

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

DÉBORAH RIBEIRO PESSOA

ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Croton polyandrus* SPRENG. (EUPHORBIACEAE) EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

João Pessoa – PB

2013

DÉBORAH RIBEIRO PESSOA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Croton polyandrus* SPRENG. (EUPHORBIACEAE) EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa – PB

2013

DÉBORAH RIBEIRO PESSOA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Croton polyandrus* SPRENG. (EUPHORBIACEAE) EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

APROVADA EM 28/ 02 /2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

Doutora em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
(Orientadora)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Doutor em Farmacologia
(Examinador Externo – CPQBA/UNICAMP)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Doutor em Farmacologia
(Examinador Interno - UFPB)

*Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, meus pais: **Joseilson Pessoa Dantas e Diana Maria Ribeiro Pessoa**, que sempre me estimularam a dar este grande passo. Agradeço pelo amor, presença constante, ensinamentos e apoio em todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre ao meu lado, iluminar meus passos e me amar incondicionalmente. Quero agradecer pelos dons da paciência, força e coragem, por ser meu amparo e refúgio, pela proteção constante. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, **Joseilson Pessoa Dantas** e **Diana Maria Ribeiro Pessoa**, por todo o amor, o carinho, a preocupação que sempre dedicam a mim. Pelos esforços (e eu sei que foram muitos), por tantas renúncias que fizeram e fazem por mim e pelas minhas irmãs até hoje e, que me permitiram chegar até aqui. Vocês são meus tesouros! Que estas palavras sejam a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo. Amo muito vocês.

Ao meu amado esposo, **Diego Coutinho Meireles**, que está sempre ao meu lado. Agradeço por todo o amor, compreensão, companheirismo e entusiasmo dedicados a mim não só nesta etapa, mas em todos os momentos da minha vida. Com certeza, sem você eu não teria conseguido concluir este trabalho. Saiba que esta vitória é NOSSA. Amo você.

As minhas queridas irmãs, **Deysiane Pessoa** e **Dayse Pessoa**, pelo sentimento de afeto, carinho, apoio e torcida nessa longa caminhada. Vocês são meu alicerce. Amo vocês.

Aos meus avós paternos, **Aderbal Pessoa de Brito** e **Odaiza Dantas Pessoa**, e maternos, **José Ribeiro de Oliveira** (*in memoriam*) e **Maria Guida de Oliveira** pelo amor e apoio incondicional. Vocês são referências para mim.

Aos meus tios, tias, primos e primas por serem minha família, pelo incentivo, torcida e apoio sempre. Obrigada pela força!

Aos meus sogros, **Tarcísio Meireles** e **Teresinha Meireles**, por serem como pais para mim, por todas as palavras de incentivo e apoio, e pela grande torcida, sempre demonstrada, pelo meu sucesso. A minha segunda família, **Marcelo**, **Suênya**, **Anselmo**, **Georgianne**, **Maria Thereza** e **Maíra**, por torcerem pelo meu sucesso e por me ajudarem sempre. Vocês são pessoas maravilhosas que Deus colocou na minha vida!

Ao meu cunhado e amigo, **Anderson Rafael** pela torcida, apoio e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos que precisei.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral**, pelo incentivo há 4 anos, desde a iniciação científica, e contribuição na minha formação pessoal e profissional. Agradeço pelos ensinamentos, prestatividade, compreensão e dedicação. Esses valores vou sempre levar comigo. Obrigada por tudo!

A Profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz** por ser uma pessoa admirável e por todo o seu conhecimento. Por ser exemplo de coragem, amor ao próximo, inteligência e alegria.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia e Divisão de Toxicologia do CPQBA, em especial aos professores Dr. **João Ernesto de Carvalho** e Dra. **Ana Lúcia T. G. Ruiz**, por abrir as portas do laboratório para nosso treinamento. O tempo que passei na UNICAMP muito contribuiu para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao professor **Reinaldo Nóbrega de Almeida** pelos ensinamentos e pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho. Agradeço pelo exemplo pessoal e profissional.

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

A Profa. Dra. **Maria Salete Trigueiro de Araújo**, pela colaboração com as análises histopatológicas, pela disponibilidade, paciência e boa vontade para sempre nos atender e tirar nossas dúvidas.

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 do mestrado, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

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

Aos meus amigos da iniciação científica (que agora já estão no mestrado): **Tatyanna Kelvia, Tatianne Mota, Vivianne Mendes, Waleska Viana e Madson Moreira** que me acompanharam desde o início, por todo apoio, ajuda, momentos de alegria e pela amizade. Obrigada por serem pessoas tão especiais. Agradeço também a **Renata Abrantes, Bruna, Ana Rebeka e Jamilly** pela torcida e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX), **Monalisa Brito, Daiene Lunguinho e Ana Paula Gomes** pela ajuda, incentivo e torcida durante toda essa caminhada.

Em especial aos amigos **Heloísa Mara** (por ser uma pessoa maravilhosa, pela amizade e por me ajudar diretamente na concretização desse trabalho), **Thaísa Rolim** (por ter dividido comigo todos os momentos alegres e tristes durante a realização deste trabalho, pela disponibilidade em me ajudar sempre, bem como pela estimada amizade, com a qual fico feliz em contar sempre), **João Carlos Pita e Aline Lira Xavier** (por terem me acompanhado desde a iniciação científica, pela ajuda imensurável em todos os momentos e principalmente pelo

otimismo, os quais foram de grande importância para enfrentar todas as dificuldades. Vocês são inspirações na minha vida profissional).

A minhas amigas de graduação pelos laços de amizade e incentivo profissional: **Andreza, Beatriz, Clarissa, Julianna, Sara e Waleska.**

A minha amiga, **Kaline Pinheiro**, pela sua amizade de muitos anos, pela torcida e pelo apoio sempre. Obrigada amiga!

A minha turma de mestrado por tantos momentos desafiadores juntos, agradeço pelas experiências compartilhadas.

Ao amigo **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

A todos os **funcionários** do CBiotec e as secretárias da Pós-graduação **Tânia Maria Araújo** e **Caroline Medeiros Manguiera** pelos serviços prestados.

A **Luis Cordeiro** e **Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George do CBiotec pelo fornecimento dos animais.

A **Capes** pela bolsa concedida durante o período de mestrado.

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

MUITO OBRIGADA!

Déborah Ribeiro Pessoa

“Não vos conformeis com este mundo, mas transformai-vos, renovando vossa maneira de pensar e julgar, para que possais distinguir o que é da vontade de Deus, a saber, o que é bom, o que lhe agrada, o que é perfeito.”

Romanos 12:2

PESSOA, D. R. ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton polyandrus* SPRENG. (EUPHORBIACEAE) EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH. 2013. 107f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é uma doença genética complexa, geralmente resultado de um processo multifatorial, que ocasiona alterações sucessivas em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Produtos naturais são amplamente utilizados na terapia do câncer e continuam representando uma fonte promissora para a descoberta de novos agentes antineoplásicos. *Croton polyandrus* Spreng. é conhecida popularmente como “croton de tabuleiro” e é pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico. Dados recentes mostram que o componente majoritário do óleo essencial das folhas dessa espécie é o p-cimeno, e que o referido óleo apresenta atividade antifúngica, mas não possui efeito antitumoral *in vitro*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral *in vivo* e toxicidade do óleo essencial das folhas de *C. polyandrus* (O.E.C.). No ensaio de hemólise em eritrócitos de camundongos foi obtido um valor de CH_{50} de 141,0 $\mu\text{g/mL}$, o que sugere moderada citotoxicidade nesse tipo de célula não tumoral, que é comumente afetada na terapia antineoplásica. No ensaio toxicológico agudo em camundongos o valor estimado da DL_{50} foi 447,18 mg/kg. Após administração aguda do O.E.C. foram observados efeitos depressores do SNC, bem como redução no peso corporal dos animais tratados com 250 e 375 mg/kg do óleo. Apesar de não apresentar atividade antitumoral *in vitro*, como também demonstrado no ensaio de citotoxicidade em células de carcinoma ascítico de Ehrlich ($CI_{50} = 270,6 \mu\text{g/mL}$), O.E.C. mostrou significativa atividade *in vivo* na mesma linhagem celular, após nove dias de tratamento com 100 e 150 mg/kg do óleo, considerando-se os parâmetros volume, peso e viabilidade das células tumorais. Não houve diferença significativa entre o efeito produzido pelo óleo nas doses de 100 e 150 mg/kg e àquele produzido pelo 5-FU (droga padrão) - 25 mg/kg. Houve um aumento significativo na porcentagem de células em apoptose tardia/necrose após o tratamento de nove dias com ambas as doses do óleo. Na análise da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, foi observado que O.E.C. induziu parada do ciclo na fase G0/G1 e aumento da fração sub-G1, o que sugere indução de morte celular por apoptose. Observou-se ainda, aumento na média de sobrevivência dos animais transplantados com tumor de Ehrlich. As análises toxicológicas indicam que, após nove dias de tratamento com O.E.C. foi observado redução no peso corporal, aumento da atividade das transaminases (AST e ALT) e alterações hematológicas sugestivas de anemia. Ainda, foi observada diminuição na contagem de leucócitos e linfócitos, bem como redução no índice de timo, dados esses que em conjunto sugerem imunossupressão, efeito comumente observado após terapia antineoplásica. A análise histopatológica confirmou o indício de hepatotoxicidade, especialmente para a dose de 150 mg/kg do O.E.C., entretanto, os danos foram considerados moderados e reversíveis. O.E.C. não induziu aumento na quantidade de eritrócitos micronucleados, no ensaio do micronúcleo, o que indica ausência de genotoxicidade. Portanto, é possível inferir que o O.E.C. apresenta atividade antitumoral *in vivo* com moderada toxicidade, o que não representa um fator limitante para a continuação de seus estudos pré-clínicos.

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

PESSOA, D. R. STUDY OF TOXICITY AND ANTITUMOR ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Croton polyandrus* SPRENG. (EUPHORBIACEAE) AGAINST EHRLICH ASCITIC TUMOR. 2013. 107f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer, a complex genetic disease is usually the result of a multifactor process which leads to successive gene changes affecting proliferation, differentiation, and cell death. Natural products are widely used in cancer therapy, and they continue to be a promising source for new anticancer agents. *Croton polyandrus* Spreng., known popularly as “croton de tabuleiro” is rarely (either in of phytochemical or pharmacological terms) reported in the literature. Recent studies have shown its antifungal activity, but no in vitro antitumor effects for the leaf’s essential oil (whose major component is p-cymene), have been reported. The present study aimed to evaluate the essential oil, extracted from the leaves of *C. polyandrus* (O.E.C.) for in vivo antitumor activity and toxicity. Hemolysis assay with mouse erythrocytes obtained a CH₅₀ value of 141.0 µg/mL, suggesting moderate cytotoxicity for non-tumor cells that are typically affected during cancer therapy. In acute toxicological testing with mice, the estimated LD₅₀ was 447.18 mg/kg. When O.E.C. was acutely administrated, CNS depressive effects were observed as well as reductions in the body weights of the animals with dosages at 250 and 375 mg/kg. Although not displaying *in vitro* antitumor activity, as also demonstrated for ascites carcinoma cells in the Ehrlich cytotoxicity assay (IC₅₀ = 270.6µg/ml), O.E.C. showed significant *in vivo* activity, in the same cell line after nine days of treatment with 100 and 150 mg/kg oil, this considering the parameters of volume, weight and tumor cell viability. There was no significant difference between the effect produced by the oil at doses of 100 and 150 mg/kg, and that produced by 5-FU (the standard drug treatment) at 25 mg/kg. There was a significant increase in the percentage of cells found in either late apoptosis or necrosis after nine days of treatment using both doses of oil. While analyzing the distribution of cells during differing phases of the cell cycle, it was observed that O.E.C. induced cycle arrest at the G0/G1 phase, and increased the sub-G1 fraction, suggesting an induction of cell death through apoptosis. There was also an increase in the median survival rate for the animals with transplanted Ehrlich tumor. The toxicological analyzes revealed (after nine days of treatment) reductions in body weight, increased activity of transaminases (AST and ALT), and hematological changes suggestive of anemia. A decrease was seen in the leukocyte and lymphocyte counts, and a thymus index reduction, which together suggest the immunosuppressive effects commonly observed after anticancer therapy. Histopathologic analysis confirmed O.E.C. hepatotoxicity at 150 mg/kg. However, the damage was moderate and reversible, and O.E.C. did not induce an increase in micronucleated erythrocytes, implying non-genotoxicity. The results for O.E.C. indicate antitumor activity *in vivo* with moderate toxicity, thus suggesting further preclinical study.

Keywords: *Croton polyandrus*. Essential oil. Antitumor activity. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Análise da distribuição das fases do ciclo celular nas células de tumor de Ehrlich, após tratamento com solução 5% tween 80 (controle negativo) (A), O.E.C. (100 mg/Kg) (B), O.E.C. (150 mg/kg) (C) e 5-FU (25 mg/kg) (D). Histogramas representativos de conteúdo de DNA (eixo x, fluorescência FL3/H) *versus* número de eventos..... 59
- Figura 2** - Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado; (B) 5-FU (25 mg/kg); (C) O.E.C. (100 mg/kg); (D) O.E.C. (150 mg/kg)..... 66
- Figura 3** - Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: (A), (B) e (C) Controle transplantado; (D) O.E.C. (100 mg/kg); (E) O.E.C. (150 mg/kg) e (F), (G) e (H) 5-FU (25 mg/kg) 67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.C.. 52
- Gráfico 2** - Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com o O.E.C. 53
- Gráfico 3** - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose tardia/necrose após tratamento com solução 5% tween 80 (controle negativo), O.E.C. (100 mg/Kg) e O.E.C. (150 mg/kg)... 57
- Gráfico 4** - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 5% tween 80 (controle negativo), O.E.C. (100 mg/Kg), O.E.C. (150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). 58
- Gráfico 5** - Avaliação da sobrevida de camundongos inoculados com células de tumor de Ehrlich e tratados com O.E.C. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de <i>Croton polyandrus</i>	36
Tabela 2 - Valores de TGI (inibição total do crescimento) do óleo essencial de <i>Croton polyandrus</i> e da doxorrubicina.	38
Tabela 3 - Efeitos da administração oral de doses únicas do O.E.C. em camundongos.	54
Tabela 4 - Efeitos do tratamento agudo com O.E.C. (250 e 375 mg/kg) na avaliação ponderal e consumo de água e ração dos camundongos.	55
Tabela 5 - Efeitos do tratamento agudo do O.E.C. nos índices dos órgãos de camundongos.	56
Tabela 6 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU na viabilidade celular, volume tumoral e peso dos tumores de carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos após nove dias de tratamento....	57
Tabela 7 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU sobre o consumo de água, ração e ganho de peso dos animais tratados durante nove dias.	60
Tabela 8 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento.....	61
Tabela 9 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento.....	62
Tabela 10 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos órgãos de camundongos após nove dias de tratamento.	65
Tabela 11 - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.C. e ciclofosfamida.	70

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU - 5-fluorouracil

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - Aspartato aminotransferase

CEUA - Comitê de Ética em Uso de Animais

CH50 - Concentração que produz 50 % de hemólise

CHCM - Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média

CI50 - Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular

CPQBA - Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

HBSS - Solução tampão salina de Hank's

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

HE - Hematoxilina-eosina

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LABETOX - Laboratório de Ensaio Toxicológicos

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-Oxidase

O.E.C. - Óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Solução Tampão Fosfato

PPgPNSB - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

SBF - Soro Fetal Bovino

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SDS - Docecil Sulfato de Sódio

SRB - Sulforrodamina B

TCA - Ácido Tricloroacético

TGI - Inibição de Crescimento Total

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

VCM - Volume Corpuscular Médio

VHT - Veia Hepática Terminal

VP - Veia Porta

v/v - volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 O Câncer: conceito e epidemiologia	21
2.2 Modelos experimentais no estudo do câncer	22
2.3 Produtos naturais e o câncer	26
2.4 Óleos essenciais biologicamente ativos	28
2.5 Toxicologia de produtos naturais.....	30
2.6 <i>Croton polyandrus</i> : família, gênero e espécie	34
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Local da pesquisa.....	42
4.2 Material	42
4.2.1 Óleo essencial de <i>Croton polyandrus</i>	42
4.2.2 Animais	42
4.2.3 Linhagem de células tumorais	43
4.3 Métodos	43
4.3.1 <i>In vitro</i>	43
4.3.1.1 Citotoxicidade frente eritrócitos	43
4.3.1.2 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich	44
4.3.2 <i>In vivo</i>	45
4.3.2.1 Ensaio Toxicológico pré-clínico agudo	45
4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células tumorais de carcinoma de Ehrlich	46
4.3.2.2.1 Volume, peso do tumor e viabilidade celular	46
4.3.2.2.2 Análise e quantificação da apoptose	47
4.3.2.2.3 Análise do ciclo celular.....	47
4.3.2.3 Avaliação da toxicidade	48
4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração	48

4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	48
4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos	48
4.3.2.3.4 Análises anatomopatológicas.....	49
4.3.2.4 Avaliação da genotoxicidade	49
4.3.3 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	52
5.1 <i>In vitro</i>	52
5.1.1 Citotoxicidade frente eritrócitos	52
5.1.2 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich	52
5.2 <i>In vivo</i>	53
5.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo	53
5.2.1.1 Avaliação comportamental e DL ₅₀	53
5.2.1.2 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração	54
5.2.1.3 Avaliação dos índices dos órgãos	55
5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células de carcinoma ascítico de Ehrlich.....	56
5.2.2.1 Volume, peso do tumor e viabilidade celular	56
5.2.2.2 Análise e quantificação da apoptose	57
5.2.2.3 Análise do ciclo celular.....	58
5.2.3 Avaliação da toxicidade.....	59
5.2.3.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração	59
5.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	60
5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos	64
5.2.3.4 Análises anatomopatológicas.....	65
5.2.4 Avaliação da sobrevida	69
5.2.5 Avaliação da genotoxicidade	69
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	91

Introdução



1 INTRODUÇÃO

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

As indústrias farmacêuticas foram e continuam sendo beneficiadas pelos conhecimentos populares sobre o uso medicinal das plantas. Estima-se que mais de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. As chances de se obter novas entidades químicas de plantas, animais, fungos e bactérias são reais. Mesmo que a nova entidade química não passe em todos os testes clínicos, ela servirá de modelo para a síntese de novos candidatos a fármaco. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais. No caso das drogas antitumorais e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; FERREIRA; PINTO, 2010; BRASIL, 2011).

