quantitativos, calculando a probabilidade de

ocorrência de um determinado evento. Cientistas se valem, dessa avaliação para estabelecer a probabilidade de ocorrência de um efeito nocivo. O processo de avaliação de risco apresenta várias fases, dentre elas a identificação do perigo (avaliação da toxicidade) e o estabelecimento da relação dose-resposta. No processo de estabelecimento da relação dose-resposta, um passo fundamental na maioria das metodologias de avaliação do risco é a utilização dos parâmetros NOAEL e LOAEL, considerados a principal abordagem usada em avaliações baseadas em limiar de risco. Geralmente objetivam determinar não a dose segura em animais de laboratório, mas a dose segura para humanos. Sendo assim, a extrapolação de dados de animais para humanos utilizando fatores de incerteza na avaliação de risco fornece uma margem de segurança adicional para a proteção da população (ETTLIN et al., 2010; SEO et al., 2011). Os valores de NOAEL e LOAEL para o O.E.X. definidos nesse estudo foram respectivamente, 250 e 375 mg/kg para ambos os animais experimentais de ambos os sexos. Portanto, a disponibilidade desses marcadores precoces de toxicidade para a monitorização dos seres humanos vem conferir segurança adicional para estudos clínicos.

Todavia, 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 e SNA, são necessárias para obtermos maiores conclusões sobre os dados observados.

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 analisados nos estudos de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* para investigação da toxicidade da droga em estudo sobre o sistema gastrintestinal, são o consumo de alimentos e a avaliação ponderal.

Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, os animais tratados com ambas as doses do O.E.X. e com o 5-FU tiveram uma redução do peso corporal e do consumo de ração quando comparados ao grupo controle transplantado (Tabela 3).

O 5-fluorouracil (5-FU), um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia do câncer (DIASIO e HARRIS, 1989), tem um importante papel no tratamento do câncer de cólon e é usado por pacientes com câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço (PETERS e KÖHNE,

1999). É um antimetabólito que interfere na duplicação e transcrição do DNA. Embora o mecanismo de ação desse fármaco ainda não tenha sido completamente elucidado é provável que seja pela ligação do fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado (FdUMP), um metabólito da droga à timidilato sintetase, inativando-a, portanto, impedindo a síntese das timinas e consequentemente a síntese do DNA. Um segundo mecanismo é a incorporação de outro metabólito da droga, o Furd (5-fluorouridina), ao RNA (ácido ribonucléico) mensageiro no momento de sua transcrição, no lugar da uracila, formando, assim, um falso RNA (NOORDHUIS et al., 2004; PANDOLFO et al., 2005). As reações adversas mais destacadas para este quimioterápico são mielossupressão, náusea, vômito, diarreia, anorexia, perda de peso, mucosite, estomatite, alopecia, fotossensibilidade, hiperpigmentação, hemorragias nos pulmões e intestinos (HEIDELBERGER et al., 1958; ESPÍRITO SANTO, 2006; EL-SAYYAD et al., 2009).

Como já mencionado, esses efeitos sobre o trato gastrointestinal podem ser observados no tratamento com a maioria dos antineoplásicos atualmente utilizados na clínica médica. Tais efeitos podem, portanto, estar relacionados ao catabolismo da doença ou ao seu tratamento, sendo motivados seja por mecanismo direto sobre os neurotransmissores determinantes do Sistema Nervoso Central - SNC ou mecanismo indireto influenciando os receptores do trato gastrointestinal com a liberação de neuromoduladores que agiriam complementarmente em nível central (SCHEIN et al., 2006).

A diminuição do ganho de massa corpórea e consumo de ração nos animais tratados com o O.E.X., pôde ser visto também 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.

Não coincidentemente, os mesmos grupos que apresentaram uma redução significativa no consumo de alimentos, também apresentaram uma redução significativa no peso dos animais quando comparados ao controle transplantado, corroborando a correlação entre toxicidade gastrointestinal *versus* anorexia *versus* perda de peso (Tabelas 3 e 4).

É notória a incessante busca de fármacos eficientes, que tenham baixa toxicidade e, consequentemente, causem o mínimo de efeitos colaterais.

De modo geral, os rins são os primeiros alvos de danos tóxicos das drogas, dos xenobióticos ou dos produtos químicos, estando envolvidos em muitas funções corporais críticas, uma vez que os mesmos possuem um alto fluxo sanguíneo circulante, pois são os órgãos que filtram o sangue e devido à presença de transportadores de íons nas células epiteliais que compõem o néfron, sendo este sua unidade morfofisiológica (PFALLER e

GSTRAUNTHALER, 1998). Os rins também possuem função endócrina e são essenciais para a eliminação dos produtos de degradação (HENRY, 2008).

A alteração da função renal é uma das consequências mais comuns de toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos (HENRY, 2008). Vários fármacos são capazes de causar lesões nefrotóxicas. Estudos apontam esses efeitos indesejados em animais e humanos de substâncias como aintinflamatórios não esteroidais, antibióticos do tipo aminoglicosídeos, cefalosporinas e tetraciclina e vários antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica, como o metotrexato, docetaxel, cisplatina, dentre outros (PFALLER e GSTRAUNTHALER, 1998; BEZERRA, 2008; KOROLKOVAS, 2010;).

Os compostos nitrogenados não protéicos (NPN) são formados no organismo como resultado do catabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Concentrações elevadas dos principais componentes NPN (uréia, creatinina e ácido úrico) ocorrem como consequência da função renal reduzida, desse modo, a avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de uréia e creatinina (PFALLER e GSTRAUNTHALER, 1998).

A uréia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da uréia hepática. É filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos dutos coletores juntamente com a água (GROSS; WEHRLE e BUSSEMAKER, 1996). A creatinina, por sua vez, é um produto da degradação da creatina muscular. É uma substância que também é filtrada pelo glomérulo, mas que não é reabsorvida pelos túbulos renais. O processo de secreção tubular da creatinina é insignificante, de modo que a quantidade excretada de creatinina representa sua quantidade real filtrada. Dessa forma, a capacidade renal de filtrar esse metabólito representa um importante parâmetro para avaliação da função glomerular (PEREIRA, 1998; BRENNER e LEVINE, 2004).

Dentro desse contexto, ao ocorrer 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.

Com o tratamento com o O.E.X. e com o 5-FU, os valores de uréia e creatinina demonstraram alterações quando comparados ao grupo controle sadio, sendo evidenciada uma diminuição significativa. Tendo em vista que danos renais não foram evidenciados no exame histopatológico, pois a função renal permaneceu preservada ao longo do tratamento com o óleo, é sugestivo que a ingesta deficiente de alimentos por parte dos animais tratados tenha ocasionado a redução dos níveis de uréia (Tabela 5). Chalansani e colaboradores (1997)

destacam que a produção de uréia é afetada pela ingestão de proteína e pela taxa de síntese; desse modo, a diminuição do consumo de proteínas, portanto, uma nutrição deficiente levam a valores plasmáticos reduzidos deste produto, enquanto os estados catabólicos (queimaduras) e cargas elevadas de proteína, bem como sangramento do trato gastrointestinal superior causam seu aumento. De acordo com Silva et al. (2005) a alimentação recente pode contribuir para valores elevados de uréia no sangue, este mesmo autor encontrou valores médios de uréia no soro sanguíneo de $57,3 \pm 5,4$ mg/dL em animais de pequeno porte criados em cativeiro que tiveram o sangue coletado após a morte. Tais valores são semelhantes aos encontrados em nosso estudo para os animais do grupo controle sadio, o que pode ser justificado pelo ganho de massa corpórea por parte dos mesmos (Tabela 5). Mas, é importante deixar claro que, sendo a uréia sintetizada no fígado, a hepatopatia avançada frequentemente está associada com níveis plasmáticos de uréia reduzidos (LUM e LEAL-KHOURI, 1989). Entretanto, tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da uréia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da uréia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina (BEZERRA et al., 2008; MELO-DINIZ, 2000).

