

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAYHANA PRISCILA MEDEIROS SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE EXTRATOS BRUTO E
FRACIONADOS OBTIDOS DE FOLHAS DE *BOWDICHIA VIRGILIOIDES***

MACEIÓ
2015

TAYHANA PRISCILA MEDEIROS SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE EXTRATOS BRUTO E
FRACIONADOS OBTIDOS DE FOLHAS DE *BOWDICHIA VIRGILIOIDES***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva

Co-orientador: Professor Dr. Renato Santos Rodarte

MACEIÓ
2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S729s Souza, Tayhana Priscila Medeiros.
Avaliação *in vitro* do potencial anticâncer de extratos bruto e fracionados obtidos de folhas de *Bowdichia virgilioides* / Tayhana Priscila Medeiros Souza. – 2015.
85f. ; il.

Orientador: Luiz Antônio Ferreira da Silva.
Coorientador: Renato Santos Rodarte.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 74-85.

1. *Bowdichia virgilioides*. 2. Produtos naturais. 3. Plantas medicinais.
4. Agentes antineoplásicos. I. Título.

CDU: 57.085:615.28



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, 5/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Tayhana Priscila Medeiros Souza, intitulada: “Avaliação *in vitro* do potencial anticâncer de extratos bruto e fracionados obtidos de folhas de *Bowdichia virgilioides*”, orientada pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva e coorientada pelo Prof. Dr. Renato Santos Rodarte, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 24 de agosto de 2015.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva – (ICBS/UFAL)



Profª. Drª. Salete Smaniotto - (ICBS/UFAL)



Prof. Dr. Jéssu Costa Ferreira Júnior – (IFAL)

Dedico este trabalho aos meus pais **Rita de Cássia Medeiros Santos** e **Ednaldo de Souza Silva** por todo amor, carinho, dedicação e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e ao meu avô **José Pereira dos Santos** (*in memoriam*) que foi meu segundo pai, sempre me acolheu e foi um exemplo para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo. Por todas as bênçãos concedidas, por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida, por ter tido a oportunidade de estudar, por ter me consolado nos momentos difíceis, ter iluminado meu caminho e guiado meus passos;

Aos meus pais por todo o amor e compreensão. Sem eles eu nada seria. Quero agradecê-los por todo o esforço, pela educação e por serem para mim uma base sólida;

Ao meu namorado Jorge Lucas pelo amor, pelo companheirismo, pelos conselhos, por ter acreditado muito em mim e, principalmente, pela paciência e compreensão;

Aos meus amigos Thiago, Neto, Manu, Camila, Daniel e Anne que, de certa forma, sempre se fizeram presentes na minha vida e tornaram essa jornada mais fácil;

Agradeço aos meus orientadores Prof^o Dr^o Luiz Antônio Ferreira da Silva e Prof^o Dr^o Renato Santos Rodarte pela oportunidade e pela confiança;

Aos meus companheiros de laboratório Simone, Bruna, Myka, Helô, Thalita, João, Bruno e Midian por terem tornado o dia a dia de trabalho mais leve e proveitoso, por toda ajuda dada, principalmente nos momentos finais e por terem dividido comigo momentos e experimentos;

Ao corpo docente do curso de Farmácia e do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, que contribuíram para a minha formação;

Ao CNPq, a Fapeal e a UFAL, pelo apoio financeiro e suporte científico importantes no desenvolvimento dos trabalhos do LBCM, assim como para produção dessa dissertação.

RESUMO

A resistência a quimioterápicos tem sido um problema na terapêutica contra o câncer. Nesse contexto, a busca por compostos ativos derivados de produtos naturais vem aumentando. Atividade analgésica, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras, despertam interesse em espécies que compõem a família Fabaceae. A espécie *Bowdichia virgilioides* é utilizada popularmente para o tratamento de diversas doenças, mas existem poucos relatos científicos comprovando suas propriedades farmacológicas, como antimalárica (DEHARO et al., 2001), hipoglicemiante (SOUZA et al., 2009), anti-inflamatória e antinociceptiva (BARROS et al., 2010). O objetivo desse trabalho foi investigar *in vitro* o potencial anticâncer do extrato aquoso bruto obtidos das folhas de *B. virgilioides* e de suas frações em linhagens tumorais e em cultura primária, com uma análise qualitativa dos metabólitos secundários presentes nos extratos testados. Foram utilizadas as linhagens celulares humanas de adenocarcinoma pulmonar (A549), melanoma (MDA-MB-435S) e leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM) e cultura primária de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). Foram realizadas avaliações da viabilidade celular com todos os extratos obtidos, seguido de avaliação dos potenciais genotóxico, apoptótico e antioxidante da fração clorofórmica (BvF C), bem como sua ação sobre o ciclo celular da linhagem tumoral CCRF-CEM. As análises estatísticas foram feitas pelo método *One-Way ANOVA*, seguido pelo pós-teste Newman-Kewls e, nos resultados de ciclo celular, pelo teste de variância *Two-Way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, ambos com nível de significância selecionado para $p < 0,05$. O extrato bruto diminuiu significativamente a viabilidade da linhagem A549 nas concentrações de 1,8 a 30 $\mu\text{g/mL}$ em relação a cultura não tratada. A fração BvF C foi capaz de diminuir a viabilidade celular de todas as linhagens tumorais testadas e não mostrou nenhum efeito em células de cultura primária, sugerindo uma ação seletiva; aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio e induziu parada do ciclo celular em G1, sem causar danos genômicos e apoptose. Os resultados mostraram que o BvF C é um potente inibidor proliferativo de células de leucemia linfoblástica T, sem afetar a viabilidade de PBMC normais, podendo se tornar um alvo interessante como um possível agente anticâncer.

Palavras-chave: *Bowdichia virgilioides*. Produtos Naturais. Metabólitos Secundários. Anticâncer. Extrato Aquoso Bruto.

ABSTRACT

Resistance to chemotherapy has been a problem in the treatment against cancer. In this context, the search for active compounds derived from natural products is increasing. Analgesic activity, anti-inflammatory, antitumor, among others, arouse interest in species that make up the Fabaceae family. The *Bowdichia virgilioides* species is commonly used for the treatment of various diseases, but there are few scientific reports demonstrating its pharmacological properties, such as antimalarial (DEHARO et al., 2001), hypoglycemic (SOUZA et al., 2009), anti-inflammatory and antinociceptive (BARROS et al., 2010). The aim of this study was to investigate in vitro anticancer potential of crude aqueous extract obtained from the leaves of *B. virgilioides* and its fractions in tumor cell lines and in primary culture, with a qualitative analysis of secondary metabolites present in the extracts. Human lung adenocarcinoma cell lines were used (A549), melanoma (MDA-MB-435S) and T lymphoblastoid leukemia (CCRF-CEM) and primary culture of mononuclear cells of human peripheral blood (PBMC). Evaluations were carried out in cell viability with all the extracts obtained, followed by assessment of potential genotoxic, apoptotic and antioxidant chloroform fraction (BVF C) as well as its effect on the cell cycle of tumor cell line CCRF-CEM. Statistical analyzes were made by one-way ANOVA, followed by Newman-Kewls post-test and the results of the cell cycle, by the Two-Way ANOVA test followed by the post-test Bonferroni, both with significance level selected to $p < 0.05$. The crude extract significantly decreased the viability of the A549 strain in concentrations of 1.8 to 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$ compared to untreated culture. The BVF fraction C was able to reduce cell viability of all tested tumor cell lines and showed no effect on primary cultured cells, suggesting a selective action; increased levels of reactive oxygen species and induced cell cycle arrest in G1, without causing genomic damage and apoptosis. The results showed that the BVF C is a potent inhibitor of proliferative T lymphoblastoid leukemia cells without affecting the viability of normal PBMC can therefore become an attractive target as a potential anticancer agent.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*. Natural Products. Secondary Metabolites. Anticancer. Crude Aqueous Extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diferença entre os tipos de tumores.....	16
Figura 2 -	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.....	18
Figura 3 -	Atividade dos agentes antineoplásicos em relação a fase do ciclo celular.....	24
Figura 4 -	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	30
Figura 5 -	Biossíntese dos compostos fenólicos.....	31
Figura 6 -	Fotografia da planta: <i>Bowdichia virgilioides</i> KUNT.....	33
Figura 7 -	Histograma do ciclo celular.....	40
Figura 8 -	Célula com micronúcleo.....	41
Figura 9 -	Classificação visual sugerida por Collins et al., (2008).....	43
Figura 10 -	Célula normal e célula em apoptose (aumento de 400x).....	44
Figura 11 -	Efeito do extrato bruto e fracionados de <i>Bowdichia virgilioides</i> na viabilidade celular da linhagem A549.....	49
Figura 12 -	Efeito do extrato bruto e fracionados de <i>Bowdichia virgilioides</i> na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-435S.....	50
Figura 13 -	Efeito do extrato bruto e fracionados de <i>Bowdichia virgilioides</i> na viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM.....	51
Figura 14 -	IC ₅₀ do extrato BvF C.....	52
Figura 15 -	Efeito da fração clorofórmica de <i>Bowdichia virgilioides</i> na viabilidade celular da cultura primária de PBMC.....	53
Figura 16 -	Análise da viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM após tratamento com extrato bruto e frações de <i>Bowdichia virgilioides</i>	54
Figura 17 -	Efeito do extrato clorofórmio de <i>Bowdichia virgilioides</i> na viabilidade celular da cultura primária de PBMC.....	55

Figura 18 -	Efeito do BvF C no ciclo celular da linhagem CCRF-CEM.....	56
Figura 19 -	Efeito do BvF C na taxa de micronúcleos após tratamento de 24h.....	57
Figura 20 -	Efeito do BvF C na taxa de apoptose após 24h de tratamento.....	59
Figura 21 -	Acumulação de ROS intracelular na linhagem CCRF-CEM.....	60
Figura 22 -	Efeito do BvF C na indução de ROS em CCRF-CEM.....	61
Figura 23 -	Representação da acumulação de ROS em CCRF-CEM.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Pesos e rendimentos do extrato aquoso bruto e frações da folha de <i>Bowdichia virgilioides</i>	46
Tabela 2 -	Efeitos do BvF C sobre o DNA da linhagem CCRF-CEM após 24h de tratamento.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais ciclinas e cdk's que regulam o ciclo celular.....	20
Quadro 2 - Ações farmacológicas de <i>Bowdichia virgilioides</i> KUNT descritas na literatura.....	34
Quadro 3 - Metabólitos secundários encontrados nos extratos das folhas de <i>Bowdichia virgilioides</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APO	Apoptose
A549	Linhagem tumoral humana de adenocarcinoma pulmonar
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BvF Ac	Fração acetato da folha de <i>Bowdichia virgilioides</i>
BvF MA	Fração metanol:água da folha de <i>Bowdichia virgilioides</i>
BvF C	Fração clorofórmica da folha de <i>Bowdichia virgilioides</i>
CCRF-CEM	Linhagem tumoral humana de leucemia linfoblástica T
CDK	Proteínas quinases dependentes de ciclinas
CELLS	Células sem tratamento
CIS	Quimioterápico cisplatina
CP	Quimioterápico ciclofosfamida
Colo-205	Linhagem tumoral humana de adenocarcinoma colorretal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DX	Quimioterápico doxorrubicina
EABF	Extrato Aquoso Bruto de Folhas de <i>Bowdichia virgilioides</i>
HCT-116	Linhagem tumoral humana de carcinoma colorretal
Hep-G2	Linhagem tumoral humana de carcinoma hepatocelular
HT-29	Linhagem tumoral humana de adenocarcinoma colorretal
H1299	Linhagem tumoral humana de carcinoma pulmonar
H2170	Linhagem tumoral humana de carcinoma pulmonar
H292	Linhagem tumoral humana de carcinoma pulmonar
IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
INC	Instituto Nacional do Câncer
MCF-7	Linhagem tumoral de câncer de mama
MDA-MB-435S	Linhagem tumoral humana de melanoma

MN	Micronúcleo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVCAR	Linhagem tumoral humana de adenocarcinoma de ovário
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico humano
PBS	Tampão fosfato-salino
q. s. p.	Quantidade suficiente para
SupT1	Linhagem tumoral humana de linfoma linfoblástico T
SUS	Sistema Único de Saúde
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TGFβ	Fator de crescimento β
5-FLU	Quimioterápico 5-fluorouracil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Câncer	16
2.1.1	Definição e Classificação.....	16
2.1.2	Incidência do Câncer no Brasil.....	17
2.1.3	Alterações Celulares e Moleculares na Carcinogênese.....	19
2.1.3.1	Ciclo celular e apoptose.....	19
2.1.4	Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	22
2.1.5	Principais Formas de Tratamento do Câncer.....	23
2.1.6	Fármacos Antineoplásicos.....	23
2.1.6.1	Agentes Alquilantes.....	25
2.1.6.2	Antimetabólitos.....	25
2.1.6.3	Antibióticos Citotóxicos.....	26
2.1.7	Resistência a Quimioterápicos.....	26
2.2	Fitoterapia	27
2.2.1	História.....	27
2.3	Metabólitos Secundários	29
2.4	<i>Bowdichia virgilioides</i> KUNT	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Amostras e extratos	36
4.2	Prospecção fitoquímica	36
4.3	Cultura de células	37
4.4	Ensaio de viabilidade celular	37
4.4.1	Ensaio do MTT.....	37
4.4.2	Ensaio de Exclusão com Azul de Tripán.....	38
4.5	Ciclo celular	39
4.6	Ensaio de genotoxicidade	40
4.6.1	Ensaio de Micronúcleo.....	40

4.6.2	Ensaio do Cometa Alcalino.....	41
4.7	Ensaio de apoptose por difusão em agarose.....	43
4.8	Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	44
4.9	Análises estatísticas.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Obtenção dos extratos obtidos de folhas de <i>Bowdichia virgilioides</i>	46
5.2	Identificação de metabólitos secundários presentes nos extratos bruto e frações de <i>Bowdichia virgilioides</i>	47
5.3	Efeito dos extratos bruto e fracionados sobre a viabilidade celular.....	47
5.4	Efeito sobre o ciclo celular da linhagem CCRF-CEM após tratamento com BvF C.....	55
5.5	Efeitos do BvF C sobre o DNA da linhagem CCRF-CEM...	56
5.6	Efeitos do BvF C sobre a apoptose na linhagem CCRF-CEM.....	58
5.7	Efeito do tratamento com BvF C sobre a produção de EROS por células de leucemia linfoblástica T.....	59
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	72
8	PERSPECTIVAS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa uma enfermidade cada vez mais comum e um sério problema de saúde, principalmente por se tratar de uma doença complexa, necessitando de tratamentos que, geralmente, comprometem a qualidade de vida do paciente (DALKIC et al., 2010). Devido à relativa semelhança entre células tumorais e normais, o grande desafio para o tratamento de cânceres é a distinção entre essas células e, geralmente, esse tratamento consiste em uma combinação de terapias (INCA, 2012).