Deve-se considerar que somente os esteroides de origem vegetal respondem por cerca de 15% de um total de 150 bilhões de dólares do mercado farmacêutico mundial. Ainda, considerando-se que a comercialização anual do Taxol® (paclitaxel) foi de um bilhão de dólares a partir de 1999, e a da vimblastina e vincristina, todos agentes antineoplásicos, atingem valores anuais de venda de 160 milhões de dólares, fica claro que os produtos naturais continuam a desempenhar importante papel econômico e terapêutico na medicina moderna (VARANDA, 2006).

Dentro desse contexto, estima-se que o estudo de produtos naturais tem sido a estratégia mais bem sucedida na quimioterapia ao longo dos anos, resultando em um arsenal clinicamente importante, o qual inclui fármacos como etoposídeo (Topophos®), vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), docetaxel (Taxotere®) e topotecano (Hycamtin®). Além disso, vários outros produtos naturais estão a ser testados quanto à atividade antitumoral (CRAGG; NEWMAN, 2005; LÚCIO et al., 2011; PITA et al., 2012).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com 20% de toda a flora mundial e aproximadamente 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Esse imenso patrimônio genético é considerado como

uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (SIMÕES et al., 2004; HEINZMANN; BARROS, 2007; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Entretanto, existe um grande número de plantas brasileiras que permanecem sem quaisquer estudos quanto a sua química, propriedades terapêuticas e/ou tóxicas e que representam um enorme potencial para o desenvolvimento de fármacos (VARANDA, 2006; MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010).

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

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

Deste modo, demonstra-se a importância e necessidade dos estudos com produtos naturais, e, reconhecendo-se o potencial farmacológico da família Euphorbiaceae e a importância do gênero *Croton*, optamos por conduzir os estudos do óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus* Spreng, cujos efeitos farmacológicos ainda são pouco conhecidos, o que poderá levar à descoberta de nova fonte de substâncias naturais ativas com atividade antitumoral.

Fundamentação Teórica



2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O Câncer: conceito e epidemiologia

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

O câncer (neoplasia maligna) é uma doença genética complexa, cujas células possuem um acúmulo progressivo de mutações de seu genoma, resultando na proliferação desordenada. As mutações fazem com que as células que antes executavam um programa de ciclo celular bem definido, associado às suas funções em seu tecido de origem, cresçam de maneira descontrolada. Esse crescimento alterado é consequência não só da duplicação celular desordenada, mas também da progressiva resistência à morte celular. Além disso, as células cancerosas podem ultrapassar os limites dos tecidos de origem, adquirir a capacidade de modificar o ambiente que as cerca, desrespeitar fronteiras e migrar pelos diversos tecidos do corpo, podendo estabelecer novos tumores – as metástases – ao se fixarem em locais diferentes do ponto de origem. 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; ZATS, 2006; SILVA et al., 2007).

Atualmente são conhecidos mais de cem tipos de câncer, diferenciados pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento e, por isso, o câncer não pode mais ser considerado como uma única enfermidade (CARVALHO, 2006).

O processo de carcinogênese, ou seja, de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, em geral dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerígena origine um tumor detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor e geralmente é resultado de um sistema complexo e 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) (ALMEIDA et al., 2005; WHO, 2011).

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, representando cerca de um oitavo do total de mortes. Sua incidência é fortemente afetada por aspectos demográficos, como o envelhecimento da população, hábitos de alimentação e, em especial, fatores ambientais como a incidência de raios ultra-violeta. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que o número de novos casos de câncer continuará subindo e, até 2030, as taxas de mortalidade irão chegar a mais de 11 milhões de mortes por ano (MATSUO et al., 2010). Esses dados demonstram que, apesar dos bilhões de dólares investidos em pesquisas, especialmente nas últimas três décadas, a diminuição da morbidade e mortalidade dessa doença ainda está bem abaixo do que se poderia esperar.

No Brasil, de acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA) o número estimado para 2012/2013 é de 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (BRASIL, 2011). Adicionalmente, 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 no país (MACHADO; MELO-JÚNIOR, 2009).

Diante desse cenário, é evidente a necessidade que recursos e esforços sejam direcionados no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como, entre outras, na pesquisa, possibilitando uma melhor compreensão sobre a causa da doença e seus determinantes, levando a um avanço na sua prevenção e tratamento, com alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas.

2.2 Modelos experimentais no estudo do câncer

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

O desenvolvimento de modelos experimentais tem contribuído para o estudo e a compreensão do mecanismo de ação de muitos compostos antineoplásicos (LONGATO et al., 2011). Para a descoberta de quimioterápicos, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Linhagens de células tumorais podem ser utilizadas em estudos *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar as células neoplásicas em cultura e geralmente são realizados antes dos estudos *in vivo* (HOLBECK, 2004). Esse tipo de modelo, 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, reprodutível e, ainda, permite a elucidação de um provável mecanismo de ação do fármaco (SUGGITT; BIBBY, 2005).

Entretanto, a atividade antitumoral/citotóxica seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Esse último modelo permite a obtenção de informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da amostra em estudo, algumas das quais não são facilmente obtidas em modelos *in vitro*. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é o ideal para uma conclusão mais definitiva, em relação a dados pré-clínicos, a respeito da atividade de uma nova amostra com potencial anticâncer (SMITH et al., 2005).

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI; XU, 2006).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna. Corresponde ao adenocarcinoma mamário murino e foi transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Este tumor é um carcinoma de crescimento rápido com comportamento muito agressivo, é capaz de crescer em todas as linhagens de camundongos e provoca uma inflamação local, com aumento da permeabilidade vascular, resultando em edema intenso, migração celular e formação progressiva de mais fluido ascítico. Esse fluido que permanece na cavidade peritoneal murina é essencial para o crescimento do tumor, sendo fonte de nutrientes para as células tumorais (NASCIMENTO et al., 2006).

Esse tumor pode se manifestar de duas maneiras, a forma ascítica (inoculação de células via intraperitoneal) ou a forma sólida (inoculação via subcutânea). Adicionalmente, é prático, transponível e tem sido utilizado para a análise de efeitos antineoplásicos de diversos compostos (NASCIMENTO et al., 2006; SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006).

Após a inoculação intraperitoneal dessas células, o volume da ascite e o número de células aumentam progressiva e rapidamente. A ascite se forma provavelmente pela indução de inflamação, com o aumento da permeabilidade vascular do peritônio. Dessa forma, os camundongos com esse tumor morrem após um curto período de tempo devido a diversos fatores como a pressão mecânica exercida pelo fluido ascítico e a hemorragia intraperitoneal. Além disso, a progressão do tumor de Ehrlich é caracterizada por profundas alterações na resposta imune, levando a um quadro de declínio da imunocompetência do organismo (MELO et al., 2004; MARCHETTI, 2008).

Este modelo também possibilita a análise da sobrevida dos animais com tumor, submetidos ao tratamento com o fármaco em estudo, uma vez que se buscam terapias que consigam prolongar a vida do paciente e aliar a isto melhora na sua qualidade de vida.

Muitas substâncias antineoplásicas exercem seus efeitos citotóxicos por indução de apoptose (BERNARDI; JACQUES-SILVA; LENZ, 2003). Apoptose é considerada como morte celular programada (fisiológica) altamente regulada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos. É essencial para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, formação das vilosidades intestinais, entre outros processos (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; DUARTE, 2010).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas marcantes e coordenadas que incluem a retração das células, ocasionando redução do contato entre elas, formação de prolongamentos na membrana celular (“blebs” de membrana), fragmentação de membrana nuclear, condensação cromatínica e fragmentação internucleossômica do DNA (SARASTE; PULKKI, 2000; GRIVICICH; REGNER; 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 (EROs) (ARAVINDARAM; YANG, 2010).

Esse processo culmina com a formação de corpos apoptóticos, que são rapidamente reconhecidos por macrófagos, através da sinalização decorrente da translocação de fosfatidilserina da monocamada interna para a monocamada externa da membrana celular (ANSELMi et al., 2002). Dessa forma, essas células são fagocitadas antes que se desintegrem, evitando o extravasamento do conteúdo celular e assim, não há inflamação nem lesão do tecido, garantindo o seu funcionamento normal (ANSELMi et al., 2002; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta a injúrias severas às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Consequentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória que pode causar injúria e até morte das células vizinhas. Ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (ANAZZETTI; MELO, 2007).

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

Na via extrínseca da apoptose ou via receptores de morte como CD95 (Fas ou Apo-1) ou TNF-R1 (receptor do fator de necrose tumoral) os receptores são estimulados por ligantes de morte específicos. Tais receptores, quando estimulados, associam-se às caspases iniciadoras (como a pró-caspase -8 ou -10) através de proteínas adaptadoras, como a FADD (*Fas-Associated Death Domain*), TRADD (*TNF Receptor- Associated Death Domain*) e RIP (*Receptor-Interacting Protein*), levando a trimerização do receptor. O complexo resultante ativa a caspase iniciadora que, subsequentemente, ativa a cascata de caspases efetoras (caspases -3, -6 e -7) que clivam substratos específicos, produzindo assim as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (ISRAELS; ISRAELS, 1999; FISCHER; SCHULZE-OSTHOFF, 2005; LIU et al., 2006).

A via intrínseca da apoptose ou mitocondrial é iniciada por sinais provenientes do interior da célula, detectados pelas mitocôndrias. Caso isso ocorra, as mitocôndrias sofrem um desacoplamento e liberam para o citosol, o citocromo *c*, as proteínas SMAC/Diablo (segunda ativadora das caspases derivada da mitocôndria) e o AIF (fator indutor de apoptose). O citocromo *c* liberado liga-se à APAF-1 (fator ativador de proteases – 1) e a pró-caspase-9, formando um complexo chamado apoptossomo. Esse complexo, na presença de ATP, ativa a caspase -9 (caspase iniciadora), que cliva e ativa caspases efetoras. Por outro lado, a SMAC inativa as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), ativa a caspase-3, o que culmina em apoptose (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

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

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

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

2.3 Produtos naturais e o câncer

Os produtos naturais e compostos desenvolvidos com base no conhecimento adquirido a partir de produtos naturais têm apresentado uma significativa diversidade estrutural e frequentemente esse arsenal tem-se refletido na obtenção de novas moléculas com atividade biológica e mecanismo de ação elucidado. Como resultado, os produtos naturais,

particularmente aqueles derivados de plantas, são amplamente utilizados na quimioterapia (KINGHORN et al., 2009).

Como já salientado, a descoberta de novas drogas anticâncer de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. Um dos exemplos mais importantes é o de *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*, utilizada pela população de Madagascar no tratamento do diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (MANN, 2002; CARVALHO, 2006).

Outra descoberta importante na área de câncer foram os derivados da casca de *Taxus brevifolia* Nutt, que incluem o paclitaxel e o docetaxel. Eles se ligam aos microtúbulos das células modificando a dinâmica de equilíbrio, resultando em uma paralisação do ciclo celular entre a metáfase e a anáfase. O paclitaxel é indicado principalmente para tratamento do câncer de mama e de ovário, mas também pode ser utilizado em tumores epiteliais, como o de pescoço, esôfago e pulmão. O docetaxel é um análogo semissintético do paclitaxel, e também é aprovado para o uso contra o câncer de mama e de pulmão (BERTINO; SALMON, 2001; MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011).

O irinotecano é um semissintético solúvel em água, derivado da camptotecina, que é um alcaloide isolado da casca de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne. A camptotecina avançou em estudos clínicos nos anos 70 e, mesmo apresentando alguma atividade antitumoral, era insolúvel em água e possuía efeito tóxico imprevisível, levando a interrupção de sua futura avaliação. O interesse renovado na camptotecina foi motivado pela identificação da topoisomerase I como alvo principal nos anos 80. A descoberta desse novo mecanismo de ação estimulou esforços dirigidos para a síntese de análogos mais solúveis em água, tendo um perfil tóxico mais favorável e consistente atividade antitumoral. O irinotecano exibe significativa atividade contra os carcinomas gástrico, pulmonar, pancreático e cervical, e ainda tumores do sistema nervoso central de grau elevado, linfomas e leucemia (GRIVICICH et al., 2001; MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011). Em relação ao faturamento, sabe-se que Os medicamentos antitumorais oriundos de produtos naturais movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Diante do exposto, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas. Além disso, um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foi aprovado para utilização clínica entre 2005 e 2007 (HARVEY, 2008; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

2.4 Óleos essenciais biologicamente ativos

As plantas medicinais possuem uma grande habilidade para a síntese de metabólitos secundários, constituindo inúmeras fontes de fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. Essas substâncias são agrupadas em classes, tais como compostos fenólicos, terpenoides, alcaloides, flavonoides, taninos, entre outros (VIEGAS JUNIOR, 2003; PONTES et al., 2007; SILVA et al., 2007; NOGUEIRA, 2009).

Óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são produtos naturais extraídos de diferentes partes da planta e constituem matérias-primas de grande importância para a indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Eles são caracterizados quimicamente como uma mistura complexa de componentes voláteis (principalmente mono- e sesquiterpenoides, benzoides, fenilpropanoides, etc.), de baixo peso molecular, geralmente lipofílicos e odoríferos. Apresentam diferentes ações biológicas em humanos e outras plantas, neste último estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos. Eles são muito úteis no tratamento de diferentes doenças, sendo utilizados como antisépticos, anti-inflamatórios e antimicrobianos, com sua aplicação medicinal se tornando popular ao longo dos tempos (BAKKALI et al., 2008).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido publicados relatando a atividade antitumoral de óleos essenciais, bem como de compostos deles isolados (SOEUR et al., 2011). O óleo essencial obtido de *Cymbopogon flexuosus*, por exemplo, mostrou significativa atividade antitumoral *in vitro* contra linhagem de câncer de cólon (502713), neuroblastoma (IMR-32), fígado (Hep-g-2) e colo de útero (SiHa) (SHARMA 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 de câncer de mama (MDA-MB-231) (RICHMOND et al., 2009).

Manosroi et al. (2006) mostraram uma inibição da proliferação células de leucemia murina (P388) e de carcinoma epidérmico de boca humano (KB) dos óleos essenciais de *Ocimum sanctum*, *Citrus citratus*, *Alpinia officinarum*, *Lavandula angustifolia*, *Vetiveria zizanioides*, *Zingiber montanum*, *Piper nigrum*, *Cymbopogon nardus*, *Curcuma longa*, *Ocimum basilicum*, *Citrus hystrix*, *Piper betel*, *Albizia lebbeck*, *Ocimum americanum*, *Mentha spicata* e *Psidium guajava*.

O óleo essencial de *Nigella sativa*, por sua vez, mostrou atividade antitumoral *in vitro* frente células de câncer de laringe (Hep-2). O estudo dos constituintes químicos deste óleo revelou como composto majoritário o p-cimeno, que também é o composto majoritário do óleo essencial das folhas da espécie *Croton polyandrus*, objeto de estudo do presente trabalho (HARZALLAH et al., 2011). Além disso, um estudo do p-cimeno complexado com rutênio demonstrou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em células de carcinoma de Ehrlich, evidenciando-se a parada no ciclo celular na fase G2/M e indução de apoptose (CHATTERJEE et al., 2008).

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

Além dos 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 monoterpeno ascaridole, respectivamente (BEZERRA et al., 2009). O óleo essencial de *Croton flavens* mostrou atividade antitumoral *in vitro* em células adenocarcinoma de pulmão (A-549) e colorretal (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).

Efeitos antitumorais *in vivo* também são evidenciados pelo óleo essencial das folhas de *Guatteria friesiana* em linhagem tumoral sarcoma-180, o qual apresentou baixa toxicidade sistêmica (BRITTO et al., 2012).

Adicionalmente, monoterpenos isolados de diferentes espécies e que são amplamente encontrados em óleos essenciais, também são conhecidos na literatura por seus potentes efeitos antitumorais, dentre eles, carvacrol, timoquinona, alasmontamina A, linalol e timol

(BASER, 2008; RAVIZZA et al., 2008; HIRASAWA et al., 2009; EFFENBERGER; BREYER; SCHOBERT, 2010; HUANG et al., 2010).

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

2.5 Toxicologia de produtos naturais

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

Se a população dos países mais pobres utiliza as plantas medicinais por tradição e ausência de alternativas econômicas viáveis, nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitomedicamentos influenciado pelos modismos de consumo de produtos naturais. Este modismo favoreceu a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para males como a impotência, a ansiedade e a obesidade, algumas vezes em um único extrato. O conceito mais perigoso surgido por esta época foi o de que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas através de séculos de utilização pela população de todo o mundo (VEIGA-JÚNIOR, 2008).

O surgimento do conceito “natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa a “ausência de produtos químicos”, que são aqueles que podem causar algum dano ou que, de alguma forma, representam perigo. Assim, produtos naturais passaram a ser sinônimos de saudáveis, seguros e benéficos. Entretanto, como já salientado, esse conceito é extremamente equivocado, já que muitas plantas contêm substâncias capazes de produzir potencial toxicidade em organismos vivos (MENGUE et al., 2001).

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas, e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas

(CAPASSO et al., 2000). Outro exemplo é o confrei (*Symphytum officinale* L. - Boraginaceae), planta utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas que também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998).

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

No que diz respeito ao tratamento do câncer, é consenso que o objetivo da quimioterapia antineoplásica é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, devido a relativa semelhança entre células malignas e normais do organismo a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma inespecífica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos indesejáveis da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (OLIVEIRA et al., 2007; KARAPIDAKI et al., 2009). Assim sendo, o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (ALMEIDA et al., 2005).

Diante disso, é evidente a importância da avaliação do balanço entre a atividade antitumoral *versus* toxicidade de um determinado produto para verificar sua aplicabilidade farmacológica.