Como dito anteriormente, a creatinina é um composto nitrogenado não protéico formado a partir da desidratação da creatina. A interconversão de fosfocreatina e creatina é uma característica particular do processo metabólico da contração muscular. Uma parte da creatina livre no músculo não participa da reação e é convertida espontaneamente em creatinina. Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008).

A taxa de produção da creatinina está relacionada à massa muscular, à atividade muscular e à ingestão de creatina na carne, bem como à ingestão total de proteínas; essas variáveis também interferem nas concentrações plasmáticas de creatinina (RAHN; HEIDENREICH e BRUCKNER, 1999). As elevações em cada uma das variáveis aumentam a creatinina plasmática, enquanto as reduções levam à concentração plasmática reduzida. A creatinina é excretada na circulação em uma taxa relativamente constante. Uma fração substancial da excreção da creatinina nos rins é resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. A creatinina sérica elevada, portanto, está associada com uma redução da taxa de filtração glomerular (HENRY, 2008). Existe uma variação diária relativamente pequena da creatinina em um indivíduo saudável, com variação média de aproximadamente 5 % (KEEVIL et al., 1998). Desse modo, pequenas alterações nos limiares de creatinina em uma pessoa servem como

marcadores sensíveis de alterações na função renal se outras causas de alteração da creatinina puderem ser eliminadas (HENRY, 2008). Sendo assim, a dosagem de creatinina é um importante sinalizador clínico, já que a queda da filtração glomerular com consequente elevação da taxa de creatinina plasmática implica na perda da função renal (BERNE e LEVY, 2006).

Segundo Megan (1998); Soares e colaboradores (2002) o valor sérico da creatinina influencia na massa muscular, na nutrição e na ocorrência de edema. Então, como os resultados encontrados evidenciam valores de creatinina reduzidos nos animais transplantados quando comparados ao grupo controle sadio, os mesmos podem ser indicativos de debilitação ou de massa muscular reduzida (Tabela 5). Dessa forma, como houve uma significativa perda de peso nos animais tratados e sendo a creatinina a principal reserva de energia muscular, seus valores reduzidos podem ser justificados pela diferença ponderal observada entre os animais tratados.

Em suma, os valores diminuídos de uréia e creatinina encontrados nesse estudo podem ser justificados por McKinnell e Holt (2007), que reforçam a informação de que níveis séricos de uréia e creatinina podem ser enganosos em pacientes com doença hepática, uma vez que valores baixos também podem ser encontrados em quadros de déficit nutricional (especialmente a ingesta de proteína), síntese de uréia deficiente e reduzida massa muscular, características essas apresentadas pelos animais experimentais. Desse modo, descarta-se, o efeito hepatotóxico grave, tendo em vista que não foram observadas alterações hepáticas graves no estudo histopatológico.

Dentre os parâmetros bioquímicos utilizados, as provas de função hepática desempenham importante interesse, pois diversas substâncias são extensamente biotransformadas pelo fígado. Comumente, na clínica dos pequenos animais, são detectadas anormalidades nas atividades séricas das enzimas hepáticas, as quais são consideradas indicadores sensíveis de perturbações hepatobiliares. Elevações nas atividades séricas enzimáticas podem dever-se a alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, indução de enzimas microssomais ou lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular. Diversos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, devido à variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático. Por definição, as transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino (SHARON e CENTER, 1995).

Como células metabolicamente complexas, os hepatócitos contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática. No hepatócito, as enzimas comumente medidas são encontradas em localizações específicas; o tipo de lesão hepática determina o padrão de alteração enzimática. 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 (HENRY, 2008). 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 (ZHOU et al., 1998). Os principais marcadores de lesão celular são as enzimas citoplasmáticas e mitocondriais, que não são específicas dos hepatócitos, e podem estar aumentadas com lesão em outros órgãos (HENRY, 2008). Desse modo, apesar da AST ser encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias das células hepáticas, ela também é encontrada no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. Quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. Já a ALT é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma dos hepatócitos, o que torna o seu aumento mais específico de lesão hepática (JORGE, 2006).

A velocidade de excreção das transaminases é variável, a AST elimina-se mais rapidamente do que a ALT. Os efeitos tóxicos de substâncias podem atingir todos os sistemas e órgãos, porém é o fígado que paga o maior tributo, provavelmente devido a dois fatores importantes: a sua posição anatômica, que o torna mais vulnerável e o seu próprio determinismo funcional, que condiciona maior concentração celular, não apenas dos compostos a serem transformados, como também dos metabólitos resultantes (VASCONCELOS et al., 2007).

O fígado é, portanto, o maior e mais complexo dos órgãos internos, envolvido com a síntese de proteínas plasmáticas, lipídios e lipoproteínas, mas também tem função na reserva de energia, síntese de vários hormônios (HENRY, 2008). Dessa forma, assim como os rins, o fígado é um órgão susceptível aos efeitos dos antineoplásicos.

A administração do O.E.X. nos animais experimentais não mostrou alteração significativa nos níveis de ALT, todavia, resultou em um aumento significativo da atividade da AST em ambos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle sadio, todavia, indício enzimático de comprometimento hepático induzido pelo óleo, não pode ser confirmado, pois além de não ter sido observado aumento concomitante de ALT, não foi demonstrada alteração significativa da atividade da AST quando comparada ao grupo controle transplantado (Tabela 4). A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80 % da AST está presente na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT. Valores aumentados de AST também podem significar distrofia muscular progressiva (inclusive no músculo cardíaco) e embolia pulmonar, além de outras condições clínicas, como na gangrena, esmagamento muscular, enfermidades hemolíticas, dermatomiosite, colangite (inflamação dos ductos biliares) e infecção por parasitas (MELO-DINIZ, 2000). Desse modo, o aumento da AST pode também ser justificado pela acentuada atividade hemolítica produzida pelo composto, uma vez que, a AST está grandemente distribuída com altas concentrações, dentre outros locais, nos eritrócitos. Estudos demonstram que há aumento da AST e da lactato desidrogenase e diminuição da haptoglobina pela ruptura dos eritrócitos no interior dos vasos sanguíneos, dados esses que corroboram com os nossos resultados (FIGHERA, 2007).

Também foi observado um aumento de AST em todos os animais do grupo controle transplantado, quando comparados ao grupo controle sadio. Este aumento pode estar relacionado a danos provocados pela massa tumoral sobre um ou mais tecidos onde a AST pode ser encontrada, como por exemplo, o músculo esquelético. O implante e o crescimento do tumor na região subaxilar provocou trauma mecânico que invadiu músculo esquelético ocasionando liberação de AST. Já com os animais tratados com o 5-FU, essa alteração nos níveis de AST não foi observada, o que pode ser justificado pela potente atividade supressora de tumor desta droga, que por sua vez, não permitiu que houvesse dano muscular capaz de liberar AST.

O hemograma é um importante aliado dos estudos de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes e que podem limitar a utilização de fármacos e medicamentos; alterações hematológicas podem refletir, também, na atividade imunológica

(MEDEIROS et al., 2009). O hemograma é constituído pelas informações quantitativas (número total de células, contagem diferencial, índices hematimétricos) e qualitativas (morfologia do esfregaço sanguíneo), sendo composto de duas partes: o Eritrograma e o Leucograma (LOPES e CUNHA, 2002).

Compreendem-se no eritrograma o número total de hemácias, a concentração de hemoglobina, volume globular e proteínas plasmáticas (LOPES e CUNHA, 2002). Compreende-se no leucograma a contagem total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos (KERR, 2003). O leucograma raramente é patognomônico em determinada moléstia, entretanto as informações obtidas podem ser úteis na elaboração de diagnóstico diferencial, na avaliação da gravidade da doença e o fornecimento do prognóstico (LATIMER e MEYER, 1992).