Dentre as práticas de tratamento antineoplásico, a quimioterapia é a mais utilizada para o tratamento de diversos tumores. A radioterapia e a cirurgia também tem desempenhado papéis importantes no tratamento do câncer, entretanto as taxas de cura ainda são consideradas insatisfatórias (REED, 2009).

A incidência de novos casos de câncer aumenta a cada ano, sendo responsável por cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo (BASKAR et al., 2012). Dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) relatam que, entre os anos de 2003 a 2013, o câncer de pulmão e o câncer de mama foram os mais frequentes e os que mais causaram mortes entre homens e mulheres, respectivamente (MS, 2013).

O câncer ser uma doença quase uniformemente fatal se deve ao fato, principalmente, dos tumores desenvolverem mecanismos de resistência a fármacos quimioterápicos, o que resulta na falha do tratamento e na progressão do câncer (BORST; ELFERINK, 2002; CALEY; JONES, 2012).

Diante deste fato, a busca por moléculas bioativas capazes de inibir a progressão do câncer se faz necessário. A descoberta de novos anticancerígenos de origem vegetal vem incentivando pesquisas na área. Nesse contexto, os produtos naturais vêm ganhando destaque (BRANDÃO et al., 2010). Alguns fármacos muito utilizados na terapia convencional, como o paclitaxel, a vincristina e a vimblastina, foram isolados de plantas e são empregados para o tratamento de diversos tipos de câncer (HAMAYUN, 2007).

Considerando que muitas espécies de plantas não tiveram algum tipo de estudo fitoquímico ou de atividade biológica investigada, acredita-se que muitas

substâncias promissoras a fármacos anticâncer podem ser de origem vegetal (BRANDÃO et al., 2010; SHAH et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

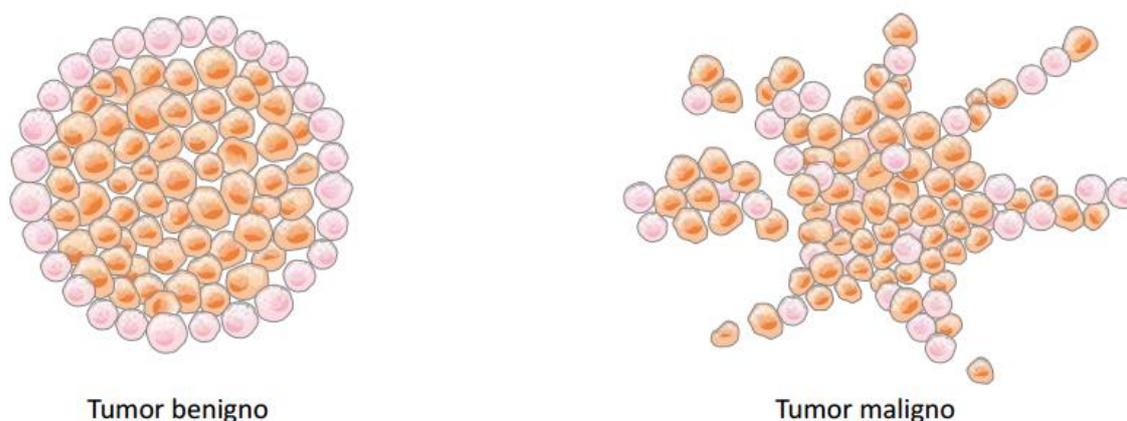
2.1 Câncer

2.1.1 Definição e Classificação

Os termos câncer, tumor maligno ou neoplasia maligna são sinônimos e representam um conjunto de mais de 100 mil diferentes tipos de doenças que, comumente, apresentam o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos subjacentes, podendo migrar para outras regiões do corpo. A combinação dessas duas características é o que torna o câncer perigoso (INCA, 2012).

As neoplasias podem ser benignas, as quais tem seu crescimento de forma organizada, expansivo e com limites nítidos, ou malignas, que proliferam desordenadamente e são capazes de provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e levar à morte (Figura 1), (MS, 2011).

Figura 1 - Diferença entre os tipos de tumores.



Fonte: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf.

Independentemente da exposição a agentes carcinógenos, as células normais sofrem mutações genéticas espontâneas, que não alteram seu desenvolvimento

normal. Quando essas alterações ocorrem em genes denominados proto-oncogenes (que se encontram inativos em células normais), estes podem ser ativados e se transformarem em oncogenes – genes responsáveis pela malignização das células normais (MS, 2011).

A classificação da neoplasia é baseada no tipo de célula/ tecido em que ele se inicia, podendo ser denominado de carcinoma (tecidos epiteliais ou mucosas), sarcomas (tecidos conjuntivos), leucemias (células sanguíneas brancas), mielomas (células plasmáticas da medula óssea), neuroblastomas (células malignas embrionárias), gliomas (células gliais) e linfomas (células do sistema linfático), (ALBERTS et al., 2010b; INCA, 2012).

O processo de formação de câncer (carcinogênese), geralmente, se inicia lentamente, podendo demorar anos para que uma célula cancerosa prolifere e o tumor seja visível (ALBERTS et al., 2010b). Entretanto, é um processo complexo de múltiplos estágios que, geralmente, envolvem mais de uma mudança genética além de outros fatores epigenéticos que aumentam a probabilidade de mutações genéticas, resultando no câncer (RANG et al., 2012).

O período de iniciação depende do tipo e localização inicial do câncer e da intensidade do estímulo carcinogênico, ou seja, da ausência ou presença de agentes oncoiniciadores (no estágio de iniciação, onde os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos, provocando danos genéticos nas células), oncopromotores (transforma as células em malignas, no estágio de promoção da carcinogênese) e oncoaceleradores (atuam no estágio de progressão, sendo responsáveis pela proliferação desordenada e irreversível da célula), como consequência do desequilíbrio nos mecanismos de controle do ciclo celular (MS, 2011).

As causas que levam ao desenvolvimento de um câncer são variadas, e incluem fatores externos – como hábitos sociais e culturais e o meio ambiente, e fatores internos – como predisposição genética (INCA, 2014).

2.1.2 Incidência do Câncer no Brasil

O câncer é um sério problema de saúde que afeta milhões de pessoas no mundo, reduzindo a qualidade de vida e levando, em muitos casos, à morte (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). Estimativas do Globocan relatou que em

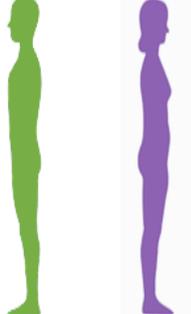
2012 houve mais de 14 milhões de novos casos de câncer e mais de 8 milhões de mortes por câncer no mundo (WHO, 2013).

O perfil epidemiológico pelo qual vem se apresentando no Brasil, está tornando o câncer um problema relevante e tem conquistado espaço em políticas governamentais, permitindo, a partir do conhecimento sobre a situação atual dessa doença, estabelecer prioridades e alocar recursos para modificar essa realidade na população do país (INCA, 2012).

A estimativa para o ano de 2014, que também é válida para o ano de 2015, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, foi cerca de 395 mil novos casos de câncer no país (sem contar com os casos de câncer da pele não melanoma), onde 204 mil no sexo masculino e 190 mil no sexo feminino, (INCA, 2014).

Os tipos de cânceres mais incidentes nos homens foram câncer de próstata (22,8%) e pulmão (5,4%), nas mulheres os tipos de cânceres mais incidentes foram de mama (20,8%) e cólon (6,4%). Na figura 2 mostra a estimativa de 2014/2015 para os 10 tipos mais incidentes de cânceres em ambos os sexos (INCA, 2014). De acordo com as taxas de mortalidade dos principais cânceres mais frequentes em 2013, o câncer de pulmão e o câncer de mama são os tipos mais letais em homens e mulheres, respectivamente (MS, 2013).

Figura 2 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%		Homens	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tíreoide	8.050	2,9%
Esófago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>>.

2.1.3 Alterações Celulares e Moleculares na Carcinogênese

A principal característica das células cancerosas é a proliferação descontrolada e a inativação de genes de supressão tumoral ou a transformação de proto-oncogenes. Algumas alterações podem conferir essa autonomia de crescimento tecidual e levar a mudanças em diversos sistemas celulares, tais como fatores de crescimento, transdutores do ciclo celular (como ciclinas, por exemplo), mecanismo apoptótico, expressão da telomerase e angiogênese direcionada ao tumor (RANG et al., 2012).

2.1.3.1 Ciclo celular e apoptose

O ciclo celular é uma série de eventos que ocorrem numa célula, resultando na sua divisão e duplicação e é controlado por vários mecanismos, o que assegura que a divisão celular ocorra de forma adequada (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). A maioria das células se encontram no estado de repouso (G₀), mas podem receber sinais que façam com que ela entre no ciclo celular (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000).

O ciclo celular é dividido em 3 fases: a fase G₁ (G de “gap” que significa “intervalo”); a fase S (síntese), onde a célula duplica seu DNA; a fase G₂, que é uma fase de crescimento; e a fase M (mitose), a qual representa a divisão celular propriamente dita. Na fase G₁, a célula sofre a ação de fatores mitogênicos e de moléculas inibidoras, como o TGF β . A fase G₁ é caracterizada por 2 momentos: G₁ precoce, onde a célula ainda está susceptível a influências externas que podem fazer com que o ciclo seja bloqueado no ponto de restrição e a célula entra em G₀ (“repouso”); e G₁ tardia, onde a célula não sofre influências do meio e progride no ciclo (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000).

As CDK's (quinases dependentes de ciclinas) são proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular, ou seja, regulam a passagem da célula de uma fase para outra, e são reguladas por ciclinas que formam um complexo ciclina/CDK (Quadro 1) específico para cada fase do ciclo celular, particularmente nas transições de fases, tanto de G₁ para S quanto de G₂ para M (BONELLI et al., 2014).

Quadro 1 - Principais ciclinas e cdk's que regulam o ciclo celular.

Fase do Ciclo Celular	Complexo ciclina/ckd
G1	ciclina D/ cdk4, 6
G1/S	ciclina E/ cdk 2
S	ciclina A/ cdk 1
M	ciclina B/ cdk 1

Fonte: Autora, 2015 – Adaptado de ALBERTS, 2010.

Um grupo de inibidores do ciclo (CDKI's) atuam bloqueando ou regulando negativamente as CDK's, impedindo a progressão do ciclo celular. A complexidade da regulação do ciclo celular reflete diretamente no grande número de alterações que podem levar a proliferação celular anormal, ocasionando o desenvolvimento do câncer (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Existem diversos mecanismos que levam a evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, entretanto, a maioria deles interferem na divisão celular, levando a alterações do ciclo celular (RANG et al., 2007). Os fatores de crescimento ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação, como genes supressores de tumor que inibem a replicação celular para reparo ao DNA quando há dano, inibem a multiplicação (DE ALMEIDA et al., 2005).

Mutações tanto nos genes que estimulam (oncogenes) quanto nos que bloqueiam o ciclo celular (genes supressores de tumor) podem conferir a uma célula vantagens quanto ao crescimento e proliferação sobre as células normais, ocasionando uma desregulação do ciclo celular (WARD, 2000). Essas mutações podem originar células potencialmente malignas e conferir-lhes uma resistência à processos celulares eliminatórios (OKADA; MAK, 2004).

Dois mecanismos são empregados para a eliminação de células nos organismos multicelulares: a necrose e a apoptose (JIN et al., 2007). A morte por necrose é desencadeada pela ruptura da membrana plasmática e geralmente desencadeia processos inflamatórios; já a morte por apoptose é uma “morte limpa” onde ocorre a condensação da cromatina e o DNA fragmentado forma os chamados

corpos apoptóticos e células tumorais possuem a capacidade de resistir a esse tipo de morte celular (BROWN, 2008).

Os genes que controlam o tempo de vida celular, envolvidos no processo de apoptose, e genes responsáveis por reparos no DNA também podem sofrer mutações e estão envolvidos no processo de carcinogênese. O mecanismo de apoptose (ou morte celular programada) elimina de forma rápida células desnecessárias (que estejam em excesso) ou prejudiciais (células que sofreram danos) ao organismo (WARD, 2002).

Em 1964, o termo “morte celular programada” foi proposto para designar um tipo de morte que acontece de forma não acidental (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964) que, posteriormente, ficou conhecida como apoptose (KERR; WYLLIE., 1972). Ela ocorre em resposta a diversas situações, como na organogênese, atrofia de órgãos, resposta inflamatória e deleção de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH; NAGASHREE, 2001).

Vários fatores podem desencadear o processo de apoptose, como agentes quimioterápicos, danos no DNA e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (HENGARTNER, 2000). A apoptose pode ser ativada por duas vias: intrínseca e extrínseca (PROGRAMMED, 2007). A via intrínseca que é desencadeada por estresse celular, resulta na ativação de caspase-9, e os sinais são transduzidos principalmente para a mitocôndria, que é a organela mediadora desse processo (HENGARTNER, 2000). A via extrínseca é iniciada pela ativação de caspase-8, desencadeada por um grupo de receptores de membrana da família dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), com consequente ativação dos receptores de morte. Cada uma dessas vias convergem para uma via comum de ativação proteolítica de caspase-3 (DANIEL et al., 2001; GHAVAMI et al., 2009).

Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004). Essa característica pode ser adquirida por diversos mecanismos, entre eles por lesões no DNA ou espécies reativas de oxigênio (ZÖRNIG et al., 2001). A morte programada é alvo para a ação de quimioterápicos (NICHOLSON, 2000) e mecanismos moleculares da apoptose tem sido investigados e vários estudos sendo realizados nesse sentido, como por exemplo fármacos que tem como principal alvo membros da família Bcl-2 e Bcl-XL

onde, a redução de suas atividades, é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose (KIM et al., 2007; OLTERS DORF et al., 2005).

2.1.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Os efeitos deletérios relacionados ao oxigênio são conhecidos desde o final do século XIX, mas a identificação dos radicais livres como responsáveis por esses efeitos só foi possível quando Denham Harman declarou sua teoria sobre o envolvimento desses radicais em processos de envelhecimento, mutagênese e câncer (HARMAN, 1992). As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido a sua capacidade de serem ou gerarem radicais livres. Sabe-se que o estresse oxidativo no tecido inflamado pode dar início a carcinogênese (ROESSNER et al., 2008). A formação dessas espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre durante processos biológicos oxidativos, sendo formados fisiologicamente nos sistemas biológicos ou através do metabolismo de compostos exógenos, como a fosforilação oxidativa, responsável pela geração de energia através do ATP na mitocôndria (SOSA et al., 2013).