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

A membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos (AKI; YAMAMOTO, 1991). Vários estudos indicam que certos compostos isolados de plantas, tais como polifenóis, glicosídeos,

saponinas e triterpenoides podem causar alterações nas membranas das células vermelhas do sangue e, posteriormente, produzir hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; BADER et al., 1996; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

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

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas. São obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las, permitindo dessa forma, conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste, os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (LARINI, 1999).

Grande parte dos trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais e sintéticos, baseados em regulamentações nacionais e internacionais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (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.

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 ocupacional ou acidentalmente, ou ainda por estilo de vida. Isso acontece pois a ação mutagênica por vezes se manifesta somente após 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. Há necessidade de testes rápidos e confiáveis que detectem os danos provocados por este tipo de exposição, como o teste do micronúcleo (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

O teste do micronúcleo *in vivo* é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de cromossomos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (RIBEIRO et al., 2003).

Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele 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; NEPOMUCENO, 2010).

Os micronúcleos podem ser observados 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 nas espécies nas quais é comprovado que o baço não remove eritrócitos contendo micronúcleos, como é o caso de camundongos (DERTINGER et al., 2006). As principais vantagens do teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico são: dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais; utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio (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; NEPOMUCENO, 2010). Vários estudos comprovam que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (HAYASHI et al., 2000; HAMADA et al., 2001; SILVA, 2011).

2.6 *Croton polyandrus*: família, gênero e espécie

Plantas 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 medicamentos fitoterápicos ou fonte de fármacos (SIMÕES et al., 2004).

Dentre as famílias de plantas medicinais existentes destaca-se a família Euphorbiaceae, que é a sexta maior família de vegetais do mundo, representada por 300 gêneros e nestes estão incluídos mais de 8.000 espécies distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo. Apesar de amplamente distribuída na região Amazônica, algumas espécies da família nunca foram estudadas do ponto de vista químico, farmacológico e/ou toxicológico (CRONQUIST, 1981; BERRY, 2006). Seus principais gêneros em número de espécies são: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (1.300), *Acalypha* L. (400), *Macaranga* Du Petit Thouars (400), *Antidesma* Burman (150), *Drypetes* Vahl (150), *Jatropha* L. (150), *Manihot* Miller (150) e *Tragia* Plumier (150) (WEBSTER, 1994). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, de hábito e habitat diferentes, e difundidas em todos os tipos de vegetação (BARROSO et al., 1991).

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

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

Dentre as atividades farmacológicas experimentalmente comprovadas para o gênero *Croton* estão em destaque o seu potencial anti-inflamatório (ORTEGA et al., 1996), antifúngico (MAcBAE; HUDSON; TOWERS, 1988), moluscicida (ROUQUAYROL et al., 1980), hipotensor (BHAKUNI et al., 1969), larvicida (KALYANASUNDARAM; DAS, 1985), antiviral (MAcBAE; HUDSON; TOWERS, 1988), antiulcerogênico (HIRUMA-LIMA et al., 1999), analgésico (NARDI et al., 2006), antiestrogênico (COSTA et al., 1999),

inseticida (ATAL et al., 1978), antimicrobiano (KUMAR; BAGCHI; DAROKAR, 1997), antioxidante (NARDI et al., 2003), antidiabético (TORRICO et al., 2007), laxativo (FARNSWORTH et al., 1969), antimutagênico (ROSSI et al., 2003), vasorelaxante (MILLER et al., 2001) e ainda mostraram citotoxicidade frente *A. salina* (HORGAN, 2001) e indução de diferenciação celular (MATA-GREENWOOD et al., 2001).

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

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

Dentre as espécies deste gênero encontradas no Brasil, destaca-se a *Croton polyandrus* Spreng. que é conhecida no nordeste brasileiro como “croton de tabuleiro”, porém não apresenta uso popular. É comum em terrenos arenosos e em vegetação da costa desta região. Trata-se de uma espécie do semi-árido brasileiro, embora ocorra também no domínio da floresta atlântica ocorrendo nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (SILVA et al., 2010).

A espécie é pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico. O estudo farmacológico das partes aéreas e das raízes de *Croton polyandrus* Spreng realizado por Fernandes (2012) levou a identificação de óxido de β -cariofileno, β -sitosterol, feofitina A, carvacrol, 5- β -hidroxi-2-oxo-*p*-ment-6(1)-eno, 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído, 1,2,3,4-tetrahidroxi-*p*-mentano, sitosterol-3-*O*- β -D- glicopiranosídeo e sacarose.

O óleo essencial obtido das folhas de *Croton polyandrus* foi estudado do ponto de vista químico e identificado através de técnicas específicas. Pela análise em CG-EM

(Cromatografia Gasosa em Espectrometria de Massa) e CG-FID (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama) do óleo essencial das folhas de *C. polyandrus* foi possível identificar 33 componentes, correspondendo a 86,1% do total do óleo em uma mistura de 72,7% de monoterpenos e 24,2% de sesquiterpenos. Os constituintes majoritários foram o p-cimeno (12,4%), acetato de bornila (11%), ascaridol (6,4%) e cânfora (6,4%) como mostrado na tabela 1 (FERNANDES et al., 2012).

Além disso, estudo recente com o óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus* foi realizado em seis cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus* - ATCC 13150, *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* - P03, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 25853, *Escherichia coli* - ATCC 25922 e *Escherichia coli* - 5) e seis cepas de fungos (*Candida albicans* – ATCC 90028, *Candida albicans* – LM 109, *Candida tropicalis* - ATCC 13803, *Candida tropicalis* – LMP 20, *Candida krusei* – LM 13 e *Candida krusei* – LM 08). O óleo essencial não apresentou atividade antibacteriana frente às linhagens de bactérias gram positivas e gram negativas testadas, mas demonstrou significativa atividade antifúngica contra as cepas de *Candida* (FERNANDES et al., 2012).

Foi realizado também o estudo da atividade antitumoral *in vitro* pelo método da sulforrodamina B, utilizando-se as linhagens tumorais: glioma (U251), melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário (NCI-ADR/RES), rim (786-O), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29) e leucemia (K562). Os resultados do óleo essencial expressos em inibição total do crescimento (TGI – *total growth inhibition*), assinalados na tabela 2, mostram efeito citotóxico, para a maioria das linhagens celulares utilizadas, apenas na concentração mais elevada (250 µg/mL). Considerando-se os critérios descritos por Fouché et al. (2008), o óleo essencial de *Croton polyandrus* foi inativo para todas as linhagens tumorais (TGI > 50 µg/mL) (FERNANDES et al., 2012).

Muitos dos compostos que se mostram promissores nos testes *in vitro* podem não apresentar boa atividade em animais, da mesma forma que o efeito inverso também pode ocorrer, ou seja, compostos inativos *in vitro* podem produzir importantes efeitos *in vivo*.

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; GILMAN, 2006).

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Croton polyandrus* (FERNANDES et al., 2012)

SUBSTÂNCIAS	(% relativa)
n-Nonano	1,00
α -Thujeno	0,50
Tetrahidro-citroneleno	0,80
α -Pineno	1,60
Canfeno	0,70
β -Pineno	0,50
Mirceno	1,90
Mesitileno	2,10
n-Decano	2,40
α -felandreno	1,7
α -Terpineno	3,3
p-Cimeno	12,4
Limoneno	1,90
1,8-Cineol	3,70
γ -Terpineno	4,20
n-Undecano	2,90
Cânfora	6,40
Isoborneol	1,50
Borneol	0,60
Terpinen-4-ol	2,30
p-Cimen-8-ol	0,40
α -Terpineol	1,90
Ascaridol	6,4
Acetato de bornila	11,0
Acetato de mirtenil	0,8
(E)-Cariofileno	2,4
α -Humuleno	3,3
(Z)- β -Farneseno	0,6
β -Bisaboleno	0,9
Espatulanol	0,8
Óxido de cariofileno	2,6
Epóxido de Humuleno II	1,5
4(12),8(13)-dien-5-ol- cariofila	1,1
Total identificado	86,10

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 parenteral, com observação do efeito farmacológico.

A falha na correlação entre os efeitos observados *in vitro* e *in vivo*, muitas vezes pode estar associada a características farmacocinéticas dos compostos, como baixa biodisponibilidade, duração de ação (muito curta ou muito longa), ou a necessidade de ativação metabólica (PEREIRA, 2007).

Diante do exposto, podemos afirmar que o fraco efeito citotóxico do óleo essencial de *Croton polyandrus* (O.E.C.) frente as linhagens tumorais testadas em ensaio *in vitro* não indica que o mesmo venha a ser ineficaz quando avaliado em modelos *in vivo*.

Tabela 2 - Valores de TGI (inibição total do crescimento) do óleo essencial de *Croton polyandrus* e da doxorubicina ($\mu\text{g/mL}$) (FERNANDES et al., 2012).

Linhagens celulares	TGI ($\mu\text{g/mL}$)	TGI ($\mu\text{g/mL}$)
	O. E. C.	Doxorrubicina
CHO	72,5	1,58
U251	65,0	0,97
UACC-62	81,7	0,22
MCF7	122,0	2,01
NCI/ADR-RES	155,7	>250
786-0	104,0	1,12
NCI-H460	139,6	2,04
PC-3	87,0	1,16
OVCAR-3	82,1	6,12
HT29	164,5	>250
K-562	>250	>250
HaCat	>250	>250

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do O.E.C. em eritrócitos de camundongos;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do O.E.C. em camundongos, com base na RE N° 90/04 da ANVISA;
- Avaliar a possível atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do O.E.C. frente células tumorais malignas de carcinoma de Ehrlich;
- Avaliar o perfil das células tumorais retiradas da cavidade peritoneal dos animais inoculados com tumor de Ehrlich por meio de estudos de viabilidade;
- Investigar o possível mecanismo de ação do O.E.C. por meio de estudos de apoptose e ciclo celular;
- Avaliar o efeito imunomodulador do O.E.C., através da determinação dos índices de baço e timo;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do O.E.C. através da avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos, análise anatomopatológica de órgãos vitais, consumo de água e ração, e evolução ponderal;
- Avaliar o efeito do O.E.C. na sobrevida dos animais inoculados com tumor de Ehrlich;
- Avaliar a atividade genotóxica do O.E.C. através do Teste do Micronúcleo em sangue periférico.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George localizados no Centro de Biotecnologia (CBiotec), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS/UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Óleo essencial de *Croton polyandrus*

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

4.2.2 Animais

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

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do CBiotec/UFPB (CEUA), sob a certidão N° 0403/12.

4.2.3 Linhagem de células tumorais

Para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foi usada a linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/UNICAMP). As células são mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus musculus*) no Biotério Prof. Thomas George, sendo realizado repique semanal.

4.3 Métodos

4.3.1 *In vitro*

4.3.1.1 Citotoxicidade frente eritrócitos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O.E.C. 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. Os controles positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma- Aldrich®) em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave 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 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH_{50} do O.E.C. (concentração do que produz 50% de hemólise), utilizando a seguinte fórmula:

$$\%Hemólise = \frac{A_{Tx} - A_{óleo} \times 100}{A_{Tx}}$$

Onde:

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

$A_{óleo}$ = Absorbância do poço contendo a concentração do O.E.C.

4.3.1.2 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich

Células da linhagem carcinoma ascítico de Ehrlich foram utilizadas para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. As células foram coletadas da cavidade peritoneal do camundongo com 7 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 de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10% de soro fetal bovino (SBF) (Nutricell®). As células tumorais foram então semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware®) e incubadas com diferentes concentrações (10 -500 µg/mL) do O.E.C. por 24 h (37 °C e 5 % CO₂). 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 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; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado espectrofotometricamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

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 *In vivo*

4.3.2.1 Ensaio Toxicológico pré-clínico agudo

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” (RE N. 90/04 – ANVISA), com algumas modificações (BRASIL, 2004).

Camundongos Swiss, seis machos e seis fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses de 250, 375 e 500 mg/kg do O.E.C. intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo. O número de animais mortos foram contabilizados para estimativa da dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais (DL₅₀).

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

Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB e descrito por Almeida e colaboradores (1999). Desde a 24ª hora e até 14 dias após a administração da dose, foram observadas a variação do peso e o consumo de água e alimentos pelos animais experimentais.

Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados. Os órgãos, fígado, rins, coração, timo e baço foram removidos e pesados. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células tumorais de carcinoma de Ehrlich

4.3.2.2.1 Volume, peso do tumor e viabilidade celular

As células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram implantadas por via intraperitoneal (2.10^6 células/animal), na cavidade peritoneal de camundongos fêmeas (n=12). Vinte e quatro horas após a implantação, O.E.C. foi solubilizado em Tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5%) e administrado (i.p.) durante nove dias, nas doses de 100 e 150 mg/kg. 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®) (25 mg/kg) foi usado como controle positivo. Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução de 5% de Tween 80. 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 (Carcinoma de Ehrlich).

No dia seguinte após a administração da última dose, seis animais de cada grupo foram anestesiados para coleta de sangue e análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Os animais foram então eutanasiados, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal, e o volume do líquido foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para contagem das células viáveis e não-viáveis, através do ensaio de exclusão do azul de tripan. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluirm o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação do número de células viáveis (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

O peso do tumor foi mensurado pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico e expresso em gramas (g). Os órgãos (timo, baço,

fígado, coração e rins) foram extirpados, pesados, para cálculo do índice dos órgãos, e fixados em formaldeído (10%).

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos, foi realizada avaliação do consumo de água e ração e evolução ponderal durante o tratamento.

Adicionalmente, seis animais de cada grupo foram mantidos vivos para o cálculo da sobrevivência de animais experimentais (DOLAI et al., 2012).

4.3.2.2.2 Análise e quantificação da apoptose

A capacidade do O.E.C. produzir apoptose das células tumorais presentes no líquido ascítico foi avaliada utilizando-se o kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (Sigma-Aldrich®, EUA). As células coletadas da cavidade peritoneal de camundongos dos diferentes grupos, após tratamento de nove dias com O.E.C., foram lavadas e ressuspensas em solução de HBSS estéril de modo a se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Numa alíquota contendo 1×10^6 células/mL, foram adicionados 300 µL do tampão de ligação (HEPES/NaOH 100 mM, NaCl 1,4 M, CaCl_2 25 mM), 2,5 µL de Anexina-V FITC e 5 µL de solução iodeto de propídeo - IP (100 µg/mL em 10 mM de K_3PO_4 , contendo 150 mM de NaCl). A suspensão foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo (FacsCalibur®, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram tratados no programa WinMDI versão 2.9.

4.3.2.2.3 Análise do ciclo celular

Um dos mecanismos de apoptose foi avaliado por determinação da porcentagem de células com conteúdo reduzido de DNA na fração sub-G1. Para isso, uma alíquota de células foi retirada do líquido ascítico dos animais dos diferentes grupos experimentais, após nove dias de tratamento com O.E.C., para análise do ciclo celular. As células foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) e a concentração ajustada para 1×10^6 células/mL. Em seguida, 1×10^6 células/mL foram transferidas para um tubo de poliestireno e centrifugadas a 3000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300 µL da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e Triton X-100 0,1% (p/v)] (Sigma-Aldrich® – T-8787, EUA), 50 µg/mL de PI e água

Milli-Q (volume final = 50 mL) e as células foram incubadas durante 4 horas, a 4°C, ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCalibur®, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram tratados no programa WinMDI versão 2.9.

4.3.2.3 Avaliação da toxicidade

4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

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

4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No dia seguinte após administração da última dose, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico, 50 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 (ureia, 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. As extensões sanguíneas foram coradas automaticamente no HEMATEL 200® e analisadas em microscópio óptico TAIMIN®, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

4.3.2.3.3 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, rins e coração) extirpados, pesados e examinados macroscopicamente para investigação de mudanças de

coloração, hemorragias ou outras alterações. Em seguida os órgãos (fígado e rins) foram fixados em formaldeído (10%). O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.3.2.3.4 Análises anatomopatológicas

Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) 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 e ao método de Gordon e Sweet para reticulina, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os procedimentos descritos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo e o registro fotomicrográfico foi realizado no Laboratório Virchow[®], sediado em João Pessoa/PB, em microscópio triocular Leica ATC 2000[®], acoplado a um sistema de transmissão de vídeo-imagem com placa de captura Wonder.

4.3.2.4 Avaliação da genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo, grupos de cinco camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas foram intraperitonealmente tratados com duas diferentes doses do O.E.C. (150 e 300 mg/kg). Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 5%) foram incluídos. Após 48 horas os animais foram anestesiados com tiopental sódico, 50 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 (OECD, 1997).

4.3.3 Análise estatística

Para os ensaios *in vitro* com eritrócitos, foram realizados três experimentos em triplicata. Os valores de 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* tiveram seus valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste *t* não pareado, para análise de duas colunas e teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, para a comparação de mais de duas colunas, seguido do teste de *Tukey* (para variáveis paramétricas). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 5.0.

Resultados



5 RESULTADOS

5.1 *In vitro*

5.1.1 Citotoxicidade frente eritrócitos

A citotoxicidade do O.E.C. foi avaliada frente eritrócitos de camundongos Swiss. A porcentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com o óleo essencial. O valor de CH_{50} obtido foi de 141,0 (140,5 - 141,6) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

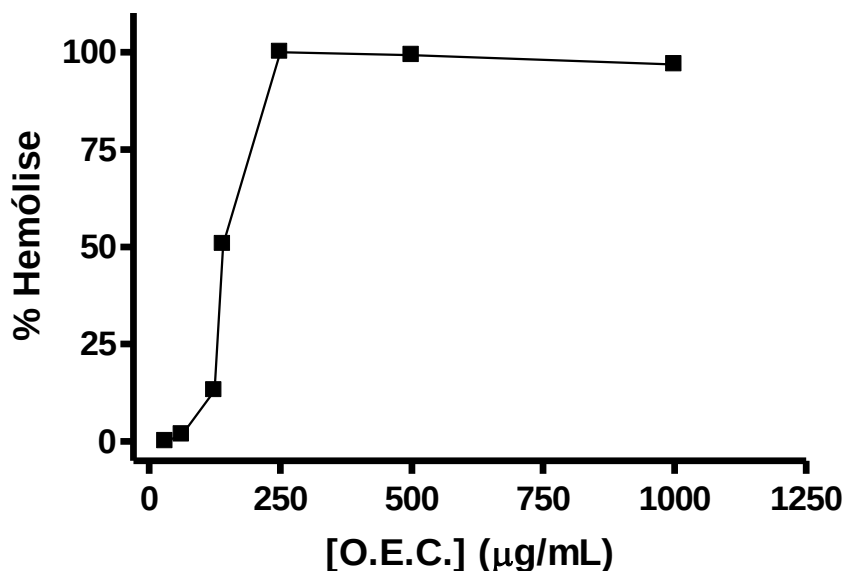


Gráfico 1 - Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.C. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em triplicata, com intervalo de confiança de 95%.

