

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

ALINE LIRA XAVIER

ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Lippia microphylla* Cham.
(VERBENACEAE) E SUA TOXICIDADE

JOÃO PESSOA

2011

ALINE LIRA XAVIER

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Lippia microphylla* Cham. (VERBENACEAE) E
SUA TOXICIDADE**

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

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco

JOÃO PESSOA

2011

ALINE LIRA XAVIER

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Lippia microphylla* Cham. (VERBENACEAE) E
SUA TOXICIDADE**

APROVADA EM ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
Orientadora – UFPB**

**Profa. Dra. Lêonia Maria Batista
Examinador interno – UFPB**

**Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Examinador externo – UFPE**

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Examinador suplente – UFPB**

Aos meus pais, **Vanildo da Silva Xavier** (*in memoriam*) e **Josefa Matias Lira Xavier**, que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade. Que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus. A vocês, pais por natureza, por opção e por amor!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o maior mestre, a quem devo tudo que sou e tudo que tenho.

Ao meu irmão **Wagner Xavier**, pela amizade, apoio e torcida nessa caminhada.

Ao meu namorado **Roosevelt Albuquerque**, pelo amor, apoio, companheirismo e paciência em todos os momentos, contribuindo direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho.

A Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral Castello Branco** pela orientação e principalmente pelo exemplo de pessoa e professora. Sua responsabilidade, inteligência, simpatia e dedicação ao que faz, a torna uma pessoa única pela qual tenho imensa admiração.

A Profa. Dra. **Teresinha Gonçalves da Silva** pela valiosa colaboração na realização de todo esse trabalho.

A Profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz** e ao Prof. Dr. **Marcelo Sobral da Silva**, professores que em 2004 me deram a oportunidade de iniciar minhas atividades na área da pesquisa científica, dando-me um voto de confiança, contribuindo dessa forma não só com meu desenvolvimento profissional, mas também pessoal.

Ao Prof. Dr. **Josean Fechine**, pela colaboração no fornecimento do material vegetal.

A Profa. Dra. **Hilzeth de Luna Freire Pessoa** pelos ensinamentos e contribuição nos estudos de genotoxicidade.

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

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial a doutoranda **Jaciana dos Santos Aguiar**, pelo auxílio na realização de parte desse trabalho.

Aos amigos e alunos de pós-graduação do Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), **Monalisa Brito, Ana Paula Moura, Daiene Lunguinho, Igara Lima e Carolina Uchôa** pela ajuda, incentivo e torcida durante toda essa caminhada.

Em especial ao aluno **João Carlos Pita**, pela ajuda em todos os momentos e principalmente pela estimada amizade, com a qual fico feliz em contar sempre.

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

Aos sempre amigos da graduação **Camila Figueiredo, Carminha Alustau, Karine Queiroga, Felipe Queiroga, Edison Vieira, Marianna Nóbrega e Priscilla Nêris** pelo apoio e torcida em todos os momentos.

A Profa. Dra. **Maria Salete Trigueiro de Araújo** pela disposição, paciência e boa vontade para sempre nos atender e tirar nossas dúvidas.

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

A todos os professores ministrantes das disciplinas do mestrado, pelos ensinamentos científicos.

A todos os amigos do mestrado, turmas 2009 e 2010, pelo companheirismo e incentivo.

As secretárias da pós-graduação, **Tânia Maria Araújo, Caroline Medeiros Manguiera e Francis-Mary Nogueira** pelos serviços prestados.

A todos os funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica em especial **Crispim Duarte**, pelo apoio e prestatividade em todos os assuntos relacionados com experimentação animal.

Aos amigos farmacêuticos da Maternidade Frei Damião, **Renata Leite, Penha Jales, Edilson Sobral, Cicilia Florêncio e João Paulo Guedes**, pelo apoio e

compreensão em todas as trocas de plantões, e ajustes de escala de trabalho contribuindo dessa forma para a realização dessa dissertação.

E a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desse trabalho.

Muito obrigada!

“Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim,
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor, do que ficou,
Vou me lembrar, realizar...
Eu vou sofrendo, mas seguindo, enquanto tantos não entendem,
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso, em Jesus!”

Pe. Fábio de Melo – Tudo posso

Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade.

XAVIER, A. L.

Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, LTF/CCS/UFPB (2011)

RESUMO

O câncer é uma doença genética complexa que constitui um importante problema de saúde pública em todo mundo sendo responsável por cerca de sete milhões de óbitos a cada ano. Muitos dos fármacos antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica foram isolados de espécies vegetais ou são baseados em protótipos isolados das mesmas. Porém, agentes antineoplásicos, naturais ou sintéticos, podem ocasionar sérios danos ao organismo, o que justifica a necessidade de avaliação de sua toxicidade. *Lippia microphylla* é uma planta conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro e é pouco relatada na literatura. Existem vários relatos de constituintes isolados de espécies desse gênero que apresentam atividade antitumoral, o que despertou o interesse para a investigação de uma possível atividade antitumoral de *Lippia microphylla*. Adicionalmente, óleos essenciais isolados de diferentes espécies, são conhecidos por apresentarem diferentes atividade biológicas, dentre elas atividade antitumoral. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *L. microphylla* (O.E.L.), através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente foi avaliada a atividade antitumoral *in vitro* frente células das linhagens sarcoma 180 e K562. Os valores de CI_{50} obtidos foram de 100,1 $\mu\text{g/mL}$ e 60,05 $\mu\text{g/mL}$ para as duas linhagens, respectivamente. A investigação do mecanismo de citotoxicidade (via intrínseca da apoptose e envolvimento de estresse oxidativo) por meio da suplementação do meio de cultura com ciclosporina A (um inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial) e os antioxidantes glutationa e N-acetilcisteína resultou em CI_{50} de 118,3 $\mu\text{g/mL}$, 107,3 $\mu\text{g/mL}$ e 109,2 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem sarcoma 180, respectivamente, e 51,94 $\mu\text{g/mL}$, 55,49 $\mu\text{g/mL}$ e 94,18 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem K562, respectivamente. O valor de CH_{50} obtido no experimento de citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos foi 300,2 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* as taxas de inibição do crescimento tumoral foram de 38,2 % e 59,8 % para a dose de 50 mg/kg e 100 mg/kg do O.E.L., respectivamente. As análises toxicológicas demonstraram leve toxicidade gastrointestinal e hematológica, e alteração significativa na função hepática, evidenciada por aumento de AST e ALT, e corroborada com a análise histopatológica, para ambos os grupos tratados com o O.E.L. No entanto, as alterações são consideradas reversíveis e não substanciais quando comparados àquelas produzidas por diversos antineoplásicos largamente utilizados na clínica médica. Portanto, é possível inferir que o O.E.L. apresenta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* com moderada toxicidade, o que não representa um fator limitante para sua aplicabilidade terapêutica.

Palavras-chave: *Lippia microphylla*. Atividade antitumoral. Toxicidade. Óleo essencial.

Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade.

XAVIER, A. L.

Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, LTF/CCS/UFPB (2011)

ABSTRACT

Cancer is a complex genetic disease that is a major public health problem worldwide accounting for about seven million of deaths each year. Many anticancer drugs currently used in clinical medicine have been isolated from plant species, or they are based on substances isolates of these species. But natural products, as anticancer agents, can also cause damage to the organism, requiring toxicity studies. *Lippia microphylla* is a plant popularly known as alecrim-de-tabuleiro, rarely reported in literature. There are several reports of constituents isolated from species of this genus that have antitumor activity, which sparked interest in the investigation of a possible antitumor activity of *Lippia microphylla*. Additionally, essential oils isolated from different species are known to have different biological activities, among them anticancer activity. Therefore this study aimed to evaluate the antitumor activity and toxicity of essential oil of this species through *in vitro* and *in vivo*. Initially was evaluated the *in vitro* antitumor activity against cell lines sarcoma 180 and K562. The IC₅₀ values obtained were 100, 1 µg/mL and 60.05 µg/mL for the two strains respectively. Investigation of the mechanism of cytotoxicity (intrinsic pathway of apoptosis and involvement of oxidative stress) through supplementation of culture medium with cyclosporin A and the antioxidants glutathione and N-acetylcysteine resulted in IC₅₀ of 118,3 µg/mL, 107,3 µg/mL e 109,2 µg/mL for sarcoma 180 respectively, and 51.94 µg/mL, 55.49 µg/mL and 94.18 µg/ml for K562, respectively. The CH₅₀ value obtained in the experiment of cytotoxicity against erythrocytes was 300.2 µg/mL. In the evaluation of antitumor activity the *in vivo* inhibition rates of tumor growth were 38.2% for the dose of 50 mg/kg and 59.8% for 100 mg/kg of essential oil of *Lippia microphylla* (OEL). The toxicological analysis showed moderate gastrointestinal and hematological toxicity, and alterations in liver function, as evidenced by an increase in AST and ALT, corroborated with histopathological analysis, for both groups treated with OEL. However the changes are reversible and not considered substantial when compared with several widely anticancer drugs used in clinical medicine. Therefore, we can infer that the O.E.L. displays antitumor activity *in vitro* and *in vivo* with moderate toxicity, which is not a limiting factor for its possible pharmacology applicability.

Keywords: *Lippia microphylla*. Antitumor activity. Toxicity. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Micronúcleo em eritrócito de sangue periférico.....	27
Figura 2.	<i>Lippia microphylla</i>	34
Figura 3.	Camundongos Swiss provenientes do biotério da UFPE.....	40
Figura 4.	Camundongo com tumor na região subaxilar.....	44
Figura 5.	(A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus®; (B) Analisador hematológico celular automático <i>Animal Blood Counter Vet</i> ®.....	45
Figura 6.	Tumores dos camundongos transplantados com sarcoma 180 dos grupos (n = 6): (A) Controle transplantado; (B) O.E.L. (50 mg/kg); (C) O.E.L. (100 mg/kg); (D) 5-FU (50 mg/kg). Os grupos estão dispostos em suas respectivas colunas.....	53
Figura 7.	Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado; (B) 5-FU (50 mg/kg); (C) O.E.L. (50 mg/kg); (D) O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina (400 x)....	59
Figura 8.	Histopatologia do fígado dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado; (B) 5-FU (50 mg/kg); (C), (D), (E) e (F) O.E.L. (50 mg/kg); (G) (H) (I) e (J) O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina (A, B, C, E, F, G, H, I e J) e método de Gordon e Sweet para reticulina (D) (100 x e 400 x).....	61
Figura 9.	Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado; (B) 5-FU (50 mg/kg); (C) e (D) O.E.L. (50 mg/kg); (E) e (F) O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina (25 x, 100 x e 400 x).....	63
Figura 10.	Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais mostrando os graus de necrose coagulativa: (A) 5-FU (50 mg/kg); (B) O.E.L. (50 mg/kg). Hematoxilina-eosina (25 x).....	64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Viabilidade de células K562 após tratamento com o O.E.L. ($\mu\text{g/mL}$) na ausência e presença de Ciclosporina A (CSA), N-acetilcisteína (NAC) e Glutathione (GSH). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %..... 50
- Gráfico 2.** Viabilidade de células sarcoma 180 após tratamento com o O.E.L. ($\mu\text{g/mL}$) na ausência e presença de Ciclosporina A (CSA), N-acetilcisteína (NAC) e Glutathione (GSH). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %..... 50
- Gráfico 3.** Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.L. ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata, com intervalo de confiança de 95 %..... 51
- Gráfico 4.** Efeito do O.E.L. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor (%) após os diferentes tratamentos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) submetidos aos diferentes tratamentos.....	54
Tabela 2.	Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.....	55
Tabela 3.	Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos.....	55
Tabela 4.	Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos índices dos órgãos de camundongos.....	58
Tabela 5.	Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.L. e ciclofosfamida.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
AIF	Fator Indutor de Apoptose
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fator de Ativação de Protease Associada à Apoptose 1
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CH₅₀	Concentração que produz 50 % de hemólise
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CI₅₀	Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular
CSA	Ciclosporina A
DBM	Departamento de Biologia Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 1-1 difenil-2-picrilhidrazila
dTTP	Trifosfato de deoxitimidina
dUTP	Trifosfato de deoxiuridina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona

H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
LABETOX	Laboratório de Ensaios Toxicológicos
LPS	Lipopolissacarídeo
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
MPTP	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
O₂⁻	Ânion superóxido
O.E.L.	Óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
SOD	Superóxido Dismutase
TS	Timidilato sintase
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VCM	Volume Corpuscular Médio
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1	Câncer.....	21
2.2	Produtos naturais e o câncer.....	22
2.3	Toxicologia de produtos naturais.....	24
2.4	Modelos experimentais no estudo do câncer.....	28
2.5	<i>Lippia microphylla</i> : família, gênero e espécie.....	33
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Local da pesquisa.....	39
4.2	Material.....	39
4.2.1	Óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i>	39
4.2.2	Animais.....	39
4.2.3	Linhagens de células tumorais.....	40
4.3	Métodos.....	40
4.3.1	<i>In vitro</i>	40
4.3.1.1	Citotoxicidade frente células tumorais.....	40
4.3.1.2	Investigação do mecanismo de toxicidade.....	42
4.3.1.3	Citotoxicidade frente eritrócitos.....	42
4.3.2	<i>In vivo</i>	43
4.3.2.1	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células da linhagem sarcoma 180.....	43
4.3.2.2	Análises toxicológicas.....	44

4.3.2.2.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e ração.....	44
4.3.2.2.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	45
4.3.2.2.3	Avaliação dos índices dos órgãos.....	45
4.3.2.2.4	Análises anatomopatológicas.....	46
4.3.2.3	Genotoxicidade.....	46
4.4	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	49
5.1	<i>In vitro</i>	49
5.1.1	Citotoxicidade frente células tumorais.....	49
5.1.2	Investigação do mecanismo de citotoxicidade.....	49
5.1.3	Citotoxicidade frente eritrócitos.....	51
5.2	<i>In vivo</i>	51
5.2.1	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente células da linhagem sarcoma 180.....	51
5.2.2	Análises toxicológicas.....	53
5.2.2.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e ração.....	53
5.2.2.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	54
5.2.2.3	Avaliação dos índices dos órgãos.....	57
5.2.2.4	Análises anatomopatológicas.....	58
5.2.3	Genotoxicidade.....	64
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	79

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas pelos homens no tratamento de inúmeras enfermidades. Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. Analisando os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, observa-se que 28 % destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semi-sintéticos, ao passo que 24 % são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais. Portanto, mais da metade dos novos medicamentos lançados no referido período são derivados de produtos naturais, o que mostra a importância dessa fonte nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (BRANDÃO et al., 2010).