Evidências sugerem que as células tumorais apresentam um aumento intrínseco de ROS, devido ao aumento da atividade metabólica mitocondrial (PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004). Quantidades elevadas de ROS em células tumorais podem gerar consequências significativas, como a estimulação da proliferação celular, mutações e instabilidade genética e aumento da resistência a agentes anticancerígenos (MORIN, 2003; VASILEVSKAYA; O'DWYER, 2003).

As funções biológicas de EROS, seus efeitos no desenvolvimento e progressão do câncer, seus possíveis mecanismos e consequências têm sido avaliados. Alguns autores sugerem como principais mecanismos que levam ao aumento do estresse oxidativo o mal funcionamento e mutações mitocondriais (CAREW et al., 2003; COPELAND et al., 2002; KUMIMOTO et al., 2004) e o processo inflamatório crônico (HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003). Esses processos resultam em um aumento da proliferação celular de células cancerígenas (BEHREND; HENDERSON; ZWACKA, 2003; SCHIMMEL; BAUER, 2002), danos ao DNA (JACKSON; LOEB, 2001; VAFA et al., 2002), resistência a fármacos

quimioterápicos (KIM et al., 2004b; PELICANO et al., 2003) e morte celular (HENSLEY et al., 2000; ZHOU et al., 2003).

2.1.5 Principais Formas de Tratamento do Câncer

Um das principais dificuldades de tratar o câncer é que, geralmente, o crescimento do tumor já se encontra avançado antes do seu diagnóstico (RANG et al., 2012). Visando a cura, o prolongamento da vida útil e a melhora da qualidade de vida existem três principais tipos de tratamento do câncer: a quimioterapia, a radioterapia e a excisão cirúrgica (MS, 2011), além desses a terapia de fotorradiação e a imunoterapia tem sido utilizadas com o objetivo de erradicar o câncer através de terapia combinada (ALMEIDA et al., 2005).

A radioterapia e a cirurgia se baseiam em um tratamento local do câncer e, geralmente, são utilizadas em conjunto e levam à remoção dos tumores com eficácia. Quando utilizada separadamente, a radioterapia pode levar a redução do tamanho do tumor e diminuir a recorrência e a possibilidade de metástase (ALMEIDA et al., 2005).

O tratamento sistêmico do câncer é feito por meio da terapia com fármacos denominados quimioterápicos (ou antineoplásicos) administrados de acordo com esquemas terapêuticos em intervalos regulares (MS, 2011). O objetivo da quimioterapia é a destruição de células neoplásicas, sem que as células normais sejam prejudicadas, entretanto, a maioria dos fármacos quimioterápicos não atuam de forma específica e lesam células cancerígenas e células normais (HAHN; WEINBERG, 2002; ALMEIDA et al., 2005).

2.1.6 Fármacos Antineoplásicos

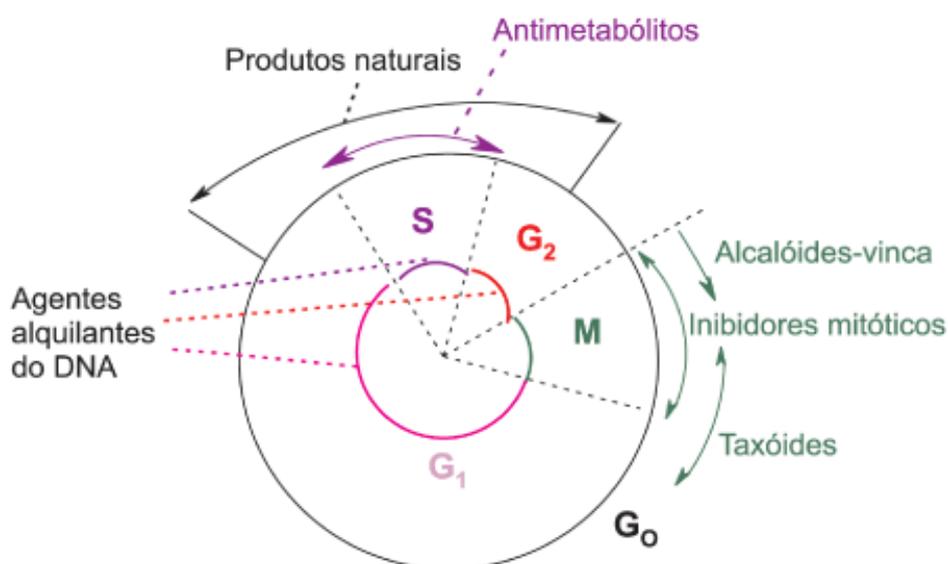
A maioria dos fármacos antineoplásicos afetam apenas a divisão celular (fármacos ciclo-celular específicos) – em muitos casos, durante a fase S do ciclo, gerando danos ao DNA e levando as células a apoptose – sem nenhum efeito específico na invasividade, na perda da diferenciação e na capacidade de metástase (RANG et al., 2012). Outros fármacos, ciclo-celular não específicos, são capazes de

eliminar as células tumorais independente de estarem em alguma fase de divisão ou em repouso, G₀ (ALMEIDA et al., 2005). A figura 4 mostra em qual etapa do ciclo celular alguns agentes antineoplásicos agem.

Os produtos naturais utilizados na terapia clínica do câncer podem agir no ciclo celular de forma específica ou não (ALMEIDA et al., 2005). Os quimioterápicos vimblastina e vincristina (alcalóides da vinca), paclitaxel e etoposídeo são exemplos de fármacos que atuam diretamente em alguma etapa da divisão e inviabilizam a proliferação celular (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Os principais fármacos anticâncer podem ser divididos em alquilantes, antibióticos citotóxicos, hormônios, anticorpos monoclonais, inibidores de proteína quinase e agentes diversos, os quais não se encaixam nas categorias anteriores (RANG et al., 2012). Os agentes hormonais não são citotóxicos, atuam modulando a proliferação celular e sua ação antitumoral depende de uma série de eventos que interferem ou bloqueiam a síntese de proteínas importantes para o crescimento e divisão celular (GOODMAN; GILMAN, 1994). Os anticorpos monoclonais e os inibidores de proteína quinase, apresentam uso muito restrito. Os fármacos citotóxicos incluem os agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos citotóxicos e alguns derivados de plantas (RANG et al., 2012).

Figura 3 - Atividade dos agentes antineoplásicos em relação a fase do ciclo celular.



Fonte: ALMEIDA et al., 2005.

2.1.6.1 Agentes Alquilantes

Esses agentes possuem grupamentos químicos que são capazes de formar ligações covalentes com o DNA da célula. São os mais utilizados de todos os fármacos anticâncer e sua ação pode resultar tanto na interferência da transcrição e replicação quanto na morte celular por apoptose (KESKIN et al., 2000).

Um exemplo de agente alquilante é o quimioterápico ciclofosfamida, pertencente ao grupo das mostardas nitrogenadas, muito utilizado em diversos esquemas terapêuticos (RANG et al., 2012). A ciclofosfamida é um pró-fármaco – ativo após ser metabolizado no fígado – que impede a divisão celular (agente não-específico de fase do ciclo celular) e também possui atividade imunossupressora (RICCARDI et al., 2013). É indicado no tratamento do câncer de mama, adenocarcinoma de pulmão, leucemia linfóide aguda, entre outras (ANVISA, 2000).

Os compostos de platina compreendem outra classe dos agentes alquilantes. A cisplatina, por exemplo, é classificada como um agente alquilante não-específico sobre o ciclo celular e age formando ligações covalentes bifuncionais (ou seja, possuem dois grupos alquilantes), mudam a conformação do DNA, inibindo sua síntese (NEVES; VARGAS, 2011). É indicada para tratamento do câncer de bexiga, pulmão, ovário, entre outros (ANVISA, 2000; RANG et al., 2012).

2.1.6.2 Antimetabólitos

Os antagonistas do folato, análogos de pirimidina e análogos da purina são as classes que compreendem esse tipo de fármacos (RANG et al., 2012). Seu mecanismo de ação se baseia em bloquear ou interferir as vias de síntese do DNA (CHAN; CRONSTEIN, 2013). O metotrexato e a fluoruracila são exemplos de quimioterápicos pertencentes a essa classe e são indicados para o tratamento de câncer de pulmão, gástrico, bexiga, cabeça, pescoço e outros (ANVISA, 2000).

2.1.6.3 Antibióticos citotóxicos

São amplamente empregados e com elevada toxicidade. As antraciclinas, dactinomicina, bleomicinas e mitomicinas são tipos de antibióticos que fazem parte do grupo dos antibióticos citotóxicos (DE ALMEIDA et al., 2005).

Dentre vários antibióticos, a doxorrubicina (que é o principal antibiótico anticâncer do grupo das antraciclinas) possui elevado potencial citotóxico e é muito utilizada para o tratamento de câncer de mama, melanoma e leucemia linfoblástica aguda (ANVISA, 2000; RANG et al., 2012). Age intercalando o DNA e provocando quebras na dupla hélice, forma radicais livres e desencadeia o processo de morte celular por apoptose (SWIFT et al., 2006).

2.1.7 Resistência a Quimioterápicos

A resistência aos quimioterápicos desenvolvida pelas células neoplásicas pode ser primária (ou intrínseca) – quando o fármaco é administrado pela primeira vez – ou adquirida, durante o tratamento com o fármaco. A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um tipo de resistência adquirida e consiste na ausência de resposta ao tratamento com quimioterápicos (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Essa resistência pode estar relacionada com uma série de fatores que dão origem a vários mecanismos de resistência (PERSIDIS, 1999). A diminuição no acúmulo dos fármacos citotóxicos e na quantidade de fármaco captado pelas células, a ativação insuficiente do fármaco, maior concentração da enzima-alvo e o reparo rápido de lesões induzidas pelo fármaco, são exemplos de mecanismos de resistência (SZAKÁCS et al., 2006).

Dentre os mecanismos citados, o principal mecanismo de resistência está relacionado ao transporte da droga através da membrana plasmática e, no mínimo, três bombas de transporte estão envolvidas e promovem o efluxo do quimioterápico para fora da célula. Uma das proteínas responsáveis pelo efluxo do quimioterápico é a glicoproteína-P e, quando super expressa, desencadeia mecanismos de resistência (BORST et al., 2000).

A seleção de novos tratamentos do câncer como fármacos inibidores da angiogênese (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000), terapia genética (MALEK et al., 2008),

reversão da multiresistência aos fármacos (KEITH et al., 2004), além de produtos naturais com potencial anticâncer vem sendo estudados (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002).

2.2 Fitoterapia

2.2.1 História

O uso de plantas com fins medicinais para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). O termo fitoterapia deriva do grego *phyton* que significa “vegetal” e de *therapeia*, “tratamento”, e consiste no uso interno ou externo de vegetais para o tratamento de doenças, sejam eles “in natura” ou sob a forma de medicamentos (ALVES; SILVA, 2003). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2007), 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais. Desde os primórdios diversas plantas são utilizadas pela humanidade (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006), sem qualquer estudo que comprovasse seu real poder medicinal, o seu uso era baseado no empirismo, onde as propriedades terapêuticas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Nesse contexto, houve um grande avanço na terapia dado por Paracelso que defendia a Teoria da Assinatura dos Corpos, na qual as plantas apresentavam uma “impressão divina” que indicava suas virtudes curativas. Segundo essa teoria, a semelhança das formas das plantas aos órgãos humanos determinava o seu efeito curativo sobre estes (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). A partir daí, as plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular devido suas propriedades terapêuticas e/ou tóxicas (DI STASE, 2007).

Nos países mais desenvolvidos, bem como nos países em desenvolvimento, o consumo de produtos à base de fontes naturais tem aumentado a cada dia (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). No Brasil, a utilização de ervas medicinais teve sua base na prática indígena, que influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasta cultura popular.

Apesar dos progressos da terapia alopata, da indústria farmacêutica e dos fitoterápicos ainda serem associados à crença popular sem base científica, a fitoterapia vem sendo colocada em destaque e muitas pesquisas são realizadas para comprovar suas propriedades farmacológicas (ALVES; SILVA, 2003).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão devido a sua complexidade, estima-se a existência de mais de 2 milhões de espécies diferentes de plantas, animais e microrganismos (SIMÕES et al., 2007), contando com mais de 56.000 espécies de plantas catalogadas – quase 19% da flora mundial (DIAS, 1996; GIULIETTI et al., 2005) em que se estima um total de 350.000 a 550.000 (SIMÕES et al., 2007) onde, muitas delas são utilizadas pela população na medicina tradicional.

O uso de fitoterápicos com finalidade preventiva, curativa, paliativa e com fins de diagnósticos foi reconhecido oficialmente pela Organização Mundial de Saúde em 1978. O Ministério da Saúde, indo de encontro a essa abordagem sobre plantas medicinais e fitoterápicos, aprovou em 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, como base para o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF – criado devido à influência da fitoterapia no cotidiano das pessoas, além do fato do Brasil deter a maior parcela da biodiversidade mundial. Esse programa tem como meta a promoção do uso sustentável dos componentes da biodiversidade brasileira, gerando riquezas, inclusão social, melhoria da qualidade de vida, além de ampliar as opções terapêuticas e melhorar a atenção à saúde dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), sem que o conhecimento popular tradicional seja desvalorizado, mas sim preservado (BRASIL, 2006; 2009).

No Brasil, as plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro dessas plantas ainda são insuficientes (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Desta forma, se faz necessária a avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos resultantes de substâncias contidas nestas plantas que são utilizadas comumente pela população.

2.3 Metabólitos Secundários

Devido a sua origem biológica, as plantas necessitam produzir substâncias para se manterem vivas e em equilíbrio natural. Essa produção ocorre por meio de rotas biossintéticas, as quais dão origem a metabólitos primários que são responsáveis pela nutrição e desenvolvimento das mesmas, bem como metabólitos secundários, que são substâncias responsáveis por mecanismos de defesa ou proliferação da espécie (SIMÕES et al., 2007).