Pacientes portadores de doenças neoplásicas apresentam alta frequência de anormalidades das células sanguíneas. Uma diminuição nos níveis de hemoglobina e hemácias é uma complicação comumente observada em pacientes oncológicos. Frequentemente pode não existir sinais de infiltração neoplásica da medula óssea, perdas sanguíneas, hemólise, distúrbios endócrinos, renais ou hepáticos, nem de deficiências nutritivas que justifiquem a anemia. Quando nenhum desses fatores estiver presente, a anemia pode dever-se, exclusivamente, à presença do próprio tumor (MAGALHÃES et al., 2010).

A anemia no paciente com câncer é, de longa data, considerada como achado comum do ponto de vista de sinal e relativamente pouco importante do ponto de vista de sintoma. Ainda nos dias atuais se dá pouca importância para o tratamento da anemia nos pacientes com câncer, uma vez que sintomas relacionados à anemia, sobretudo fadiga e letargia, são frequentemente subestimados e subvalorizados ou atribuídos unicamente como consequência da doença neoplásica ou do tratamento quimioterápico instituído. Dependendo da doença neoplásica, a frequência de anemia varia entre 20,0% e 60,0% (CANÇADO, 2007).

Os resultados obtidos demonstram que o implante do tumor, por si só, não foi capaz de reduzir significativamente o número de hemácias, a quantidade de hemoglobina e os valores do hematócrito, como se observa comparando os dados para o grupo controle transplantado com sarcoma 180 em relação ao controle sadio. Em contrapartida, nos animais tratados com ambas as doses do óleo foram evidenciadas alterações significantes nos parâmetros hematológicos supracitados em relação ao grupo controle sadio e ao 5-FU (Tabela 6). Esse resultado mostra que a supressão das células sanguíneas ocorrida, embora não justificada pela presença do próprio tumor, deva-se ao tratamento com o O.E.X. Recente estudo prospectivo analisando mais de 15.000 pacientes com câncer de 24 países europeus observou que entre os

pacientes que não apresentavam anemia no início do estudo, 63% tornaram-se anêmicos com o tratamento quimioterápico e/ou radioterápico (CANÇADO, 2007).

Desse modo, a indução de toxicidade em nível de células sanguíneas observada, pode ser corroborada com a capacidade deste produto natural em produzir danos à membrana eritrocitária, tendo em vista que, o aumento da destruição de hemácias (hemólise) induz a produção de hemácias (eritropoiese) caracterizada pela hiperplasia eritroblástica na medula óssea e pela anemia e reticulocitose no sangue. O desequilíbrio entre destruição e produção de hemácias é a causa da anemia, resultando em diminuição do número de hemácias, da concentração de hemoglobina e do valor do hematócrito (VERRASTRO; LORENZI e NETO, 1996).

Além da atividade hemolítica, outro mecanismo desencadeador da anemia pode ser a resposta medular inadequada, caracterizada pela incapacidade da medula óssea em aumentar sua atividade eritropoética suficientemente para compensar a menor sobrevivência das hemácias. Isso se deve, basicamente, à secreção inapropriadamente baixa de eritropoetina (EPO), à diminuição da resposta da medula óssea à EPO e à diminuição da eritropoese conseqüente à menor oferta de ferro à medula óssea (CANÇADO, 2007).

Entretanto, como esses efeitos sobre as células sanguíneas podem ser observados no tratamento com a maioria dos antineoplásicos atualmente utilizados na clínica médica, não se trata de uma característica negativa específica desse produto natural.

A análise do número de eritrócitos, valor da hemoglobina, hematócrito e as várias relações entre eles fornecem os chamados índices hematimétricos que permitem interpretar pelos valores encontrados no hemograma as variações da série vermelha (VERRASTRO; LORENZI e NETO, 1996).

Quando o parâmetro avaliado foi a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) das hemácias, não foram observadas alterações nos grupos tratados com o óleo, todavia, quando o índice hematimétrico avaliado foi o Volume Corpuscular Médio (VCM) foi observada alteração no grupo tratado com o 5-FU, quando este foi comparado aos grupos tratados com o O.E.X. e com o grupo controle sadio. Desse modo, como foi observada alteração considerável no número de eritrócitos do grupo tratado com o 5-FU quando comparado aos grupos tratados com o óleo, a alteração no valor do VCM pode ser justificada, já que o mesmo é definido pela relação que existe entre o volume globular obtido (hematócrito) e o número de eritrócitos. No entanto, a Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) teve um aumento significativo no grupo tratado com a dose de 150 mg/kg do O.E.X., assim como no grupo tratado com o 5-FU quando comparados ao grupo controle transplantado. O grupo tratado

com o 5-FU também apresentou um aumento no valor do CHCM quando comparado ao grupo controle sadio (Tabela 6). Presume-se que esta alteração seja decorrente do tratamento com os produtos, pois não guarda relação com o processo tumoral por si só. Diante desse fato, a causa específica para o aumento dos valores de CHCM necessita de maiores esclarecimentos.

Alterações consideráveis no número global de leucócitos com modificações na contagem diferencial também foram observadas nesse estudo.

A inoculação do tumor, por si só, é capaz de causar uma reação leucemóide nos animais transplantados, caracterizada por granulocitose e esplenomegalia (KODAMA; SENDO e KOBAYASHI, 1974; SATO et al., 2005; LINS et al., 2009). Esses resultados demonstram que o tumor sarcoma 180 modifica significativamente o parâmetro leucócito. Sendo assim, os dados obtidos nesse estudo corroboram com esses achados, uma vez que, animais inoculados com sarcoma 180 mostraram um aumento significativo no número de leucócitos totais circulantes quando comparados com os animais sadios (Tabela 6).

Após o tratamento com o óleo o parâmetro leucócitos totais permaneceu inalterado quando comparado com o grupo controle transplantado, porém foi observada alteração significativa quando comparado ao 5-FU e ao controle sadio (Tabela 6).

Um dos riscos da quimioterapia e radioterapia no tratamento de pacientes com câncer é o desenvolvimento de leucopenia (diminuição do número de leucócitos), a qual substancialmente aumenta o risco de infecções (TAKIGUCHI et al., 2001; BEZERRA et al., 2008). No tratamento com 5-FU foi possível evidenciar uma leucopenia acentuada, efeito colateral já conhecido deste antineoplásico, em contrapartida, o tratamento com o óleo promoveu uma leucocitose, dado esse que pode ser justificado pelo aumento acentuado da percentagem de neutrófilos que foi observada nos grupos transplantado e tratados com ambas as doses do O.E.X., quando comparados ao grupo controle sadio. Tal alteração é característica de casos de necrose tecidual e presença de tumores (LOPES; BIONDO e SANTOS, 2007). Além disso, 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). Adicionalmente, estudos recentes têm demonstrado que o heme é uma molécula pró-inflamatória capaz de induzir a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*. Esses achados atestam um papel proeminente para heme livre no desenvolvimento de inflamação associada com doenças hemolíticas. Desse modo, a neutrofilia observada é reforçada pela atividade hemolítica produzida pelo produto em estudo (ARRUDA et al., 2004). Contrariamente, o 5-FU demonstrou redução da percentagem de neutrófilos e porcentagem de linfócitos aumentada, todavia, tais efeitos já eram esperados para este quimioterápico.