Os vegetais representam a maior fonte de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica, especialmente devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Pesquisadores da área mostram-se impressionados com a diversidade de estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos encontrados (VARANDA, 2006). O entusiasmo no estudo dessa área vem crescendo a cada dia em função da fácil aceitabilidade e disponibilidade das plantas medicinais (KAUR, 2005).

De acordo com Newman et al. (2003), medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87 % das enfermidades humanas. Dentre os grupos de compostos de origem natural descobertos e com uso terapêutico já consagrado, estão os alcaloides da *P. somnifera*, os glicosídeos cardiotônicos, a maioria dos antibióticos, dentre outros. Algumas substâncias químicas de origem natural estão sendo testadas quanto à atividade anti-HIV, como a hipericina e os derivados acilados da castanospermina. Os derivados da artemisina, uma lactona sesquiterpênica com grupo endoperóxido, têm sido utilizados no combate à malária (JOHN, 2000). Outras substâncias presentes nos vegetais com atividade antimicrobiana são compostos aromáticos, principalmente fenóis e antibióticos macrocíclicos produzidos através de uma das vias biossintéticas do acetato (COWAN, 1999).

Deve-se considerar que somente os esteróides 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 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).

No Brasil, país com uma flora diversificada em toda a sua extensão e vegetações de diferentes características, há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8 % foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas e/ou tóxicas (VARANDA, 2006). O panorama mostra que 84 % dos fármacos consumidos no Brasil são importados e 78 a 80 % da produção é feita por empresas multinacionais. Do déficit de US\$ 95 bilhões da balança, US\$ 25 bilhões são da importação de produtos químicos e farmacêuticos, índices que justificam a busca de novos agentes terapêuticos com estruturas ativas ou com atividades complementares às drogas já existentes (CALIXTO, 2009; MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

A integridade de um determinado tecido, assim como sua função, é conferida por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Este equilíbrio é mantido através de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando esse equilíbrio é perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem um tumor. No processo de progressão tumoral, algumas células tumorais perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos, são as denominadas metástases (FERREIRA; ROCHA, 2004).

A perda do controle da proliferação e a aquisição de características associadas com a progressão tumoral são consequências de alterações que ocorrem no conteúdo genético das células normais. Devido à complexidade e à existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação de um tumor (FERREIRA; ROCHA, 2004). Dessa forma, o processo de transformação de uma célula normal em célula tumoral geralmente é resultado de um processo multifatorial, que inclui a interação de fatores genéticos e três categorias de agentes externos: carcinógenos físicos (como ultravioleta e radiação ionizante), carcinógenos químicos (como vários constituintes da fumaça do cigarro ou contaminantes de água e alimentos) e carcinógenos biológicos (como infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas) (WHO, 2009).

Assim sendo, o câncer pode ser considerado uma doença genética complexa, que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (FERREIRA; ROCHA, 2004).

O câncer é um importante problema de saúde pública para países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que nestes últimos são diagnosticados 55 % dos 10 milhões de novos casos por ano (BRANDÃO et al., 2010).

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS), o impacto global do câncer mais

que dobrou nos últimos 30 anos. Estima-se que no ano de 2008 ocorreram cerca de 12 milhões de novos casos de câncer e sete milhões de óbitos em todo mundo (BRASIL, 2009). E as perspectivas futuras indicam que a mortalidade por câncer continuará aumentando, chegando a nove milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030 (BRANDÃO et al., 2010).

No Brasil as estimativas de 2010 apontaram para a ocorrência de quase meio milhão de novos casos (BRASIL, 2009). Dessa forma, as doenças tumorais neoplásicas vêm sendo indicadas como a terceira causa *mortis* mais frequente no Brasil, e juntamente com as doenças cardiovasculares e causas externas são responsáveis por 73 % dos óbitos brasileiros (MACHADO; MELO-JUNIOR, 2009).

Diante desse cenário, torna-se fundamental que recursos e esforços sejam direcionados para o estudo do câncer, possibilitando uma melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes, levando a um avanço na prevenção e tratamento da mesma.

2.2 Produtos naturais e o câncer

Os produtos naturais, particularmente aqueles derivados de plantas, têm sido há muito tempo uma produtiva fonte de novas moléculas e drogas anticâncer (KIM et al., 2010).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, mais de dois terços das drogas utilizadas no tratamento do câncer, aprovadas entre 1940 e 2006, são produtos naturais ou foram desenvolvidos com base no conhecimento adquirido a partir de produtos naturais (EFFERTH, 2010). Drogas de diferentes classes fazem parte desse arsenal. É o exemplo dos alcaloides da vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), extraídos da planta *Catharanthus roseus* (vincapervinca); taxanos (paclitaxel, docetaxel), compostos relacionados com plantas do gênero *Taxus*, da família Taxaceae; derivados da podofilotoxina (etoposídeo, teniposídeo), dois glicosídeos antineoplásicos encontrados nos rizomas das plantas *Podophyllum peltatum* e *P. emodi*; camptotecina (e seus derivados topotecano, irinotecano), um alcaloide derivado da casca da planta chinesa *Camptotheca acuminata*; antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina), antibióticos isolados de *Streptomyces peucetius*, dentre outros (BRANDÃO, 2010).

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

Óleos essenciais são produtos naturais extraídos de plantas que contêm componentes aromáticos voláteis. Essa mistura de componentes voláteis (principalmente mono- e sesquiterpenoides, benzoides, fenilpropanoides, etc.) exerce 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 microrganismos. 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 (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Nos últimos anos, muitos estudos relatando propriedades biológicas de óleos essenciais têm sido publicados, inclusive vários relatos de óleos essenciais de diferentes famílias, apresentando atividade antitumoral (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). O óleo essencial obtido de *Bupleurum marginatum*, por exemplo, mostrou significativa atividade antitumoral *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais (HepG2, Caco-2, CCRF-CEM, HeLa, MiaPaCa-2 e MCF-7) (ASHOUR et al., 2010). Esse efeito é também evidenciado em outras linhagens para outros óleos essenciais obtidos de diferentes espécies como, por exemplo, *Oreopanax nubigenus* e *Schefflera rodrigueziana* que mostraram potente atividade antitumoral *in vitro* contra células MDA-MB-231 (RICHMOND et al., 2009), *Laurus nobilis*, cujo óleo essencial produziu inibição significativa da proliferação de células C32 e ACHN (LOIZZO et al., 2007), além de óleos essenciais obtidos de *Platycladus orientalis*, *Prangos asperula* e *Cupressus sempervirens* que também apresentam atividade antitumoral *in vitro* em células C32 (LOIZZO et al., 2008). O óleo essencial de *Croton flavens* por sua vez, mostrou atividade antitumoral *in vitro* frente células A-549 e DLD-1, assim como constituintes dele isolados, como o α -cadinol, β -elemeno

e α -humuleno, que também se mostraram ativos, apesar de não serem seus componentes majoritários (SYLVESTRE et al., 2006).

Diferentes mecanismos de ação têm sido propostos relacionados à atividade antitumoral de óleos essenciais, já estando evidenciada a participação de vias apoptóticas nos efeitos tóxicos contra células tumorais produzidos por alguns óleos como, por exemplo, o óleo obtido de *Schinus molle* em células K562 (DÍAZ et al., 2008) e àquele obtido de *Cymbopogon flexuosus* em células HL60 (SHARMA et al., 2009).

E 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 monoterpene ascaridole, respectivamente (BEZERRA et al., 2009).

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

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

2.3 Toxicologia de produtos naturais

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

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos, a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas, e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas. Além disso, componentes tóxicos como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúxico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial e diversas substâncias isoladas

de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

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

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

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

Inúmeros trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2009; LINS et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Nesses estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como uréia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular.

Adicionalmente, devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento de cânceres, seja com

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

Efeitos genotóxicos de medicamentos antineoplásicos em células não tumorais são de especial significância devido à possibilidade dos mesmos induzirem tumores secundários nos pacientes em tratamento (CAVALCANTI, 2010). Tendo em vista esse fato, testes genéticos têm sido utilizados com sucesso para a detecção de mutágenos/carcinógenos e antimutágenos/anticarcinógenos (VIEIRA; PAULA; CHEN-CHEN, 2010). Além disso, a avaliação do potencial genotóxico é um dos mais importantes estudos de segurança pré-clínicos necessários para a aprovação e registro de medicamentos (MUHAMMAD, 2010).

Um ensaio amplamente utilizado na área de genotoxicidade é o teste *in vivo* do micronúcleo, realizado em roedores. Ele é muito utilizado em pesquisa e avaliações de segurança para investigação do potencial de agentes físicos e químicos de causar danos genéticos (DERTINGER, 2006).

Esse teste baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Conseqüentemente, na telófase (fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre a formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos), tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010) (Figura 1).

Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ela interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina, ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, os micronúcleos (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

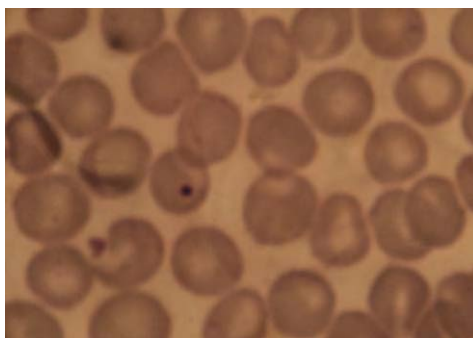


Figura 1 – Micronúcleo em eritrócito de sangue periférico (Foto: Monalisa Brito)

Os micronúcleos podem ser visualizados tanto em amostras de medula óssea, quanto em amostras de sangue periférico. Historicamente, estudos baseados na observação de micronúcleos em medula óssea, têm sido preferidos aos estudos de observação em sangue periférico, com a justificativa de que o baço promoveria a filtração, com posterior destruição dos eritrócitos com inclusões celulares, diminuindo, portanto, a sensibilidade do teste (DERTINGER et al., 2006; HAYASHI et al., 2000; WAKATA et al., 1998). Entretanto vários estudos demonstram que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (ABRAMSSON-ZETTERBERG et al., 1999; ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006; HAMADA et al., 2001; HAYASHI et al., 1992; HYNES et al., 2002; ROMAGNA; STANIFORTH, 1989; TOROUS et al., 2001, 2003; WAKATA et al., 1998). Assim, o teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico se torna mais vantajoso, uma vez que: dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais, utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio, facilitando a integração do mesmo na rotina de estudos toxicológicos e/ou farmacológicos, sem a necessidade da realização de um ensaio em separado para avaliação de efeitos genotóxicos (ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006; HAMADA et al., 2001; MACGREGOR et al., 1995;

WAKATA et al., 1998), e ainda permite uma contagem das células micronucleadas mais satisfatória, devido à uniformidade das células do sangue periférico quando comparadas às da medula óssea (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010; HOOFTMAN; RAAT, 1982;).

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

2.4 Modelos experimentais no estudo do câncer

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos (PITA, 2010; QI; XU, 2006).

Uma das principais preocupações numa abordagem experimental é encontrar um sistema limpo e livre de outras variáveis que não àquela a qual se está investigando. Apesar de esta não ser a condição do organismo inteiro, o estudo de uma função específica pode se tornar difícil na presença de muitas variáveis (PERES; CURI, 2005). Nesse ponto, a cultura de células surge como uma ferramenta importante no estudo de um fenômeno biológico, pois consiste em um sistema que permite a experimentação de uma única condição (PERES; CURI, 2005).

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

A maioria dos agentes antineoplásicos tem sido identificada em virtude de sua citotoxicidade contra células tumorais. Para usá-los de modo efetivo e seguro, um conhecimento aprofundado de seu mecanismo de ação, particularmente em níveis celular e molecular é de grande importância (MESHKINI; YAZDANPARAST, 2010).

Grande parte dos fármacos antineoplásicos exerce seus efeitos citotóxicos por meio da indução de apoptose (KONDOH et al., 2004).

Diferentemente da morte celular por necrose, onde ocorre um processo de morte celular descontrolado, com lise das células, resposta inflamatória e sérios danos ao organismo, a apoptose é um processo de morte celular programada que

atua na regulação da homeostase tecidual (promovendo um equilíbrio entre a taxa de proliferação celular e a taxa de morte celular), na organogênese, no processo de atrofia de órgãos, na eliminação de células potencialmente deletérias (como por exemplo, células que sofreram lesão no DNA), dentre outros. Esse tipo de morte envolve a participação ativa das células em uma cascata de auto-destruição, caracterizada por um conjunto de mudanças morfológicas e bioquímicas (ARAVINDARAM; YANG, 2010).

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. (KONDOH et al., 2004). As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos (OTT et al., 2007). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, múltiplos de 200 pares de base (LY; GRUBB; LAWEN, 2003).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (ou de receptores de morte) e via intrínseca (ou mitocondrial) (DASH, 2010).

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

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

Embora haja diferenças nas vias de sinalização ativadas por receptores de morte diferentes, é possível delinear uma via de sinalização geral (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Vários receptores de morte localizados na membrana citoplasmática das células estão envolvidos na indução de apoptose, tais como Fas (CD95, APO-1) e receptor de fator de necrose tumoral. O receptor Fas (FasR) medeia a sinalização apoptótica após se ligar ao seu ligante natural, Fas (FasL), este processo é seguido pelo recrutamento de uma proteína adaptadora citoplasmática, *Fas-associated death domain* (FADD) e pró-caspase 8, para formar o *death-inducing signaling complex* (DISC). A caspase 8 iniciadora torna-se então ativada, levando à ativação da cascata de caspases por meio da ativação direta de caspases efetoras, tais como a caspase -7 e -3 (TANEL; AVERILL-BATES, 2007).