5.1.2 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich

Células da linhagem carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratadas com concentrações crescentes do O.E.C. por 24 h, e a viabilidade celular foi analisada através do ensaio de redução do MTT.

Os resultados mostram que o O.E.C. reduziu a porcentagem de viabilidade celular de maneira concentração dependente, apresentando um valor de CI_{50} de 270,6 (245,5 - 298,2) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2).

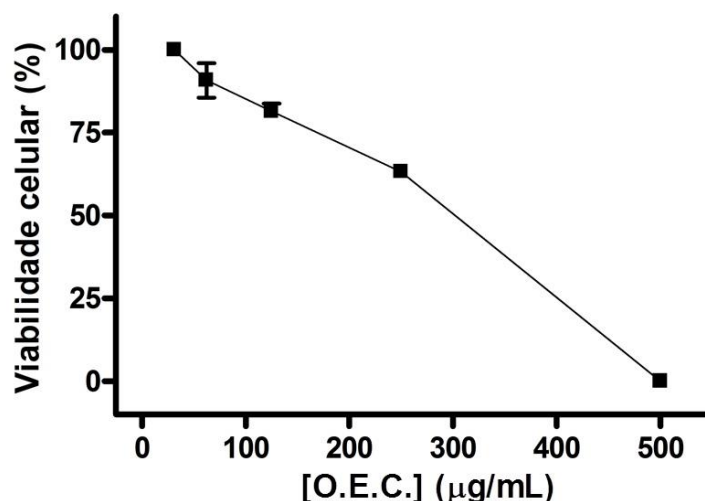


Gráfico 2 - Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com o O.E.C. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

5.2 *In vivo*

5.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

5.2.1.1 Avaliação comportamental e DL_{50}

Após o tratamento agudo (i.p.) com doses de até 500 mg/kg do O.E.C. em camundongos, foi evidenciada uma relação dose-dependente na morte dos animais experimentais, como mostrado na tabela 3. O valor de DL_{50} obtido foi em torno de 447,18 mg/kg. Ainda, foram observados alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (Tabela 3). Foram observados leves efeitos excitatórios sobre o SNC, de curta duração (hiperatividade), na menor dose (250 mg/kg) e predomínio de efeitos depressores sobre o SNC (ptose, ataxia, e abdução das patas do trem posterior) a partir da dose de 375 mg/kg. Esses efeitos depressores se manifestaram especialmente como precursores nos eventos de óbito, mais especificamente a respiração forçada dos animais.

Tabela 3 - Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas do O.E.C. em camundongos.

Dose (mg/kg)	Sexo	M/T	Sintomas
250	M	0/6	Hiperatividade
	F	0/6	Nenhum
375	M	2/6	Hiperatividade, ptose, respiração forçada, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular
	F	1/6	Hiperatividade, ptose, respiração forçada, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular
500	M	5/6	Hiperatividade, ptose, ataxia, respiração forçada, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, abdução das patas do trem posterior, diarreia
	F	3/6	Hiperatividade, ptose, ataxia, respiração forçada, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, abdução das patas do trem posterior, diarreia

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

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

Na Tabela 4 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal, avaliados durante os 14 dias de observação.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que, após tratamento com dose única do O.E.C., houve diminuição significativa no consumo de água nas doses de 250 e 375 mg/kg para ambos os grupos (macho e fêmea), quando comparado ao grupo controle. Já no consumo de ração percebe-se diminuição significativa na dose de 250 mg/kg somente para os machos e em 375 mg/kg para ambos os grupos. Em relação ao peso corporal, houve diminuição significativa nos grupos tratados com o O.E.C. nas doses de 250 e 375 mg/kg para os machos, quando comparados ao grupo controle.

Esses parâmetros não puderam ser avaliados na dose de 500 mg/kg devido a morte dos animais experimentais.

Tabela 4 - Efeitos do tratamento agudo com O.E.C. (250 e 375 mg/kg) na avaliação ponderal e consumo de água e ração dos camundongos.

Grupos	Sexo	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	M	--	46,92 ± 1,45	40,72 ± 0,63	31,22 ± 0,57	37,68 ± 1,68
	F		39,38 ± 0,71	34,42 ± 0,97	30,45 ± 0,84	33,85 ± 0,70
O.E.C.	M	250	38,85 ± 1,01 ^a	35,69 ± 1,21 ^a	28,45 ± 0,92	30,03 ± 1,05 ^a
	F		32,08 ± 0,89 ^a	34,16 ± 1,43	27,52 ± 1,05	32,67 ± 0,88
O.E.C.	M	375	33,08 ± 2,16 ^a	27,43 ± 0,93 ^a	30,65 ± 0,96	29,55 ± 2,56 ^a
	F		26,15 ± 1,28 ^a	25,28 ± 1,99 ^a	29,02 ± 0,92	32,84 ± 0,63

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^ap<0,05 comparado com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.1.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a eutanásia dos animais sobreviventes, os órgãos foram removidos e pesados. Nenhuma alteração significativa no índice de coração, rins, baço e timo foi observada entre os grupos de animais controle e tratados com O.E.C. nas diferentes doses (250 e 375 mg/kg). Já o índice do fígado, para as fêmeas na dose de 375 mg/kg, diminuiu significativamente quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeitos do tratamento agudo do O.E.C. nos índices dos órgãos de camundongos.

Grupos	Sexo	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Controle	M	----	4,41 ± 0,15	62,47 ± 3,76	13,21 ± 0,75	2,72 ± 0,19	4,41 ± 0,51
	F		3,56 ± 0,06	60,74 ± 1,28	11,17 ± 0,48	3,84 ± 0,16	6,28 ± 0,63
O.E.C	M	250	3,95 ± 0,21	57,41 ± 3,26	12,19 ± 0,79	2,93 ± 0,27	4,50 ± 0,13
	F		3,66 ± 0,07	61,38 ± 2,03	11,03 ± 0,28	3,31 ± 0,24	5,91 ± 0,41
O.E.C.	M	375	4,03 ± 0,14	51,63 ± 0,76	12,80 ± 0,47	2,70 ± 0,48	4,33 ± 0,28
	F		3,65 ± 0,12	53,37 ± 1,15 ^a	10,70 ± 0,26	3,71 ± 0,16	7,15 ± 0,51

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média

^ap<0,05 comparado com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* frente células de carcinoma ascítico de Ehrlich

5.2.2.1 Volume, peso do tumor e viabilidade celular

Camundongos transplantados com células tumorais de carcinoma de Ehrlich foram tratados intraperitonealmente com o O.E.C. (100 e 150 mg/kg), por nove dias, para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*.

Uma significativa redução do peso dos tumores, volume e viabilidade de células tumorais foi observada em ambos os grupos tratados com o óleo essencial e também com o 5-FU (25 mg/kg), quando comparados ao controle transplantado.

Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o O.E.C. e o 5-FU. Os dados da viabilidade celular, o volume tumoral (mL) e o peso tumoral (g) dos tumores dos animais tratados com o O.E.C. (100 e 150 mg/kg), 5-FU (25 mg/kg) e do controle transplantado estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU na viabilidade celular, volume tumoral e peso dos tumores de carcinoma ascítico de Ehrlich, em camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Viabilidade celular ($\times 10^6$ cél./mL)	Volume tumoral (mL)	Peso tumoral (g)
Controle	----	219,8 $\pm$ 27,77	9,34 $\pm$ 1,40	11,70 $\pm$ 1,44
5-FU	25	2,99 $\pm$ 0,96 ^a	0,09 $\pm$ 0,02 ^a	2,30 $\pm$ 0,09 ^a
O.E.C.	100	4,85 $\pm$ 1,28 ^a	0,10 $\pm$ 0,02 ^a	2,28 $\pm$ 0,33 ^a
O.E.C.	150	3,95 $\pm$ 0,49 ^a	0,04 $\pm$ 0,02 ^a	0,82 $\pm$ 0,13 ^a

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0.05$ dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2.2 Análise e quantificação da apoptose

No gráfico 3 é possível observar que os tratamentos com O.E.C. induziram um aumento significativo na porcentagem de células de carcinoma de Ehrlich marcadas com Anexina V-FITC e IP, em comparação com o controle. Após o tratamento com O.E.C. (100 e 150 mg/kg) a porcentagem de células em apoptose tardia/necrose foi de 24,63% e 14,86%, respectivamente.

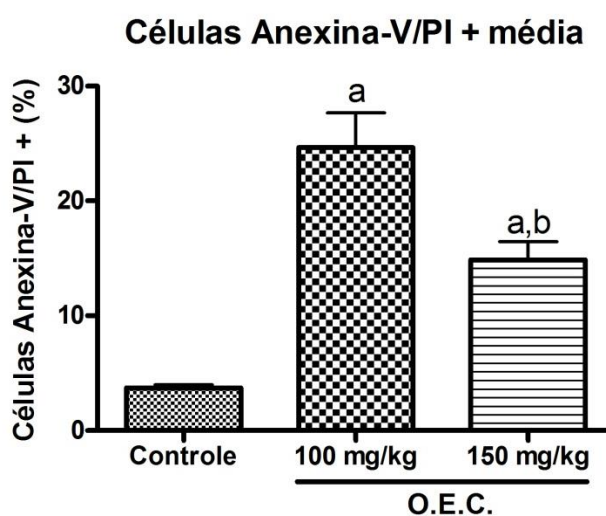


Gráfico 3 - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose tardia/necrose após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.C. (100 mg/Kg) e O.E.C. (150 mg/kg). ^a $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.). ^b $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo tratado com 100 mg/kg por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2.3 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com 100 e 150 mg/kg do O.E.C. induziu alteração significativa na distribuição das células de carcinoma de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular.

Após o tratamento com O.E.C. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) houve um aumento na porcentagem de células na fase G0/G1 (76,5%, 62,2% e 84,3%, respectivamente), e redução simultânea de células nas fases S (11,4%, 14,9% e 8,4%, respectivamente) e G2/M (2,8%, 13,8% e 4,8%, respectivamente).

Além disso, aumento significativo no conteúdo de DNA sub-diploide (DNA fragmentado) foi encontrado nas células dos animais tratados com O.E.C. A porcentagem de células na fase sub-G1 foi de 9,1% e 8,9% após tratamento com 100 e 150 mg/kg, respectivamente.

Os perfis representativos das fases do ciclo celular obtidos após administração do O.E.C. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) estão representados na Figura 1.

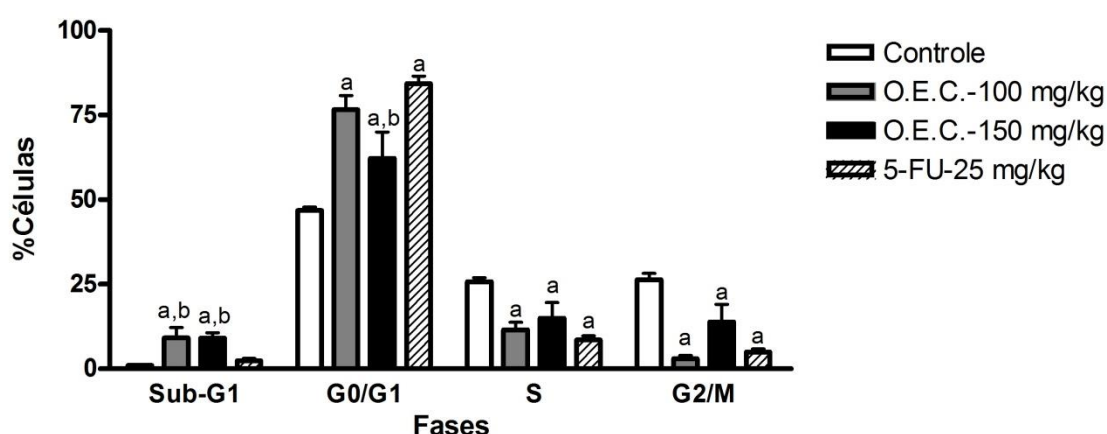


Gráfico 4 - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.C. (100 mg/Kg), O.E.C. (150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). ^a $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo controle, ^b $p < 0,05$ dados analisados em comparação com o grupo tratado com o 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

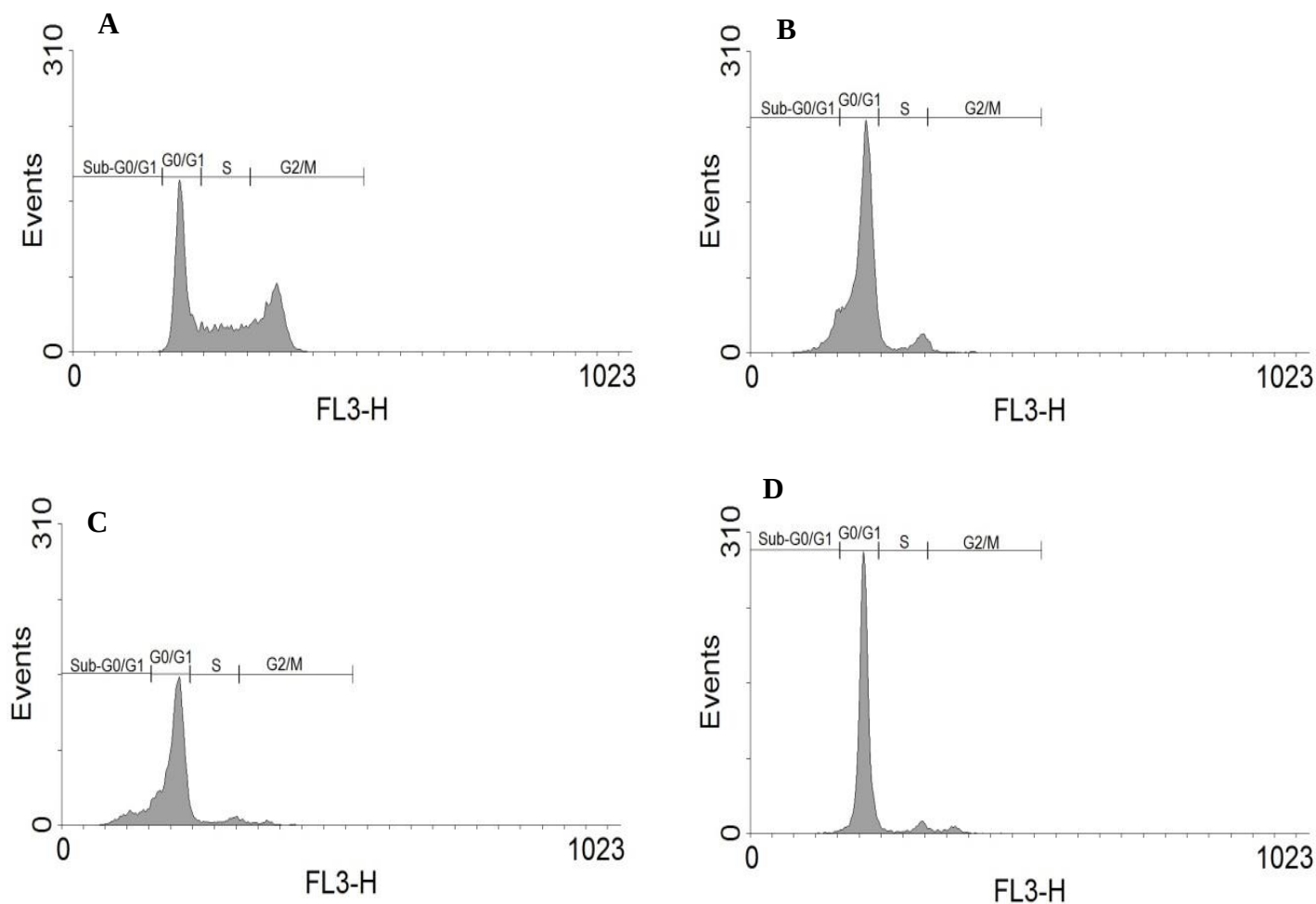


Figura 1 - Análise da distribuição das fases do ciclo celular nas células de tumor de Ehrlich, após tratamento com solução 5% tween 80 (controle negativo) (A), O.E.C. (100 mg/Kg) (B), O.E.C. (150 mg/kg) (C) e 5-FU (25 mg/kg) (D). Histogramas representativos de conteúdo de DNA (eixo x, fluorescência FL3/H) *versus* número de eventos.

5.2.3 Avaliação da toxicidade

5.2.3.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração

Na Tabela 7 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal, avaliados durante os nove dias de tratamento.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que, após tratamento de nove dias com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.C., houve diminuição significativa no consumo de

ração em ambas as doses, tanto quando comparados ao grupo controle transplantado, quanto ao sadio. Em relação ao consumo de água, uma diminuição foi observada apenas na maior dose do tratamento.

Em relação ao peso corporal, ao serem avaliados os animais após a retirada/ drenagem do volume de tumor ascítico residual, foi verificada uma diminuição significativa em todos os animais tratados, inclusive com o 5-FU.