Um aumento significativo no percentual de monócitos também foi observado no grupo controle transplantado e nos grupos tratados com as doses de 100 e 150 mg/kg quando comparados ao grupo tratado com o 5-FU. O significativo aumento desse parâmetro nos camundongos transplantados pode ser justificado pela simples inoculação do tumor que induz danos e inflamação local, o que estimula o aumento no número de monócitos uma vez que a fagocitose é requerida. Em contrapartida, foi observada diminuição na percentagem de linfócitos e eosinófilos no sangue periférico de animais do grupo controle transplantado e tratados com o O.E.X. quando comparados com o grupo sadio tratado apenas com 5 % de Tween-80 (Tabela 6). A principal função do timo é fornecer o ambiente adequado para a diferenciação, seleção e maturação de linfócitos T, a partir de células progenitoras migrantes da medula óssea. Nesse caso particular, tendo ocorrido redução do índice de timo após o tratamento com o óleo essencial em estudo, o efeito linfopênico observado pode então ser justificado, uma vez que, o timo é reconhecido como um sítio de produção de linfócitos (LIMA e CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Já o estresse crônico provoca a liberação de glicocorticóides endógenos, principalmente cortisol, substância imunossupressora que causa eosinopenia com neutrofilia, linfopenia e monocitose. Glicocorticóides causam eosinopenia por vários mecanismos, dentre eles, aumentando fagocitose de eosinófilos pelos macrófagos, bem como, reduzindo a produção de eosinófilos da medula óssea (BUSH, 2004). Desse modo, a presença do tumor nos animais transplantados pode está provocando situações de estresse, que por sua vez, é refletido pelo leucograma de estresse classicamente caracterizado pela neutrofilia, linfopenia, monocitose e eosinopenia observada nos animais do nosso estudo (MEYER; COLES e RICH, 1995).

O sistema imune é uma rede composta por órgãos, células especializadas e moléculas solúveis que têm a finalidade de reconhecer os elementos estranhos ao organismo e elaborar uma reação, ou resposta imune específica, dirigida a esses antígenos, com a finalidade de eliminá-los do organismo e preservar a saúde. A degeneração ou atrofia de órgãos imune podem influenciar a função normal desse sistema. 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 (LIMA e CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

O baço serve como reservatório para sangue e filtra ou purifica o sangue e linfa que flui através dele. Quando o baço sofre danos ou é removido, o indivíduo é mais susceptível à infecções (YU et al., 2007). O timo é um órgão linfóide primário, essencial para o estabelecimento inicial de um repertório funcional de células T em humanos (LIMA e

CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). Em animais adultos, está envolvido no estabelecimento e restauração das funções imunes, em particular a produção e desenvolvimento de linfócitos. Assim, o timo fornece resistência contra o desenvolvimento de tumores em animais (OGISO et al., 1976).

Os resultados obtidos mostram que o índice de baço aumentou significativamente em animais inoculados com sarcoma 180, quando comparados com animais não transplantados sadios, dados estes que corroboram com Lins et al. (2009), que mostra um aumento no índice de baço e timo, acompanhado por supra regulação de granulócitos em animais inoculados com sarcoma 180.

O tratamento com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.X. provocaram uma redução significativa no índice do baço, quando comparado ao grupo controle transplantado e no índice de timo, quando comparado ao grupo controle sadio, indicando um efeito imunossupressor nessas condições. Adicionalmente, observou-se que o 5-FU, droga de uso corrente na clínica médica, também apresentou um efeito imunossupressor. Tal efeito foi mais pronunciado do que o efeito produzido pelo O.E.X., tendo sido demonstrada diminuição dos índices de baço e timo quando comparados com o grupo controle transplantado e ao controle sadio, respectivamente. Portanto, os dados mostram que o O.E.X. e o 5-FU são capazes de causar imunossupressão (Tabela 7).

Entretanto, faz-se necessário destacar que os tumores em si podem contribuir para a imunossupressão: pacientes com câncer montam respostas imunes adaptativas contra os tumores. No entanto, os tumores desenvolvem mecanismos eficazes para fugirem da imunovigilância. A morte de células T causada por tumores desempenha um papel fundamental no estabelecimento desta imunotolerância (LU e FINN, 2008).

É sabido que agentes antitumorais, como o 5-FU, causam significativa involução do baço e timo (BEZERRA et al., 2008). Eichhorst et al. (2001) mostraram que 5-FU causa apoptose em diferentes tipos celulares como hepatócitos e células do sistema imune, como os timócitos e esplenócitos.

Dados da literatura 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), corroborando com os resultados do presente trabalho, onde os animais tratados com 5-FU tiveram seus índices de fígado reduzidos quando comparados ao grupo controle transplantado, evidenciando hepatotoxicidade. O mesmo resultado foi observado nos grupos tratados com as

dose de 100 e 150 mg/kg do O.E.X., demonstrando também efeito hepatotóxico, corroborado pela análise histopatológica, todavia, as alterações hepáticas apresentadas pelo O.E.X. representam hepatotoxicidade de baixo grau, ou seja, são de pequena proporção e raras, indicando reversibilidade com o fim do tratamento (Tabela 7).

A análise histopatológica dos fígados dos animais de todos os grupos experimentais revelou, portanto, a presença de fígado reacional que pode ser consequência local de um efeito sistêmico, produzido pela neoplasia, ou pode ser mediada por administração de drogas. No presente estudo, tal reação hepática foi caracterizada pela presença de focos esparsos de necrose lobular e hiperplasia das células de Kupfer (Figura 8). Os animais experimentais apresentaram também sobrecarga hepatocelular lipídica (esteatose macrovesicular e microvesicular), discreta e panlobular (Figura 8), lesão de etiologia metabólica, geralmente reacional à terapia medicamentosa, porém de natureza reversível e com rápida melhora após a descontinuidade do tratamento (VASCONCELLOS et al., 2007). A esteatose geralmente é resultante de alterações fisiopatológicas crônicas, envolvendo aumento da síntese hepática, oxidação deficiente e redução da secreção hepática de lipídios, todavia, pode também ocorrer associada a diversas outras condições clínicas, como diabetes, rápida perda de peso e hiperlipidemia (LEWINSKI, 2012). Sendo assim, a esteatose observada nos animais desse estudo pode ter sido induzida ou favorecida por períodos de carência alimentar e/ ou desnutrição, corroborada pela diminuição da massa corpórea dos mesmos. Na inanição há falta tanto de aminoácidos como de colina na dieta. O aminoálcool colina é indispensável para síntese de fosfolípidos. Pode ser sintetizada no organismo, mas isto exige uma reação de transmetilação envolvendo a metionina, que é um aminoácido essencial. Portanto, a falta de metionina se traduz em deficiência de colina. Como os triglicérides não podem ser empacotados em VLDL (*very low density lipoprotein*), não podem ser exportados, e acumulam no hepatócito dando esteatose (LEWINSKI, 2012). Estudos demonstram que gotículas hialinas podem representar alterações no metabolismo e síntese de proteínas, devido a insucessos no processo de transcrição. Falhas na transcrição e síntese de proteínas podem estar relacionadas a alterações lipídicas de maior gravidade devido a alterações na síntese de lipoproteína necessária para a liberação e transporte de lipídios a partir dos hepatócitos (RAMÍREZ-DUARTE; RONDÓN-BARRAGÁN e ESLAVA-MOCHA, 2008). Outra hipótese para a instalação do quadro de esteatose nos animais seria o estresse oxidativo. Estudos indicam que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos importantes na gênese da esteatose. O mesmo seria consequência do aporte aumentado de ácidos graxos livres ao fígado, excedendo assim a capacidade oxidativa da mitocôndria hepática. Esta geração

excessiva de partículas reativas de oxigênio, em última instância, causaria a lipoperoxidação de membranas. Os metabólitos da lipoperoxidação da membrana do hepatócito (como o malonaldeído) e as partículas reativas de oxigênio são importantes agentes pró-inflamatórios que parecem ativar as células de ITO, favorecendo a fibrogênese (OLIVEIRA, 2012). Baseado nessa hipótese é evidente a necessidade de realizar experimentos que investiguem o papel do estresse oxidativo na gênese da esteatose em camundongos, todavia, os mesmos não foram realizados no presente trabalho.