A outra maneira pela qual a apoptose pode ocorrer é por meio da via intrínseca ou mitocondrial. Esta via é ativada por estresse intra ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, estresse oxidativo, hipóxia ou ativação de oncogenes (DASH, 2007).

A via intrínseca é iniciada por um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial interna a solutos com massa molecular menor que 1500 Da, por meio da formação de megaporos, os chamados Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP), resultando em perda do potencial de membrana, *swelling* (inchaço) mitocondrial e ruptura da membrana mitocondrial externa, com liberação de várias proteínas do espaço intermembrana para o citoplasma da célula, dentre elas várias moléculas pró-apoptóticas tais como o citocromo c, SMAC/Diablo e o Fator Indutor de Apoptose (AIF), dentre outras. No citossol o citocromo C forma um complexo com a APAF-1 (Fator de Ativação de Protease Associada à Apoptose 1) e

a pró-caspase-9, complexo este denominado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 e outras caspases efetoras, que por sua vez dará início a apoptose. (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007).

Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a transição de permeabilidade mitocondrial leva à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento nos níveis de EROs por sua vez levam à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso celular. Além disso, é sabido que as EROs induzem a ativação das caspases -9 e -3 (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Estudos de uma variedade de agentes antineoplásicos, em diferentes linhagens celulares, têm demonstrado que alguns desses agentes executam sua função por indução de estresse oxidativo (CAO, 2004; MESHKINI; YAZDANPARAST, 2010). Estresse oxidativo e produção de EROs intracelulares ocorrem quando a homeostase redox dentro das células é alterada (MESHKINI; YAZDANPARAST, 2010).

Nas células existem vários mecanismos de defesa antioxidantes que atuam prevenindo os efeitos destrutivos dos vários tipos de EROs. Esses mecanismos de defesa incluem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), assim como pequenas moléculas como vitaminas C e D. Adicionalmente, existe ainda a glutathione reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cis-teinil-glicina) que está presente na maioria das células e é o tripeptídeo tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Ela está envolvida no combate do estresse oxidativo celular, manutenção do estado essencial redox e têm funções de detoxificação (ANDRADE-JUNIOR et al., 2005). Uma deficiência ou anormalidade em algum desses mecanismos de defesa resultam em superprodução de EROs seguido de oxidação de biomoléculas importantes como proteínas, lipídios e DNA. Em condições fisiológicas normais existe um delicado balanço entre a taxa de geração e consumo de radicais livres (DUH, 1999; MOHAMMADI; YAZDANPARAST, 2010; NORDBERG; AMER, 2001). Em casos anormais, particularmente quando a taxa de produção excede a taxa de consumo ou inativação de EROs, seus níveis se tornam elevados com sérias consequências à saúde (MOHAMMADI; YAZDANPARAST, 2009).

As EROs possuem um paradoxo em suas funções biológicas: de um lado elas previnem doenças ajudando o sistema imune, mediando a sinalização celular e exercendo um papel fundamental na apoptose, e por outro, elas podem danificar muitas moléculas biológicas, levando dessa forma à danos teciduais e morte celular (FINKEL; HOLBROOK, 2000; MARTINDALE; HOLBROOK, 2002; MOHAMMADI; YAZDANPARAST, 2009).

Um papel para o estresse oxidativo na indução de apoptose é sugerido por observações de que um aumento nos níveis de EROs induzem apoptose, enquanto antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) inibem a morte celular (SILVA, 2007; CHANDRA, 2003; GORMAN, 1997). Além disso, estudos relatam a geração de EROs após o tratamento das células com vários tipos de agentes, incluindo quimioterápicos. A habilidade do estresse oxidativo provocar apoptose através de extenso dano celular tem sido associado com peroxidação lipídica e alterações nas proteínas e núcleo (SILVA, 2007; GORMAN, 1997; KANNAN; JAIN, 2000).

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 (PITA, 2010; QI; XU, 2006).

Sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, foi originado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo. O tumor foi descoberto em 1914 pelo Dr. W. H. Woglom no Laboratório Crocker nos Estados Unidos e é mantido por transplantes sucessivos desde então (PITA, 2010; ZUCKERBERG, 1973).

Essa linhagem celular é amplamente utilizada em todo mundo, tanto para estudos de atividade antitumoral *in vitro*, como para estudos de atividade antitumoral *in vivo*. As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor pode ser implantado de duas maneiras: por meio da inoculação na cavidade intraperitoneal, onde elas se desenvolvem formando um tumor ascítico (“líquido”) ou por meio de inoculação subcutânea promovendo a formação de tumores sólidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). A forma sólida é pouco hemorrágica e se caracteriza pelo rápido crescimento, atingindo aproximadamente 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias após o transplante (Ó PESSOA, 1992).

2.5 *Lippia microphylla*: família, gênero e espécie

A família Verbenaceae compreende cerca de 36 gêneros e aproximadamente 1000 espécies de distribuição pantropical. No Brasil ocorrem aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies (SANTOS et al., 2009).

As espécies de Verbenaceae têm seu potencial econômico amplamente explorado, sendo utilizadas tanto com fins ornamentais, quanto com fins terapêuticos, neste último caso devido principalmente a presença de óleos essenciais (SANTOS et al., 2009).

Lippia é um dos principais gêneros da família Verbenaceae. Este inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, encontradas principalmente na América Central e do Sul, assim como na África tropical. A maioria das espécies estão distribuídas no Brasil, Paraguai e Argentina (CAMPOS et al., 2010). Várias delas são utilizadas popularmente por suas já conhecidas propriedades: analgésica, anti-inflamatória, antipirética, sedativa, antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, larvicida, antimicrobiana, antiviral, moluscicida, antimalárica, antiespasmódica, anticonvulsivante e estimulante (ABENA et al., 1998; MONTEIRO et al., 2007; PASCUAL et al., 2001; SILVA et al., 2010; VALENTIN et al., 1995). Também são utilizadas no tratamento de distúrbios respiratórios ou gastrointestinais (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Adicionalmente, constituintes isolados de espécies desse gênero já apresentaram atividade antitumoral *in vitro* frente diferentes linhagens de células tumorais humanas, tais como, HCT-15 (carcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), U251 (glioblastoma), PC-3 (câncer de próstata), K562 (leucemia mielóide crônica) (GONZALÉZ-GÜERECA; SOTO-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, 2010), MK-1 (adenocarcinoma gástrico), HeLa (carcinoma epitelial), HL60 (leucemia promielocítica), CEM (leucemia linfoblástica aguda), assim como células tumorais murinas B16F10 (melanoma) (ABE; NAGAO; OKABE, 2002; COSTA et al., 2001; MESA-ARANGO et al., 2009).

No que diz respeito à espécie *Lippia microphylla* Cham., conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro, alecrim-do-mato, alecrim-pimenta ou alecrim-da-chapada (Figura 2), existem relatos de uso popular de suas folhas no tratamento de doenças respiratórias ou como antiséptico (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

A espécie é pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico. Apenas quatro trabalhos podem ser encontrados. Santos et al. (2003) relatam o isolamento de uma nova naftoquinona, denominada microfilaquinona, de uma mistura de naftoquinonas (6-metoxi e 7-metoxi-nafto [2-3-b] -furan-4,9-quinonas), assim como o isolamento da tecomaquinona I, das raízes dessa espécie. Adicionalmente, a atividade citotóxica desses constituintes foi avaliada frente cinco linhagens de células tumorais, com todas as substâncias apresentando significativa atividade antitumoral.



Figura 2 – *Lippia microphylla* (Foto: Josean Fechine)

Souza et al. (2005) demonstraram atividade antifúngica significativa do óleo essencial de *L. microphylla*. David et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante de *Lippia microphylla* e outros 31 extratos de plantas do nordeste brasileiro, através do ensaio do radical 1-1 difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e do ensaio de descoloração de beta-caroteno. O extrato de *L. microphylla* foi um dos que apresentou maior atividade antioxidante (ensaio de descoloração do beta-caroteno) (DAVID et al., 2007).

Em 2010 uma análise realizada pelo grupo de pesquisa da fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba do óleo essencial obtido das folhas de *Lippia microphylla* resultou na identificação de três constituintes correspondendo a 100 % do total de componentes do óleo, são eles: timol (95,63 %), p-cimeno (3 %) e

carvacrol (1,37 %) (Dados não publicados). Adicionalmente, alguns estudos com esses constituintes majoritários, mais precisamente o timol, assim como seu isômero, o carvacrol, demonstram potente atividade antitumoral frente diferentes linhagens de células (ANDERSEN, 2006; BASER, 2008; HORVATHOVA et al., 2006; HORVATHOVA; TURCANIOVA; SLAMENOVA, 2007; MASTELIC et al., 2008).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do O.E.L. frente células tumorais malignas das linhagens sarcoma 180 e K562;
- Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de citotoxicidade do O.E.L., assim como o envolvimento da via intrínseca da apoptose;
- Avaliar a citotoxicidade do O.E.L. frente eritrócitos de camundongos Swiss;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do O.E.L. frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma 180;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do O.E.L. através da determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, análise anatomopatológica de órgãos vitais, consumo de água e ração, e evolução ponderal;
- Avaliar o efeito imunomodulador do O.E.L., através da determinação dos índices de baço e timo;
- Avaliar o efeito genotóxico *in vivo* do O.E.L., através do ensaio do micronúcleo.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), assim como no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia do Departamento de Biologia Molecular (DBM), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Óleo essencial de *Lippia microphylla*

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

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) (Figura 3) pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/LTF/UFPB) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida (pellets de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF / UFPB (CEPA), sob a certidão Nº 0509/109.



Figura 3 – Camundongos Swiss provenientes do biotério da UFPE (Foto: Aline Xavier)

4.2.3 Linhagens de células tumorais

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

Para os ensaios *in vitro*, além da linhagem sarcoma 180 foram utilizadas ainda, células tumorais da linhagem K562 (linhagem humana de leucemia mielóide crônica), também fornecidas pela Profa. Dra. Teresinha G. da Silva. As mesmas são mantidas no Laboratório de Ensaios Toxicológicos em meio de cultura, sendo realizado repique a cada dois dias.

4.3 Métodos

4.3.1 *In vitro*

4.3.1.1 Citotoxicidade frente células tumorais

Células da linhagem sarcoma 180 foram utilizadas para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. As células foram coletadas da cavidade peritoneal

do camundongo com 7-10 dias de inoculação, solubilizadas com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e em seguida centrifugadas à 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Nutricell®) suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10 % de soro bovino fetal (SBF) (Nutricell®). As células tumorais foram então semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware®) e incubadas com diferentes concentrações (10 -640 µg/mL) do O.E.L. 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 pelo menos duas vezes. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich®).

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado espectroscopicamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; 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:

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

Onde:

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

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

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

A linhagem humana K562 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF (v/v) e antibióticos, à 37 °C e 5 % de CO₂. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram semeadas em placas de 96 poços (3 x 10⁵ células/mL), e tratadas com diferentes concentrações (10 – 200 µg/mL) do O.E.L., ou DMSO a 0,5 % (veículo) por 72 h (37 °C e 5 % CO₂). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT como descrito anteriormente.

4.3.1.2 Investigação do mecanismo de citotoxicidade

Para avaliação do envolvimento do estresse oxidativo, e da via intrínseca da apoptose no mecanismo de citotoxicidade do O.E.L., células das linhagens sarcoma 180 e K562 foram semeadas em placas de 96 poços com meio RPMI-1640 suplementado com ciclosporina A (um inibidor da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial), glutationa e N-acetilcisteína (ambos antioxidantes), nas concentrações finais de 1 µM, 1 mM e 1 mM, respectivamente, e incubadas com diferentes concentrações do O.E.L. por 24 h (sarcoma 180) ou 72 h (K562) (SILVA, 2007). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito anteriormente.

4.3.1.3 Citotoxicidade frente eritrócitos

Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss coletado pelo plexo orbital. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para evitar coagulação. Para obtenção da suspensão de eritrócitos, 2 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de 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 então, novamente ressuspensos em PBS, para a obtenção de uma solução de eritrócitos a 1 % a ser utilizada no ensaio de hemólise. O óleo essencial foi solubilizado em DMSO (5 %) e PBS, no dobro das

concentrações desejadas. A cada 1 mL dessas soluções foi adicionado 1 mL da solução de eritrócitos, em quadruplicata. O controle positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos com 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) em PBS (1 mL), e DMSO (5 %) em PBS (1 mL), respectivamente. Os tubos foram mantidos sob agitação suave por 60 minutos. Logo após esse período, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido (KANG et al., 2009). A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm para cálculo da concentração que produz 50 % de hemólise (CH_{50}) através da determinação da percentagem de hemólise pela fórmula:

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

Onde:

DO = Densidade óptica do tubo com o produto teste

$DO_{CONTROLE NEGATIVO}$ = Densidade óptica do controle negativo

$DO_{CONTROLE POSITIVO}$ = Densidade óptica do controle positivo

4.3.2 *In vivo*

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

Células tumorais ascíticas da linhagem sarcoma 180, com oito dias após implante, foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via subcutânea (0,2 mL - 25×10^6 células/mL), na região subaxilar dos animais experimentais (n = 6) (Figura 4). Vinte e quatro horas após a implantação, o O.E.L. foi solubilizado em Tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5 %) e administrado por via intraperitoneal durante sete dias, nas doses de 50 e 100 mg/kg. 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®) (50 mg/kg) foi usado como controle positivo. Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução de 5 % de Tween 80 (MONTENEGRO et al., 2008). Foi utilizado ainda um quinto grupo (controle sadio), cujos animais (n = 6)

permaneceram nas mesmas condições experimentais dos grupos tratados e controle, porém não foram transplantados com as células tumorais (sarcoma 180). No nono dia, todos os animais foram eutanasiados e os tumores extirpados, pesados e fixados em formaldeído (10 %). A inibição tumoral foi calculada seguindo a fórmula abaixo:

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

Onde:

PI % = percentual de inibição do peso tumoral

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

B = média dos pesos dos tumores de cada grupo tratado



Figura 4 – Camundongo com tumor na região subaxilar (Foto: Aline Xavier)

4.3.2.2 Análises toxicológicas

4.3.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

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

4.3.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

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

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

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus[®] (Roche Diagnostic System) e para o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente (Figura 5). As extensões sanguíneas foram coradas automaticamente no HEMATEL 200[®] e analisadas em microscópio óptico TAIMIN[®], para realização da contagem diferencial de leucócitos.