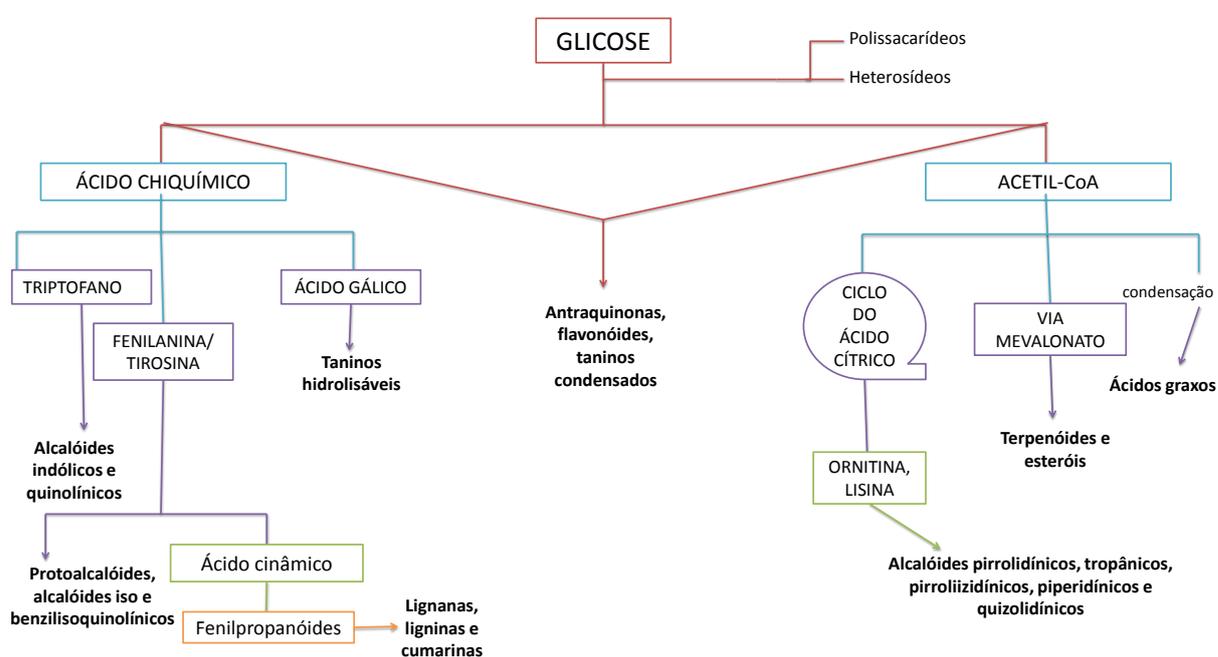
Os metabólitos secundários são os compostos responsáveis por diversas atividades biológicas dos vegetais (FUMAGALI et al., 2008) e, geralmente, são os causadores dos efeitos tóxicos da planta. Estudos mostram que taninos possuem ação bactericida, fungicida, moluscicida, entre outras (DIN et al., 2013; LOPES et al., 2013; SCALBERT, 1991); já flavonoides são responsáveis, principalmente, por atividades antioxidante e anticâncer (CUSHNIE; LAMB, 2005; SINGH; KAUR; SILAKARI, 2014). Existem relatos que catequinas e xantonas também são responsáveis pela atividade anticâncer, inibindo a ação de agentes carcinogênicos (KONDO et al., 1999; SAIGG; SILVA, 2009; JESUS; CUNHA, 2012; SZKARADEK et al., 2013; WASZKIELEWICZ et al., 2013). Portanto, se faz necessário conhecer e estudar esses metabólitos secundários para avaliar e determinar suas atividades biológicas bem como seus efeitos nocivos para o ser humano.

A produção de metabólitos secundários é resultado de interações complexas entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (WINK, 1990). Em alguns casos, essa produção pode estar restrita a um período específico do desenvolvimento do vegetal, ou a condições ambientais (SIMÕES et al., 2007), ou por motivo de estresse causados por ataques microbiológicos, ou limitações nutricionais (MANN, 2002).

A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose (Figura 4), através de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. Ainda existem alguns metabólitos secundários que não derivam apenas de um desses intermediários, mais sim de uma combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste (SIMÕES et al., 2007).

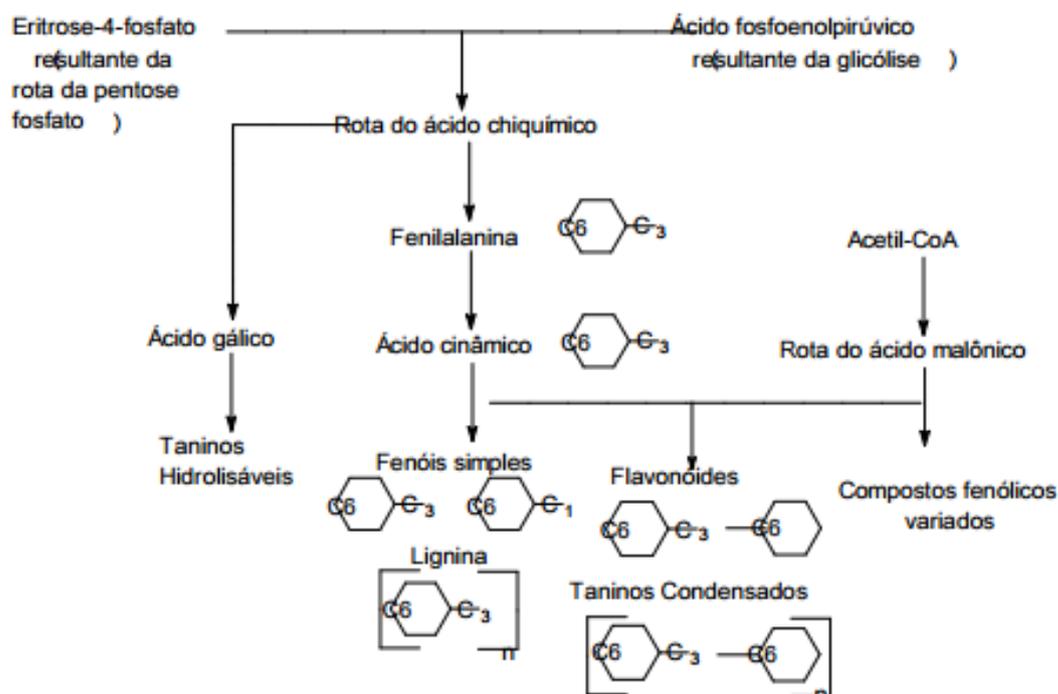
Existem três principais grupos de metabólitos secundários – terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza e são biossintetizados pelas rotas do ácido chiquímico e do ácido mevalônico (Figura 5). Entre os fenólicos mais abundantes se encontram os flavonoides – e derivados – e cumarinas (SOARES, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 4 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: Autora, 2015 – Adaptado de SIMÓES et al., 2007.

Figura 5 - Biossíntese dos compostos fenólicos.



Fonte: TAIZ; ZEIGER (2004).

O conhecimento dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um grande desafio para a química, farmacologia, fitoquímica, fisiologia, patologia, entre outras. A crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais sejam avaliadas para comprovar sua eficácia e segurança por meio de estudos pré-clínicos e clínicos (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

As plantas possuem em sua composição inúmeros constituintes e, seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos e/ou antagônicos, uma vez que os diferentes princípios ativos (devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes) podem interferir para uma mesma atividade. Em estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios simples, sensíveis e reprodutíveis para a detecção do efeito específico (VEIGA, PINTO & MACIEL, 2005).

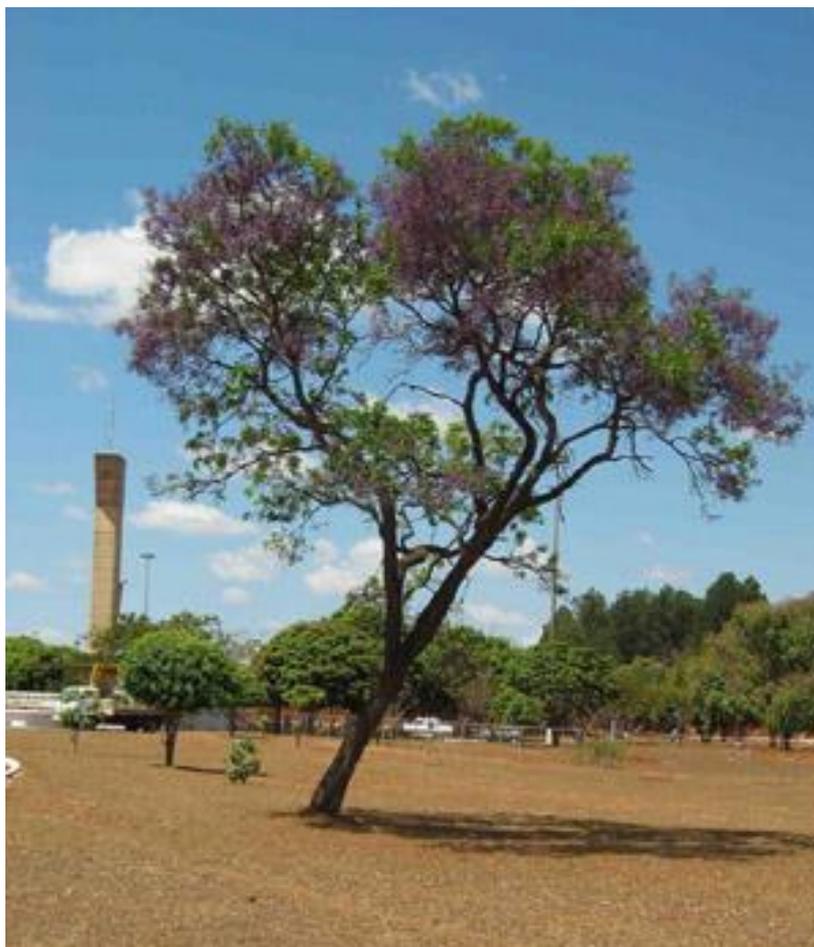
2.4 *Bowdichia virgilioides* KUNTH

A família Fabaceae se destaca por ser composta por inúmeras espécies com vasto espectro de atividades biológicas que são empregadas na medicina popular para fins variados (ROCHA et al., 1994). Dentro dessa família se encontra a espécie *Bowdichia virgilioides* que, apesar de muito utilizada popularmente, possui poucos estudos publicados sobre suas propriedades farmacológicas.

Bowdichia virgilioides KUNTH (Figura 6) é conhecida popularmente como sucupira, sucupira-do-cerrado, sucupira-do-campo, sucupira-amarela, sucupira-preta, é encontrada nos ecossistemas de cerrado, cerradão e início de mata ciliar, com maior ocorrência nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste (CONCEIÇÃO et al., 2010). Sua madeira é empregada para acabamentos internos, como molduras, assoalhos, painéis e portas, como também para a fabricação de mourões, pontes rurais, caibros e esteiros. Quando em flor, a árvore é extremamente ornamental, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo em geral, particularmente útil para a arborização de ruas estreitas. A planta é adaptada a terrenos secos e pobres, é ótima para plantios em áreas degradadas de preservação permanente. Floresce durante os meses de agosto e setembro. Os frutos amadurecem a partir do final do mês de outubro até o início de dezembro (SAMPAIO et al., 2001; LORENZI, 1992).

Embora existam muitas espécies da família Fabaceae, há gêneros de grande incidência no Brasil, como *Bowdichia*, que ainda são pouco estudados, buscando a comprovação da presença ou não de atividades biológicas. Esse fato direcionou nosso laboratório à investigação científica da espécie *Bowdichia virgilioides* visando avaliar mecanismos moduladores da resposta inflamatória dos extratos de casca, semente e folha dessa planta. Algumas das atividades farmacológicas de *B. virgilioides*, comprovadas cientificamente, estão listadas no quadro 1. Resultados relativos a efeitos antinociceptivos (SILVA et al., 2010) e anti-inflamatórios corroboram com os fins já praticados pela população. Além disso, dados recentes do laboratório sugerem possíveis atividades imunossupressora, cicatrizante, genotóxica e anticarcinogênica (MATOS, 2012; SOUZA, 2012). Esses achados abriram caminho à busca em compreender melhor os efeitos dos diferentes extratos de *B. virgilioides* na regulação gênica de linhagens de células tumorais e em células normais

Figura 6 - Fotografia da planta: *Bowdichia virgilioides* KUNTH.



Fonte: Agenda Fiocruz de Notícias. Disponível em: http://2.bp.blogspot.com/_axsdk0cPPrQ/Rq9uUAYQgSI/AAAAAAAAAVM/adoJrfWGCRg/s640/sucupira+107-0710_IMG+copy.jpg . Acesso em: 07 de junho de 2015.

Quadro 2 - Ações farmacológicas de *Bowdichia virgilioides* KUNTH descritas na literatura.

Ação farmacológica	Parte da planta/ extrato	Referências
Reumatismo, Artrite e Doenças de pele	Sementes	CRUZ, 1965
Cicatrização de feridas	Extrato da Casca	BACCHI, 1986
Anti-ulcerogênico	Extrato da Casca	OLIVEIRA; SAITO, 1989
Antimalárica	Extrato da Casca	DEHARO et al., 2001
Hipoglicemiante	Raiz (chá); Extrato aquoso da casca.	MACEDO; FERREIRA, 2004; SOUZA et al., 2009
Antimicrobiana	Óleo essencial; Extrato aquoso da casca e folha.	ALMEIDA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009; AGRA et al., 2013
Anti-inflamatória	Entrecasca; Extrato aquoso da casca e da folha.	BARROS et al., 2010; THOMAZZI et al, 2010
Antinociceptiva	Casca; Extrato aquoso da casca e da folha	BARROS et al., 2010; THOMAZZI et al., 2010
Atividade contra o dano muscular	Extrato hidroetanólico da casca	SANTOS et al., 2014
Larvicida	Extrato da casca do caule	BEZERRA-SILVA et al., 2015

Fonte: Autora, 2015 – Adaptado de SOUZA, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação do potencial anticâncer dos extratos bruto e fracionados obtidos de folhas de *Bowdichia virgilioides*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos;
- ✓ Avaliar a viabilidade de células tumorais humanas tratadas com cada extrato;
- ✓ Selecionar os extratos com potencial antitumoral;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos selecionados sobre a viabilidade de células humanas normais;
- ✓ Avaliar a ação dos extratos selecionados sobre o DNA de células tumorais humanas;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos selecionados no ciclo celular de células tumorais;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos selecionados sobre a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras e extratos

As amostras das folhas de *Bowdichia virgilioides* foram coletadas sazonalmente no *Arboretum* da Universidade Federal de Alagoas e identificadas pela professora Rosangela Lyra do IMA, sendo as exsicatas depositadas no Herbário (nº MAC29914). O extrato aquoso bruto da folha (EABF) foi obtido pela infusão do material, seco e triturado, seguido de filtragem e liofilização.

As frações foram obtidas por partição líquido-líquido (ESTEVAM et al., 2009) onde, 3 g do EABF foi diluído em 500 mL de metanol:água (3:2) e filtrado. Seguindo uma ordem de polaridade dos solventes (do mais apolar para o mais polar), utilizou-se hexano, clorofórmio e acetato de etila (todos na proporção de 1:1). Em seguida, as frações resultantes foram rotaevaporadas e o pó foi concentrado. Para a utilização nos ensaios biológicos, o extrato bruto e suas frações, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica é um método qualitativo para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários. Para a realização dos testes foram utilizadas 30 mg de cada extrato e frações, solubilizados em 30 mL de metanol.

Foram realizados os testes para: i) fenóis e taninos; ii) antocianinas, antocianidinas e flavonoides; iii) leucoantocianidinas, catequinas e flavononas; iv) flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas; v) esteroides e triterpenóides; vi) saponinas; alcaloides; vii) antraquinonas, antronas e cumarinas. Todos os testes seguiram a metodologia descrita por Mattos (1997).