Os animais tratados com o 5-FU sofreram um dano hepático maior que os tratados com ambas as doses do óleo. Conforme já mencionado, as lesões dos grupos tratados com o óleo são relatadas na literatura como evidência de fraca hepatotoxicidade em que a retirada da droga ou ajuste de dose geralmente conduz a uma rápida melhora e reversão dos danos (VASCONCELLOS et al. 2007). Adicionalmente pode-se dizer que o fígado é um órgão com alta capacidade regenerativa e adaptativa e até mesmo quando áreas de necrose por coagulação do parênquima, como as observadas no fígado dos animais tratados com o O.E.X., estão presentes, mas o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é completa (KUMMAR; ABBAS e FAUSTO, 2004).

A análise histopatológica não evidenciou alterações nos rins dos animais tratados com o O.E.X. e com o 5-FU (Figura 9), demonstrando uma baixa toxicidade do composto 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 (Tabela 5).

No tocante a neoplasia de região axilar desenvolvida nos animais experimentais, foi revelada sua malignidade, de modo a enquadrá-la no contexto de um sarcoma pleomórfico, com intensa celularidade caracterizada por anaplasia, anisocitose, gigantismo, nucléolos proeminentes e cromatina grosseira. A histopatologia do sarcoma 180 demonstrou, portanto, seu comportamento agressivo local, com invasão de tecido adiposo, músculo esquelético e feixes neurais, além da incapacidade de formar metástases corroborando com relatos da literatura (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982) (Figura 10).

Com relação à atividade mitótica observou-se, redução do número de células em mitose por campo, sugerindo um efeito citotóxico tanto para o grupo tratado com o 5-FU quanto para o grupo tratado com ambas as doses do O.E.X., tendo em vista que a contabilização de tais células foi semelhante para ambos os grupos (3 mitoses por campo). No tratamento com o óleo essencial também foi demonstrada áreas de necrose tumoral com

extensão de cerca de 40 % (150 mg/kg), reforçando sua característica de produto natural com potencial antitumoral (Figura 10).

Ainda, faz-se necessário destacar que o tratamento com o O.E.X., com ambas as doses, produziu diminuída infiltração de tecido muscular esquelético e adiposo, em comparação com o controle transplantado e 5-FU, refletindo um crescimento tumoral menor e autolimitado, diminuindo a agressividade deste tumor maligno, além, de apresentar reação desmoplásica positiva, caracterizada como discreta (100 e 150 mg/kg do O.E.X.), comparada ao 5-FU, cuja reação foi dita moderada. Desmoplasia, por definição, se refere à produção de tecido conjuntivo, com disposição colagênica, acompanhando o desenvolvimento de diversas lesões, notadamente neoplasias. Trabalhos tem demonstrado a responsabilidade de miofibroblastos nesse processo (FURUSE et al., 2003).

Pelo grande potencial terapêutico e por despertar interesses tão diversificados, torna-se relevante a avaliação da toxicidade e genotoxicidade de produtos naturais, pois muitas substâncias derivadas de plantas podem apresentar efeitos mutagênicos. Essa avaliação é, portanto, um passo fundamental para que as indústrias farmacêuticas deliberem um novo agente terapêutico (MARSIGLIA et al., 2011).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é consequência de danos no DNA e estes danos podem ser o processo inicial da formação de neoplasias por carcinógenos químicos (VIEIRA; SANTOS e CHEN-CHEN, 2010).

Para se conhecer o potencial genotóxico e antigenotóxico de um determinado composto, existem testes de genotoxicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI et al., 2000). Esses modelos são frequentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, com os mecanismos conhecidos de ativação de proto-oncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (RIBEIRO, 2003). Dentre os métodos disponíveis para avaliação destaca-se o ensaio do micronúcleo, que detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos, quanto aneugenicidade – aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (HAYASHI et al., 2000; BONASSI; EL-ZEIN e BOLOGNESI, 2011).

A terapia anticâncer pode causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais (VIEIRA; PAULA e CHEN-CHEN, 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. Tal ensaio utiliza mamíferos que apresentam capacidade de metabolização similar aos seres humanos, a qual dificilmente pode ser reproduzida na íntegra em ensaios *in vitro* (CASTRO et al., 2004).

O aparecimento de micronúcleos nas células analisadas é uma consequência de danos cromossômicos, evidenciando claramente a manifestação de distúrbios do processo mitótico (RIBEIRO, 2003). Há uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e em humanos (AZEVEDO et al., 2003; VALADARES; CASTRO e CUNHA, 2007).

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).

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 terapêutica (Tabela 8). Tal achado é 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, 2003).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados com o óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens* Aubl. é possível concluir que:

- ✓ O O.E.X. mostrou ser bioativo frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach;
- ✓ O O.E.X. não apresentou atividade antitumoral *in vitro* frente células da linhagem murina sarcoma 180;
- ✓ O O.E.X. apresentou toxicidade considerável frente eritrócitos de camundongos Swiss;
- ✓ O O.E.X. apresentou toxicidade aguda moderada quando administrado a camundongos Swiss, todavia, esta toxicidade foi menor do que a comumente observada para antineoplásicos utilizados na clínica médica;
- ✓ O O.E.X. apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais malignas da linhagem S180;
- ✓ O O.E.X. exerceu efeito imunossupressor quando administrado na maior dose (150 mg/kg), o qual, foi similar ao efeito produzido pelo 5-FU;
- ✓ O O.E.X. não apresentou potencial genotóxico no modelo experimental avaliado;
- ✓ Portanto é possível inferir que o O.E.X. possui significativa atividade antitumoral e moderada toxicidade nos modelos experimentais avaliados, o que não representa um fator limitante para sua possível aplicabilidade terapêutica. Entretanto, são necessários estudos controlados, que possam contribuir para elucidar mais precisamente possíveis riscos do seu uso, pela população, com fins terapêuticos.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, H.M.; EZZAT, S. M. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. **Zeitschrift für Naturforsch C.**, v. 66, n.3-4, p. 143-148, 2011.

ABEL, P. D. **Water Pollution Biology**. Chichester: Ellis Horwood Ltd. Publishers, 1989.

ADAMS, J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. **Cancer Cell**, v.5, p. 417-421, 2004.

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, p. 133-138, 1991.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª edição, Artmed, Porto Alegre, p. 1313-1362, 2002.

ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 141-145, 2010.

ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Guanabara Koogan, 357p, Rio de Janeiro, 2006.

ALMEIDA, E. F. **Anatomia foliar da madeira de espécies de *Xylopia* L. (Annonaceae)**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Botânica Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2008.

ANDERSON, J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 107-111, 1991.

- ANDRADE, N. C. et al. Terpenoids of the Annonaceae: Distribution and compilation of 13 C NMR data. **Recent Research Development Phytochemistry**, v. 7, p. 1-85, 2003.
- APARICIO, R. M. et al. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.
- APTSIAURI, N. et al. Role of altered expression. of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 601, p. 123-131, 2007.
- ARAVINDARAM, K.; YANG, N. Anti-Inflammatory plant natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1103-1117, 2010.
- ARRUDA, M. A. et al. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK and NF-Kb. **Journal of Immunology**, v.173, p. 2023-2030, 2004.
- ASEKUN, O. T.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopi aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v. 75, p. 368-70, 2004.
- ASHOUR, M. L. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1079-1087, 2009.
- ATCC – “American Type Culture Colletion”. **MTT Cell Proliferation Assay. Instructions**. 2001. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/2273.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2011. 17:30:50.
- AZEVEDO, L. et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 41, p. 1671 - 1676, 2003.
- BADER, G. et al. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, v. 51, p. 414-417, 1996.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALDWIN, A. S. I. JR. Series introduction: the transcription factor NF-B and human disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.107, p. 3-6, 2001.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, SEIZE, **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Ed. Ateneu. p. 59-67, 2003.
- BARROSO, G.M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. LTC- Livros Técnicos e Científicos Ed. S. A./Ed. da Universidade de São Paulo, 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. 3106-3119, 2008.