Figura 5 – (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus[®]; **(B)** Analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet*[®] (Foto: Aline Xavier)

4.3.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado e rins) extirpados, pesados, examinados macroscopicamente, para

investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações, e em seguida foram fixados em formaldeído (10 %). O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula abaixo:

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

4.3.2.2.4 Análises anatomopatológicas

Após a pesagem dos órgãos e tumor, os mesmos foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10 %) tamponada e após 24 horas, foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, (LEIKA[®]), os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subseqüentemente 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.

4.3.2.3 Genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo, grupos de seis camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos foram intraperitonealmente tratados com três diferentes doses do O.E.L. (50 mg/kg, 100 mg/kg e 150 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 24 horas os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg - Thiopentax[®], Cristália) e amostras de sangue periférico foram coletadas pelo plexo orbital, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov[®]) para

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

4.4 Análise estatística

Para os ensaios *in vitro* com células tumorais, foram realizados pelo menos três experimentos em quatro replicatas. Para os ensaios *in vitro* com eritrócitos foram realizados três experimentos em triplicata. Os valores de CI_{50} e CH_{50} foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95 %.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se o teste análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de *Tukey* onde os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 *In vitro*

5.1.1 Citotoxicidade frente células tumorais

Duas linhagens de células tumorais foram tratadas com concentrações crescentes do O.E.L. por 24 h (sarcoma 180) ou 72 h (K562), e a viabilidade celular foi analisada através do ensaio de redução do MTT.

Os resultados mostram que o O.E.L. apresenta atividade antitumoral *in vitro* de maneira dependente de concentração nas duas linhagens de células utilizadas. Entretanto, seu efeito citotóxico foi mais pronunciado em células K562, para a qual foi obtido um valor de CI_{50} de 60,05 (55,28 – 65,24) $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9490$) (Gráfico 1). Para células da linhagem sarcoma 180, a CI_{50} foi de 100,1 (94,96 - 105,5) $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9811$) (Gráfico 2).

5.1.2 Investigação do mecanismo de citotoxicidade

Uma vez que o O.E.L. mostrou citotoxicidade frente células tumorais, decidiu-se investigar possíveis mecanismos envolvidos no processo de morte celular.

Para avaliação do envolvimento da via intrínseca da apoptose, as células tumorais foram tratadas com concentrações crescentes do óleo em estudo por 24 h (sarcoma 180) ou 72 h (K562) em meio de cultura suplementado com ciclosporina A (um inibidor do MPTP) (CSA), e a viabilidade celular avaliada através do ensaio de redução do MTT.

Em células K562, observou-se que não houve diminuição do efeito citotóxico produzido pelo óleo na presença de CSA, obtendo-se um valor de CI_{50} de 51,94 (47,92 - 56,30) $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9697$) (Gráfico 1).

Para avaliar o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de citotoxicidade do O.E.L. frente células tumorais da linhagem K562, promoveu-se a suplementação do meio de cultura de células, expostas às diferentes concentrações do óleo essencial, com NAC e GSH, que são espécies antioxidantes. Como mostra o gráfico 1 houve uma redução no efeito citotóxico do óleo essencial na presença de NAC, enquanto na presença de GSH não foi observada diminuição na citotoxicidade.

Os valores de CI_{50} obtidos foram de 94,18 (85,81 - 103,4) $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9564$) e 55,49 (55,37 - 55,62) $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9999$) na presença de NAC e GSH, respectivamente (Gráfico 1).

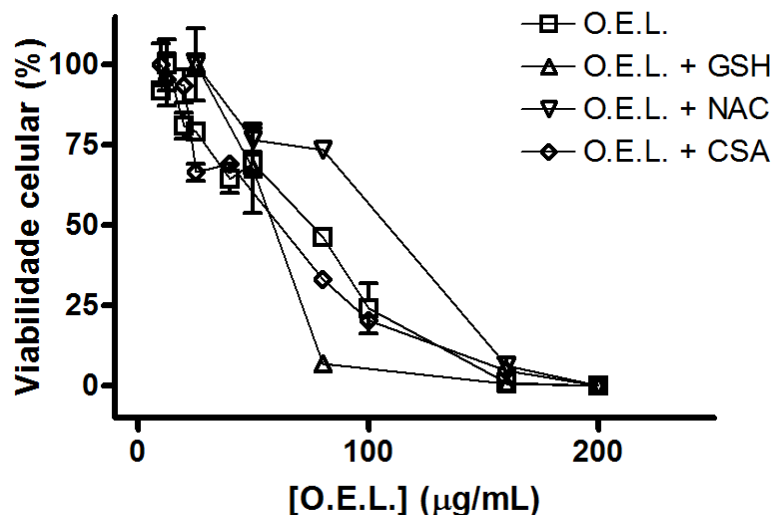


Gráfico 1 – Viabilidade de células K562 após tratamento com o O.E.L. ($\mu\text{g/mL}$) na ausência e presença de Ciclosporina A (CSA), N-acetilcisteína (NAC) e Glutathione (GSH). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

A investigação do mecanismo de citotoxicidade do O.E.L. por meio da suplementação com CSA, frente células da linhagem sarcoma 180, diferentemente do que observado frente às células K562, resultou em diminuição da citotoxicidade, obtendo-se um valor para a CI_{50} de 118,3 (113,7 - 123,1) $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9857$) (Gráfico 2).

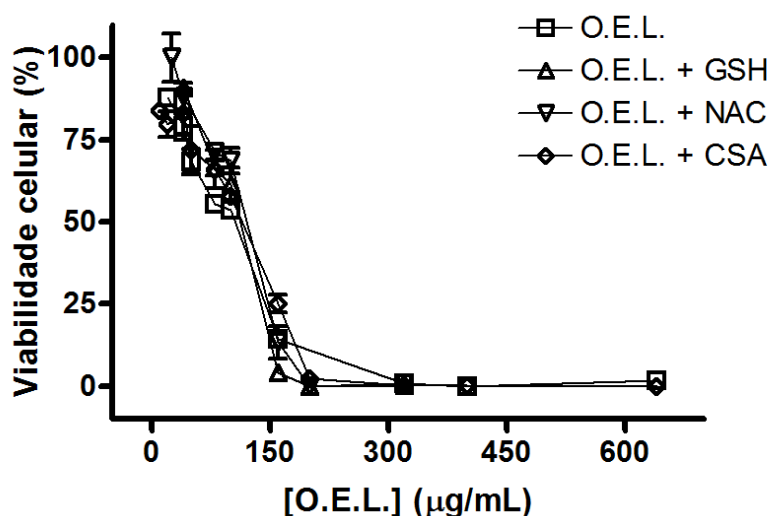


Gráfico 2 – Viabilidade de células sarcoma 180 após tratamento com o O.E.L. ($\mu\text{g/mL}$) na ausência e presença de Ciclosporina A (CSA), N-acetilcisteína (NAC) e Glutathione (GSH). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

No que diz respeito à investigação do envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de morte de células dessa linhagem, não foi observada diminuição na citotoxicidade após suplementação com NAC e GSH, resultando em valores de CI₅₀ de 109,2 (103,8 - 114,9) µg/mL ($R^2 = 0,9714$) e 107,3 (102,8 - 111,9) µg/mL ($R^2 = 0,9789$), respectivamente (Gráfico 2).

5.1.3 Citotoxicidade frente eritrócitos

A citotoxicidade do O.E.L. 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 CH₅₀ obtido foi de 300,2 (283,4 – 317,9) µg/mL (Gráfico 3).

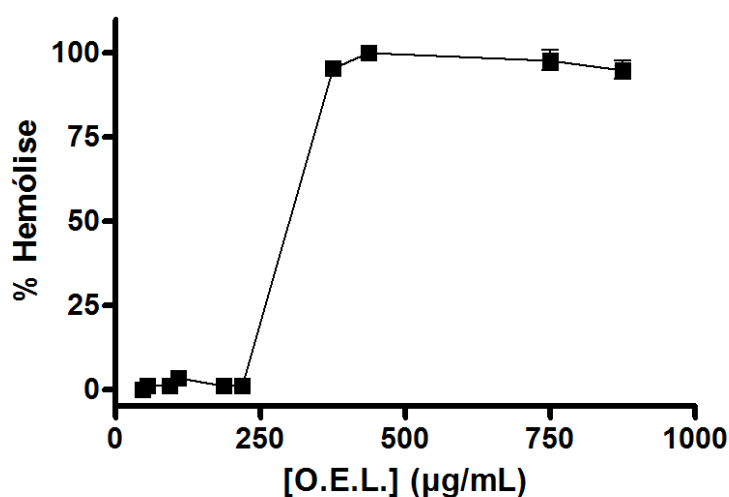


Gráfico 3 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o O.E.L. (µg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média de três experimentos em triplicata, com intervalo de confiança de 95 %.

5.2 *In vivo*

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

Camundongos transplantados com sarcoma 180 foram tratados intraperitonealmente com o O.E.L. (50 e 100 mg/kg), por sete dias, para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*. Uma significativa redução do peso dos tumores foi

observada em ambos os grupos tratados com o óleo essencial. Após oito dias do implante, a média do peso dos tumores foi de $2,12 \pm 0,20$ g no grupo controle transplantado, e $1,31 \pm 0,17$ g e $0,85 \pm 0,09$ g, nos grupos tratados com o O.E.L. nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Os camundongos tratados com 5-FU (50 mg/kg) também apresentaram uma significativa redução no peso dos tumores ($0,29 \pm 0,06$ g) quando comparados com o grupo controle transplantado (Gráfico 4). As taxas de inibição do crescimento tumoral foram 38,2 % e 59,8 % para os camundongos tratados com o O.E.L. nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente, e 86,3 % para os camundongos tratados com 5-FU (50 mg/kg). Os tumores dos animais tratados com o O.E.L. (50 mg/kg e 100 mg/kg), 5-FU (50 mg/kg) e do controle transplantado estão apresentados na Figura 5.

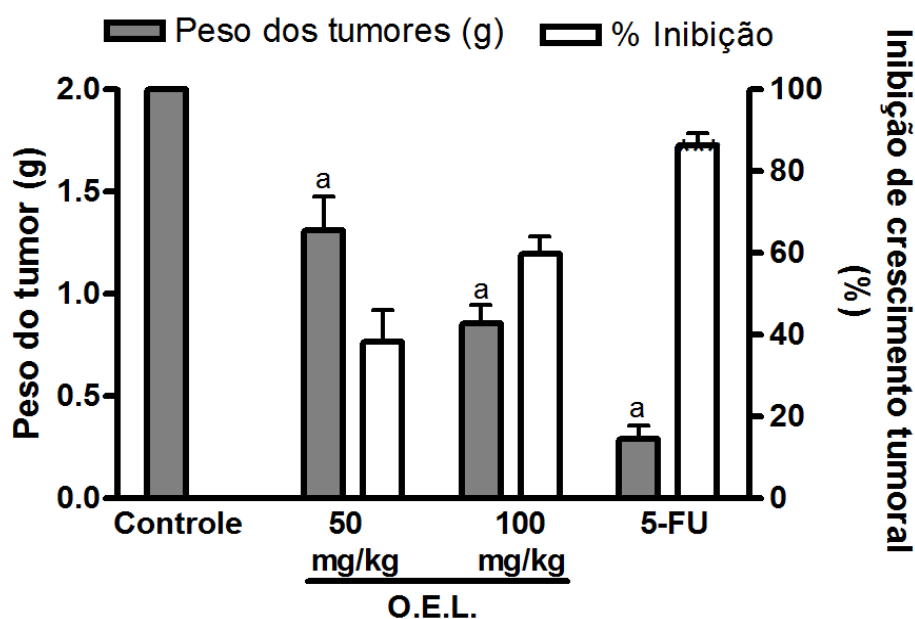


Gráfico 4 – Efeito do O.E.L. e 5-FU em camundongos transplantados com sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor (g) e a taxa de inibição do crescimento do tumor (%) após os diferentes tratamentos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle.



Figura 6 – Tumores dos camundongos transplantados com sarcoma 180 dos grupos (n = 6): (A) Controle transplantado; (B) O.E.L. (50 mg/kg); (C) O.E.L. (100 mg/kg); (D) 5-FU (50 mg/kg). Os grupos estão dispostos em suas respectivas colunas (Foto: Aline Xavier).

5.2.2 Análises toxicológicas

5.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Na tabela 1 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, avaliados durante os sete dias de tratamento com o O.E.L., bem como a evolução ponderal dos animais.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que houve uma diminuição significativa do consumo de água dos animais tratados com a maior dose do O.E.L., e dos animais tratados com 5-FU, quando comparados com o grupo controle transplantado. Os mesmos grupos também apresentaram uma redução significativa no consumo de ração.

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

Tabela 1 – Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) submetidos aos diferentes tratamentos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Animais sadios					
5 % Tween 80	-	42,9 ± 3,0	31,9 ± 2,3	29,4 ± 0,5	32,6 ± 0,8
Animais S180					
5 % Tween 80	-	52,9 ± 1,5	31,2 ± 1,8	29,1 ± 0,7	38,5 ± 1,1
5-FU	50	34,6 ± 3,5 ^a	18,5 ± 3,2 ^a	27,5 ± 0,7	22,1 ± 0,9 ^a
O.E.L.	50	54,2 ± 2,4	26,1 ± 1,6	25,1 ± 0,7	32,0 ± 0,7
O.E.L.	100	31,1 ± 3,6 ^a	17,3 ± 2,4 ^a	24,0 ± 0,5	23,7 ± 0,7 ^a

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^ap < 0,05 comparado ao controle transplantado. Animais S180: animais transplantados com sarcoma 180.