Tabela 7 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU sobre o consumo de água, ração e ganho de peso dos animais tratados durante nove dias.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Sadio	--	35,67 ± 1,12	30,85 ± 1,57	28,62 ± 0,37	32,27 ± 0,86
Controle	--	34,69 ± 2,16	29,33 ± 1,45	27,74 ± 1,20	31,02 ± 1,10
5-FU	25	33,44 ± 1,57	32,84 ± 1,21	27,56 ± 0,62	25,78 ± 0,35 ^{a,b}
O.E.C.	100	32,19 ± 2,70	24,41 ± 0,88 ^{a,b}	27,90 ± 1,31	26,88 ± 0,94 ^{a,b}
O.E.C.	150	24,38 ± 1,70 ^{a,b}	15,49 ± 1,17 ^{a,b}	29,30 ± 0,86	24,34 ± 0,93 ^{a,b}

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo controle sadio por ANOVA seguido de Tukey

5.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

A investigação dos efeitos toxicológicos do O.E.C. prosseguiu-se também com a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de ureia e creatinina em ambos os grupos tratados com o O.E.C. e no grupo tratado com o 5-FU, quando comparados com o controle transplantado e tampouco com o sadio. Já em relação às enzimas hepáticas, pode-se observar um aumento significativo da atividade enzimática da AST e ALT no grupo tratado com a dose de 150 mg/kg do O.E.C., em relação ao grupo transplantado e ao sadio. O grupo tratado com 5-FU e o grupo tratado com a

dose de 100 mg/kg do O.E.C. não apresentaram alterações nas atividades de AST e ALT (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Sadio	--	283,2 ± 24,94	53,6 ± 6,55	39,0 ± 1,87	0,42 ± 0,08
Controle	--	287,8 ± 20,19	71,8 ± 7,31	66,0 ± 11,64	0,46 ± 0,04
5-FU	25	242,0 ± 12,17	67,8 ± 7,11	43,0 ± 7,14	0,32 ± 0,02
O.E.C.	100	348,0 ± 32,35	54,0 ± 8,50	52,8 ± 16,86	0,63 ± 0,15
O.E.C.	150	405,2 ± 24,43 ^{a,b}	240,8 ± 27,88 ^{a,b}	30,6 ± 4,41	0,60 ± 0,02

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

Em relação à avaliação hematológica, houve uma diminuição significativa na contagem de hemácias do grupo tratado com o óleo essencial na dose de 150 mg/kg, quando comparado ao controle sadio e ao controle transplantado. Diminuição significativa também foi observada no parâmetro hemoglobina e hematócrito, nos valores do grupo tratado com O.E.C. (150 mg/kg), quando comparados ao controle sadio (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Sadio	--	$9,36 \pm 0,14$	$14,84 \pm 0,24$	$43,84 \pm 0,55$
Controle	--	$8,20 \pm 0,50$	$12,50 \pm 0,80$	$40,76 \pm 2,38$
5-FU	25	$8,48 \pm 0,16$	$12,88 \pm 0,08$	$37,32 \pm 1,01$
O.E.C.	100	$8,79 \pm 0,23$	$14,14 \pm 0,17$	$40,40 \pm 0,69$
O.E.C.	150	$6,21 \pm 0,74^{a,b}$	$10,46 \pm 0,18^b$	$34,22 \pm 4,07^b$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

Em relação ao Volume Corpuscular Médio (VCM) houve aumento significativo no grupo tratado com 150 mg/kg do O.E.C. em comparação tanto ao controle transplantado quanto ao sadio. Enquanto que, para o grupo tratado na dose de 100 mg/kg, houve uma diminuição significativa em comparação ao controle transplantado e estes dados para o 5-FU diminuíram significativamente tanto em comparação ao controle transplantado como para o sadio. Aumento significativo foi observado para os valores da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) no grupo tratado com 150 mg/kg do O.E.C. em comparação ao grupo controle transplantado. Em relação à Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), não houve alteração significativa em nenhum dos grupos tratados (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento (continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Sadio	--	46,80 ± 0,97	15,84 ± 0,47	33,74 ± 0,38
Controle	--	49,60 ± 0,25	15,26 ± 0,19	30,68 ± 0,28
5-FU	25	43,80 ± 0,58 ^{a,b}	15,22 ± 0,23	34,52 ± 0,83
O.E.C.	100	46,00 ± 0,84 ^a	16,14 ± 0,26	34,04 ± 0,52
O.E.C.	150	54,80 ± 0,20 ^{a,b}	16,88 ± 0,24 ^a	32,62 ± 1,79

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

No que se refere à contagem total de leucócitos, foi observado uma diminuição significativa nesse parâmetro nos grupos tratado com 150 mg/kg do O.E.C. e 25 mg/kg do 5-FU em comparação com o grupo transplantado (Tabela 9).

Na contagem diferencial de leucócitos, houve uma diminuição de linfócitos e aumento de neutrófilos do grupo tratado com o O.E.C. (150 mg/kg) em comparação com o controle sadio. No tratamento após a dose de 100 mg/kg a única alteração observada foi um aumento de neutrófilos em comparação com o controle sadio. Já o grupo tratado com o 5-FU apresentou aumento significativo na percentagem de linfócitos e reduções significativas no número de leucócitos totais e porcentagem de neutrófilos, quando comparados ao grupo controle transplantado (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento (continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Sadio	--	$8,18 \pm 0,43$	$60,60 \pm 4,24$	$34,60 \pm 4,21$	$4,40 \pm 0,74$	$0,40 \pm 0,24$
Controle	--	$13,66 \pm 1,0$	$36,20 \pm 6,53^b$	$54,20 \pm 9,22$	$4,20 \pm 1,2$	$0,29 \pm 0,20$
5-FU	25	$4,12 \pm 0,59^a$	$78,40 \pm 2,21^a$	$17,40 \pm 2,5^a$	$3,40 \pm 0,75$	$0,40 \pm 0,24$
O.E.C.	100	$10,86 \pm 2,87$	$41,40 \pm 8,48$	$64,0 \pm 6,63^b$	$4,0 \pm 1,13$	$0,22 \pm 0,11$
O.E.C.	150	$4,86 \pm 1,0^a$	$24,23 \pm 2,88^b$	$63,40 \pm 5,5^b$	$5,60 \pm 1,12$	$0,60 \pm 0,40$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Na Tabela 10 estão expressos os valores referentes aos índices dos órgãos dos animais avaliados após nove dias de tratamento.

Nenhuma alteração significativa nos índices de coração, fígado, rins e baço foi observada entre os grupos de animais controle, sadio e tratados com o O.E.C. nas doses avaliadas (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).

Houve apenas uma diminuição significativa no índice do timo do grupo tratado com O.E.C. (150 mg/kg) em relação ao grupo controle sadio.

Tabela 10 - Efeitos do O.E.C. e 5-FU nos órgãos de camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Sadio	----	4,22 ± 0,25	50,83 ± 2,07	10,85 ± 0,47	3,73 ± 0,54	5,54 ± 0,46
Controle	----	3,86 ± 0,12	69,42 ± 4,04	13,17 ± 0,59	2,61 ± 0,15	6,19 ± 0,28
5-FU	25	4,84 ± 0,48	57,39 ± 1,92	12,29 ± 0,30	2,85 ± 0,08	6,32 ± 0,51
O.E.C.	100	4,38 ± 0,15	64,35 ± 4,09	13,15 ± 0,64	2,88 ± 0,60	7,12 ± 0,98
O.E.C.	150	4,73 ± 0,31	62,35 ± 5,46	14,55 ± 0,32	1,84 ± 0,13 ^a	5,49 ± 0,83

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

^ap < 0,05 comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.3.4 Análises anatomopatológicas

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

Os rins removidos dos grupos controle transplantado e tratados com 5-FU e O.E.C., nas doses de 100 e 150 mg/kg, apresentaram-se histologicamente com lobos bem definidos (pirâmide medular e tecido cortical recobrimdo a sua base e lados) e lóbulos preservados. Glomérulos (corpúsculo de Malpighi) preservados, inclusive numericamente, envolvidos por fina cápsula de Bowman e o tufo capilar sustentado por delicado mesângio (Figura 2A), fazendo relação com a arteríola renal e túbulos contorcidos proximais (Figura 2B). 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 (Figura 2C). Partes delgadas e curvilíneas das alças de Henle estavam delineadas por células achatadas. Túbulos coletores direcionados para as papilas, delineados por células altas, com citoplasmas claros (anfófilicos), tendo tecido fibroconjuntivo interveniente delicado (Figura 2D).

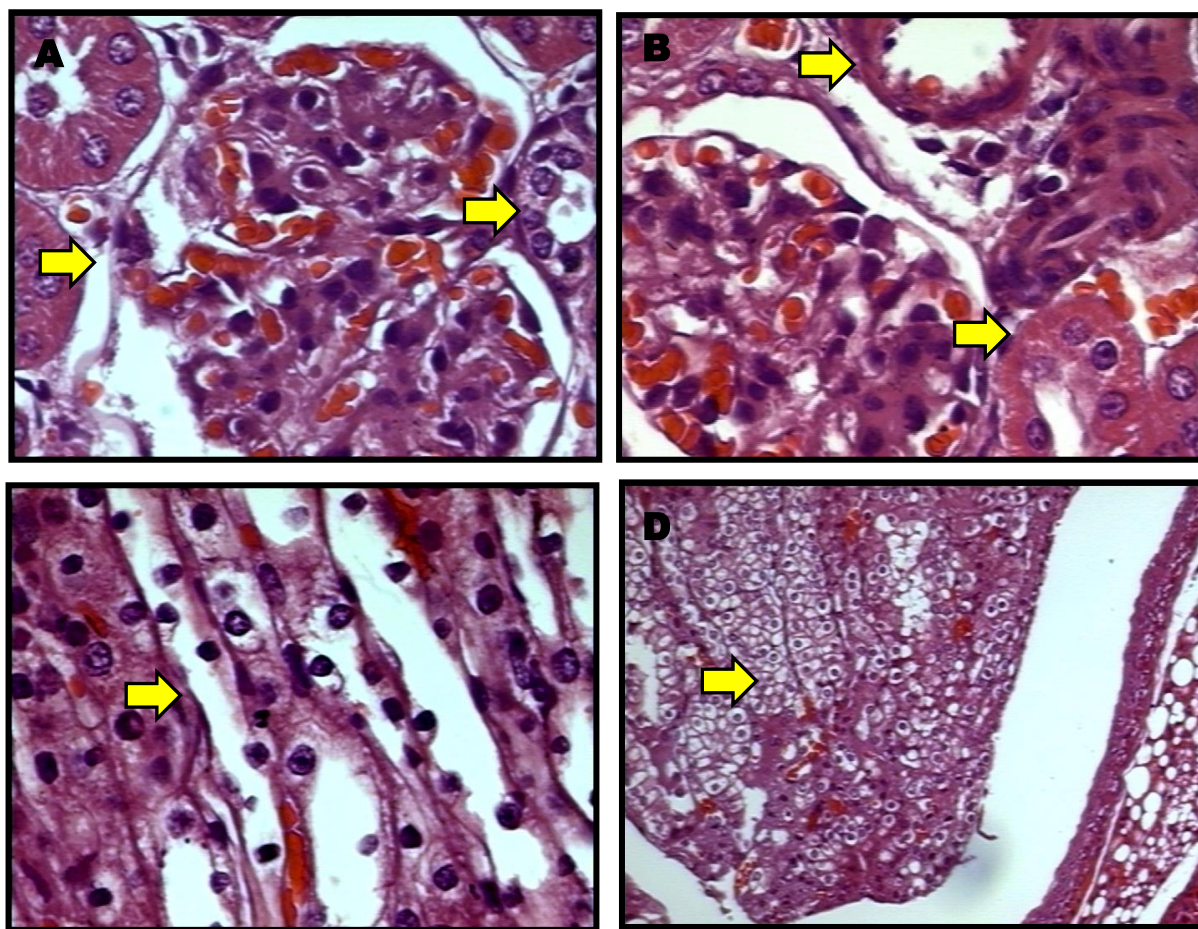


Figura 2 - Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado e **(B)** 5-FU (25 mg/kg) – Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio e sua relação com arteríola renal e túbulos contorcidos proximais; **(C)** O.E.C. (100 mg/kg) – Alças de Henle sem particularidades histológicas; **(D)** O.E.C. (150 mg/kg) – Túbulos coletores revestidos por epitélio cilíndrico, cujas células mostram citoplasmas claros, configurando estrutura calicial, em relação com a pélvis renal; Hematoxilina-eosina: **A – C** (x 400); **D** (x 100).

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle transplantado apresentaram arquitetura do tipo lobular, com veias hepáticas terminais de paredes finas, presença de inflamação sinusoidal leve e ausência de fibrose parenquimatosa (Figura 3A). No seio do lóbulo, identificou-se discreto infiltrado inflamatório linfocitário coincidente com focos de necrose, em raros sítios (Figura 3B). De modo geral, os hepatócitos eram isomorfos e os referidos focos de necrose parenquimatosa foram vistos, nas zonas III (Figura 3C). Havia portite linfocitária discreta, de natureza reacional, na ausência de atividade periportal e perisseptal.

O quadro histológico observado em um animal tratado com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.C. superpôs-se aquele do grupo controle transplantado, exceto pela observação de hiperplasia de células de Kupffer nos referidos animais (Figura 3D).

Entretanto, em dois animais dos mesmos grupos de tratamento, identificaram-se além das características descritas acima, um aumento moderado do número de linfócitos em alguns espaços portais e os focos de necrose parenquimatosa foram vistos, aleatoriamente, nas zonas I, II e III (Figura 3E). Nestes animais, delineou-se histologicamente, um quadro de hepatite em atividade discreta, de natureza tóxica. As mesmas características foram observadas para os animais tratados com o 5-FU. Neste grupo, em adição, observou-se uma atividade periportal e perisseptal caracterizando discreta necrose em “saca-bocado” - pequenas áreas de hepatocitolise e inflamação, em poucos espaços portais (Figura 3F), atividade parenquimatosa com necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfoistiocíticos, em numerosos sítios (Figura 3G) e fenômenos hepatocelulares de poliploidia (Figura 3H). Nesse grupo de tratamento (5-FU), as alterações histológicas foram consistentes com hepatite tóxica, com moderado grau de atividade.

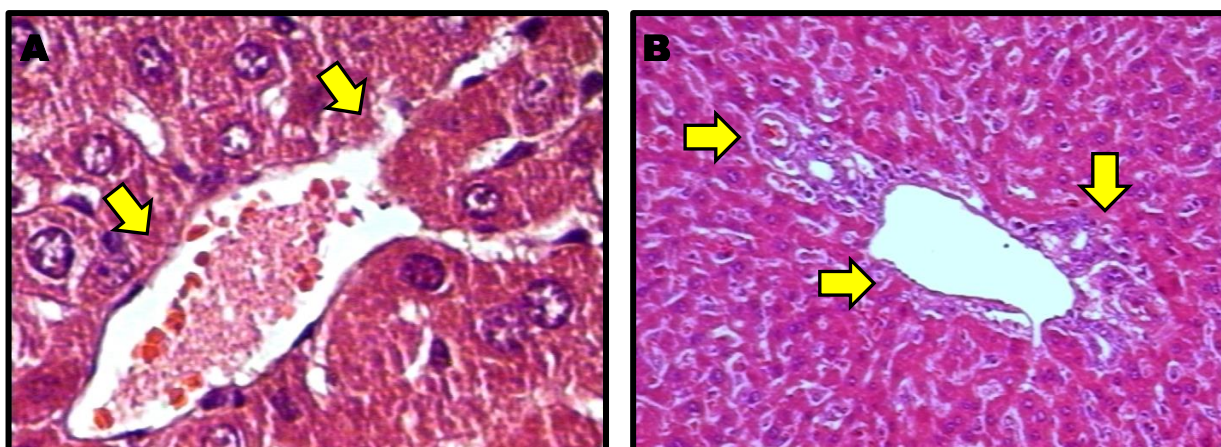


Figura 3 - Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado – Veia hepática terminal com parede fina e permeável aos sinusóides; **(B)** Controle transplantado – Espaço portal com tríade vasculobiliar; **(C)** Controle transplantado – Infiltrado linfoistiocítico na zona III; **(D)** O.E.C. (100 mg/kg) - Hiperplasia reacional de células de Kupffer; **(E)** O.E.C. (150 mg/kg) – Pequeno foco de necrose na zona II do ácino hepático; **(F)** 5-FU (25 mg/kg) - Discreta necrose em “saca- bocado” **(G)** 5-FU (25 mg/kg) – Regeneração hepatocelular poliploide; **(H)** 5-FU (25 mg/kg) – Afluxo linfoistiocítico moderado comprometendo o espaço portal. Hematoxilina-eosina: **A, C - G** (x 400); **B e H** (x 100).