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

BEZERRA, D. P. et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1224 – 1231, 2009.

BOAKYE-YIADOM, K.; FIAGBE, N. I.; AYIM, J. S. Antimicrobial properties of some West African medicinal plants iv. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constitutive of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae). **Lloydia**, v. 40, p. 543-545, 1977.

BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews**, v. 5, p. 769-784, 2006.

BOLZANNI, V. S. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. p. 45-61, 2002.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk, evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 93–100, 2011.

BOREL, F. et al. Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 99, p. 9819-9824, 2002.

BOYOM, F. F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1269-1275, 2003.

BRAGA, F. C. et al. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, p. 447-452, 2000.

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

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

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ 2011.

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

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

BERNE, R. M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 253p, 2006.

BIANCO, R. et al. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 290-294, 2006.

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

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

BRENNER, B. M.; LEVINE, S. A. **Brenner & Rector – The Kidney**. 7. ed. Philadelphia: Sunders Company, 2004.

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

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 117-128, 2004.

CAMPOS DA PAZ, M. **Citotoxicidade induzida pelo extrato de *Pteridium aquilinum* sobre células HSG e OSCC**. 2005. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia – Departamento de Biologia Molecular. Universidade de Brasília, 2005.

CANÇADO, R.D. Mieloma Múltiplo e anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 67-76, 2007.

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

CASTRO, D.B. et al. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochiospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.6, n. 3, p. 15-19, 2004.

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. et al. Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopi sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.701, n. 2, p. 153-163, 2010.

CAVENEY, W. K.; WHITE, R. L. The genetic basis of cancer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous. **Scientific American**, v. 272, p. 72-79, 1995.

- CHALANSANI, N.; CLARK, W. S.; WILCOX, C. M. Blood urea nitrogen to creatinine concentration in gastrointestinal bleeding: A reappraisal. **American Journal of Gastroenterology** v. 92, p. 1796-1799, 1997.
- CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N. E. A. (Ed). **Flowering Plants of Neotropics**. New York: New York Botanical Garden, p. 18-20, 2004.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. **Journal Natural Products**, v. 57, p. 1661-1669, 1994.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Colaboração de Leonan de A. Penna. Rio de Janeiro: IBDF, 6v.,1984.
- CORY, S.; ADAMS, J.M. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**, v. 2, p. 647-656, 2002.
- COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 304-309, 2005.
- 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. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- 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.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.
- CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J.; **Anticancer Agents from Natural Products**, Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2005.
- CRONQUIST, A. Na Integrated System of Classification of Flowering Plants. **New York: Columbia University Press**, p. XIII-XVIII, 1981.
- CRUZ, M. et al. Modelos experimentais em oncologia: o contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa da Pneumologia**. Vol XV, n. 4, Jul/ago, p. 669-682, 2009.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 n. 2A, p. 403-411, Abr./Jun. 2009.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.

DARMANIN, S. et al. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. **Natural Product Research**, v.23, n. 6, p.561-571, 2009.

DASH, P. **Apoptosis**. 2011. Disponível em: <<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/index.htm>>. Acesso em: 20 set. 2011. 15:30:40.

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

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

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

DENYER, C. V. et al. Isolation of Antirhinoviral Sesquiterpenes from Ginger (*Zingiber officinale*) Clive. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 658, 1992.

DETINGER, S. D. et al. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 83-91, 2006.

DE MESQUITA, M. L. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

DE-SOUZA, M. M. et al. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 365-371, 2006.

DÍAZ, C. et al. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. **Natural Product Research**, v. 22, p. 1521-1534, 2008.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DUH, C. Y. et al. New cadinene sesquiterpenoids from the Formosan soft coral *Xenia puerto-galerae*. **J Nat Prod**, v. 65, n.12, p. 1853-1856, 2002.

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

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. 129-139, 2010.

EFFERTH, T. Cancer therapy with natural products and medicinal plants. **Planta Medica**, v. 76, n.11, p. 1035-1036, 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, p. 243-248, 2001.

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

EL-SAYYAD, H. I. et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. **International Journal Biological Sciences**, v. 5, p. 466-473, 2009.

ESPÍRITO SANTO, E. A. R. **Reações adversas ao tratamento com 5-fluorouracil em pacientes portadores de câncer colorretal**. 2003. Dissertação (Mestrado) Linha de pesquisa: Farmacovigilância. Curso de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, 2003.

ETTLIN, R.A., et al. Successful drug development despite adverse preclinical findings part 1: processes to address issues and most important findings. **Journal of Toxicologic Pathology**, v.23, n.4, p. 189-211, 2010.

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

FALL, D. et al. Antiparasitic effect of Senegalese Annonaceae used in traditional medicine. **Dakar Medical Journal**, v. 48, p. 112-116, 2003.

FERREIRA, L.M.; FERREIRA, L.R.K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p.1-3, 2003.

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

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira** – v. 20 (Supl. 2), 2005.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 229-239, 2010.

FIGHERA, R. A. Anemia hemolítica em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35 (Supl 2), p. 264-266, 2007.

FLORES, M., YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, n.3, p. 337-340, 2008.

FURUSE, C. et al. Estudo imuno-histoquímico da desmoplasia em neoplasias de glândula salivar; Immunohistochemical study of desmoplasia in salivary gland neoplasms. **RPG. Revista de Pos-graduação**, v. 10, n. 1, p. 47-51, 2003.

GALEMBECK, F. et al. Indústria química: evolução recente, problemas e oportunidades. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1413-1419, 2007.

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

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

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

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 8-14, 2003.

GONZAGA, M. L. et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicine**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009.

GRANELL, S. et al. Bisbenzyltetrahydroisoquinolines, a new class of inhibitors of the mitochondrial respiratory chain complex I. **Planta Medica**, v. 70, p. 266-268, 2004.

GRINBERG, L. N. et al. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 54, p. 973-978, 1997.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.3, p. 335-343, 2007.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v. 46, p. 273-276, 1996.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Genética na escola**, Ribeirão Preto, v. 3, 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.

HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 402-408, 2004.

HAMADA, S.; SUTOU, S.; MORITA, T. et al. Evaluation of the Rodent Micronucleus Assay by a 28-Day Treatment Protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 37, p. 93-110, 2001.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building validated mouse models of human cancer. **Current Opinion Biology**, v.13, n. 6, p. 778-784, 2001.

HARRIGAN, G. G. et al. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two annonaceous plants, *Xylopi aethiopica* and *Miliusa cf. banacea*. **Journal Natural Products**, v. 57, p. 68-73, 1994.

HAYASHI, M.. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

HAYASHI, M. et al. *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.

HEIDELBERGER, C. et al. Studies on Fluorinated Pyrimidines: II. Effects on Transplanted Tumors. **Cancer Research**, v. 18, p. 305-317, 1958.

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

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs N.S., 1985.

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

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

HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethylmethanesulphonate. **Mutation Research Letters**, n. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1981.

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

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sourced. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 419-423, 2000.

HUANG, G. D. et al. Terpenoids from the aerial parts of *Parasenecio deltophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1954-1957, 2010.

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

IBUKI, Y.; GOTO, R. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1690, p. 11-21, 2004.

IGWE, S. A.; AFONNE, J. C.; GHASI, S. I. Ocular dynamics of systemic aqueous extracts of *Xylopi aethiopica* (African guinea pepper) seeds on visually active volunteers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 139-142, 2003.

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, p. 277-284, 1997.

ITOKAWA, H. Et al. Anticancer agents from natural products. Boca Raton, Florida, **Brunner-Routledge Psychology Press**, Taylor & Francis Group, p. 47-70. 2005.