5.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica dos efeitos do O.E.L. incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de uréia e creatinina em ambos os grupos tratados com o O.E.L. e no grupo tratado com 5-FU, quando comparado com o controle transplantado. 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 100 mg/kg do O.E.L., assim como um aumento significativo da atividade enzimática da AST no grupo tratado com a dose de 50 mg/kg do óleo essencial, quando

comparados ao controle transplantado. O grupo tratado com 5-FU não apresentou alterações nas atividades da AST e ALT.

Observa-se ainda que o implante do tumor por si só foi capaz de aumentar a atividade da AST nos animais do grupo controle transplantado quando comparados ao grupo controle sadio (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Animais sadios					
5 % Tween 80	-	103,7 ± 6,7	55,7 ± 2,0	52,8 ± 0,79	0,46 ± 0,02
Animais S180					
5 % Tween 80	-	202,7 ± 6,7 ^b	71,8 ± 3,3	32,8 ± 3,6	0,40 ± 0,03
5-FU	50	197,4 ± 29,2 ^b	62,7 ± 21,6	40,8 ± 5,1	0,42 ± 0,04
O.E.L.	50	283,2 ± 16,8 ^{a,b}	91,0 ± 7,9	29,2 ± 2,9	0,32 ± 0,02
O.E.L.	100	400,8 ± 17,1 ^{a,b}	152,3 ± 5,2 ^{a,b}	36,6 ± 4,4	0,33 ± 0,02

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a*p* < 0,05 comparado ao controle transplantado; ^b*p* < 0,05 comparado ao controle sadio. Animais S180: animais transplantados com sarcoma 180.

Em relação à avaliação hematológica não houve alterações significantes na contagem total de hemácias, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito nos grupos tratados em relação ao controle transplantado (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Animais sadios				
5 % Tween 80	-	8,46 ± 0,10	14,37 ± 0,12	47,55 ± 0,61
Animais S180				
5 % Tween 80	-	7,56 ± 0,20	13,37 ± 0,26	41,20 ± 1,21
5-FU	50	8,73 ± 0,65	15,58 ± 0,96	45,40 ± 3,26
O.E.L.	50	6,60 ± 0,19	12,02 ± 0,73	35,92 ± 2,03
O.E.L.	100	7,46 ± 0,36	14,03 ± 0,70	39,75 ± 2,24

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. Animais S180: animais transplantados com sarcoma 180.

Também não foram observadas alterações no Volume Corpuscular Médio (VCM) e na Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) das hemácias. No entanto, a Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) teve um aumento significativo no grupo tratado com a dose de 100 mg/kg do O.E.L., assim como no grupo tratado com o 5-FU quando comparados ao grupo controle transplantado. Os animais do grupo controle transplantado também apresentaram um aumento no valor do CHCM quando comparado ao grupo controle sadio (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos (Continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Animais sadios				
5 % Tween 80	-	56,22 ± 0,20	17,27 ± 0,13	29,42 ± 0,09
Animais S180				
5 % Tween 80	-	54,67 ± 0,84	17,68 ± 0,30	32,50 ± 0,62 ^c
5-FU	50	52,29 ± 1,39	18,00 ± 0,64	34,48 ± 0,65 ^{a,c}
O.E.L.	50	54,33 ± 2,04	18,17 ± 0,77	33,43 ± 0,21 ^c
O.E.L.	100	53,33 ± 0,76	18,80 ± 0,25	35,37 ± 0,44 ^{a,c}

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado; ^c $p < 0,05$ comparado ao controle sadio. Animais S180: animais transplantados com sarcoma 180.

No que diz respeito à contagem total de leucócitos, não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com o O.E.L. O mesmo não ocorreu com o grupo controle positivo, no qual houve uma redução significativa no número de leucócitos quando comparado ao grupo controle transplantado (Tabela 3).

Na contagem diferencial de leucócitos, apenas o grupo tratado com a dose de 50 mg/kg do O.E.L. apresentou uma redução significativa na porcentagem de monócitos quando comparado ao grupo controle transplantado. Os demais tipos leucocitários não apresentaram alterações significativas após os tratamentos com o óleo essencial. Já o grupo tratado com o 5-FU apresentou aumento significativo na porcentagem de linfócitos e diminuições significativas na porcentagem de neutrófilos e monócitos, quando comparados ao grupo controle transplantado. Adicionalmente, observa-se que o grupo controle transplantado apresentou uma diminuição da porcentagem de linfócitos e um aumento da porcentagem de neutrófilos e monócitos quando comparado ao grupo controle sadio (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos (Continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Animais saudáveis						
5 % Tween 80	-	7,97 ± 0,67	76,00 ± 1,48	27,83 ± 1,68	1,33 ± 0,21	1,67 ± 0,21
Animais S180						
5 % Tween 80	-	9,63 ± 1,45	42,67 ± 3,67 ^b	47,17 ± 3,80 ^b	5,33 ± 0,84 ^b	1,50 ± 0,56
5-FU	50	0,63 ± 0,04 ^a	94,00 ± 1,37 ^{a,b}	2,66 ± 0,99 ^b	2,33 ± 0,33 ^a	0,33 ± 0,33
O.E.L.	50	14,23 ± 2,71	39,17 ± 5,00 ^b	56,67 ± 4,54 ^b	2,33 ± 0,62 ^a	1,83 ± 0,31
O.E.L.	100	14,08 ± 3,40	45,33 ± 7,91 ^b	48,83 ± 7,43 ^b	3,50 ± 0,89	2,00 ± 0,52

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado; ^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio. Animais S180: animais transplantados com sarcoma 180.

5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

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

O tratamento com o O.E.L. com as diferentes doses também não resultou em alterações significativas nos índices de fígado, rins e timo quando comparados aos animais do grupo controle transplantado. Já o índice do baço reduziu significativamente nos animais tratados com a dose de 100 mg/kg do O.E.L., fato este, que não ocorreu no grupo tratado com a dose de 50 mg/kg. Já os animais tratados com 5-FU (50 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa nos índices de fígado, timo e baço (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeitos do O.E.L. e 5-FU nos índices dos órgãos de camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Animais sadios					
5 % Tween 80	-	3,39 ± 0,15	5,19 ± 0,30	62,09 ± 1,35	10,81 ± 0,18
Animais S180					
5 % Tween 80	-	3,86 ± 0,42	8,46 ± 0,77 ^b	68,75 ± 2,15	9,34 ± 0,19
5-FU	50	1,76 ± 0,27 ^{a,b}	2,74 ± 0,27 ^{a,b}	57,84 ± 2,70 ^a	11,04 ± 0,11
O.E.L.	50	3,82 ± 0,54	6,87 ± 0,39	65,25 ± 1,87	9,10 ± 0,64
O.E.L.	100	2,33 ± 0,56	5,54 ± 0,53 ^a	62,55 ± 2,14	10,88 ± 0,57

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado; ^b $p < 0,05$ comparado ao controle sadio. Animais S180: animais transplantados com sarcoma 180.

5.2.2.4 Análises anatomopatológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do O.E.L. 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.L., nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, apresentaram-se dentro dos limites da normalidade histológica. Assim, ao exame microscópico observaram-se glomérulos preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar sustentado por delicado mesângio (Figura 7 A). Os túbulos contorcidos (proximais e distais), túbulos coletores e alças de Henle estavam sustentados por escasso tecido fibroconjuntivo e revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a plano, típico (Figura 7 B-D).

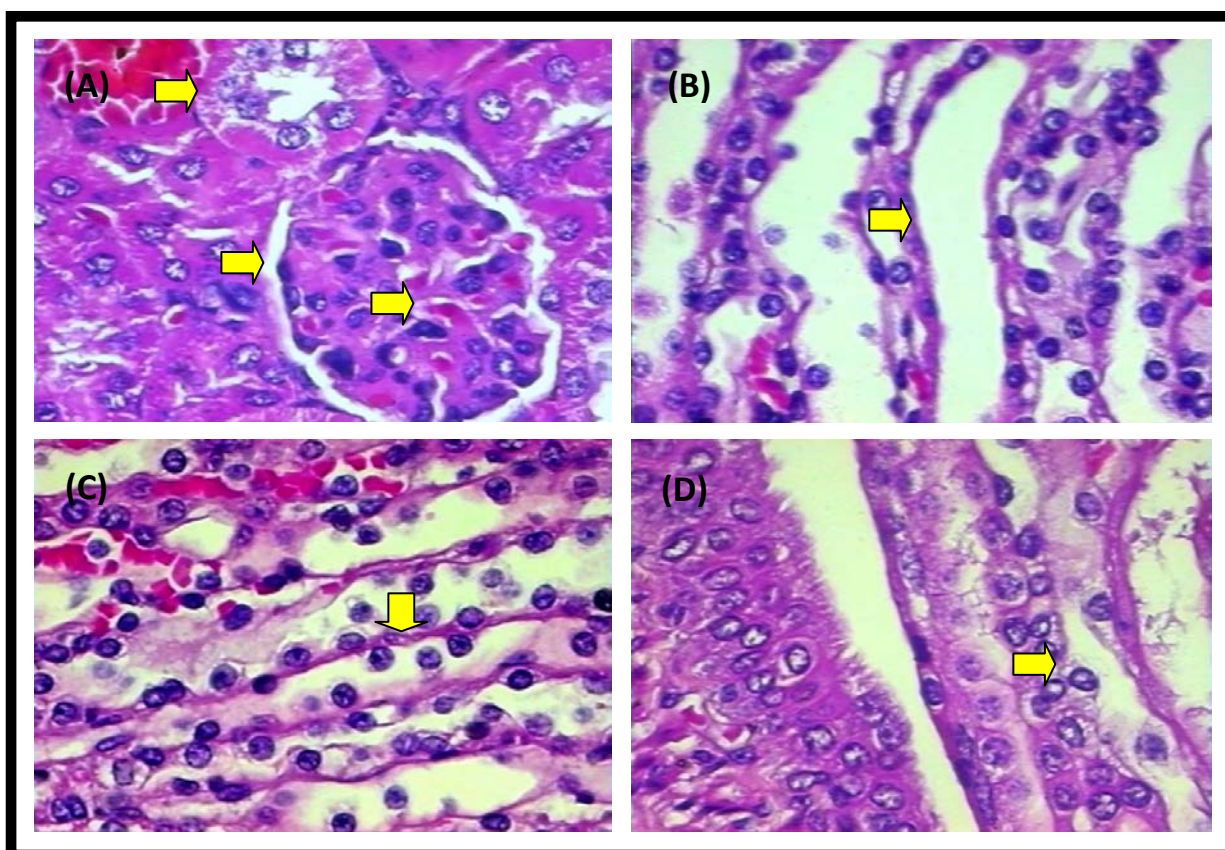


Figura 7 – Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado; **(B)** 5-FU (50 mg/kg); **(C)** O.E.L. (50 mg/kg); **(D)** O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina (400 x).

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle transplantado apresentaram alterações histológicas reacionais, focais, mínimas, sem atipias celulares, tendo hepatócitos isomorfos organizados em traves direcionadas para as veias hepáticas terminais, de paredes finas. No seio do lóbulo, identificou-se discreto infiltrado inflamatório linfocitário, em raros focos. Os espaços portais eram pequenos e regularmente distribuídos, cuja matriz laxa incorpora a tríade vascular biliar habitual (Figura 8 A).

Os fígados dos animais tratados com o antineoplásico 5-FU e o O.E.L. na dose de 50 mg/kg apresentavam arquitetura lobular preservada, verificando-se, contudo, congestão venosa portal e lobular (Figura 8 B) e focos esparsos e pequenos de necrose hepatocelular, associados a infiltrado linfocitário (Figura 8 C), coincidentes com colapso da trama reticulínica, como demonstrado pelo método de Gordon e Sweet (Figura 8 D). Esse quadro histológico reacional do parênquima era acompanhado por hiperplasia de células de Kupffer (Figura 8 E). As mesmas alterações foram observadas nos animais tratados com a dose de 100

mg/kg. Entretanto, a lesão citolítica hepatocelular mostrava-se mais frequente e com infiltrado inflamatório moderado nesse último grupo (Figura 8 G). Adicionalmente evidenciaram-se áreas de infiltração linfocitária em topografia subcapsular (subcapsulite) (Figura 8 H), bem como a ocorrência de áreas de necrose hepatocelular coagulativa, caracterizada pela acidofilia citoplasmática com cariorrexe e cariólise, por vezes, associada à exsudação inflamatória mista, destacando-se a presença de polimorfonucleares neutrófilos (Figura 8 I). Em dois animais analisados do grupo tratado com a dose de 50 mg/kg do O.E.L., constatou-se um efeito proliferativo hepatocelular, representado pela presença de figuras isoladas de mitoses (Figura 8 F). Ademais, sobrecarga metabólica lipídica constituída por macrovacúolos e microvacúolos citoplasmáticos, em hepatócitos, com distribuição zonal aleatória, ocorreu em um dos animais analisados do grupo tratado com 5-FU, um do grupo tratado com o O.E.L na dose de 50 mg/kg e em dois dos animais do grupo tratado com o O.E.L. na dose de 100 mg/kg. (Figura 8 J).