4.3 Cultura de células

Foram utilizadas as linhagens celulares humanas de leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM), adenocarcinoma pulmonar (A549) e melanoma (MDA-MB-435S), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultura primária de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética – Plataforma Brasil (nº **CAAE**: 34140312.3.0000.5013).

As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm², mantidas em meio RPMI – 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais (100X), L-glutamina (200 mM), piruvato (100 mM) e gentamicina (40 µg/ mL), em estufa de CO₂ 5%, à 37 °C.

4.4 Ensaios de viabilidade celular

4.4.1 Ensaio do MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o MTT que foi reduzido pela atividade metabólica celular, formando cristais de formazan. Dessa forma, a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) onde, para as culturas de CCRF-CEM e PBMC, 7 x 10⁴ células/ poço e para as demais culturas, 5 x 10³ células/ poço foram plaqueadas em placas de 96 poços.

O número de células plaqueadas e a determinação do tempo em que as células atingiram a fase log (fase de crescimento celular), foram definidos a partir de uma curva de crescimento celular. Após 2h30min do plaqueamento das células, foram adicionados o extrato bruto da folha (nas concentrações de 240 a 1,8 µg/ mL) e suas frações (nas concentrações de 120 a 1,8 µg/ mL), em diluição seriada, e os controles: o controle quimioterápico doxorrubicina (0,5 µg/ mL) e cisplatina (40 µg/ mL), o controle de solvente dimetilsulfóxido (DMSO 1%), além do controle sem

tratamento. O ensaio foi realizado em quadruplicata. Após 24 horas da adição dos extratos, foi adicionado o MTT (5 mg/ mL) e a leitura foi realizada 4 horas depois em leitor de microplaca, com comprimento de onda de 540nm. O cálculo da viabilidade celular foi feito da seguinte maneira:

$$\% \text{ inibição} = [1 - (\text{Absorbância}_{\text{tratado}} / \text{Absorbância}_{\text{n\~{a}o tratado}})] \times 100$$

A partir do ensaio de viabilidade celular, foi calculada a IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento), por meio de regressão não linear no programa Prism 5 (GraphPad Prism®).

4.4.2 Ensaio de Exclusão com Azul de Tripán

O teste de exclusão com o corante azul de tripan é baseado no conceito de que as células viáveis não permitem a entrada do corante, enquanto que as células mortas são permeáveis ao corante, ficando azuis.

Foram plaqueadas 7×10^4 células/ poço da linhagem tumoral CCRF-CEM e da cultura primária de PBMC e, após 2h30min foi feito o tratamento com o extrato bruto e suas frações, nas concentrações de 30, 60 e 120 µg/ mL e com os controles DMSO (1%), doxorubicina (0,5 µg/ mL) e o controle de células sem tratamento. Após 24 horas, foi realizada a contagem de 10 µL de cada poço homogeneizado com 10 µL de azul de tripan, em câmara de Neubauer. O número de células por mL de uma amostra contada na câmara de Neubauer é obtido pela equação:

$$\frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4}{4} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = \text{n}^\circ \text{ de células/ mL}$$

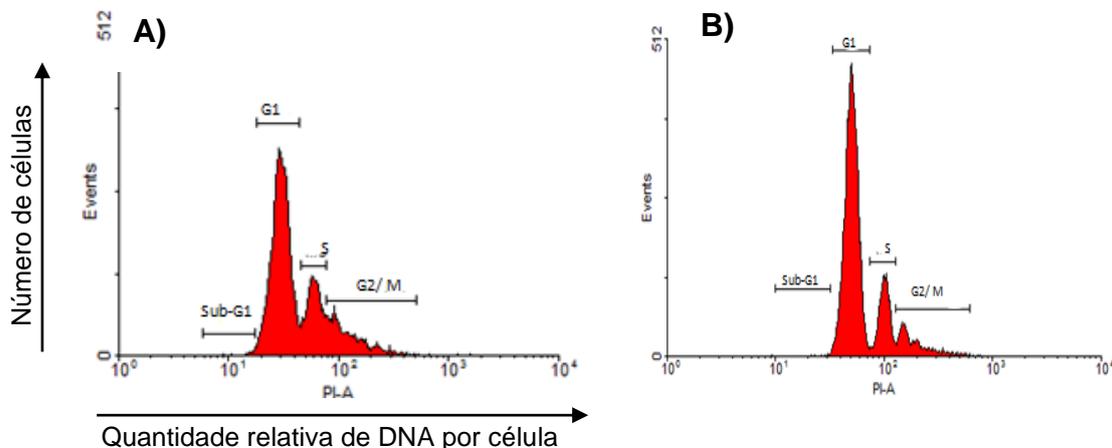
onde, Q = quadrante.

4.5 Ciclo celular

O princípio do método utilizado baseia-se na intercalação do iodeto de propídio ao DNA da célula (após lise da membrana) e, a fluorescência emitida, está diretamente ligada à fase do ciclo celular em que a célula se encontra. Para esta avaliação, seguiu-se o protocolo descrito por Nicoletti et al., (1991) com adaptações, onde 1×10^5 células/ poço da linhagem CCRF-CEM foram tratadas por 24 horas com a fração clorofórmica (BvF C) na $IC_{50} = 110 \mu\text{g/ mL}$ e os controles DMSO (1%), doxorubicina ($0,5 \mu\text{g/ mL}$) e o controle de células sem tratamento, em uma placa de 96 poços. Após o tratamento, as células foram centrifugadas e ressuspensas em $150 \mu\text{L}$ de PBS (1X). Acrescentou-se $1350 \mu\text{L}$ de etanol 90% (em PBS 1X), para fixação por 30 minutos a $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Decorrido esse tempo, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas na solução PSSI (Triton X-100, RNase (1 mg/ mL), iodeto de propídio (1 mg/ mL) e PBS (1X, q.s.p.), incubando-se por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCanto II™ (BD Biosciences). Os dados foram apresentados em porcentagem.

A padronização do protocolo para avaliação do ciclo celular e definição do perfil do ciclo celular da linhagem de leucemia linfoblastóide T (CCRF-CEM) foi realizada utilizando, como controles do experimento, linfócitos murinos (extraídos de linfonodos inguinais, axiais e mesentéricos) e timócitos (extraídos do timo de camundongos Swiss), já que estas culturas primárias possuem seu ciclo bem definido e descrito na literatura (Figura 7).

Figura 7 - Histograma do ciclo celular.



NOTA: A) Linfócitos murinos; B) Timócitos de camundongos Swiss.

Fonte: Autora, 2015.

4.6 Ensaios de genotoxicidade

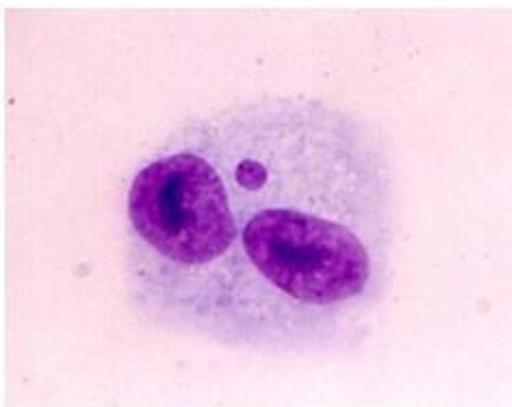
4.6.1 Ensaio de Micronúcleo

Micronúcleos são fragmentos de DNA que são separados do núcleo principal da célula (Figura 8). A formação de micronúcleo na célula é um processo considerado uma aberração cromossômica, pois ocorrem quebras na fita dupla do DNA, sem que haja reparo (FENECH, 2000).

O protocolo utilizado foi descrito por Fenech (2000, 2002). As células de leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM) foram tratadas com o extrato clorofórmico (BvF C) nas concentrações de 30, 60 e 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e com os controles: doxorrubicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DMSO (1%) e o controle de células sem tratamento. Cerca de 10 μL da amostra foram utilizados para preparar as lâminas. O volume de 100 μL foi completado com 90 μL de PBS (1X). As células foram centrifugadas (Cytocentrifuge – Cytopro™ 7620) a 350 rpm durante 5 minutos, posteriormente foram fixadas com metanol, coradas com o kit panótico rápido (Panótico Rápido – Laborclin) e avaliadas em microscópio óptico Olympus CH 30, com aumento final de 1000X (objetiva de imersão – neste caso foi utilizado óleo de imersão para a

visualização), para análise de 1000 células de cada citocentrifugado. As células foram classificadas como células normais ou células com micronúcleo.

Figura 8 - Célula com micronúcleo. Aumento 1000X.



Fonte: Gentox. Disponível em: < http://gentox.bio.br/?page_id=3 > Acesso em: 08 de Junho de 2015, às 20:52:54.

4.6.2 Ensaio do Cometa Alcalino

O princípio básico do teste é a migração do DNA em uma matriz de agarose em condições de eletroforese. Quando analisado sob microscopia, o genoma tem aparência de um cometa, com uma cabeça (região nuclear) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que migram na direção do cátodo (HARTMANN et al., 2003). Esse método é sensível e permite avaliar quebras na fita simples e dupla do DNA.

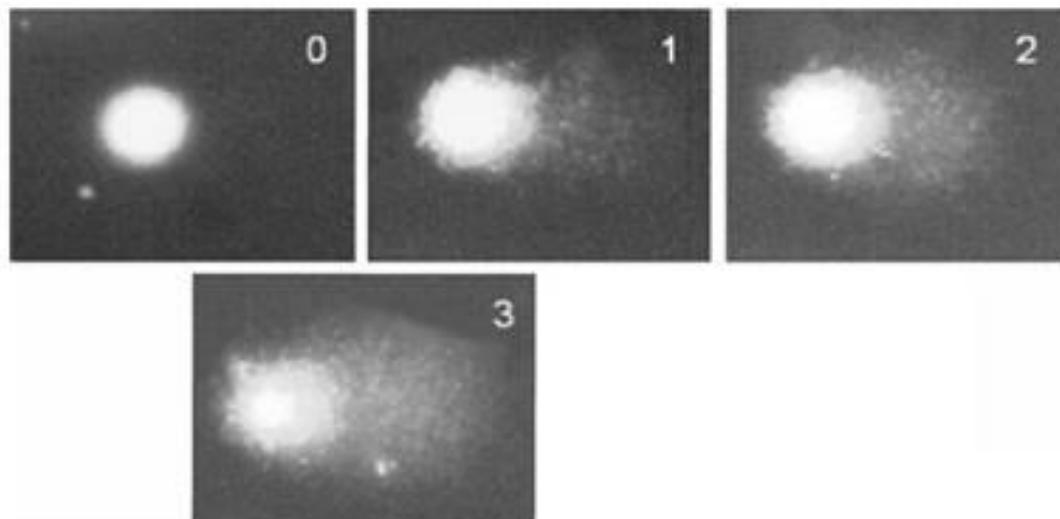
A metodologia utilizada para a realização desse ensaio foi descrita por Tice (2000) e adaptada pelo laboratório. Após o tratamento por 24 horas com fração clorofórmica (BvF C) na $IC_{50} = 110 \mu\text{g}/\text{mL}$ e os controles DMSO (1%), doxorubicina ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) e o controle de células sem tratamento, as células (CCRF-CEM) foram coletadas ($3 \mu\text{L}$ de cada poço) e homogeneizadas com gel de Agarose *Low Melting Point* (LMP - SIGMA[®]) de 0,5% em PBS (1X) e colocadas em lâminas previamente preparadas com uma fina camada de Agarose *BioReagent Normal Melting Point* (NMP - SIGMA[®]) a 1,0% em PBS (1X) e cobertas com uma lamínula, sendo em seguida colocadas sobre pacotes de gelo para a solidificação do gel e da amostra.

Após as amostras estarem solidificadas, uma nova camada de agarose LMP (0,5%) foi adicionada sobre a amostra para que esta ficasse entre as duas camadas formadas na lâmina (“sanduiche”).

Uma vez solidificada a última camada da agarose LMP, as lâminas foram retiradas e as lâminas submersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1%) e incubadas por uma hora a 16 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS (1X) por 10 minutos e colocadas em cuba de eletroforese com solução de corrida (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH = 13), onde foi realizada a migração dos fragmentos de DNA danificados. As lâminas foram novamente lavadas em PBS (1X) para neutralizar o pH e colocadas em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, foram coradas com *SYBR Green* 200x (Invitrogen™) para serem analisadas em microscópio de EPIfluorescência Olympus – PM 20.

De cada amostra foram contadas 100 células em um aumento final de 400x. Segundo Collins (2008), os cometas são classificados da classe 0 a classe 4, mas só utilizamos a classificação até a classe 3 devido à relatos na literatura de que a classe 4 são células em estado apoptótico. O material genético de cada célula foi classificado visualmente de acordo com o dano causado ao DNA em classes de 0 a 3 (Figura 9), de acordo com a densidade do núcleo e tamanho da cauda. De acordo com esse método, por exemplo, se 100 cometas são marcados e cada cometa é atribuído um valor de 0 a 3 de acordo com a sua classe, a pontuação total da amostra será entre 0 e 300 de unidade arbitrária, onde : U.A. - valor total = (0 x n₀) + (1x n₁) + (2 x n₂) + (3 x n₃), n = número de células de cada classe analisada (MANOHARAN; BANERJEE, 1985).

Figura 9 - Classificação visual sugerida por Collins et al., (2008).



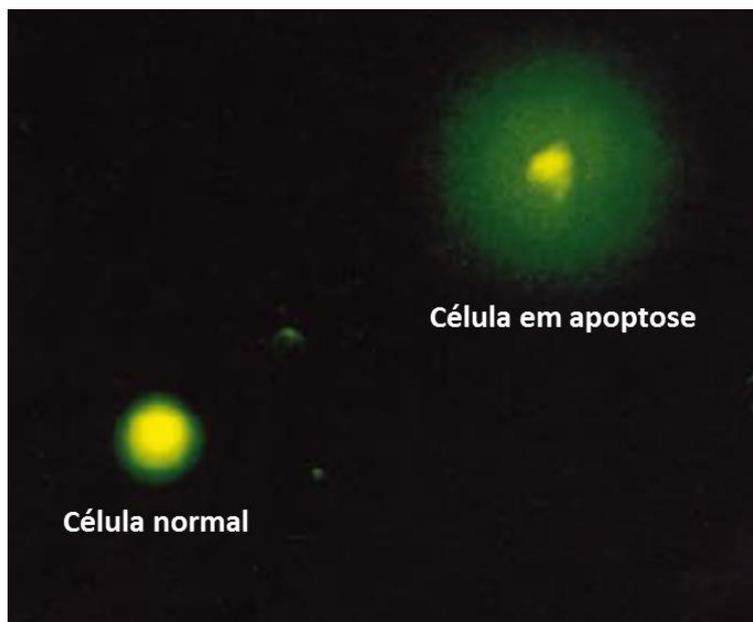
NOTA: Imagens dos cometas (a partir de linfócitos). Representação das classes 0-4 para a avaliação visual.