IUPAC – Compendium of chemical terminology. **No-observed-adverse-effect-level (NOAEL)**. 1993. Disponível em: <<http://www.old.iupac.org/goldbook/N04208.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2011. 17:30:50.

IUPAC – Compendium of chemical terminology. **Lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL)**. 1993. Disponível em: <<http://www.old.iupac.org/goldbook/L03633.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2011. 17:35:10.

JENETT-SIEMS, K. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, p. 611-615, 1999.

JOLY, L.G. et al. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guayami Indians in western Panama. **Journal of Ethnopharmacology**, v.20, p.145-171, 1987.

JORGE, S. G. **Exames laboratoriais**. Hepcentro, 2006. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>. Acesso em: 2 dez. 2011, 17:33:30.

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

KANG, C. et al. Citotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (scyphozoan: rhizostomeae) venom. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KANNAN, K. et al. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: Activation of Apaf-1. **Oncogene**, v. 20, p. 3449–3455, 2001.

- KARIOTI, A. et al. 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. 8094-8098, 2004.
- KEEVIL, B. G. et al. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 15-35, 1998.
- KLEIN, A. et al. Different mechanisms of mitotic instability in cancer cell lines. **International Journal of Oncology** v. 29, p. 1389-1396, 2006.
- KODAMA, T.; SENDO, F.; KOBAYASHI, H. Leukemoid reaction in BALB/c mice bearing transplanted tumors. **Cancer Research**, v. 34, p. 176-180, 1974.
- KONDOH, M. et al. Kaurene diterpene induces apoptosis in human leukemia cells partly through a caspase-8-dependent pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 1, 2004.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Pathology Basis of Disease**. China: W B Saunders, 2004.
- KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v.73, p. 85-90, 1982.
- LA THANGUE, N. B. A mismatched role for Bcl-2. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 101-102, 2005.
- LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 1999.
- LEBOEUF, M. et al. The Phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, p.2783, 1982.
- LEE, Y. L. et al. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals Journal**, v. 52, p. 371-375, 2003.
- LEGAULT, J. et al. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, p.402-407, 2003.
- LEWINSKI, I. W. **A nutrição parenteral pode causar esteatose hepática?** 2012. Disponível em: www.nutritotal.com.br/perguntas/?acao=bu&categoria=3&id=515. Acesso em: 20 jan. 2012. 15:00:40.

- 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, p. 68-73, 2006.
- LIMA, E. O. et al. Atividade antifúngica in vitro de óleos essenciais frente a isolados clínicos de dermatófitos. **Revista de Microbiologia**, v. 23, n. 4, p. 235-268, 1992.
- LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.
- LIMA, F. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria**, v. 29, n. 1, p.33-42, 2007.
- LINS, K. O. 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.
- LIU, J. et al. β -Elemene induces apoptosis as well as protective autophagy in human non-small-cell lung cancer A549 cells. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 146-153, 2012.
- LOIZZO, M. R. et al. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. **Anticancer Research**, v. 27, p. 3293-3299, 2007.
- LOIZZO, M. R. et al. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, p. 1002-1012, 2008.
- LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.
- LÓPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiia discreta*. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 623-630, 2009.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998.
- LOU, J. et al. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 617, p. 104-110, 2007.
- 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. 639-640, 1989.

- LUPE, F. A. **Estudo da Composição Química de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas da Amazônia**. 2007. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.
- LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, n. 2, p. 115-128, 2003.
- MAAS, P.J.M. et al. Annonaceae from Central-eastern Brazil, **Rodriguésia**. v. 52, n. 80, p. 61-94, 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. 01 - 06, 2009.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- McLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, p.1-32, 1991.
- MAGALHÃES, H. I. F. et al. *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.
- MAGALHÃES, H. I. F. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of (4-methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl) methanone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 24 Aug, 2010.
- MAIA, J. G. S. et al. Leaf volatile oils from Brazilian *Xylopia* species. **Flavor and Fragrance Journal**, v.20, n. 5, p. 474-477, 2005.
- MALAGUARNERA, L. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 23, n. 3-4, p. 367-387, 2004.
- MARTINS, D. et al. sesquiterpene dimer from *Xylopia aromatica*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 677-680, 1998.
- MARSIGLIA, J. D. C. et al. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw.. **Natureza on line**, v. 9 n.1, p. 30-34, 2011.
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.515-531, 2006.

McKINNELL, J.; HOLT, S. Liver disease and renal dysfunction. **Medicine**, v. 35, n. 9, p. 521-523, 2007.

MEDEIROS, J.S. et al. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 n.2, Apr./June, 2009.

MEDEIROS, D. F. Produtos naturais na indústria farmacêutica. In: **CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA**, Teresina. **Anais...** Teresina: Sociedade Botânica Brasil, v.32, p.257-280, 1982. Disponível em: <<http://www.ittorolac.org/...botanica/.../Xylopia%20frutescens.pdf/download>>. Acesso em: 02 fevereiro 2012. 21:10:47.

MEGAN, S.V. Nutrição. In: Burtis, C. A; Ashwood, E.R. (Ed.). **Fundamentos de Química Clínica**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.442-453, 1998.

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.

MELO, G. M. A. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de dois diterpenos e extratos da casca do caule de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae)**. 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

MELO-DINIZ, M.F.F. 2000. **Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich.** 147 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, 2000.

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

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp lethality bioassay method. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária Interpretação e Diagnóstico**. 1. ed., São Paulo: Roca., p. 27-29, 1995.

MONTENEGRO, R. C. et al. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-457, 2008.

MOREIRA, I.C.; LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 2003.

- MOREIRA, I. C. et al. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopia brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 828-31, 2003.
- MOREIRA, I. C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 55-58, 2007.
- MOSHI, M. J. et al. Brine shrimp toxicity evaluation of some tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **African Journal of Traditional CAM**, v. 4, n. 2, p. 219 – 225, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOU, X. et al. Crude drugs as anticancer agents. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 4, n.1, p.17–25, 2011.
- MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R. et al. Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycininduced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 196-203, 2006.
- NASCIMENTO, I. A.; ARAÚJO, M. M. S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Rest**, v. 2, p. 41-47, 1999.
- NASCIMENTO, A. A. et al. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopia cayennensis* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 17-21, 2006.
- NASCIMENTO, T. S. et al. Metemoglobinemia: do Diagnóstico ao Tratamento. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n.6, p. 651-664, 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M.; **Journal Natural Products**, v. 66, p. 1022, 2003.
- NG, T. B.; LI, W. W.; YEUNG, H. W. A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 55-61, 1986.
- NIERO, R. et al. Estudos da citotoxicidade em diferentes extratos de *Rubus imperialis* (Rosaceae), biomonitorado sobre *Artemia salina* Leach. In: **23ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**. Poços de Caldas, 2000. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0799-2/index.html>>. Acesso em: 15 maio 2011. 23:10:47.
- NISHIYAMA, Y. et al. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopia parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **Nature Medicine**, v. 64, p. 9-15, 2009.

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

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

NOORDHUIS, P. et al. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Genética e cancer. **Genética Médica**. Guanabara-Koogan, 6° ed., p. 274-293, 2002.

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, p. 445-453, 1976.

OKAWA, Y. et al. Augmentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascites tumor-bearing mice. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 517–521, 1992.

Ó 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.

OLIVEIRA JUNIOR, R. J. **Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

OLIVEIRA, V. M. A. et al. *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta amazonica**, v. 39, n. 4, p. 973 – 980, 2009.

OLIVEIRA, J. S. et al. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, T. **A importância da alimentação durante o tratamento do câncer**. 2010. Disponível em: <<http://www.oncoguia.com.br/site/interna.php?cat=75&id=344&menu=54>>. Acesso em: 20 jun. 2011. 13:25:34.