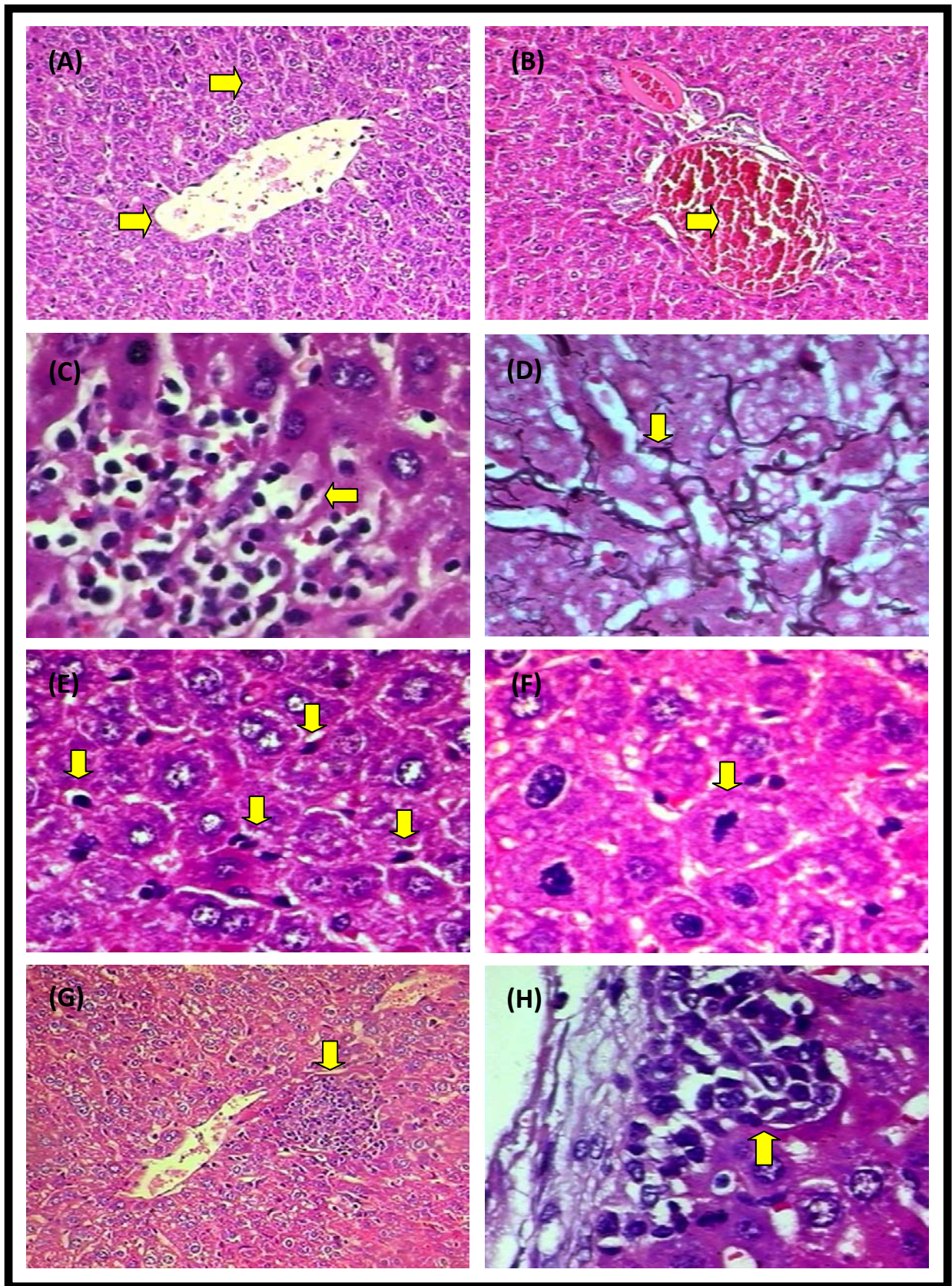


Figura 8 – Histopatologia do fígado dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado; **(B)** 5-FU (50 mg/kg); **(C)**, **(D)**, **(E)** e **(F)** O.E.L. (50 mg/kg); **(G)** **(H)** **(I)** e **(J)** O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina **(A, B, C, E, F, G, H, I e J)** e método de Gordon e Sweet para reticulina **(D)** (100 x e 400 x).

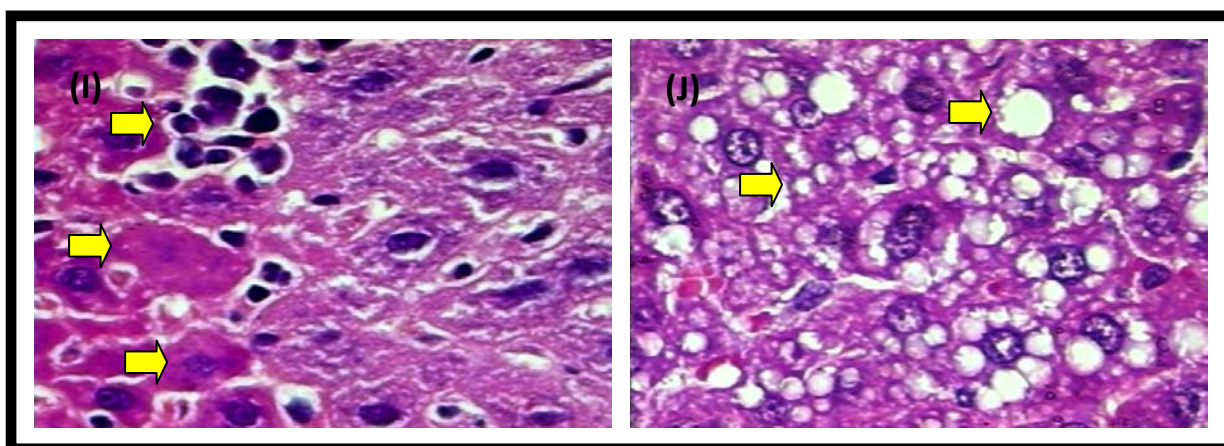


Figura 8 – Histopatologia do fígado dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado; **(B)** 5-FU (50 mg/kg); **(C)**, **(D)**, **(E)** e **(F)** O.E.L. (50 mg/kg); **(G)** **(H)** **(I)** e **(J)** O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina **(A, B, C, E, F, G, H, I e J)** e método de Gordon e Sweet para reticulina **(D)** (100 x e 400 x) (Continuação).

As análises histológicas dos tumores (sarcoma 180) dos animais experimentais revelaram uma neoplasia maligna de limites marginais irregulares e infiltrativos, em arranjos celulares sólidos, com septos fibroconjuntivos, escassos, intervenientes e com alto grau citológico. Promovendo invasão de tecido muscular esquelético (Figura 9 A), adiposo (Figura 9 B) e de perineuro (Figura 9 C), tal neoplasia mostrava proliferação de células imaturas, redondas, pleomórficas, bizarras, às vezes multinucleadas, com núcleos ora hipercromáticos, ora vesiculares, tendo nucléolos proeminentes. Algumas células tumorais em girino evocavam aspectos rabdóides (Figura 9 D e E). Além disso, observaram-se áreas de necrose tumoral coagulativa e mitoses assimétricas (Figura 9 F), com variação quantitativa entre os grupos. Nos animais tratados com 5-FU, a necrose correspondia a cerca de 40 % do crescimento neoplásico e exibia aproximadamente 2 a 3 mitoses por campo de grande aumento (Figura 10 A). Nos animais tratados com a dose de 50 mg/kg e 100 mg/kg, a necrose tumoral ocupava cerca de 20 % do tecido neoplásico, tendo aproximadamente 4 mitoses por campo de grande aumento (Figura 10 B).

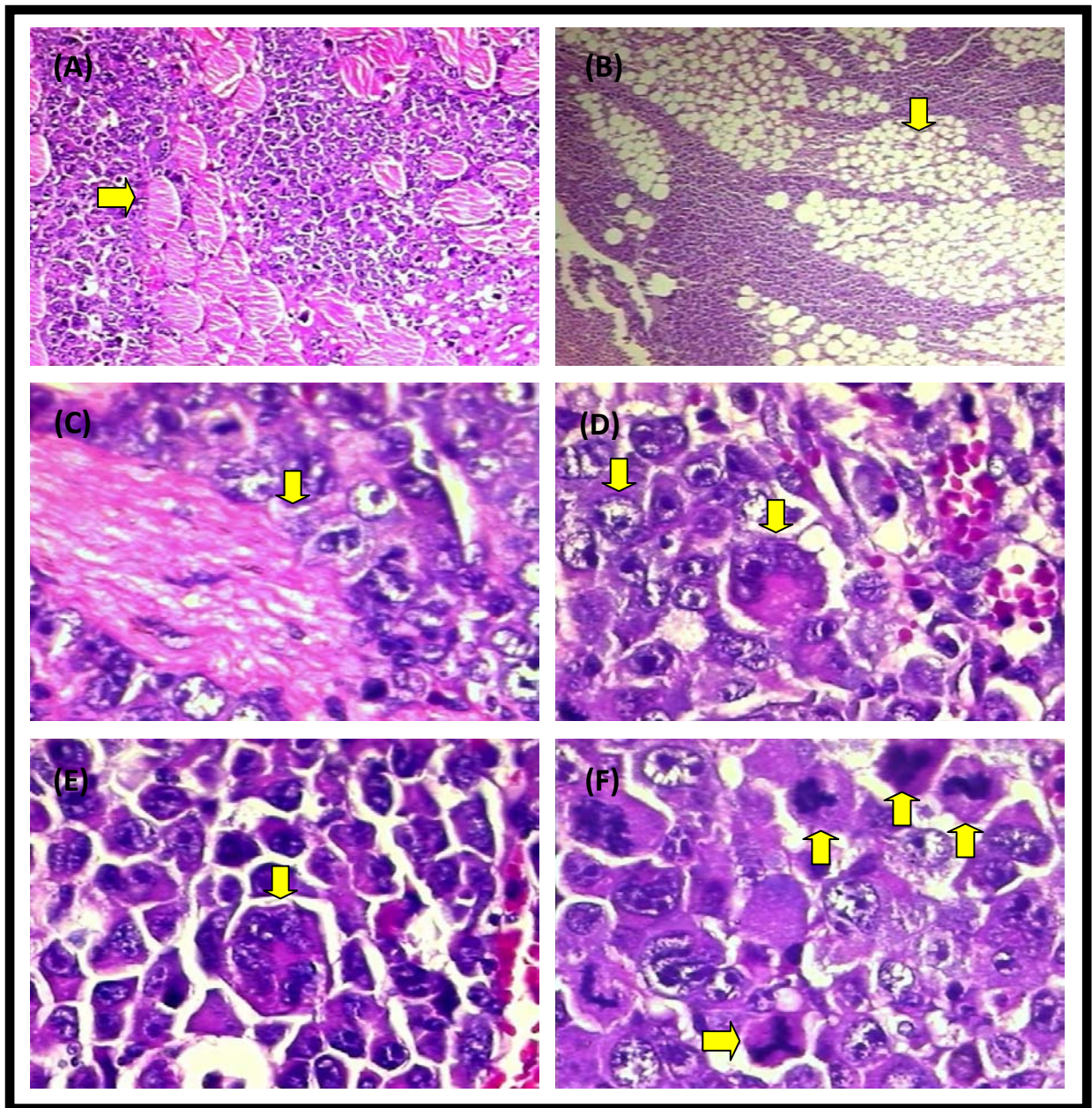


Figura 9 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle transplantado; **(B)** 5-FU (50 mg/kg); **(C)** e **(D)** O.E.L. (50 mg/kg); **(E)** e **(F)** O.E.L. (100 mg/kg). Hematoxilina-eosina (25 x, 100 x e 400 x).

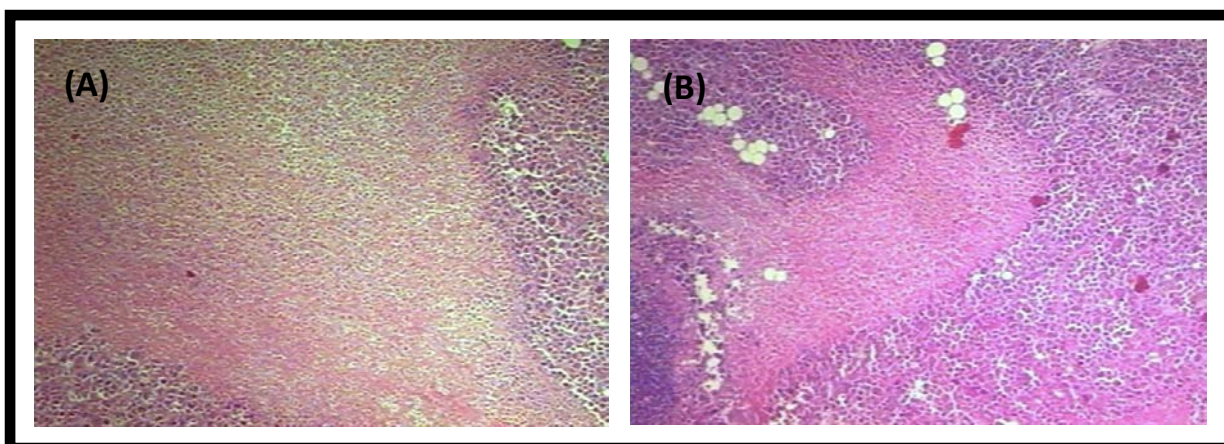


Figura 10 – Histopatologia dos tumores dos diferentes grupos experimentais mostrando os graus de necrose coagulativa: **(A)** 5-FU (50 mg/kg); **(B)** O.E.L. (50 mg/kg). Hematoxilina-eosina (25 x).

5.2.3 Genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do O.E.L. foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado está apresentado na Tabela 5. O tratamento dos animais com diferentes doses do O.E.L. não induziu um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico quando comparados ao grupo controle (5 % Tween 80).

Tabela 5 – Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.L. e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de células	Células micronucleadas
5 % Tween 80	-	6	2000	5,33 ± 0,88
Ciclofosfamida	50	6	2000	39,17 ± 2,74 ^a
O.E.L.	50	6	2000	6,17 ± 0,54
O.E.L.	100	6	2000	5,83 ± 0,60
O.E.L.	150	6	2000	10,00 ± 1,00

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

Discussão



6 DISCUSSÃO

O câncer ocupa um lugar de destaque no contexto das doenças crônico-degenerativas com mais de 12 milhões de casos novos e sete milhões de mortes, por ano, no mundo (FLORIANI; SCHRAMM, 2006).

Os avanços obtidos na compreensão dessa doença, sejam em termos de seu comportamento clínico, sejam quanto à patogênese molecular, traduziram-se em progressos importantes no âmbito do tratamento (ROQUE; FORONES, 2006).

A pesquisa por novas substâncias com atividade antineoplásica tem demonstrado a grande relevância farmacológica dos produtos originados de plantas (MAGALHÃES et al., 2010). Dentro desse contexto, os óleos essenciais e seus constituintes são sempre estudados devido às suas potentes atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais (BEZERRA, 2009).