Fonte: KUMARAVEL et al., 2009.

4.7 Ensaio de apoptose por difusão em agarose

O ensaio de apoptose seguiu o protocolo descrito por Singh (2000) com adaptações. O teste seguiu os primeiros passos do ensaio de cometa até a solução de corrida, onde as amostras/ lâminas foram incubadas por 10 minutos, e posteriormente foram colocadas em solução de acetato de amônia (acetato de amônia 1M e etanol 90%) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em etanol 75% por 15 minutos para remover os sais precipitados e detergentes mantendo o DNA na agarose. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com *SYBR Green* (Invitrogen®) diluído em PBS 1X (1:200) por 10 minutos. As células foram observadas em microscópio de EPIfluorescência Olympus – PM 20, em um aumento final de 400X, onde foi feita a contagem de 100 células por amostra. As células apoptóticas, devido à desnaturação do DNA e por sua consequente difusão no gel de agarose, são facilmente identificadas, pois seus núcleos ficam com contorno vago ou indefinido, sem qualquer limite claro ou definido (Figura 10).

Figura 10 - Célula normal e célula em apoptose (aumento de 400X).



Fonte: SINGH, 2000.

4.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a medição de ROS intracelular, utilizou-se o método do 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (H2DCFH-DA) que, ao permear na célula, mediante a presença de ROS, é oxidado à sua forma fluorescente DCF (2',7'-diclorofluoresceína).

A linhagem CCRF-CEM foi utilizada para avaliação de ROS intracelular. Para isto, 1×10^5 células/ poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços e, após 2h30min foi feito o tratamento com a fração BvF C ($IC_{50} = 110 \mu\text{g/ mL}$) e com os controles DMSO (1%), ácido gálico (50 mM e 100 mM), peróxido de hidrogênio (50 μM e 100 μM), doxorubicina (0,5 $\mu\text{g/ mL}$) e o controle de células sem tratamento.

Após 24h, as células foram centrifugadas e adicionou-se o H2DCFH-DA 5 $\mu\text{M/ mL}$, por 30 minutos, protegido da luz. Posteriormente foi adicionado PBS (1X) para leitura em citômetro de fluxo FACSCanto IITM (BD Biosciences).

4.9 Análises estatísticas

Os resultados estão representados como média e erro padrão da média (EPM) e foram avaliados estatisticamente através da análise de variância pelo teste *One-Way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Kewls* com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$. As análises dos resultados de ciclo celular foram realizadas pelo teste de variância *Two-Way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, com nível de significância selecionado para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos extratos obtidos de folhas de *Bowdichia virgilioides*

O extrato aquoso bruto de *B. virgilioides* teve um rendimento total de, aproximadamente, 2,63%. Dentre as frações obtidas por meio de partição líquido-líquido, a fração metanol-água (BvF MA) teve o maior rendimento, em seguida foi a fração acetato de etila (BvF Ac). A fração clorofórmica (BvF C) foi a fração em que se obteve o menor rendimento e a fração hexânica não teve rendimento (Tabela 1).

Tabela 1 Pesos e rendimentos do extrato aquoso bruto e frações da folha de *Bowdichia virgilioides*.

EXTRATO	PESO INICIAL (g)	VOLUME DO SOLVENTE (mL)	PESO FINAL (g)	RENDIMENTO (%)
EABF	314 †	1570	8,2744	2,63
BvF C	3 ‡	500	0,0130	0,43
BvF Ac	3 ‡	500	0,2066	6,9
BvF MA	3 ‡	500	2,7801	92,67

NOTA: †: Peso da folha triturada e seca; ‡: Peso do pó liofilizado.

Fonte: Autora, 2015.

5.2 Identificação de metabólitos secundários presentes nos extratos bruto e frações de *Bowdichia virgilioides*

A análise fitoquímica realizada com o extrato bruto e suas frações mostrou a presença, em grande parte, de compostos fenólicos, tais como taninos, flavonoides, catequinas (Quadro 3).

Dentre os compostos fenólicos presentes, o grande grupo de flavonoides foram os metabólitos secundários mais detectados. Além destes compostos fenólicos, foi observada a presença de xantonas, terpenos, esteróides e saponinas.

Quadro 3 - Metabólitos secundários encontrados nos extratos da folha de *Bowdichia virgilioides*.

EABF	BvF C	BvF Ac	BvF MA
Taninos	Taninos	Taninos	Taninos
Flavononas			Flavononóis
Xantonas	Xantonas		
Catequinas			Catequinas
Flavonononas	Flavonononas		Flavonononas
Esteroides			Esteroides
Triterpenóides	Triterpenóides		
Saponinas	Saponinas	Saponinas	Saponinas

Fonte: Autora, 2015.

5.3 Efeito dos extratos bruto e fracionados sobre a viabilidade celular

Nos ensaios proliferativos com a linhagem tumoral de adenocarcinoma pulmonar (A549), foi visto que o extrato bruto da folha inibiu a viabilidade celular da linhagem nas menores concentrações utilizadas quando comparado ao controle sem tratamento (CELLS) e, na concentração testada de 15 µg/ mL, o extrato foi capaz de inibir cerca de 42%. Já o quimioterápico utilizado, cisplatina (CIS) foi capaz de inibir cerca de 35% (Figura 11-A).

A fração clorofórmica (BvF C) inibiu, significativamente, a viabilidade celular da linhagem em todas as concentrações testadas (Figura 11-B) quando comparadas ao controle de células sem tratamento. A maior inibição foi na concentração de 120 µg/ mL (46%).

Já a fração acetato de etila (Figura 11-C) e a fração metanol-água (Figura 11-D), não foram capazes de diminuir a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas.

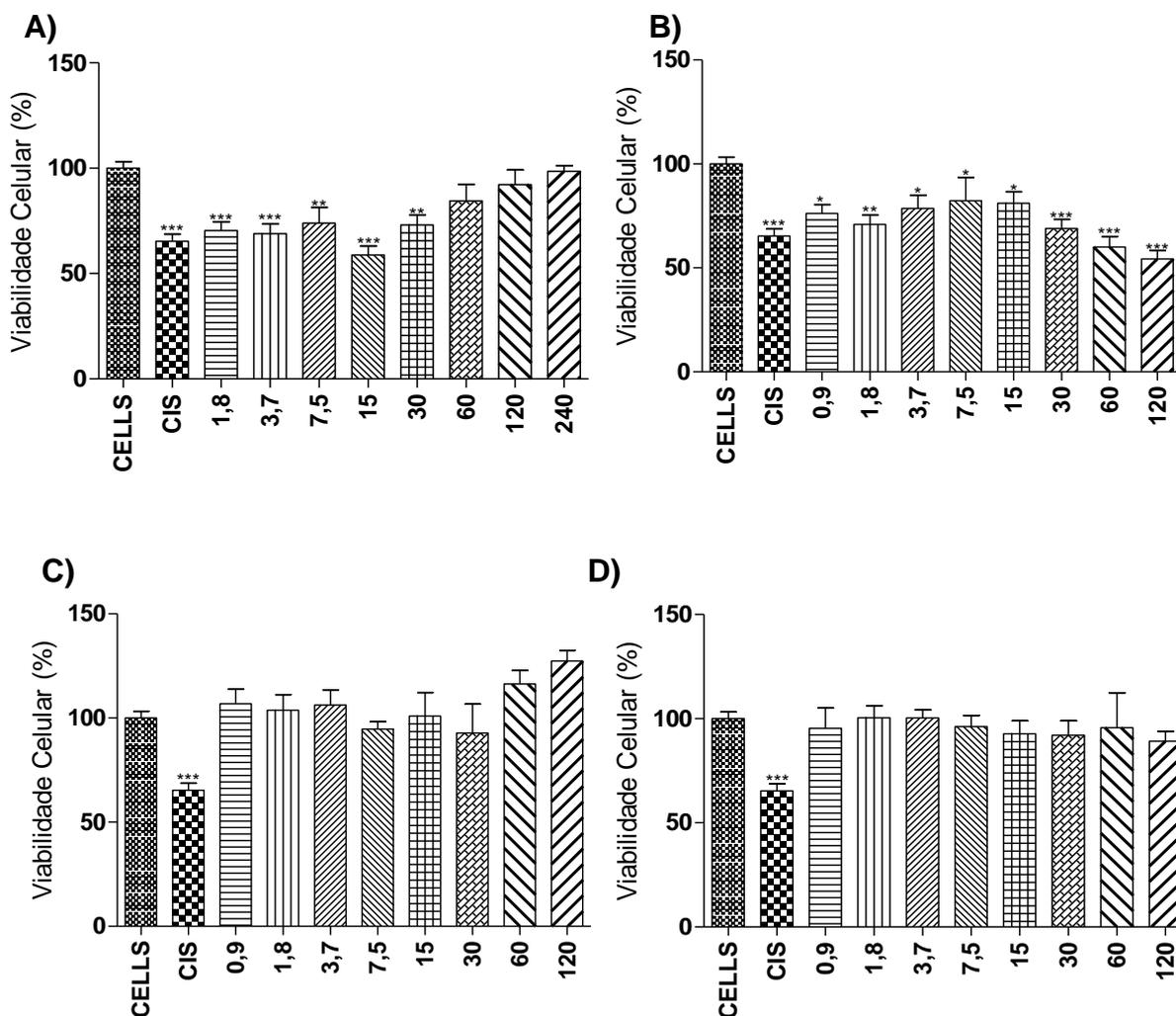
Dos 4 extratos que foram testados na linhagem MDA-MB-435S (melanoma), em 3 deles não foi observado nenhum efeito (Figura 12), apenas a fração clorofórmica mostrou potencial inibitório nas concentrações de 15 a 120 µg/ mL, chegando a inibir 53% da viabilidade celular na maior concentração testada (Figura 12-B) em relação ao controle de células não tratadas.

Na linhagem tumoral de leucemia linfoblástica T – CCRF-CEM (Figura 13) foi visto um efeito dos extratos semelhante ao que foi observado anteriormente na linhagem de melanoma onde, apenas a fração clorofórmica mostrou inibição da viabilidade celular nas concentrações de 60 e 120 µg/ mL, inibindo mais de 50% da viabilidade dessa linhagem após o tratamento de 24h, sendo estatisticamente significativo em relação ao controle de células sem tratamento.

Em todas as linhagens testadas, o controle de solvente (dimetilsulfóxido – DMSO 1%) não alterou a viabilidade celular (dados não mostrados).

Para a linhagem tumoral CCRF-CEM, foram testadas concentrações menores que 0,9 µg/ mL, chegando até a concentração de 0,1 µg/ mL (dados não mostrados) da fração clorofórmica (BvF C), para que fosse possível calcular a IC₅₀ do extrato e, a partir daí, realizar o teste de viabilidade em cultura primária de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e realizar outros ensaios para avaliar a ação desse extrato.

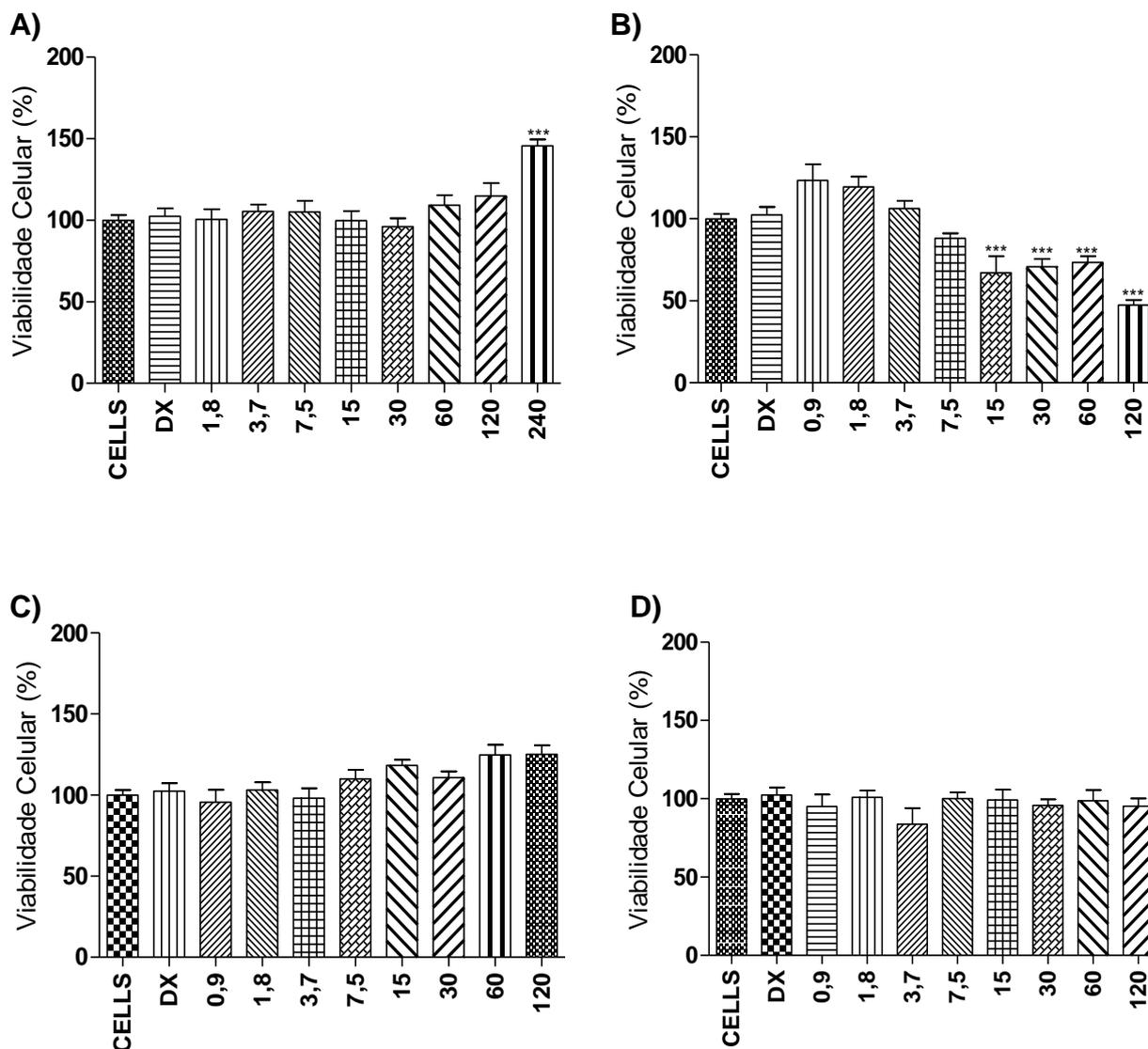
Figura 11 – Efeito do extrato bruto e fracionados de *Bowdichia virgilioides* na viabilidade celular da linhagem A549.