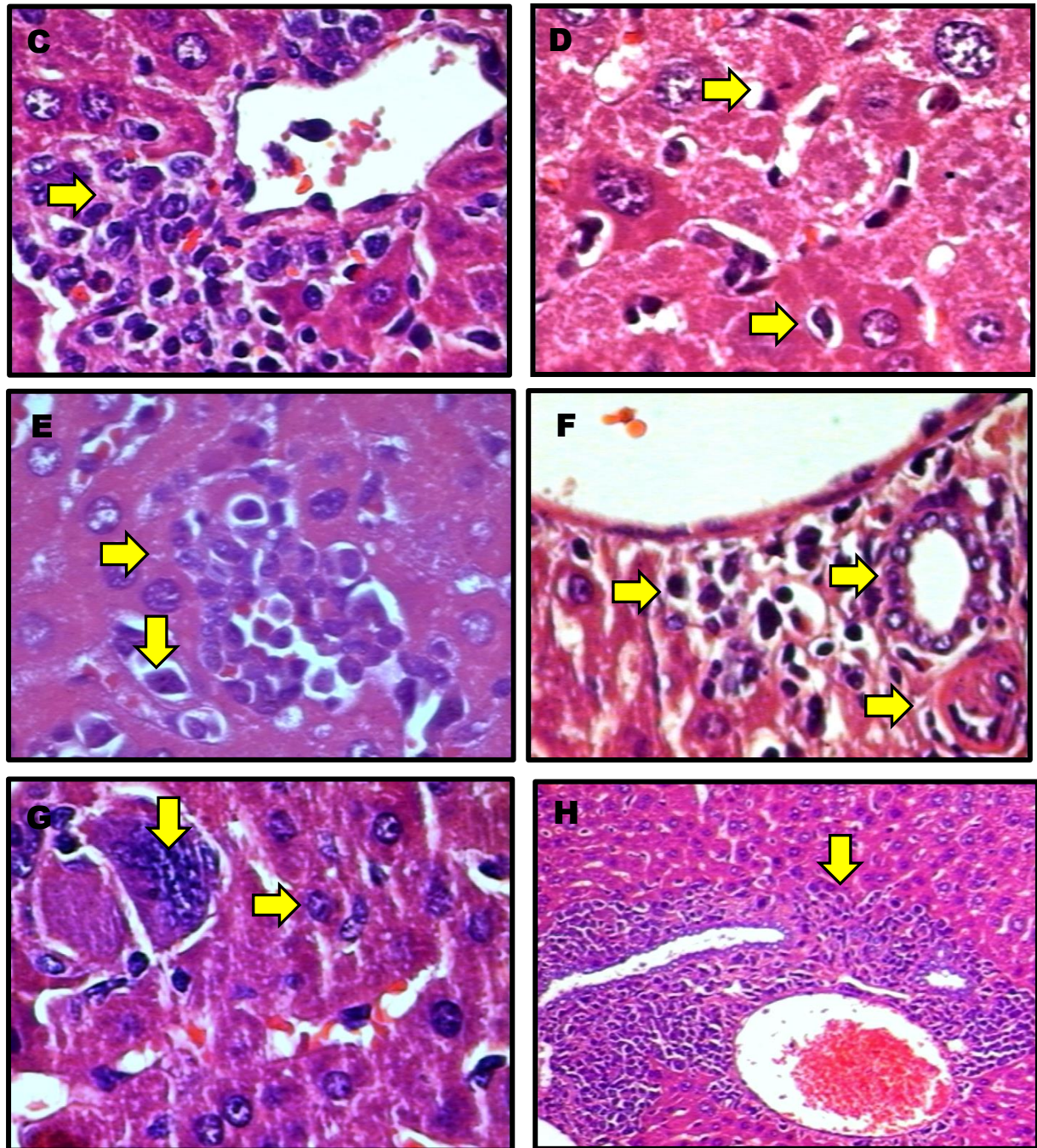


Figura 3 – Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado – Veia hepática terminal com parede fina e permeável aos sinusóides; **(B)** Controle transplantado – Espaço portal com tríade vasculobiliar; **(C)** Controle transplantado – Infiltrado linfocitário na zona III; **(D)** O.E.C. (100 mg/kg) – Hiperplasia reacional de células de Kupffer; **(E)** O.E.C. (150 mg/kg) – Pequeno foco de necrose na zona II do ácino hepático; **(F)** 5-FU (25 mg/kg) – Discreta necrose em “saca- bocado” **(G)** 5-FU (25 mg/kg) – Regeneração hepatocelular poliploide; **(H)** 5-FU (25 mg/kg) – Afluxo linfocitário moderado comprometendo o espaço portal. Hematoxilina-eosina: **A, C - G** (x 400); **B e H** (x 100) (Continuação).

5.2.4 Avaliação da sobrevida

Os grupos tratados com doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.C. e também com o 5-FU apresentaram um aumento significativo no tempo de sobrevida quando comparados ao controle transplantado. A média de vida dos grupos estudados foi: controle transplantado – 14 dias; tratado com O.E.C. (100 mg/kg) – 35 dias; tratado com O.E.C. (150 mg/kg) – 27 dias; 5-FU (25 mg/kg) – 40 dias.

Ainda, foi possível observar que o grupo tratado com O.E.C. (100 mg/kg) foi mais eficaz que o tratado com O.E.C. (150 mg/kg), nesse parâmetro de avaliação de atividade.

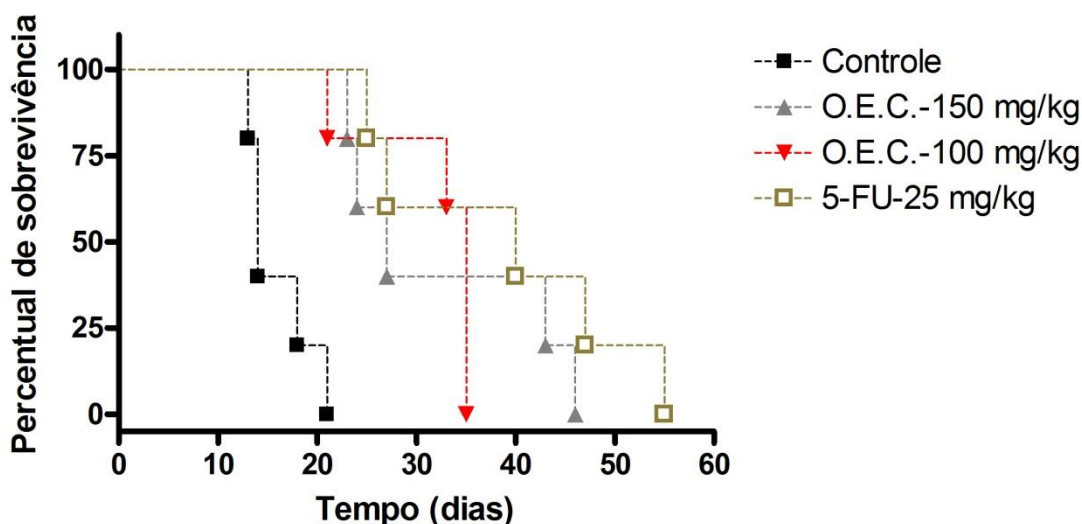


Gráfico 5 - Avaliação da sobrevida de camundongos fêmeas inoculados com células de carcinoma de Ehrlich e tratados com O.E.C. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido por Tukey.

5.2.5 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do O.E.C. foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado é apresentado na Tabela 11. O tratamento dos animais com diferentes doses do O.E.C. não induziu um aumento na frequência de eritrócitos micronuclados no sangue periférico quando comparados ao grupo controle (5% de Tween 80).

Tabela 11 - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.C. e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de células	Células micronucleadas
Controle	--	6	2000	$2,80 \pm 0,37$
Ciclofosfamida	50	6	2000	$14,50 \pm 2,60^a$
O.E.C.	150	6	2000	$2,20 \pm 0,37$
O.E.C.	300	6	2000	$2,40 \pm 0,25$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ comparado ao controle (5 % Tween 80) por ANOVA seguido de *Tukey*.

Discussão



6 DISCUSSÃO

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).

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

Considerando a situação atual, novas alternativas para o tratamento do câncer são urgentes, visto que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou até mesmo desenvolvem resistência a estes agentes (DALLA VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009). Nesse sentido, a contribuição dos produtos naturais no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para a terapia do câncer é inquestionável. Desde 1961, compostos derivados de plantas são usados como fármacos antitumorais (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Dentro desse contexto, considerando uma gama de estudos evidenciando potentes atividades biológicas dos óleos essenciais e seus constituintes, tem-se um cenário propício para a obtenção de novos produtos naturais com atividade antitumoral (BAKKALI et al., 2008; HUANG et al., 2010; BRITTO et al., 2012).

Para investigar o potencial papel do óleo essencial de *Croton polyandrus* (O.E.C.) na terapia anticâncer o presente trabalho avaliou primeiramente sua atividade citotóxica frente a linhagem murina de carcinoma ascítico de Ehrlich. Os resultados mostraram que O.E.C. apresentou baixa atividade antitumoral *in vitro* (CI₅₀ 270,6 µg/mL). Esses dados corroboram com os resultados do O.E.C. expressos em TGI, assinalados na tabela 2, uma vez que, esse óleo essencial mostrou efeito citotóxico, para a maioria das linhagens celulares utilizadas, apenas na concentração mais elevada (250 µg/mL). Considerando-se os critérios descritos por Fouché et al. (2008), O.E.C. foi inativo para todas as linhagens tumorais (TGI > 50 µg/mL).

A investigação da citotoxicidade em linhagens não tumorais é importante, tendo em vista que, se o tecido normal e o tumoral exibirem sensibilidade similar ao medicamento, não

haverá janela terapêutica e, na concentração em que o tumor responder, a célula normal responderá também e o tecido será danificado (HOFMANN, 2008). Efeitos citotóxicos de diferentes compostos podem estar relacionados com danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY; MARSETZ; IDEL, 2003).

A partir desta constatação, 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; YAMAMOTO, 1991; SILVA, 2007). Partindo dessas premissas, avaliou-se a citotoxicidade do O.E.C. em células não tumorais por meio do ensaio de citotoxicidade com eritrócitos de camundongos Swiss.

O valor de CH_{50} obtido no ensaio de hemólise (141, 0 $\mu\text{g/mL}$) demonstra que O.E.C. foi ativo contra eritrócitos, uma vez que, segundo Santos Júnior e colaboradores (2010), um produto natural em estudo, para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar CH_{50} maior que 1250 $\mu\text{g/mL}$.

Tal atividade corrobora com achados na literatura, uma vez que estudos indicam que alguns compostos isolados de plantas, tais como terpenoides, assim como polifenóis, epicatequinas e saponinas podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e subsequentemente produzir hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997). Ainda, esses resultados demonstram que, apesar do O.E.C. não ter apresentado citotoxicidade em células não tumorais das linhagens CHO (ovário) e HaCaT (queratinócito humano), como demonstrado por Fernandes et al. (2012), ele apresenta efeito citotóxico em eritrócitos, células estas comumente afetadas pelo tratamento com antineoplásicos.

Para que um agente terapêutico seja aceito e escolhido na prática clínica, é necessária a realização de numerosos estudos que precedem os estudos clínicos, são os chamados estudos pré-clínicos. Os estudos pré-clínicos são essenciais para dar embasamento à administração de novos medicamentos em seres humanos (PORTUGAL, 2012).

A investigação dos efeitos *in vivo* do O.E.C. iniciou-se com o teste toxicológico pré-clínico agudo, levando-se em consideração o que preconiza a legislação brasileira para fitoterápicos, a Resolução Específica (RE) n. 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004). A pesquisa com um novo produto natural deve apresentar estudos toxicológicos pré-clínicos capazes de proporcionar aos pesquisadores clínicos alguma segurança sobre as doses potencialmente tóxicas em animais de laboratório. Estes indícios de toxicidade são fornecidos pela dose letal mediana (DL50), caracterizada como a dose única de uma substância capaz de

provocar a morte de 50% dos animais experimentais, justificando a escolha das doses utilizadas para os experimentos de atividade antitumoral *in vivo* subsequente (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949; EATON; GILBERT, 2008).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado em camundongos submetidos às doses de 250, 375 e 500 mg/kg do O.E.C., pela via intraperitoneal. Almeida et al. (1999) descreveram um protocolo com uma metodologia simples para triagem farmacológica de extratos, substâncias, dentre outros produtos de vegetais com possíveis atividades estimulantes e depressoras no Sistema Nervoso Central (SNC) e autônomo (SNA), avaliadas através de um elenco de comportamentos pré-estabelecidos.

Na observação dos parâmetros descritos no protocolo foram evidenciadas que as alterações/efeitos foram tanto mais frequentes e intensos quanto maior a dose. Foi também possível observar que nos primeiros instantes após a administração do óleo (0; 15; 30 minutos) os animais apresentaram intensos efeitos estimulantes do SNC como hiperatividade, e contraditoriamente nos momentos seguintes, até quatro horas após a administração, foram observados efeitos depressores do SNC como resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular, ambulação diminuída, ptose e analgesia.

A ocorrência de ptose palpebral é descrita em algumas classes de drogas depressoras como os neurolépticos e os analgésicos de ação central. Já a diminuição ou perda do reflexo à dor, medido através da pressão no terço inferior da cauda do animal utilizando-se uma pinça, sugere uma atividade antinociceptiva ou analgésica (ALMEIDA et al., 2006).

Foram observados efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônomo (SNA), que sugerem estimulação parassimpática, uma vez que foram registrados em destaque a respiração forçada e diarreia (ALMEIDA et al., 2006).

De acordo com Mariz et al. (2006), alguns dos parâmetros que evidenciam toxicidade são: piloereção, prostração, contorção abdominal, paralisia do trem posterior, ptose palpebral, dispneia, aumento da evacuação e perda de peso. Deve-se destacar o fato de que todos os animais que morreram após administração aguda do O.E.C. tiveram ao longo do período de observação abdução das patas do trem posterior associado à respiração forçada como principais sinais que precederam o óbito. Esta informação pode ser importante em estudos posteriores de mecanismos de toxicidade.

Praticamente todas as drogas antineoplásicas causam alterações gastrintestinais, dentre elas a anorexia. A anorexia está diretamente associada à desnutrição e à perda de peso. A incidência da primeira em pacientes com câncer varia de 40 a 80%, resultando em efeitos clínicos que se manifestam por dificuldade de cicatrização, aumento do risco de infecção, diminuição da

resposta ao tratamento, da qualidade de vida e sobrevida, dentre outros (OLIVEIRA, 2010). Já a perda de peso está tipicamente associada à toxicidade (TALMADGE et al., 2007).

Neste contexto, parâmetros metabólicos, como o consumo de alimentos e avaliação ponderal, devem ser analisados nos estudos pré-clínicos para investigação da toxicidade da droga em estudo sobre o sistema gastrointestinal.

Foi possível verificar uma redução no consumo de água para os machos e fêmeas nas doses de 250 e 375 mg/kg. Além disso, houve uma diminuição no consumo de ração, que foi significativa para ambos os sexos na dose de 375 mg/kg, enquanto para a dose de 250 mg/kg essa diminuição do consumo de ração só foi significativa para os machos. Aliados a esses resultados, foi possível observar uma diminuição significativa no peso final dos animais machos nas doses de 250 e 375 mg/kg, o que não foi observado em fêmeas, as quais apresentaram a recuperação do peso ao final do tratamento. Isso permite sugerir a existência de uma possível toxicidade sobre o sistema gastrointestinal desses animais.

Em relação aos índices dos órgãos, apenas o fígado apresentou diminuição significativa quando comparado ao controle, na dose de 375 mg/kg do óleo em estudo. Tal fato permite inferir que doses agudas do O.E.C. podem ocasionar um possível efeito hepatotóxico nos animais tratados. Porém, a avaliação de outros parâmetros, tais como análises bioquímicas, da atividade das enzimas hepáticas (AST e ALT), e histopatológica, seriam necessárias para reafirmar tal inferência.

Uma vez realizada a avaliação toxicológica inicial foi possível determinarmos as doses farmacológicas seguras para prosseguirmos com o estudo *in vivo*. Apesar dos dados de avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do O.E.C. não serem promissores, resolvemos prosseguir com a investigação do seu possível efeito *in vivo*, considerando que, alguns fármacos antineoplásicos amplamente utilizados na prática clínica, como a ciclofosfamida, apresentam potentes efeitos *in vivo*, apesar de serem ineficazes *in vitro*. Isso ocorre porque essas substâncias são pró-fármacos que necessitam sofrer um processo de ativação metabólica para produzirem seus efeitos (GOODMAN; GILMAN, 2006). Para os ensaios *in vivo*, foi utilizada a linhagem de Carcinoma ascítico de Ehrlich, um tumor murino que tem se mostrado como excelente modelo de neoplasia experimental *in vivo* (SALGADO OLORIS; DAGLI; GUERRA, 2002; NASCIMENTO et al., 2006; VERÇOSA-JÚNIOR et al., 2006).

Nos estudos de atividade antitumoral *in vivo* foi utilizado como controle positivo o antineoplásico 5-fluoruracil (5-FU). Desde 1957, esse medicamento tem um importante papel no tratamento do câncer e continua sendo utilizado principalmente no tratamento de cânceres de cólon, mama, cabeça e pescoço (PETERS; KÖHNE, 1999). O seu mecanismo de ação

inclui inibição da timidilato sintase (TS) pelo 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), incorporação de 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação do 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA. A inibição da TS, uma enzima importante na síntese de pirimidina, resulta na depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoxiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA, sendo considerado, portanto, como agente antimetabólito (NOORDHUIS et al., 2004).

Todos os parâmetros analisados (volume do tumor, peso do tumor e viabilidade das células tumorais retiradas da cavidade peritoneal dos camundongos tratados durante nove dias) reduziram significativamente em relação ao grupo controle, caracterizando uma atividade inibitória do crescimento tumoral em ambas as doses testadas do O.E.C. Isso evidencia, portanto, uma atividade antitumoral *in vivo* significativa para o produto natural estudado. Não houve diferença significativa entre o efeito produzido pelo 5-FU (25 mg/kg) e àquele produzido pelo O.E.C. em ambas as doses usadas.

A progressão das células malignas e a velocidade de morte dessas células determinam o desenvolvimento do tumor. Vários estudos que utilizam modelos animais e cultura de células demonstram que a maioria dos cânceres apresenta alguma falha em programar a morte da célula neoplásica. Esse conhecimento é traduzido em abordagens terapêuticas importantes, uma vez que, inibir a proliferação e induzir a morte nestas células representam os mecanismos mais bem estabelecidos para inibição do crescimento do tumor (YANG et al., 2006). Por isso, uma vez evidenciada a atividade antitumoral *in vivo* significativa para o O.E.C., partimos para a análise do processo de morte celular.

O programa apoptótico apresenta características morfológicas distintas, que incluem perda da assimetria da membrana plasmática, condensação do citoplasma e do núcleo, e quebra internucleossômica do DNA (KOOPMAN et al., 1994).

A perda da assimetria da membrana plasmática é uma das primeiras características que aparecem nesse processo. Em células apoptóticas, o fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) é translocado do interior para o exterior da membrana, o que expõe a PS para o ambiente extracelular. A anexina V é uma proteína de ligação de fosfolípidos, dependente de Ca^{2+} , que possui alta afinidade pela PS, e, portanto, liga-se avidamente a células com PS exposta. Dessa forma, a conjugação da anexina V com fluorocromos, como o FITC (Isotiocianato de fluoresceína), permite a quantificação de células em apoptose por análise de citometria de fluxo (KOOPMAN et al., 1994).

A marcação com anexina V-FITC precede a perda da integridade da membrana que acompanha as últimas etapas de morte celular resultante de qualquer um dos processos, apoptose ou necrose. Assim, a coloração com anexina V-FITC é tipicamente usada em conjunto com um fluorocromo que se intercala entre pares de bases do DNA, o iodeto de propídio (IP). As células viáveis com as membranas intactas excluem o IP, em decorrência do seu elevado peso molecular, enquanto que, as membranas das células mortas e danificadas são permeáveis ao corante (KOOPMAN et al., 1994).