OLIVEIRA, C. P. M. S. Esteatose hepática. In: **Revista de Hepatologia**. Novembro/Dezembro, 2000. Disponível em: http://www.fugesp.org.br/nutricao_e_saude_conteudo.asp?id_publicacao=2&edicao_numero=4&menu_ordem=3. Acesso em: 20 janeiro 2012. 22:10:00.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630-635, 2007.

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

OYEDJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 57-59, 2006.

PAILARD, F. et al. Use of primary cultures of rats hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. **Toxicology In Vitro**, v.13, p. 693-700, 1999.

PANDOLFO, M. et al. Farmacogenoma do fluorouracil. Análise de polimorfismo no gene da diidropirimidina desidrogenase. **Infarma**, v.17, n. 3/4, 2005.

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

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

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. São Paulo: Guanabara Koogan. 2005.

PETERS, G. J.; KÖHNE, C. H. Fluoropyrimidines as antifolate drugs. In: JACKMAN, J. L. (ed.): **Antifolate Drugs in Cancer Therapy**. Totowa, NJ: Humana Press; p. 101–145, 1999.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing *in vitro* – what we know and what we need to know. **Environment Health Perspectives**, v. 106, p. 559-568, 1998.

PIERCE, B. A. Cromossomos e reprodução celular. **Genética: Um enfoque conceitual**. Guanabara-Koogan, 1º ed., p.16-43, 2004.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D. M. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **International Journal of Cancer**, v. 97, p. 72-81, 2002.

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

PONTES, W. J. T. et al. Acaricidal activity of the essential oils leaves and fruits of *Xylopia sericea* St. Hill. on the two spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v. 30, p. 838-841, 2007.

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

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

QUEVAUVILLER, A.; FOUSSARD-BLANPIN, O. The properties, especially antispasmodic, of total alkaloids of the roots of *Xylopia quintasii* Engl. and Diels. Annonaceae. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v. 170, p. 1187-1188, 1976.

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

RAHN, K. H.; HEIDENREICH, S.; BRUCKNER, D. How to assess glomerular function and damage in human. **Journal of Hypertension**, v. 17, p. 309-317, 1999.

RAMÍREZ-DUARTE, W.F.; RONDÓN-BARRAGÁN, I.S.; ESLAVA-MOCHA, P.R. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachipomus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 28, n.11, p.547-554, 2008.

RAMPINO, N. et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science**. v. 275, p. 967-969, 1997.

RAVIZZA, R. et al. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncology reports**, v. 20, n. 3, p. 625-30, 2008.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA/SEBRAE, 2v, 2002.

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

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ulbra, p. 173 - 200, 2003.

RICHMOND, J. D. et al. Essential oil compositions and cytotoxic activities of *Dendropanax capillaris*, *Oreopanax nubigenus*, and *Schefflera rodrigueziana* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communication**, v. 4, n. 2, p. 271-274, 2009.

RIGANO, D. et al. Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* Montbret et Aucher ex Benthham from Lebanon and its biological activities. **Natural Products Reserarch**, v. 25, n. 6, p. 614-626, 2011.

RODRIGUES, A.G. Buscando Raízes. **Horizontes Antropológicos** v. 16, p. 131-144, 2001.

RODRIGUES, A. M. et al. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314-317, 2006.

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

SALOMON, D.S.; BRANDT, R.; CIARDIELLO, F. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Critical Review on Oncology and Hematology**, v. 19, p. 183-232, 1995.

SANTOS, A.F. et al. Atividade moluscicida de plantas da família Annonaceae. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia. **Programa e resumos...** Águas de Lindóia: [s.n.], p.118, 1998.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

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

SCHREIER, H. et al. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 215-223, 1997.

SCHEIN, C. F. et al. Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados. **Disc Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 101-107, 2006.

SCHUTZ, A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. Porto Alegre. 4ª Ed. Editora UFRGS, 1984.

SEBOLT-LEOPOLD, J.S.; ENGLISH, J.M. Mechanisms of Drug Inhibition of Signalling Molecules. **Nature**, v. 441, p. 457-462, 2006.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SEO, D. S. et al. Acute Oral or Dermal and Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity of Tetrasodium Pyrophosphate in Sprague Dawley (SD) Rats. **Environmental Health and Toxicology**, v.26, p.1-9, 2011.

SHARMA, P. R. et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 160–168, 2009.

SHARON, A.; CENTER, D.M.V. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**, p.1166-1183, 1995.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 239-243, 2001.

- 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.
- SILVA, J.B.; GROTTA, A.S. Anatomia e óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens* Aublet. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v.3, p.87-94, 1975.
- SILVA, A. F. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 1-7, 2003.
- SILVA, T. O. et al. Reference values for chinchilla (*Chinchilla laniger*) blood cells and serum biochemical parameters. **Ciencia Rural**, v. 35, n. 3, p. 602-606, 2005.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 582p., 2006.
- SILVA, M. V. B. **Avaliação da citotoxicidade e indução de diferenciação e apoptose por diterpenos de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul (Annonaceae)**. 2007. 140 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**. v. 576, p.180-188, 2007.
- SILVA, E. C. C.; CAVALCANTI, B. C.; AMORIM, R. C. N. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 48-55, 2009a.
- SILVA, S.A.S. et al. Estudo da atividade mutagênica das plantas, *Euphorbia milii* Des Moulins & *Ricinus communis* L. através do teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2^a, p. 418-422, 2009b.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004.
- SIQUI, A. C. et al. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.
- 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, M. L. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence the different mechanisms of action. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 664-674, 2000.

SMITH, J.A. et al. 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.

SOARES, J.L.M.F. et al. **Métodos diagnósticos-Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

SOENGAS, M. S. et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**, v. 409, p. 207-211, 2001.

SOMOVA, L. I. et al. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p.165-74, 2001.

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. et al. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 223-226, 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.

SYLVESTRE, M. et al. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrcia gale* L. **Phytomedicine**, v. 12, n.4, p. 299-304, 2005.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99 – 102, 2006.

TAKAHASHI, J. A. et al. Frutoic Acid, a Dimeric Kaurane Diterpene from *Xylopi a frutescens*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 607-609, 1995.

TAKAHASHI, J. A. et al. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopi a sericea*. **Quimica Nova**, v. 24, p. 616-618, 2001.

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, p. 11–14, 2001.

TALMADGE, J. E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for câncer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TATSADJIEU, L. N. et al. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 469-472, 2003.

TONON, L. M.; SECOLI, S. R.; CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 2, p. 173-182, 2007.

TREVISAN, M.T.S. et al. Atividades larvicida e colinesterásica de plantas do gênero *Kolanchoe*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 835-840, 2007.

VALADARES, M. C., CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbelatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

VALKO, M. et al. Frees radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-48, 2007.

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

VASCONCELOS, T. H. C. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 583-591, Out/Dez, 2007.

VEGA, M. R. G. et al. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1554-1559, 2007.

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

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; NETO, S. W. **Hematologia e Hemoterapia. Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

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

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

WALL, M. E.; et al. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 3888-3890, 1966.

WHO. **Câncer**. 2011. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 12 set. 2011. 20:12:20.

XYAO, J. B. et al. Cytotoxicity of *Marchantia convolute* leaf extracts to human liver and lung cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.6, p. 731-738, 2006.

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

ZEKOVIC, Z. et al. **Chromatographia**. v. 39, p. 587, 1994.

ZHANG, A. et al. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, p. 383-394, 1997.

ZHAO, Y. S. et al. β -Elemene inhibits Hsp90/Raf-1 molecular complex inducing apoptosis of glioblastoma cells. **Journal of Neurooncology**. 2011. [Epub ahead of print]

ZHOU, S. L. et al. Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells. **Hepatology**, v. 27, p. 1064-1074, 1998.

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