NOTA: Gráficos de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto e frações da folha de *Bowdichia virgilioides* após 24h de tratamento. A549 – célula de adenocarcinoma pulmonar; A) EABF: extrato bruto aquoso da folha de *Bowdichia virgilioides*; B) BvF C: fração clorofórmica da folha; C) BvF Ac: fração acetato da folha; D) BvF MA: fração metanol-água da folha; CIS: cisplatina (40 µg/ mL); CELLS: controle de células sem tratamento, onde ***: $p < 0,001$, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora, 2015.

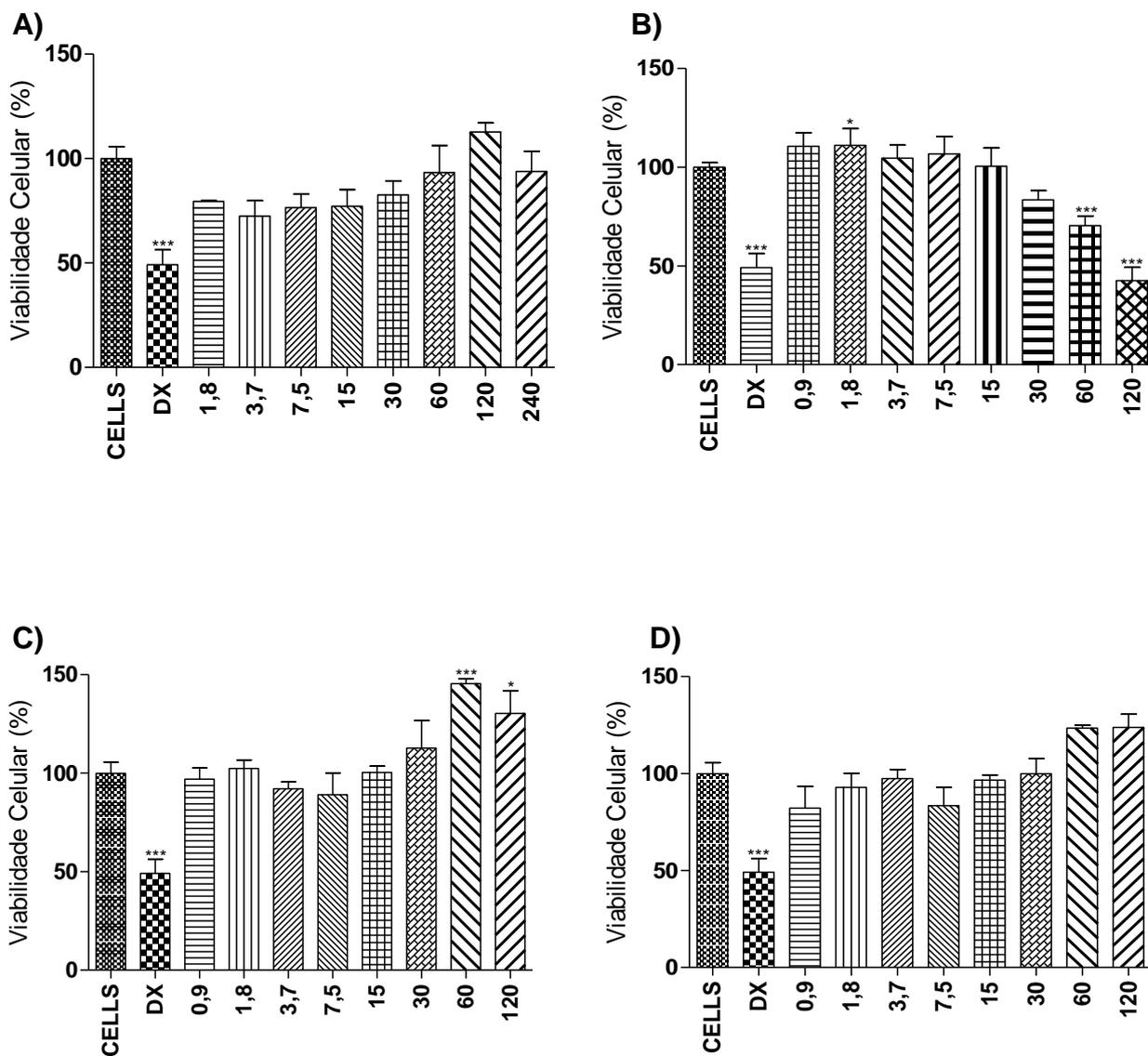
Figura 12 - Efeito do extrato bruto e fracionados de *Bowdichia virgilioides* na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-435S.



NOTA: Gráficos de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto e frações da folha de *Bowdichia virgilioides* em 24h de tratamento. MDA-MB-435S – célula de melanoma; A) EABF: extrato bruto aquoso da folha de *Bowdichia virgilioides*; B) BvF C: fração clorofórmica da folha; C) BvF Ac: fração acetato da folha; D) BvF MA: fração metanol-água da folha; DX: doxorubicina (0,5 µg/ mL); CELLS: controle de células sem tratamento, onde ***: $p < 0,001$, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora, 2015.

Figura 13 - Efeito do extrato bruto e fracionados de *Bowdichia virgilioides* na viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM.

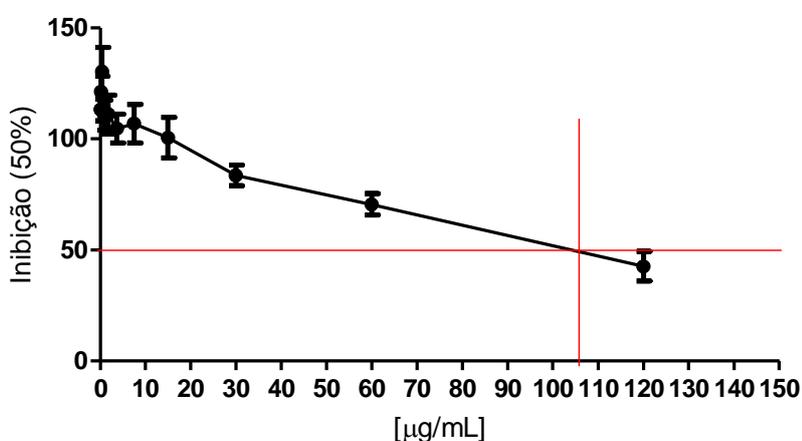


NOTA: Gráficos de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto e frações da folha de *Bowdichia virgilioides* em 24h de tratamento. CCRF-CEM – célula de leucemia linfoblástica T; A) EABF: extrato bruto aquoso da folha de *Bowdichia virgilioides*; B) BvF C: fração clorofórmica da folha; C) BvF Ac: fração acetato da folha; D) BvF MA: fração metanol-água da folha; DX: doxorubicina (0,5 µg/mL); CELLS: controle de células sem tratamento, onde ***: p < 0,001; *: p < 0,05, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

O gráfico obtido pelo programa Prism 5 (GraphPad Prism[®]) como resultado do cálculo da IC₅₀ da fração clorofórmica (Figura 14), foi obtido a partir de regressão não linear. A concentração que inibe 50% (IC₅₀) da viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM encontrada, foi de 109,7 µg/ mL, esse valor foi arredondado e a IC₅₀ de 110 µg/ mL foi utilizada para os testes realizados posteriormente com a linhagem CCRF-CEM e em cultura primária (PBMC).

Figura 14 - IC₅₀ do extrato BvF C.

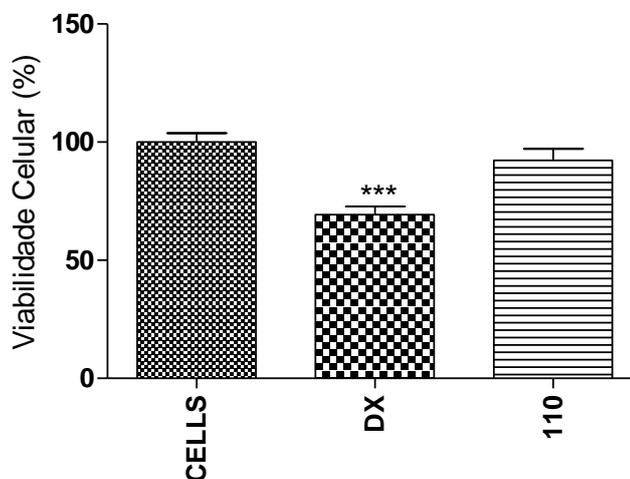


NOTA: Gráfico representando a IC₅₀ da fração clorofórmica da folha de *Bowdichia virgilioides* obtida a partir do gráfico da figura 12.B. CCRF-CEM – célula de leucemia linfoblástica T. Cálculo feito por meio de regressão não linear.

Fonte: Autora 2015.

A figura 15 mostra os resultados da fração clorofórmica, onde foi feito o tratamento apenas com a IC₅₀ encontrada, em cultura primária de células mononucleares de sangue periférico humano. O extrato não mostrou efeito sobre essas células, enquanto que o controle quimioterápico utilizado (doxorubicina) foi capaz de inibir a viabilidade celular de forma significativa em relação ao controle de células sem tratamento.

Figura 15 - Efeito da fração clorofórmica de *Bowdichia virgilioides* na viabilidade celular da cultura primária de PBMC.



NOTA: Gráfico de viabilidade celular (MTT) após tratamento com a fração clorofórmica da folha de *Bowdichia virgilioides* em 24h de tratamento. PBMC – células mononucleares de sangue periférico; BvF C: fração clorofórmica da folha; DX: doxorubicina (0,5 µg/ mL); CELLS: controle de células sem tratamento, onde ***: $p < 0,001$, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

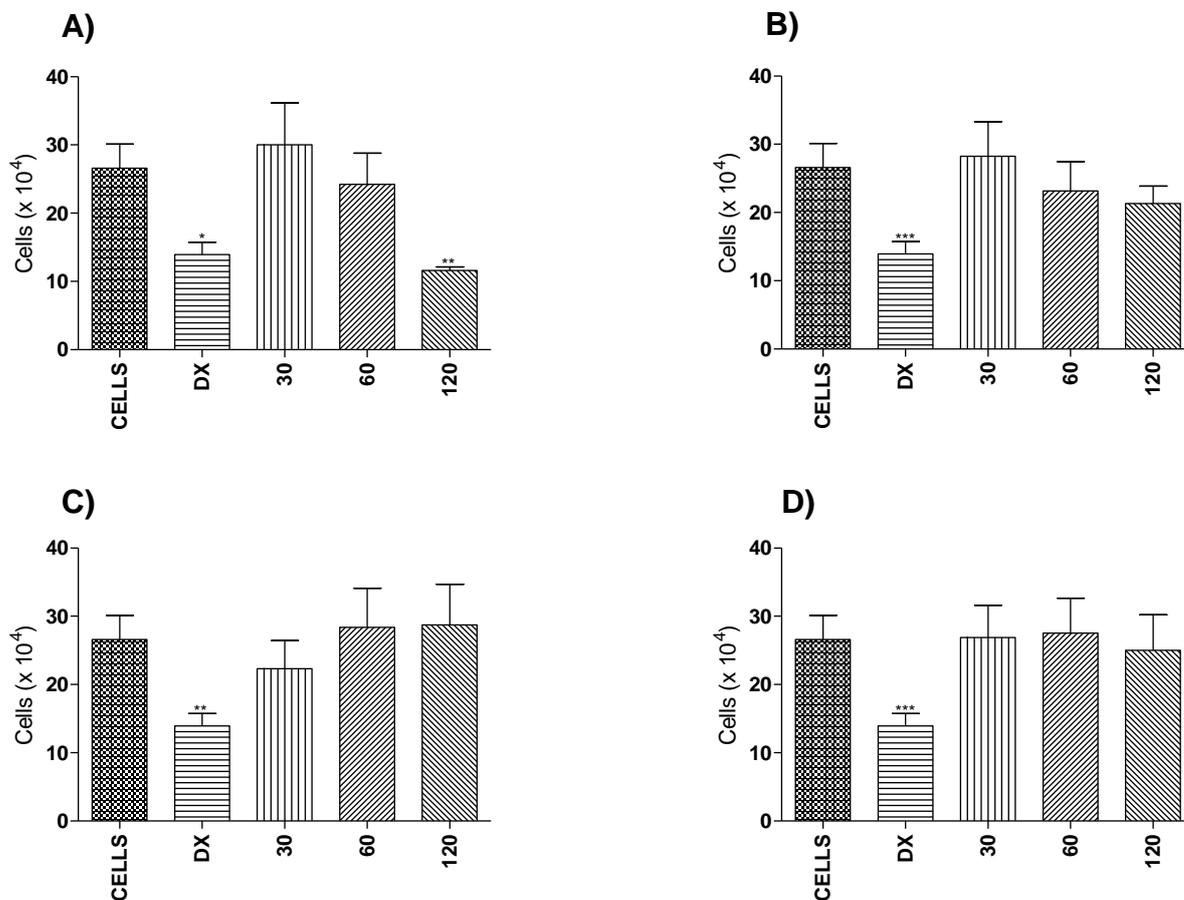
Para a avaliação da viabilidade celular por exclusão com o azul de tripan na linhagem CCRF-CEM, foram testadas apenas as concentrações de 30, 60 e 120 µg/ mL de cada extrato, após 24h (Figura 16). O extrato bruto da folha (EABF) inibiu significativamente a viabilidade celular na concentração de 120 µg/ mL quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 16-A).

Nenhum dos outros 3 extratos, nas concentrações testadas, diminuíram a viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM.

Quando avaliado em cultura de células primárias (PBMC), a fração clorofórmica, testada em sua IC_{50} , não diminuiu a viabilidade, enquanto que o quimioterápico doxorubicina mostrou uma inibição significativa em relação ao controle sem tratamento (Figura 17).

O tratamento das células (CCRF-CEM e PBMC) com dimetilsulfóxido (DMSO 1%) não alterou a viabilidade celular (dados não mostrados) após o tratamento por 24h.

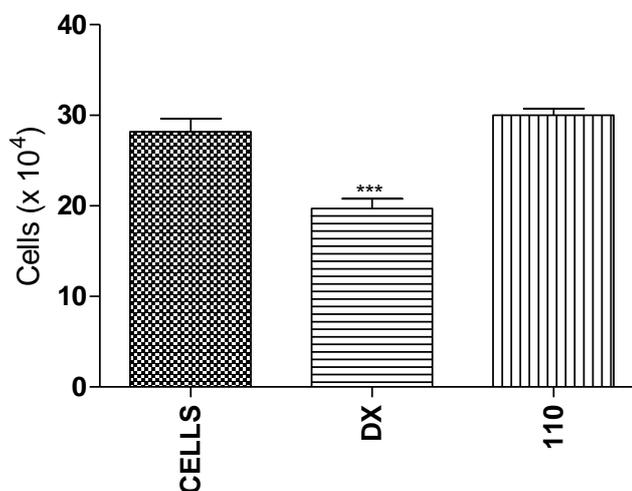
Figura 16 – Análise da viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM após tratamento com o extrato bruto e frações de *Bowdichia virgilioides*.