Esse ensaio não permite a distinção entre as células que morrem por apoptose e àquelas que morrem por necrose, pois, em ambos os casos, as células mortas são marcadas tanto com anexina V-FITC como com o IP. Apenas quando a apoptose é analisada ao longo do tempo, é possível a distinção entre essas duas formas de morte celular utilizando esse método, uma vez que, a célula deve migrar na sequência: 1) Células viáveis (marcação negativa para anexina V-FITC e IP); 2) Células nos estágios iniciais da apoptose, onde a integridade da membrana plasmática está preservada (marcação positiva para anexina V-FITC e negativa para IP); e 3) Células em apoptose tardia ou necrose (marcação positiva para anexina V-FITC e IP). O movimento das células através dessas três fases sugere apoptose. Em contraste, a observação em um único período de tempo onde as células estão duplamente marcadas, em si mesmo, revela menos informações sobre o processo pelo qual as células sofreram sua morte (KOOPMAN et al., 1994).

No presente estudo, os dados demonstram que houve um aumento significativo na população de células de carcinoma de Ehrlich marcadas com anexina V-FITC e IP após tratamento com ambas as doses do O.E.C., o que indica que essas células estão em apoptose tardia ou necrose. Observa-se que a população de células duplamente marcadas foi significativamente maior após tratamento com 100 mg/Kg do O.E.C. quando comparado com 150 mg/kg do óleo essencial.

Uma das principais maneiras de se estudar mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos é saber se o fármaco exerce seus efeitos parando ou retardando o ciclo celular e em qual fase isto acontece (ALMEIDA et al., 2005). Adicionalmente, a fim de avaliar se a morte celular que ocorre após tratamento de nove dias com o O.E.C. envolve o processo apoptótico ou necrótico, foi realizada análise da distribuição das células de carcinoma de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados mostram que houve um aumento significativo na população sub-diplóide (pico sub-G1) após ambos os tratamentos com O.E.C. Da mesma forma que para o ensaio com anexina V-FITC e IP, observa-se que a população de

células em sub-G1 foi significativamente maior após tratamento com 100 mg/Kg do O.E.C. quando comparado com 150 mg/kg do óleo essencial.

A observação de que células em apoptose apresentam uma redução na marcação do DNA após utilização de diferentes fluorocromos, como o iodeto de propídeo, tem sido usado para detecção desse processo de morte de celular. Dessa forma, o aparecimento de células com DNA com menor marcação do que àquele das células em G0/G1, o qual representa o pico Sub-G1, tem sido considerado como marcador da célula em morte por apoptose (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

Os primeiros estudos não concluíram se a redução na marcação do DNA era resultado de ativação de endonucleases envolvidas especificamente com a apoptose, ou se, durante esse processo de morte, alterações particulares na conformação do DNA induziam uma diminuição na acessibilidade do corante (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

Atualmente, várias observações indicam que a diminuição na marcação do DNA, observado em células em apoptose, é consequência da perda parcial de DNA dessas células, devido à ativação de endonucleases endógenas e liberação subsequente de fragmentos de DNA de baixo peso molecular a partir da célula, antes da análise por citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

Em resumo, as observações mais aceitas indicam que: *i)* nas células em apoptose ocorre ativação de endonucleases que promovem quebra internucleossomal do DNA; *ii)* Pequenos oligonucleossomos ou nucleossomos simples, livres, podem então difundir-se para fora do núcleo, porém, não conseguem sair da célula, uma vez que a integridade da membrana celular permanece preservada; *iii)* A fixação das células com etanol ou a permeabilização com detergente, permite que o DNA fragmentado de baixo peso molecular seja eliminado na lavagem subsequente, antes da análise por citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

A porção de DNA que permanece na célula após sua fixação ou permeabilização representa, provavelmente, fragmentos de alças de DNA ainda ligados à matriz nuclear ou longos trechos de nucleossomos que não podem ser extraídos sob essas condições. Ainda, células nos estágios finais da apoptose formam os chamados corpos apoptóticos (fragmentos de célula, incluindo DNA, envolvidos por membrana plasmática) que se destacam da célula. Sua liberação, obviamente, reduz o conteúdo de DNA celular (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

Em contraste com as células apoptóticas, células necróticas geralmente não mostram uma redução imediata da marcação do DNA. Assim, a discriminação entre células normais

viáveis e células necróticas é impossível baseado apenas nesse parâmetro (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

A avaliação do perfil do ciclo celular de células tumorais de Ehrlich após administração de O.E.C. (100 e 150 mg/kg) durante nove dias, confirmou a potente atividade antitumoral deste derivado vegetal, como demonstrada nos parâmetros descritos anteriormente. A maioria das células apresentou parada na fase G0/G1, o que representa um bloqueio na progressão do ciclo celular. Como descrito na literatura, a parada em G0/G1 serve para dar às células um tempo para reparar danos importantes antes que a replicação do DNA ocorra, evitando assim a propagação de lesões genéticas para células descendentes ou ativando a via apoptótica (MUELLER et al., 2006).

Os resultados da análise do ciclo celular, obtidos através de citometria de fluxo, corroboram com o estudo de mecanismo de ação de muitos compostos que param o ciclo celular na fase G0/G1 (GALBIATI et al., 2001; LINKE et al., 2013). Além disso, já é estabelecido que o 5-FU aumenta a população de células em G0/G1 e diminui a população de células na fase S, o que está de acordo com seu mecanismo de ação (interfere com a síntese, fase S, do DNA no ciclo celular) (YOSHIKAWA et al., 2001). O tratamento com O.E.C. também induziu diminuição da população celular na fase S.

O conjunto de todos os dados apresentados das análises de ciclo celular e anexina V-FITC e IP permite inferir que O.E.C., em ambas as doses estudadas, induz morte celular por apoptose em células de carcinoma de Ehrlich (modelo *in vivo*), sendo esse efeito mais pronunciado para a dose de 100 mg/kg.

A maioria dos fármacos antineoplásicos derivados de produtos naturais são também denominados fármacos ciclo-celular específicos. Entre eles, podemos citar: i) alcaloides da vinca – que agem pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, consequentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase; ii) taxol, éster alcaloide derivado do teixo europeu (*Taxus baccata*) e do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*), (conhecido comercialmente como Paclitaxel®) – ação também pela inibição do fuso mitótico, dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolimerização, o que os estabiliza e resulta no bloqueio da multiplicação celular iii) podofilotoxinas (ou epipodofilotoxinas), tendo-se como exemplos principais a etoposida (VP-16) e teniposida (VM-26), derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, extraída da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) – ação pelo bloqueio das células nas fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II, o que promove lesão no DNA (OLIVEIRA; ALVES, 2002; ALMEIDA et al., 2005).

Sabendo-se dos diversos efeitos colaterais que os fármacos antineoplásicos apresentam como resultado de sua toxicidade sobre outras células do organismo que não as células tumorais, foi realizada também a investigação de possíveis efeitos tóxicos do O.E.C.

Foi observado que, após tratamento com as doses de 100 e 150 mg/kg do O.E.C., houve diminuição significativa no consumo de ração em ambas as doses, tanto quando comparados ao grupo controle transplantado, quanto ao controle sadio. Em relação ao consumo de água, uma diminuição foi observada apenas na maior dose do tratamento. Além disso, os animais tratados com O.E.C. (100 e 150 mg/kg) e com o 5-FU tiveram uma redução no peso corporal quando comparados ao grupo controle transplantado. Este quimioterápico possui muitas reações adversas tais como mielossupressão, diarreia, perda de peso e hemorragias nos pulmões, intestinos e anorexia (HEIDELBERGER et al., 1958; EL-SAYYAD et al., 2009; GOODMAN; GILMAN, 2006). Os resultados demonstram que, O.E.C. também apresentou efeitos gastrintestinais indesejáveis, o que é comum para a maioria dos quimioterápicos utilizados na prática clínica (SOUZA et al., 2008).

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

Os hepatócitos (células metabolicamente complexas) contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. A atividade de duas enzimas em especial é de extrema importância para avaliação da função hepática, a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT). Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento desse tipo de lesão. Apesar de poderem também estar aumentadas em outros órgãos, elas são os principais marcadores de lesão celular, especialmente hepatopatias (HENRY, 2008; BRANCO, 2009).

AST é uma enzima encontrada no fígado, mas também no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. No fígado, é encontrada no citoplasma (40%) e nas mitocôndrias (60%) dos hepatócitos. 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 a torna útil para o diagnóstico de agressão hepática, com relativa especificidade (JORGE, 2006; BRANCO, 2009).

A administração do O.E.C. aos animais resultou em um aumento significativo da atividade das transaminases (AST e ALT) apenas na dose de 150 mg/kg, sugerindo a ocorrência de toxicidade hepática, induzida pelo óleo, evidenciada pelo aumento da AST, mas principalmente pelo aumento da ALT. É importante salientar que as alterações observadas não estão dentro dos limites aceitáveis de variação da atividade das enzimas (Valores de referência: AST - para camundongos machos e fêmeas, 70 - 400 UI/L; ALT - para machos, 25 - 200 UI/L e para fêmeas, 25 - 100 UI/L (GAD, 2007).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina. A ureia é um produto de degradação do metabolismo dos aminoácidos e constitui a forma como o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, sendo sua eliminação principalmente através dos rins (PEREIRA, 1998). Já a creatinina, por sua vez, é um produto do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. Essa substância só é excretada pela via renal, uma vez que ela não é reabsorvida, nem reaproveitada pelo organismo (GONZALÉZ; SCHEFFER, 2003).

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

A mielossupressão e a supressão da resposta imune são também reações adversas comuns à grande maioria dos antineoplásicos, levando aos casos de anemia, trombocitopenia e maior susceptibilidade às infecções. É a consequência mais comum da quimioterapia antineoplásica, uma vez que, na maioria dos casos, ela afeta as células normais de rápida divisão celular, como é o caso da medula óssea, sendo considerado entre os mais incapacitantes efeitos colaterais no tratamento do câncer (SOUZA et al, 2008).

Em conformidade com a maioria dos agentes antineoplásicos, O.E.C. provocou alterações nos parâmetros hematológicos dos animais tratados. Observou-se uma diminuição significativa na contagem de hemácias dos animais tratados com o O.E.C. (150 mg/kg) em relação tanto ao controle transplantado quanto ao controle sadio e uma diminuição significativa na hemoglobina e hematócrito, na dose de 150 mg/kg do O.E.C., ambos em relação ao controle sadio. Esses dados sugerem o quadro clínico de anemia nos animais tratados com a maior dose do óleo (150 mg/kg) (MENEZES; LEAL; OSÓRIO, 2010).

A anemia é uma complicação comum em muitos pacientes que fazem uso da quimioterapia, devido à relativa semelhança entre as células cancerosas e as células de crescimento rápido da medula óssea. É definida como condição patológica decorrente da diminuição do número de glóbulos vermelhos ou da concentração da hemoglobina ocasionando diminuição da oxigenação tecidual (CANÇADO, 2007).

Quando o parâmetro avaliado foi a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) das hemácias, foi observado um aumento significativo nos animais tratados com O.E.C. (150 mg/kg), em comparação ao controle transplantado. Além disso, para o Volume Corpuscular Médio (VCM) também observou-se um aumento significativo tanto em comparação ao controle transplantado, quanto em comparação ao sadio. Em relação à Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), não houve alteração significativa em nenhum dos grupos tratados.

Baseados nos índices hematimétricos, as anemias podem ser classificadas morfológicamente como normocítica (VCM normal), macrocítica (VCM aumentado), microcítica (VCM diminuído), normocrômica (CHCM normal) e hipocrômica (CHCM diminuído). Dessa forma, podemos sugerir que a anemia ocasionada pelo tratamento com o óleo essencial na maior dose (150 mg/kg) pode-se tratar do tipo macrocítica e normocrômica.

No que se refere à contagem total de leucócitos, foi observado uma diminuição significativa no grupo tratado com o O.E.C. (150 mg/kg) em comparação com o grupo transplantado. Já na contagem diferencial de leucócitos, houve uma diminuição da porcentagem de linfócitos do grupo tratado com o O.E.C. (150 mg/kg), em comparação com o sadio, e aumento da porcentagem de neutrófilos, após tratamento com ambas as doses do óleo, em comparação com o controle sadio. Por fim, foi possível evidenciar uma leucopenia acentuada (diminuição do número de leucócitos) com porcentagem de linfócitos aumentada e redução da porcentagem de neutrófilos no tratamento com 5-FU, efeitos colaterais já conhecidos deste antineoplásico (LINS et al., 2009).

A leucopenia nos animais tratados com a maior dose do O.E.C. (150mg/kg) representa um dos principais efeitos indesejáveis do tratamento do câncer, ocasionado pela agressão as células do sistema imunológico (BRANDÃO et al., 2010). Já o aumento da porcentagem de neutrófilos pode ser explicado como uma alteração característica de casos de necrose tecidual e presença de tumores (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

O sistema imune é composto 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 (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). A degeneração ou atrofia de órgãos imune podem influenciar a função normal do sistema imune. 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.

Os dados dos índices desses órgãos mostram que o O.E.C. não apresenta atividade imunoestimulante proporcionando, todavia, na dose de 150 mg/kg, uma aparente imunossupressão, em terapêutica continuada/doses repetidas (150 mg/kg; administração por 9 dias consecutivos). Esse resultado corrobora com os dados hematológicos que mostraram a diminuição dos linfócitos observada após tratamento com a maior dose do óleo essencial (150 mg/kg). Isso porque, o timo é considerado o órgão linfoide responsável pela produção e maturação dos linfócitos (FAUSTO et al., 2004). Tal fato representa um dos principais efeitos indesejáveis da maioria dos quimioterápicos utilizados atualmente na prática clínica (ALVES; NEPOMUCENO, 2012).

A análise histopatológica não evidenciou alterações significativas nos rins dos animais tratados com O.E.C. demonstrando uma baixa toxicidade do composto sobre esse órgão, o que corrobora com os resultados dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, nos quais não foram observadas alterações nos níveis de ureia e creatinina dos animais tratados com o O.E.C., quando comparados ao grupo controle transplantado.

Os efeitos tóxicos de substâncias podem atingir todos os sistemas e órgãos, porém é o fígado que apresenta maior susceptibilidade, provavelmente devido a dois fatores importantes: a) a sua posição anatômica, que o torna mais vulnerável e, b) 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). Várias afecções hepáticas distintas podem ser desencadeadas pelo uso de drogas e xenobióticos, incluindo hepatite aguda e crônica, hepatite fulminante, cirrose hepática, doenças hepáticas colestáticas, doença hepática gordurosa não alcoólica, distúrbios vasculares do fígado e tumores hepáticos (BITTENCOURT, 2011).

O fígado contém dois tipos principais de células epiteliais diferenciadas: os hepatócitos, que estão localizados no parênquima hepático e representam cerca de 60% das células desse órgão, e as células epiteliais biliares, localizadas nos ductos biliares (NAVES; MORENO, 2000).

A unidade estrutural e funcional do parênquima hepático é o ácino, organizado em formato de roda, sendo o aro delimitado por um conjunto de seis tríades ou espaços portais (vênula portal, arteríola hepática e ducto biliar) e o eixo central representado pela veia central

ou vênula hepática terminal. Os raios da roda são formados por placas de hepatócitos, dispostas em cordões delimitados por sinusoides fenestrados. Ele compreende massa de parênquima dependente do suprimento sanguíneo a partir do trato portal. Circundando o espaço porta, os hepatócitos estão dispostos em traves, constituindo zonas concêntricas, que cercam os vasos aferentes terminais. A zona I ou periportal - mais próxima ao espaço porta, é a primeira a receber sangue com alto conteúdo de oxigênio, insulina, glucagon e outros nutrientes. Esta zona tem alta taxa metabólica e é a última a sofrer necrose e a primeira a mostrar sinais de regeneração. A Zona III (centrilobular) – mais próxima às veias hepáticas terminais, recebe sangue por último. Aqui estão muitas das enzimas que participam do processo de biotransformação, como o NADPH citocromo P450- redutase. Já a Zona II (mediolobular) – recebe sangue com conteúdo intermediário de oxigênio (NAVES; MORENO, 2000; JORGE, 2011).

A análise histopatológica dos fígados dos animais do grupo controle transplantado mostrou a presença de fígado reacional que pode ser consequência local de um efeito sistêmico (tumor). Os animais tratados com o 5-FU sofreram um dano hepático maior que os tratados com ambas as doses do óleo em estudo. Em relação ao tratamento com O.E.C., esses dados corroboram com os resultados obtidos nas análises bioquímicas de determinação de AST e ALT para a maior dose (150 mg/kg). No entanto, todas as alterações comuns a ambos os grupos tratados 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 (MONTENEGRO et al., 2008; TORTI, et al., 2001; VASCONCELOS 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.E.C., estão presentes, mas se o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é completa (KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

O tratamento do câncer tem como principal objetivo a erradicação da doença. Entretanto, nas situações onde a cura é impossível, o foco passa a ser a melhoria dos sintomas e a preservação da qualidade de vida associada a um aumento de sobrevida dos pacientes (BRASIL, 2011). Em nosso estudo, houve um aumento da sobrevida dos animais tratados com O.E.C. em ambas as doses testadas. Da mesma forma que observado nos resultados de investigação do mecanismo de morte, o efeito benéfico na sobrevida foi mais pronunciado para os animais tratados com 100 mg/kg do O.E.C.

Os dados em conjunto mostram que a dose de 100 mg/kg do O.E.C. apresentou eficácia farmacológica semelhante àquela produzida para a dose de 150 mg/kg, segundo os parâmetros volume, peso e viabilidade do tumor, porém demonstrou maior capacidade em induzir apoptose e aumentar a sobrevida dos animais. Aliado a isso está a observação de que os efeitos toxicológicos produzidos pela dose de 100 mg/kg foram significativamente menores do que os produzidos pela dose de 150 mg/kg. Esses resultados mostram as vantagens do uso da dose de 100 mg/kg do O.E.C, considerando o balanço entre atividade biológica *versus* toxicidade como um parâmetro fundamental para sua aplicabilidade como droga farmacológica.

As plantas produzem uma grande diversidade de substâncias que podem ter importância terapêutica, no entanto, muitas delas podem apresentar efeitos mutagênicos. Vários estudos demonstram a correlação entre compostos mutagênicos e efeitos carcinogênicos (VIEIRA; SANTOS; CHEN-CHEN, 2010). Adicionalmente, muitas drogas antineoplásicas podem causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais (VIEIRA; PAULA; CHEN-CHEN, 2010). Tendo em vista esse fato, no presente trabalho foi investigado o potencial mutagênico *in vivo* do O.E.C. por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico. Este ensaio é útil para a investigação de compostos com atividade clastogênica (indução de quebra cromossômica) ou aneugênica (segregação cromossômica anormal).