Para investigar o potencial papel do O.E.L. na terapia anti-câncer o presente trabalho avaliou primeiramente sua atividade citotóxica frente a linhagem murina sarcoma 180 e a linhagem humana K562. Em ambas as linhagens, o O.E.L. apresentou atividade antitumoral *in vitro*, concentração-dependente, sendo mais ativo na linhagem K562 (Gráficos 1 e 2).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa contra o desenvolvimento de tumores, e que vários agentes antineoplásicos agem através da indução desse tipo de morte celular, resultou em uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Dessa forma, com a finalidade de se investigar o mecanismo de citotoxicidade desse produto natural frente células tumorais, decidiu-se avaliar o envolvimento da apoptose (via intrínseca) e do estresse oxidativo no processo de morte dessas células.

Um modo de se avaliar o envolvimento da via intrínseca da apoptose no mecanismo de morte celular induzido por determinada droga em estudo, é por meio da suplementação do meio de cultura com ciclosporina A, um inibidor da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Portanto, uma diminuição da citotoxicidade na presença dessa substância é indicativo do envolvimento da via intrínseca no mecanismo de morte.

Assim, células das linhagens sarcoma 180 e K562 foram tratadas com o O.E.L. na ausência e presença de ciclosporina A para avaliação do seu efeito. Na presença de ciclosporina A não houve redução na citotoxicidade induzida pelo O.E.L. em células K562, fato esse evidenciado pela semelhança entre os valores de CI_{50} obtidos na ausência e presença de ciclosporina A. Entretanto, em células sarcoma 180, o O.E.L. teve seu efeito citotóxico reduzido na presença de ciclosporina A. Esse resultado sugere que há envolvimento da via intrínseca da apoptose em células sarcoma 180, uma vez que, ao adicionarmos o inibidor do MPTP, este bloqueou a abertura dos poros mitocondriais e liberação de proteínas pró-apoptóticas, reduzindo a citotoxicidade do óleo em estudo (Gráficos 1 e 2).

Já a investigação do envolvimento de estresse oxidativo no mecanismo de ação de uma droga pode ser realizada promovendo-se a suplementação do meio de cultura das células tumorais com um antioxidante de escolha, como N-acetilcisteína e glutatona. Uma diminuição da morte celular na presença de antioxidantes permite dizer que o mecanismo de citotoxicidade está, pelo menos em parte, associada à geração de EROs.

Quando células da linhagem K562 foram tratadas com o O.E.L. na presença de NAC, houve uma redução na citotoxicidade do óleo, evidenciada pelo maior valor de CI_{50} , quando comparada com o mesmo valor obtido na ausência do antioxidante. Portanto, pode-se dizer que o mecanismo de citotoxicidade do O.E.L. frente células da linhagem K562 está, pelo menos parcialmente, relacionado à geração de EROs (Gráfico 1).

A NAC é um composto tiólico amplamente utilizado na clínica médica. É um mucolítico que teve suas primeiras aplicações no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. A NAC também é usada no tratamento de intoxicação aguda e no tratamento da síndrome da angústia respiratória no adulto (SARNSTRAND et al., 1995). Sua ampla utilização é justificada pelo fato de que NAC possui propriedades antioxidantes. Essa atividade é dada principalmente por dois mecanismos: *i*) redução direta de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e O_2^- (ânion superóxido) a espécies menos reativas formando radicais sulfúricos ou cisteína; *ii*) promoção da biossíntese de GSH que funciona como sequestrador de radicais livres ou como substrato no ciclo redox da glutatona (COTGREAVE, 1997).

Dessa forma, os resultados sugerem que NAC está neutralizando diretamente EROs, envolvidas no processo de indução de morte celular ocasionada pelo O.E.L., uma vez que, não houve nenhuma alteração no seu efeito citotóxico na presença de GSH. Esses dados corroboram com Sprong et al. (1998) que mostraram que NAC oferece proteção contra endotoxemia mediada pela administração de lipopolissacarídeos (LPS), observando diminuição de H₂O₂, e isso estaria diretamente relacionado à sua capacidade de reduzir EROs, mais do que a sua função de promover a biossíntese da GSH.

Adicionalmente, não se observou redução do efeito citotóxico sobre células da linhagem sarcoma 180 após suplementação com NAC ou GSH, sugerindo que não há envolvimento de EROs no mecanismo de citotoxicidade induzido pelo O.E.L. nessa linhagem de células murinas (Gráfico 2). Outros testes de avaliação da participação do estresse oxidativo nesse processo devem ser realizados para confirmar esse resultado preliminar.

Efeitos citotóxicos de diferentes compostos podem estar relacionados com danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY; MARSETZ; IDEL, 2003). Adicionalmente 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 (SILVA, 2007).

Dessa forma, a fim de avaliar a citotoxicidade do O.E.L. em células não tumorais foi realizado o ensaio de citotoxicidade com eritrócitos de camundongos Swiss. O resultado obtido sugere que o O.E.L. apresenta baixa toxicidade frente eritrócitos, células estas comumente afetadas nos tratamentos com agentes antineoplásicos (Gráfico 3).

Uma vez evidenciada a atividade antitumoral *in vitro* do O.E.L. partiu-se para a investigação da sua atividade antitumoral *in vivo*.

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

depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoxiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA (NOORDHUIS et al., 2004).

O O.E.L. apresentou uma atividade inibitória do crescimento tumoral em ambas as doses testadas, de maneira dose-dependente, evidenciando, portanto, uma atividade antitumoral *in vivo* significativa para o produto natural estudado (Gráfico 4).

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, procedeu-se também a investigação de possíveis efeitos tóxicos do O.E.L.

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

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

No que diz respeito ao consumo de água e ração, os animais tratados com a dose de 100 mg/kg do O.E.L. apresentaram uma diminuição significativa em ambos os parâmetros analisados, demonstrando uma toxicidade do O.E.L., quando administrado nesta dose, sobre o sistema gastrointestinal. Uma possível atividade do O.E.L. em nível de sistema nervoso central também deve ser levada em consideração (Tabela 1).

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

Não coincidentemente, os mesmos grupos que apresentaram uma redução significativa no consumo de alimentos, também apresentaram uma redução significativa no peso dos animais quando comparados ao controle transplantado, corroborando a correlação entre toxicidade gastrointestinal *versus* anorexia *versus* perda de peso (Tabela 1).

Os rins estão envolvidos em muitas funções corporais críticas. Eles regulam as condições do fluido eletrolítico e o equilíbrio ácido-base, possuem função endócrina e são essenciais para a eliminação dos produtos de degradação. A alteração da função renal é uma das consequências mais comuns de toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos (HENRY, 2008). Vários antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica desencadeiam algum tipo de toxicidade renal, como exemplos temos o metotrexato, docetaxel, cisplatina, dentre outros (BEZERRA, 2008; KOROLKOVAS, 2010).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de uréia e creatinina.

A uréia é um produto de degradação do metabolismo dos aminoácidos, constitui a forma como o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, e sua eliminação se dá principalmente através dos rins (PEREIRA, 1998).

A creatinina é um produto da degradação da creatina muscular. Essa substância não é utilizada pelo organismo, é totalmente inativa, sendo também excretada pelos rins (PEREIRA, 1998).

Quando ocorre falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, particularmente substâncias nitrogenadas como a uréia e a creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos.

O tratamento com o O.E.L. não resultou em alterações significativas nos níveis de uréia e creatinina dos animais tratados, não evidenciando portanto, toxicidade renal por parte do óleo em estudo (Tabela 2).

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos. Está envolvido com a síntese de proteínas plasmáticas, lipídios e lipoproteínas, mas também tem função na reserva de energia, síntese de vários hormônios e, principalmente, é o órgão onde ocorre o metabolismo das drogas lipossolúveis, bem como de outros compostos potencialmente tóxicos (HENRY, 2008). Dessa forma, assim como os rins, o fígado é um órgão susceptível aos efeitos dos antineoplásicos.

Inúmeras enzimas são clinicamente úteis para o reconhecimento e monitoramento de determinados processos patológicos, e a atividade de duas enzimas em especial são de extrema importância para avaliação da função hepática, a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT). Os hepatócitos contêm concentrações elevadas dessas enzimas. Em casos de lesão hepática, as mesmas extravasam para o plasma permitindo o diagnóstico e monitoramento da lesão (HENRY, 2008).

No entanto, apesar da AST ser encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias das células hepáticas, ela também é encontrada no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. Quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. Já a ALT é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma dos hepatócitos, o que torna o seu aumento mais específico de lesão hepática (JORGE, 2006).

A administração do O.E.L. aos animais resultou em um aumento significativo da atividade das transaminases (AST e ALT com a dose de 100 mg/kg e AST com a dose de 50 mg/kg) em ambos os grupos tratados, sugerindo a ocorrência de uma toxicidade hepática, induzida pelo composto, com a maior dose utilizada, evidenciada pelo aumento da AST, mas principalmente pelo aumento da ALT, e uma toxicidade provavelmente hepática quando da utilização da menor dose, evidenciada pelo aumento da AST, mas que não pode ser confirmada pois não foi observado aumento da ALT conjuntamente (Tabela 2).

Também se observa um aumento de AST em todos os animais transplantados, independente do tratamento, quando comparado ao grupo controle sadio. Este aumento pode estar relacionado a danos provocados pelo tumor sobre um ou mais tecidos onde a AST pode ser encontrada, como por exemplo, o músculo esquelético e o fígado. O músculo esquelético devido principalmente ao trauma mecânico ocasionado pelo crescimento tumoral infiltrativo na região subaxilar, e o fígado, por este ser um órgão complexo envolvido com inúmeras funções, dentre elas a participação no sistema retículo-endotelial, se constituindo na localização primária para a remoção de complexos antígeno-anticorpo da circulação, o que justifica também o aumento de ALT (Tabela 2).

A supressão hematopoiética é uma das consequências mais comuns da quimioterapia antineoplásica, e é um dos mais incapacitantes efeitos colaterais no tratamento do câncer (MAGALHÃES, 2010).

Diferentemente da maioria dos agentes antineoplásicos, o O.E.L. não provocou grandes alterações nos parâmetros hematológicos dos animais tratados. Observou-se apenas um aumento significativo no valor de CHCM. Este fato pode estar relacionado ao processo tumoral por si mesmo (hipótese corroborada pela ocorrência de valores aumentados de CHCM no grupo controle transplantado quando comparados ao grupo controle sadio) ou relacionada ao tratamento com O.E.L. A causa primária para o aumento dos valores de CHCM em todos os animais com tumor necessita de maiores investigações (Tabela 3).

Uma diminuição significativa na porcentagem de monócitos também foi observada no grupo tratado com a dose de 50 mg/kg e no grupo tratado com o 5-FU, quando comparado com o grupo controle transplantado, no entanto, o grupo controle transplantado apresentou um aumento significativo da porcentagem de monócitos quando comparado ao grupo controle sadio, não havendo diferença significativa deste último para os grupos tratados. Ou seja, a redução na porcentagem monócitos nos grupos tratados em relação ao controle transplantado só foi evidenciada devido ao significativo aumento desse parâmetro nesses camundongos transplantados, o que pode ser justificado pela simples inoculação do tumor que induz danos e inflamação local, o que estimula o aumento no número de monócitos uma vez que a fagocitose é requerida. Em contrapartida nos animais tratados com O.E.L. em ambas as doses não houve alteração significativa no número de monócitos em relação ao controle sadio. Isso significa que a forte influência do tumor em induzir aumento nesse parâmetro, por diversos mecanismos, foi compensada pelo tratamento com o O.E.L. mostrando que esse óleo, mesmo na presença do tumor, não interfere nesse parâmetro e não envolve a participação efetiva desse tipo celular (Tabela 3).

Adicionalmente deve-se observar que todos os grupos transplantados, independente do tratamento, quando comparados ao grupo controle sadio apresentaram aumento da porcentagem de neutrófilos, alteração característica de casos de necrose tecidual e presença de tumores (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). 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, efeito colateral já conhecido deste antineoplásico (PITA, 2009) (Tabela 3).

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

Os resultados obtidos mostram que o índice de baço aumentou significativamente em animais inoculados com sarcoma 180, quando comparados com animais não transplantados sadios, dados estes que corroboram com Lins et al. (2009). O tratamento com a dose de 100 mg/kg do O.E.L. provocou uma redução significativa no índice do baço, quando comparado ao grupo controle transplantado, indicando um efeito imunossupressor nessas condições. Apesar desse efeito, pode-se observar que o 5-FU, droga de uso corrente na clínica médica, apresentou um efeito imunossupressor mais potente do que o O.E.L., com diminuição dos índices de baço e timo quando comparados com o grupo controle transplantado e ao controle sadio. Além disso, apresentou ainda uma redução no índice de fígado, evidenciando um efeito hepatotóxico desse fármaco, o que corrobora com dados da literatura que mostram que hepatócitos, expostos a altas concentrações do 5-FU após administração intraperitoneal, apresentam redução de aproximadamente 5 % do peso do órgão devido à ativação de processos apoptóticos (EICHHORST et al., 2001) (Tabela 4).

A análise histopatológica não evidenciou alterações significativas nos rins dos animais tratados com O.E.L. (Figura 7) demonstrando uma baixa toxicidade do composto sobre esse órgão e corroborando com os resultados dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, nos quais não houve alteração nos níveis de uréia e creatinina (Tabela 2) dos grupos tratados com o O.E.L. quando comparados ao grupo controle transplantado.

A análise histopatológica do fígado dos animais tratados com o O.E.L., assim como com o 5-FU, demonstrou um efeito tóxico desses compostos sobre esse órgão (Figura 8), o que, em relação ao O.E.L., corrobora com os resultados obtidos nas análises bioquímicas de determinação de AST e ALT (Tabela 2). 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; VASCONCELLOS et al. 2007). Adicionalmente pode-se dizer que o fígado é um órgão com alta capacidade regenerativa e adaptativa e até mesmo quando áreas de necrose por coagulação do parênquima, como as observadas no fígado dos animais tratados com o O.E.L., estão presentes, mas o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é completa (KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

A histopatologia do sarcoma 180 demonstrou seu comportamento agressivo local, com invasão de tecido adiposo, músculo esquelético e feixes neurais, mas a incapacidade de formar metástases corroborando com relatos da literatura (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982) (Figura 9). As áreas de necrose com maior tamanho e menores números de células em mitose por campo sugerem um efeito citotóxico do 5-FU sobre essas células mais potente quando comparado com o tratamento com o O.E.L., porém os valores são próximos (Figura 10).