O tratamento com O.E.C. não ocasionou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico dos animais tratados, levando ao entendimento da ausência de capacidade genotóxica deste produto natural nas doses testadas. Trata-se, portanto, de um dado relevante na análise das propriedades deste produto natural, 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 e da citotoxicidade em linfócitos (RIBEIRO et al., 2003).

Considerando todos os dados apresentados, podemos inferir que o óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus* apresenta potente atividade antitumoral *in vivo*, apesar de não apresentar efeitos *in vitro*, e moderada toxicidade.

Esse trabalho apresenta dados importantes, tanto do ponto de vista farmacológico como toxicológico, que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais, especialmente de mecanismo de ação, e posteriormente testes clínicos com o referido óleo

essencial. Portanto, os dados mostram que o reino vegetal continua sendo uma importante fonte de produtos farmacologicamente ativos, especialmente contra o câncer.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados com o óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus* (O.E.C.) é possível concluir que:

- O.E.C. apresentou moderada toxicidade frente eritrócitos de camundongos Swiss;
- O.E.C. apresentou moderada toxicidade aguda quando administrado a camundongos Swiss;
- O.E.C. apresentou fraca atividade antitumoral *in vitro* frente células da linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- O.E.C. apresentou significativa atividade antitumoral *in vivo* frente células da linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- O.E.C. induz parada do ciclo celular na fase G0/G1 e aumento da fração Sub-G1, o que sugere indução de morte celular por apoptose;
- O.E.C. não apresentou atividade imunoestimulante como parte de seu mecanismo de ação;
- O.E.C. apresentou moderada toxicidade *in vivo*, nas doses utilizadas, toxicidade esta menor do que a comumente observada para antineoplásicos atualmente em uso na clínica médica;
- O.E.C. induziu aumento na média de sobrevida dos animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich;
- O.E.C. não apresentou genotoxicidade *in vivo*;

- Portanto é possível inferir que O.E.C. possui significativa atividade antitumoral *in vivo* e moderada toxicidade nos modelos experimentais avaliados, o que não representa um fator limitante para a continuação de seus estudos pré-clínicos.

Referências

REFERÊNCIAS

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da célula**. 4º ed. Editora Artmed, 2002.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS – JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. 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, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALMEIDA, F.; OLIVEIRA, F.; ALMEIDA, R. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. **Almeida RN. Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.

ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v. 9, n. 2, p. 125-140, 2012

AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, p. 15-18, 2003.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANSELMI, C.; ETTORRE, A.; ANDREASSI, M.; CENTINI, M.; NERI, P.; STEFANO, A. D. *In vitro* induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2 phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1,2 – pentanediol. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 437-453, 2002.

APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.

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

ATAL, C. K.; SRIVASTAVA, J. B.; WALI, B. K.; CHAKRAVARTY, R. B.; DHAWAN, B. N.; RASTOGI, R. P. Screening of indian plants for biological activity. Part VIII. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 16, p. 330-349, 1978.

BADER, G.; PLOHMANN, B.; HILLER, K.; FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, v. 51, p. 414-417, 1996.

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

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

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

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

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, v. 15, p. 9-10, 2003.

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

BERTINO, J. R.; SALMON, S. E. Princípios de terapia do câncer. In: BENNETT, G. **Tratado de Medicina Interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1178-1194.

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

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

BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Rev. Suplemento Hepatotoxicidade**, v. 30, p. 14-16, 2011.

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

BRANCO, A. C. S. C. Avaliação da toxicidade pré-clínica crônica de *Foeniculum vulgare* Mill. 2009. 136p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

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

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

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

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRITTO, A. C. S.; OLIVEIRA, A. C. A.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M. B.; Bomfim, D. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; Costa, E. V.; BEZERRA, D. P. *In Vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta medica**, v. 78, p. 409-414, 2012.

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

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

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. 58-65, 2000.

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Multi-Ciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, p. 1-18, 2006.

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

CHATTERJEE, S.; KUNDU, S.; BHATTACHARYYA, A.; HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J. The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 1149-1155, 2008.

COSTA, A. M. L.; SILVA, J. C. R.; CAMPOS, A. R.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* benth. In rats. **Phytotherapia Research**, v. 13, p. 689-691, 1999.

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

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, M. G.; NEWMAN, J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 100, p. 72-79, 2005.

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

DALLA VECHIA, L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-Inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

DARZYNKIEWICZ, S.; DEL BINO, B. G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

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

DERTINGER, S. D.; BISHOP, M. E.; McNAMEE, J. P.; Hayashi, M.; SUZUKI, T.; ASANO, N.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; MOORE, M.; TOROUS, D. K.; MACGREGOR, J. T. 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.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. B. S., KAR, B., BALA, A.; HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 865-870, 2012.

DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, D. A.; PINTO, J. M. A.; CAMPOS, V. A. C.; MOURÃO, A. R. B.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

DUARTE, R. A. Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens*. 2010. 125 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

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

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

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.

EL-SAYYAD, H. I.; ISMAIL, M. F.; SHALABY, F. M.; ABOU-EL-MAGD, R. F.; GAUR, R. L.; FERNANDO, A.; RAJ, M. H. G.; OUHTIT, A. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 466-473, 2009.

FARNSWORTH, N. R.; BLOMSTER, R. N.; MESSMER, W. M.; KING, J. C.; PERSINOS, G. J.; WILKES, J. D. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **Lloydia**, v. 32, p. 1-28, 1969.

FAUSTO, C. S. C. V.; CHAMMAS, M. C.; SAITO, O. C.; GARCIA, M. R. T.; JULIANO, A. G.; SIMÕES, C. A.; CERRI, G. G. Timo: Caracterização ultra-sonográfica. **Radio Bras**, v. 37, n. 3, p. 207 – 210, 2004.

FERNANDES, H. M. B. Constituintes Químicos e Avaliação de Atividades Biológicas de *Croton polyandrus* Spreng.(Euphorbiaceae). [Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba], João Pessoa, PB, 2012. 157f.

FERNANDES, H. M. B.; OLIVEIRA-FILHO, A. A.; SOUSA, J. P.; OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; MEIRELES, D. R. P.; BRITO, M. T.; ZELIOLI, I. A. M.; QUEIROZ, N. C. A.; FOGGIO, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SILVA, M. S.; CASTELLO-BRANCO, M. V. S.; TAVARES, J. F. Antitumor, Antimicrobial Effect and Chemical Composition of the Essential Oil of *Croton polyandrus* Spreng. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 10, p. 1430-4, 2012.

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

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

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

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

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

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.

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

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. Taylor & Francis. ISBN 0824754077, 2007.

GALBIATI, F.; VOLONTE, D.; LIU, J.; CAPOZZA, F.; FRANK, P. G.; ZHU, L.; PESTELL, R. G.; LISANTI, M. P. Caveolin-1 Expression Negatively Regulates Cell Cycle Progression by Inducing G0/G1 Arrest via a p53/p21WAF1/Cip1-dependent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 2229–2244, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. (eds.): Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 73-89, 2003.

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

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

GRIVICICH, I.; MANS, D. R. A.; PETERS, G. L.; SCHWARTSMANN, G. Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 9, p. 1087- 1103, 2001.

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

GUALANDRO, S. F. M. Diagnóstico diferencial das anemias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 5, p. 7-10, 2000.

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.

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.

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

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

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.

HEIDELBERGER, C.; GRIESBACH, L.; MONTAG, B. J.; MOOREN, D.; CRUZ, O.; SCHNITZER, R. J.; GRUNBERG, E. Studies on Fluorinated Pyrimidines: II. Effects on Transplanted Tumors. **Cancer Research**, v. 18, p. 305-317, 1958.

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

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

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

HIRASAWA, Y.; MIYAMA, S.; HOSOYA, T.; KOYAMA, K.; RAHMAN, A.; KUSUMAWATI, I.; ZAINI, N. C.; MORITA, H. Alasmontamine A, A first tetrakis monoterpene indole alkaloid from *Tabernaemontana elegans*. **Organic Letters**, v. 11, n. 24, p. 5718-21, 2009.

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

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.

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

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

HORGEN, F. D. Biological screening of rain forest plot trees from palawan island (philippines). **Phytomedicine**, v. 8, p. 71-81, 2001.

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

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem cells**, v.17, p. 306-313, 1999.

JAAFARI, A.; MOUSE, H. A.; M'BARK, L. A.; TILAOUI, M.; ELHANSALI, M.; LEPOIVRE, M.; ABOUFATIMA, R.; MELHAOUI, A.; CHAIT, A.; ZYAD, A. Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonettii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction. **Herba polonica**, v. 55, n. 2, p. 36-49, 2009.

JORGE, S. G. **Exames laboratoriais**. Hepcentro, 2006. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>. Acesso em: 21 janeiro 2013.

JORGE, S. G. Histopatologia Médica. 2011. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/cirroze.htm>>. Acesso em 23 de Janeiro de 2013.

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

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

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

KARAPIDAKI, I., BAKOPOULOU, A., PAPAGEORGIOU, A., LAKOVIDOU, Z., MIOGLOU, E., NIKOLAROPOULOS, S., MOURELATOS, D.; LIALIARIS, T. Genotoxic, cytostatic, antineoplastic and apoptotic effects of newly synthesized antitumour steroidal esters. **Mutation Research**, v. 675, p. 51-59, 2009.

KATZUNG, B. G. 2003. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9 ed. McGraw-Hill Medical: USA, 1088, 2003.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27-45, 2002.

KINGHORN, A. D.; BLANCO, E. J. C.; CHAI, H. B.; ORJALA, J.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; OBERLIES, N. H.; WANI, M. C.; KROLL, D. J.; PEARCE, C. J.; SWANSON, S. M.; KRAMER, R. A.; ROSE, W. C.; FAIRCHILD, C. R.; VITE, G. D.; EMANUEL, S.; DAVID JARJOURA, D.; COPE, F. O. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81 n. 6, p. 1051-1063, 2009.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-1420, 1994.

KUMAR, S.; BAGCHI, G. D.; DAROKAR, M. P. Antibacterial activity observed in the seeds of some coprophilous plants. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 179-184, 1997.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Pathology Basis of Disease**. China: W B Saunders, 2004.

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

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

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

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

LIMA, F. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria**, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

LINKE, S. P.; CLARKIN, K. C.; LEONARDO, A. D.; TSOU, A.; WHAL, G. M. A reversible, p53-dependent Go/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. **Genes & Development**, v. 10, p. 934-947, 2013.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, p. 20-6, 2009.

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

LIU, Y-Q.; MU, Z-Q.; YOU, S.; TASHIRO, S-I.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Fas/FasL Signaling Allows Extracellular-Signal Regulated Kinase to Regulate Cytochrome c Release in Oridonin-Induced Apoptotic U937 Cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1873- 1879, 2006.

LONGATO, G. B.; RIZZO, L. Y.; SOUSA, I. M. de O.; TINTI, S. V.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA G. M.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. **Planta Medica**. Disponível em: <[http://dx.doi.org/ 10.1055/s- 0030-1270889](http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1270889)>. Acesso em: 13 out. 2012.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

LÚCIO, A.S.S.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; PITA, J.C.L.R.; CASTELLO-BRANCO, M.V.S.; DINIZ, M.F.F.M.; AGRA, M.F.; DA-CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; TAVARES, J.F. Azaphenanthrene Alkaloids with Antitumoral Activity from *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, p. 7125–7131, 2011.

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

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

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews (Cancer)**, v. 2, p. 143-148, 2002.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, v. 235, p.114 – 120, 2006.

MARCHETTI, G. M. Atividade Anticâncer do extrato bruto e das frações das folhas de *Calea pinnatifida* Banks. 2008. 113f. Dissertação de Mestrado, Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 372-378, 2006.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

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

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

MECCIA, G.; ROJAS, L. B.; ROSQUETE, C.; SAN FELECiano, A. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 144-146, 2000.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 143–151, 2003.

MELO, P. S.; JUSTO, G. Z.; DURAN, N.; HAUN, M. Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47– 54, 2004.

MENEZES A. E. B.; LEAL, L. P.; OSÓRIO, M. M. Validation of hematimetric indices in the etiologic diagnosis iron deficiency anemia in 6 to 23 months-old toddlers. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 4, n. 1, p. 749-56, 2010.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MILLER, M. J. S.; VERGNOLLE, N.; MC KNIGHT, W.; MUSAH, R. A.; DAVISON, C. A.; TRENTACOSTIK, A. M.; THOMPSON, J. H.; SANDOVAL, M.; WALLACE, J. L. Inhibition of neurogenic inflammation by the Amazonian herbal medicine sangre de grado. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 725-730, 2001.

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

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

MORAES, M. O.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Screening for anticancer activity of plants from the northeast of brazil. **Fitoterapia**, v. 68, p. 235-239, 1997.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

MORAIS, S. M. L.; CAVALCANTI, E. S. B.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B.; CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 161-164, 2006.

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

MUELLER, S.; SCHITTENHELM, M.; HONECKER, F.; MALENKE, E.; LAUBER, K.; WESSELBORG, S. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin *in vitro*. **International Journal of Oncology**, v. 29, p. 471–9, 2006.

NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBO, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; MONACHE, F. D.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DOVALLE, R. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* Bark. **Phytomedicine**, v. 10, p. 176-184, 2003.

NARDI, G. M.; DAL BO, S.; DELL MNACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DOVALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 73-78, 2006.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, E. S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, p. 2650 – 2653, 2006.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação celular: Importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 389-399, 2000.

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

NOGUEIRA, L. G. Determinação do potencial biológico e antioxidante de extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2010.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 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.

OECD (1997). **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. OECD Guideline for testing of chemicals No 474.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J.; **Química Nova**, v. 25, p. 976, 2002.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA M. S.; PAULA J. R.; BARA M. T.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., *Punicaceae* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 201-207, 2010.

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

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

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.

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

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

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

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

PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; SOUSA, T. K. G.; MANGUEIRA, V. M.; TAVARES, J. F.; JÚNIOR, R. J. O.; VERAS, R. C.; PESSOA, H. L. F.; SILVA, M. S.; MORELLI, S.; ÁVILA, V. M. R.; SILVA, T. G.; DINIZ, M. F. F. M.; CASTELLO-BRANCO, M. V. S. *In Vitro* and *in Vivo* Antitumor Effect of Trachylobane-360, a Diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, p. 9573-9589, 2012.

PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHAWARTZ, M. O. E. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre ácaro rajado (*Tetranychus ueticae* KOCH). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, 2007.

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

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

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; CASTELAR, I.; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 376-381, 2009.

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

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

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

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas-RS: Ulbra, 2003.

RICHMOND, J. D.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; HABER, W. A.; MORIARTY, D. M.; SETZER, W. N. Essential oil compositions and cytotoxic activities of *Dendropanax capillaris*, *Oreopanax nubigenus*, and *Schefflera rodrigueziana* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 271-4, 2009.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**, v. 5, p. 897-906, 2004.

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

ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) Latex. **Phytomedicine**, v. 10, p. 139-144, 2003.

ROUQUAYROL, M. Z.; FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. E.; JOSE DE ABREU MATOS, F.; CRAVEIRO, A. A. Molluscicidal activity of essential oils from northeastern brazilian plants. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 135-143, 1980.

SALGADO OLORIS, S. C.; DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L. Effect of h-carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Sciences**, v. 71, p. 717-724, 2002.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-37, 2000.

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

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

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SILVA, T. H. A.; BUTERA, A. P.; LEAL, D. H. S.; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 1-17, 2007.

SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D.; SOUZA, H. E. M.; CORREA, R. S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293 – 298, 2007.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

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

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

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

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

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

SOUZA, W. A.; NEGRÃO, A. J. M.; FILHO, C. G.; FERREIRA, V. H.; LINO, R. S.; FREITAS, R. E.; BIAZOTTO, G.; PEREIRA, D. M. Toxicidade de antineoplásicos revisão bibliográfica. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008.

SUÁREZ, A. I.; VÁSQUEZ, L. J.; MANZANO, M. A.; COMPAGNONE, R. S. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Journal Flavour Fragrance**, v. 20, p. 611-614, 2005.

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

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. 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.

TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793, 2007.

TORRICO, F.; CEPEDA, M.; GUERRERO, G.; MELENDEZ, F.; BLANCO, Z.; CANELON, D. J.; DIAZ, B.; COMPAGNONE, R. S.; SUAREZ, A. I. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 166-169, 2007.

TORTI, V. R.; COBB, A. J.; EVERITT, J. L.; MARSHALL, M. W.; BOORMAN, G. A.; BUTERWORTH, B. E. Nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by inhaled bromodichloromethane in wild-type and p53-heterozygous mice. **Toxicological Sciences**, v. 64, n. 2, p. 269, 2001.

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

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

VERÇOSA JÚNIOR, D.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CASSALI, G. D.; RIBEIRO, E. L.; ZANI, C. L.; MELO, M. M. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 788-798, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

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.

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

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

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

YANG, H.; CHEN, C.; CHANG, W.; LU, F.; LAI, Y.; CHEN, C.; HSEU, T.; KUO, C.; HSEU, Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Androdia camphorate*. **Cancer Letters**, v. 231, p. 215-227, 2006.

YOSHIKAWA, R.; KUSUNOKI, M.; YANAGI, H.; NODA, M.; FURUYAMA, J.; YAMAMURA, T.; HASHIMOTO-TAMAOKI, T. Dual Antitumor Effects of 5-Fluorouracil on the Cell Cycle in Colorectal Carcinoma Cells: A Novel Target Mechanism Concept for Pharmacokinetic Modulating Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 61, p. 1029-1037, 2001.

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

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

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, v. 19, p. 124-28, 2004.

WEBSTER, G. L. Systematics of the Euphorbiaceae. **In: Annals of The Missouri Botanic Garden**, California, EUA. n. 81, v. 1, p. 44, 1994.

WHO. **Câncer**. 2011. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 23 novembro de 2012.