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, a terapia anticâncer pode 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.L. por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico. Este ensaio é útil para a investigação de compostos com atividade clastogênica (indução de quebra cromossômica) ou aneugênica (indução de perda de cromossomos inteiros).

O tratamento com o O.E.L. não provocou um aumento significativo na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico dos animais tratados, sugerindo que o mesmo não possui efeito genotóxico (clastogênico e/ou aneugênico) *in vivo*, característica importante para sua aplicabilidade na terapêutica (Tabela 5).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados com o óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* é possível concluir que:

- O O.E.L. apresentou atividade antitumoral *in vitro* frente células da linhagem sarcoma 180 e K562, sendo mais potente nessa última linhagem;
- No mecanismo de citotoxicidade do O.E.L. há envolvimento, pelo menos parcial, da produção de EROs na linhagem K562, e da via intrínseca da apoptose na linhagem sarcoma 180;
- O O.E.L. não apresentou toxicidade frente eritrócitos de camundongos Swiss até a dose de 250 µg/mL;
- O O.E.L. apresentou significativa atividade antitumoral *in vivo* de maneira dose-dependente;
- O O.E.L. apresentou moderada toxicidade *in vivo*, nas doses utilizadas, toxicidade esta menor do que a comumente observada para antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica;
- O O.E.L. não apresentou atividade imunoestimulante como parte de seu mecanismo de ação, mas, contrariamente, exerceu efeito imunossupressor quando administrado na maior dose, o qual, por sua vez, foi menos pronunciado que o efeito produzido pelo 5-FU ;
- O O.E.L. não apresentou genotoxicidade *in vivo*;
- Portanto é possível inferir que o O.E.L. possui significativa atividade antitumoral e moderada toxicidade nos modelos experimentais avaliados, o

que não representa um fator limitante para sua possível aplicabilidade na terapêutica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative Constituents in Plants 9.1) Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 7, p. 920-922, 2002.
- ABENA, A. A.; NGONDZO-KOMBETI, G. R.; BIOKA, D. Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. **Encephale**, v. 24, n. 5, p. 449-454, 1998.
- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWE, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: The response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mutation Research**, v. 423, n. 1-2, 113-124, 1999.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.
- ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **International journal of toxicology**, v. 25, p. 29-127, 2006.
- ANDRADE-JUNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-8, 2005.
- 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, n. 5, 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.

ASANAMI, S., SHIMONO, K., SAWAMOTO, O., KURISU, K., AND UEJIMA, M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 347, n. 2, p. 73-78, 1995.

ASHOUR, M. L.; EL-READI, M.; YOUNS, M.; MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; EFFERTH, T.; WINK, M. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1079-1087, 2010.

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.

BERMUDEZ, J. A. Z. Indústria farmacêutica, estado e sociedade. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, São Paulo: Hucitec, 1995. p. 15.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-63, 2008.

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

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. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.

CALIXTO, J. B. Pró-Inovação na Indústria Brasileira. Brasil é ainda dependente da importação de medicamentos. Disponível em:
<http://www.protec.org.br/farmacos_detalle.php?termobusca=enitec&id=9069>.
Acesso em: 1 abr. 2011. 7:45:53

CAMPOS, J. M. S.; SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; PINHEIRO, L. C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L. F. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 291, n. 1-2, p. 133-140, 2010.

CAO, D. X.; QIAO, B.; GE, Z. Q.; YUAN, Y. J. Comparison of burst of reactive oxygen species and activation of caspase-3 in apoptosis of K562 and HL-60 cells induced by docetaxel. **Cancer Letters**, v. 214, n. 1, p. 103-113, 2004.

CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; FURTADO, G. V.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; CAMARA, C. A.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A.; RAO, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopiia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 701, n. 2, p. 153-163, 2010.

CHANDRA, J.; HACKBARTH, J.; LE, S.; LOEGERING, D.; BONE, N.; BRUZEK, L. M.; NARAYANAN, V. L.; ADJEI, A. A.; KAY, N. E.; TEFFERI, A.; KARP, J. E.; SAUSVILLE, E. A.; KAUFMANN, S. H. Involvement of reactive oxygen species in adaphostin-induced cytotoxicity in human leukemia cells. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4512-4519, 2003.

COFFING, S.; ENGEL, M.; DICKINSON, D.; THIFFEAULT, C.; SPELLMAN, R.; SHUTSKY, T.; SCHULER, M. The rat gut micronucleus assay: a good choice for alternative in vivo genetic toxicology testing strategies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 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.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001.

COSTA, S. M. O.; SANTOS, H. S.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. Constituents of the essential oil of *Lippia microphylla* Cham. from Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 4, p. 378-379, 2005.

COTGREAVE, I. A. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 205-27, 1997.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DASH, P. **Apoptosis**. 2010. Disponível em:
<<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/index.htm>>. Acesso em:
20 dez. 2010. 15:30:40.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R.; DE QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of brazilian caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.

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

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.

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

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. da UNESP, 1996.

DUH, P.D.; DU, P. C.; YEN, G. C. Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 11, p. 1055-1061, 1999.

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

EFFERTH, T. Cancer therapy with natural products and medicinal plants. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1035-1036, 2010.

EICHHORST, S. T.; MÜERKÖSTER, S.; WEIGAND, M. A.; KRAMMER, P. H. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95 (APO-1/Fas) system. **Cancer Research**, v. 61, n. 1, p. 243-8, 2001.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLORIANI, C. A.; SCHRAMM, F. R. Cuidador do idoso com câncer avançado: um ator *vulnerado*. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 527-534, 2006

GARCIA et al. **Fitoterápicos**. In: SIMÕES, et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre: Universidade/UFRS, 2002.

GONZAGA, M. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; SOARES, S. A.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicine**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009.

GONZÁLEZ-GUËRECA, M. C.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside, from *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone', **Natural Product Research**, v. 24, n. 16, 1528-1536, 2010.

GORMAN, A.; MCGOWAN, A.; COTTER, T. G. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. **FEBS Letters**, v. 404, n. 1, p. 27-33, 1997.

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

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.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3867, 1991.

HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A. O.; SUFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research**, v. 278, n. 2-3, p. 209-213, 1992.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I.-D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

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

HENRY, J. B. **Diagnóstico clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Barueri: Manole, 2008.

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

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

HORVATHOVA, E.; SRAMKOVA, M.; LABAJ, J.; SLAMENOVA, D. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on

human cells cultured *in vitro*. **Neuro endocrinology letters**, v. 27, n. 2, p. 44-7, 2006.

HORVATHOVA, E.; TURCANIOVA, V.; SLAMENOVA, D. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. **Neoplasma**, v. 54, n. 6, p. 478-83, 2007.

HUANG, G. D.; YANG, Y. J.; WU, W. S.; ZHU, Y. Terpenoids from the aerial parts of *Parasenecio deltophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1954-7, 2010.

HYNES, G. M.; TOROUS, D. K.; TOMETSKO, C. R.; BURLINGSON, B.; GATEHOUSE, D. G. The single laser flow cytometric micronucleus test: A time course study using colchicines and urethane in rat and mouse peripheral blood and acetaldehyde in rat peripheral blood. **Mutagenesis**, v. 17, n. 1, p. 15-23, 2002.

JOHN, L. **Planta chinesa é alternativa contra malária**. Araraquara: Tribuna Imprensa, 2000.

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

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer, Sunderland, 2007.

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

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

KANNAN, K.; KAMINSKI, N.; REHAVI, G.; JAKOB-HIRSCH, J.; AMARIGLIO, N.; GIVOL, D. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: Activation of Apaf-1. **Oncogene**, v. 20, p. 3449–3455, 2001.

KAUR, S.; MICHAEL, H.; ARORA, S.; HÄRKÖNEN, P. L.; KUMAR, S. The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n.1, p. 15-20, 2005.

KIM, H. K.; WILSON, E. G.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics: A tool for anticancer lead-finding from natural products. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1094-1102, 2010.

KONDOH, M.; SUZUKI, I.; SATO, M.; NAGASHIMA, F.; SIMIZU, S.; HARADA, M.; FUJII, M.; OSADA, H.; ASAKAWA, Y.; WATANABE, Y. Kaurene diterpene induces apoptosis in human leukemia cells partly through a caspase-8-dependent pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 1, 2004.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

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

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v. 73, n. 1, p. 85-90, 1982.

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, n. 1, p. 20-6, 2009.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. **Anticancer Research**, v. 27, n. 5, p. 3293-3299, 2007.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 6, p. 1002-1012, 2008.

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

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, n. 2, p. 115-28, 2003.

MACGREGOR, J. T.; TUCKER, J. D.; EASTMOND, D. A.; WYROBEK, A. J. Integration of cytogenetic assays with toxicology studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 328-337, 1995.

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.

MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; CAVALCANTI, B. C. et al. **In vitro and in vivo antitumor effects of (4-methoxyphenyl) (3,4,5-trimethoxyphenyl) methanone**. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e0p67234915r3g67/>>. Acesso em: 2 fev. 2011, 17:36:20.

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

MALAGUARNERA, L. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 23, n. 3-4, p. 367-387, 2004.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1-15, 2002.

MASTELIC, J.; JERKOVIC, I.; BLAZEVIC, I. et al. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3989-96, 2008.

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, n. 1-2, p. 143-151, 2003.

MESA-ARANGO, A. C. MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

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

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, 1999.

MOHAMMADI, M.; YAZDANPARAST, R. Methoxy VO-salen complex: *In vitro* antioxidant activity, cytotoxicity evaluation and protective effect on CCl₄-induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 716-721, 2009.

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.

MUHAMMAD, H.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; POÇA, K. S.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; AFZAN, A.; SULAIMAN, S. A.; ISMAIL, Z.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 647-653, 2011.

MONTEIRO, M. V. B.; DE MELO LEITE, A. K. R.; BERTINI, L. M.; DE MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NORDBERG, J.; AMER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

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 Onc.**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

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

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139-149, 2010.

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

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

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-22, 2007.

PANIS, C. et al., Marcadores Laboratoriais de Toxicidade na Quimioterapia do Câncer com Paclitaxel e Doxorubicina. Disponível em: <<http://www.inesul.edu.br/revista/index.php?vol=5>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

PASCUAL, M.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

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

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

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

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

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

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.

RICHMOND, J. D.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; HABER, W. A.; MORIARITY, 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 Communication**, v. 4, n. 2, p. 271-274, 2009.

ROMAGNA, F.; STANIFORTH, C. D. The automated bone marrow micronucleus test. **Mutatation Research**, v. 213, p. 91-104, 1989.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, M. N. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43, n. 2, p. 94-101, 2006.

SANTOS, H. S.; COSTA, S. M.; PESSOA, O. D.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; FORTIER, S.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L. Cytotoxic naphthoquinones from roots of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 7-8, p. 517-20, 2003.

SANTOS, J. S. et al. Verbenaceae sensu strict na região de Xingó. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SARNSTRAND, B.; TUNEK, A.; SJODIN, K.; HALLBERG, A. Effects of N-acetylcysteine stereoisomers on oxygen-induced lung injury in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 94, n. 2, p. 157-64, 1995.

SCHREIER, H.; GAGNÉ, L.; BOCK, T.; ERDOS, G. W.; DRUZGALA, P.; CONARY, J. T.; MÜLLER, B. W. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 72, n. 4, p. 215-23, 1997.

SENA-FILHO, J. G.; MELO, J. G. S.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, A. M.; PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 506-509, 2006.

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

SILVA, A. C.; 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, n. 7, p. 167-179, 2010.

SILVA, E. C. C.; CAVALCANTI, B. C.; AMORIM, R. C. N. et al. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 48-55, 2009.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SILVA, M. V. B. **Avaliação da citotoxicidade e indução de diferenciação e apoptose por diterpenos de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul (Annonaceae)**. 2007. 140 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

SILVA, P. S.; VICCINI, L. F.; SINGULANI, J. L.; DE SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of

Lippia and Lantana species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, 2010.

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

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; DE SOUSA, C. P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SPRONG, R. C.; WINKELHUYZEN-JANSSEN, A. M.; AARSMAN, C. J. et al. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increase mortality. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, p. 1283-93, 1998.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAUB, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, 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 câncer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TANEL, A.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 798-810, 2007.

TOROUS, D. K.; HALL, N. E.; DERTINGER, S. D.; DIEHL, M.; ILLI-LOVE, A. H.; CEDERBRANT, K.; SANDELIN, K.; BOLCSFOLDI, G.; FERGUSON, L. R.; PEARSON, A.; et al. Flow cytometric enumeration of micronucleated reticulocytes: High transferability among 14 laboratories. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 1, p. 59-68, 2001.

TOROUS, D. K.; HALL, N. E.; MURANTE, F. G.; GLEASON, S. E.; TOMETSKO, C. R.; DERTINGER, S. D. Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 2, p. 309-314, 2003.

TORTI, V. R.; COBB, A. J.; EVERITT, J. I.; MARSHALL, M. W.; BOORMAN, G. A.; BUTTERWORTH, B. E. Nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by inhaled

bromodichloromethane in wild-type and p53-heterozygous mice. **Toxicology Sciences**, v. 64, n. 2, p. 269-80, 2001.

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

VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; BASTIDE, J. M.; BESSIERES, J. M. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1439-1442, 1995.

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

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M. et al. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1416-21, 2007.

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.

VIEIRA, P. M.; COSTA, P. M.; RIBEIRO E SILVA, C.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the Genotoxic, Antigenotoxic, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic Fruit Extract of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. (Solanaceae) by Micronucleus Test in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 6, p. 1409-1414.

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. M.; SANTOS, S. C.; 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.

WAKATA, A.; MIYAMAE, Y.; SATO, S.; SUZUKI, T.; MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; KONDO, K.; HAYASHI, M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by SGM/T/JEMS.MMS. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 84-100, 1998.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1-3, p. 239-254, 1996.

WHO. **Câncer**. 2010. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 12 dez. 2010. 20:12:20.

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