NOTA: Gráficos de viabilidade celular do extrato bruto e frações da folha de *Bowdichia virgilioides* em 24h de tratamento. CCRF-CEM – célula de leucemia linfoblástica T; A) EABF: extrato bruto aquoso da folha de *Bowdichia virgilioides*; B) BvF C: fração clorofórmica da folha; C) BvF Ac: fração acetato da folha; D) BvF MA: fração metanol-água da folha; DX: doxorubicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); CELLS: controle de células sem tratamento, onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

Figura 17 - Efeito do extrato clorofórmico de *Bowdichia virgilioides* na viabilidade celular da cultura primária de PBMC.



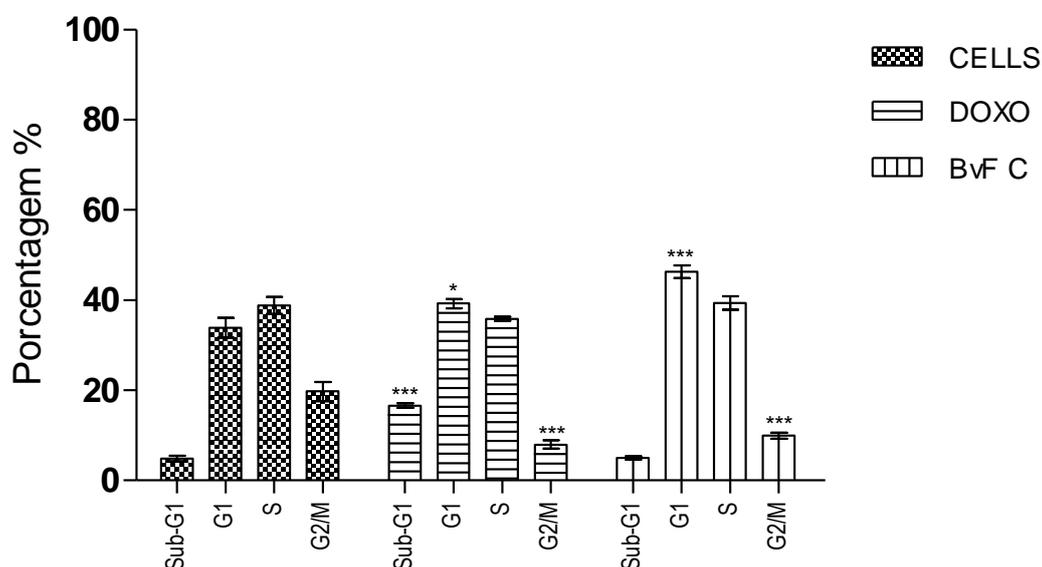
NOTA: Gráfico de viabilidade celular da fração clorofórmica da folha de *Bowdichia virgilioides* em 24h de tratamento. PBMC – células mononucleares de sangue periférico; BvF C: fração clorofórmica da folha; DX: doxorubicina (0,5 µg/ mL); CELLS: controle de células sem tratamento, onde ***: $p < 0,001$, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

5.4 Efeito sobre o ciclo celular da linhagem CCRF-CEM após tratamento com BvF C

Na análise das fases do ciclo celular (Figura 18), o extrato BvF C mostrou um significativo aumento da fase G1, de 34% para 46%, e diminuição da fase G2/M, de 20% para 10%, quando comparado as mesmas fases da célula sem nenhum tratamento (CELLS). Por outro lado, as fases Sub-G1 e S não mostraram nenhuma alteração, mantiveram o mesmo perfil que a linhagem tumoral sem tratamento, com 5% e 39%, respectivamente.

Figura 18 – Efeito do BvF C no ciclo celular da linhagem CCRF-CEM.



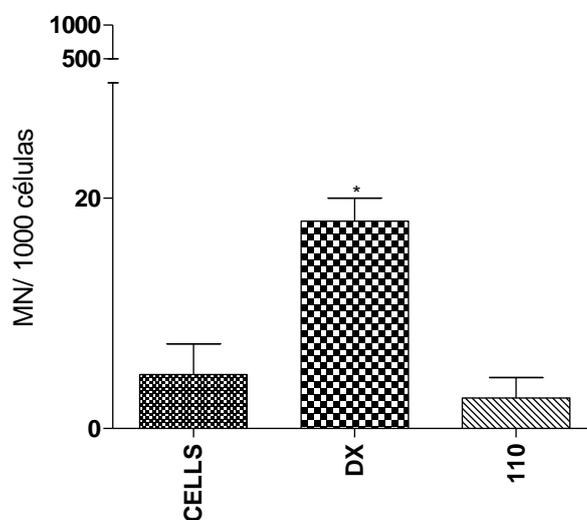
NOTA: **Gráfico de ciclo celular da fração clorofórmica da folha de *Bowdichia virgilioides* em 24h de tratamento.** CCRF-CEM – leucemia linfoblástica T; BvF C: fração clorofórmica da folha (110 µg/ mL); DOXO: doxorubicina (0,5 µg/ mL); CELLS: controle de células sem tratamento. Valores representados como média aritmética ± erro padrão da média, análise de variância pelo teste *Two-Way ANOVA* e o teste *t* de *Student* seguido do teste de comparações de *Bonferroni*, com nível de significância selecionado para $p < 0.05$, onde ***: $p < 0,001$, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

5.5 Efeitos do BvF C sobre o DNA da linhagem CCRF-CEM

Para a avaliação da indução de micronúcleos, foi feita a contagem de 1000 células/ amostra. A fração clorofórmica foi testada na concentração de 110 µg/ mL e, após 24h de tratamento, não foi observado nenhuma formação significativa de micronúcleos em relação ao controle de células não tratadas (CELLS), apenas o controle quimioterápico mostrou um aumento significativo (Figura 19).

Figura 19 – Efeito do BvF C na taxa de micronúcleos após tratamento de 24h.



NOTA: Gráfico representado pela média e o erro padrão da média do tratamento de 24h na linhagem de leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM). Os dados foram analisados pelo teste de One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls, ($p < 0,05$). CELLS: células sem tratamento; DX: doxorubicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); BvF C: fração clorofórmica do extrato bruto aquoso da folha de *Bowdichia virgilioides* (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$); *: $p < 0,05$ em relação ao controle sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

Na análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa alcalino, o tratamento com o extrato BvF C, assim como o controle de células sem tratamento (CELLS), não induziu danos irreparáveis ao DNA da linhagem CCRF-CEM, apresentando danos de classe 0 em sua maioria. O grupo tratado com o controle quimioterápico doxorubicina, mostrou danos ao DNA de classes 3 e 4 em grande quantidade, sendo a sua unidade arbitrária estatisticamente significativa em relação ao grupo de células sem tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos do BvF C sobre o DNA da linhagem CCRF-CEM após 24h de tratamento.

ENSAIO DE COMETA ALCALINO – CCRF-CEM 24h					
Tratamentos	Níveis de Danos no DNA				U.A. (0 a 300)
	classe 0	classe 1	classe 2	classe 3	
CELLS	95,33 ± 1,85	3,33 ± 1,20	0,67 ± 0,33	0,67 ± 0,33	6,67 ± 3,18
DX	6,00 ± 6,00	6,00 ± 1,00	22,00 ± 2,00	66,00 ± 9,00	248,00 ± 22,00 ^{***}
BvF C	96,67 ± 0,88	2,00 ± 0,58	1,33 ± 0,67	0,00 ± 0,00	3,33 ± 1,87

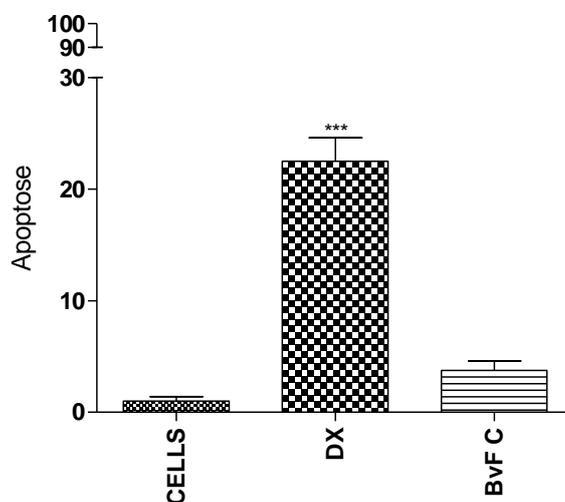
NOTA: Valores representados como média aritmética ± erro padrão da média, análise de variância pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$, onde ^{***}: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo. CELLS – CCRF-CEM sem tratamento; DX – doxorrubicina (0,5 µg/ mL); BvF C – fração clorofórmica da folha de *B. virgilioides* (110 µg/ mL). UA: valor da unidade arbitrária de degradação calculada para o tratamento de 24 horas.

Fonte: Autora 2015.

5.6 Efeitos de BvF C sobre a apoptose na linhagem CCRF-CEM

Não foi observado aumento da taxa de apoptose no grupo tratado com a fração clorofórmica (BvF C), enquanto que o quimioterápico doxorrubicina aumentou significativamente a apoptose, em relação ao controle de células sem tratamento (Figura 20).

Figura 20 – Efeito do BvF C na taxa de apoptose após 24h de tratamento.



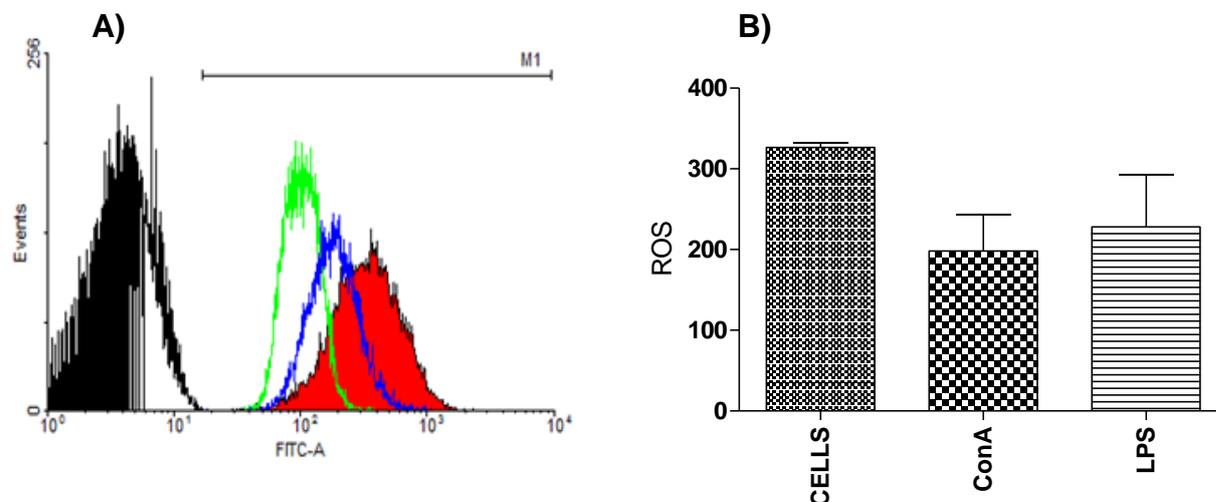
NOTA: Gráfico representado pela média e o erro padrão da média após tratamento de 24h na linhagem de leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM). Os dados foram analisados pelo teste de Student-Newman-Keuls, ($p < 0,05$). CELLS: células sem tratamento; DX: doxorubicina ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$); BvF C: fração clorofórmica do extrato bruto aquoso da folha de *Bowdichia virgilioides* ($\text{IC}_{50} = 110 \mu\text{g}/\text{mL}$); ***: $p < 0,001$ em relação ao controle sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

5.7 Efeito do tratamento com BvF C sobre a produção de ROS por células de leucemia linfoblástica T

No ensaio piloto para determinar o perfil de espécies reativas de oxigênio intracelular e o perfil da célula após receber estímulo com Con A e LPS (Figura 21), observou-se que o nível de ROS produzido pela linhagem tumoral CCRF-CEM não apresentou diferença estatística em relação à CCRF-CEM quando estimulada com Con A ou LPS. Diante desse resultado, não foi utilizado nenhum estímulo para avaliar a produção de EROS nas células tratadas com BvF C.

Figura 21 - Acumulação de ROS intracelular na linhagem CCRF-CEM.

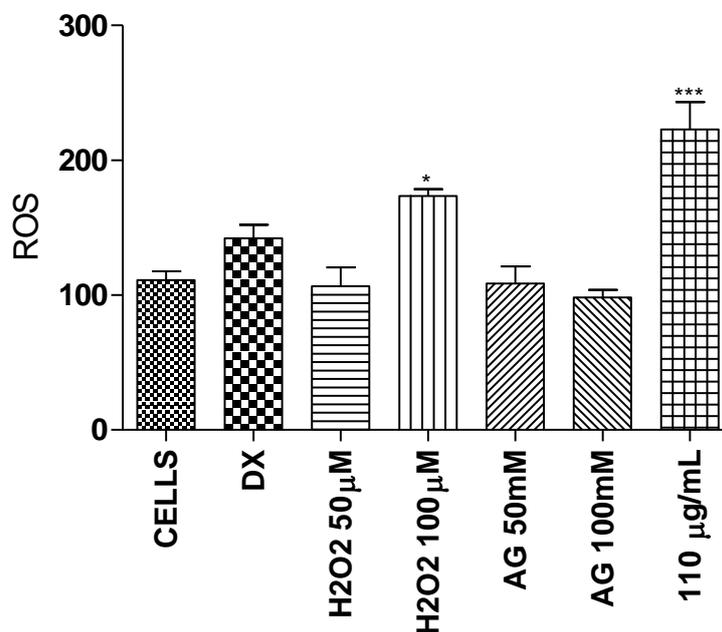


NOTA: **Efeito da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) após 24h de tratamento.** CCRF-CEM – leucemia linfoblástica T. A) Histograma representando a fluorescência emitida pela presença de ROS intracelular. Em preto-e-branco, a representação da célula sem DCF; em vermelho, o controle basal (célula sem estímulo + DCF); em verde, o controle célula + Con A (estímulo); em azul, o controle célula + LPS (estímulo). B) Gráfico em barras representativo do histograma. LPS: lipopolissacarídeo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Con A: concanavalina A (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Valores representados como média aritmética \pm erro padrão da média, $n = 4$, análise de variância pelo teste *One-Way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Kewls*.

Fonte: Autora 2015.

O aumento significativo de ROS intracelular na linhagem CCRF-CEM só foi observado nos grupos tratados com a fração clorofórmica (BvF C 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e com o peróxido de hidrogênio na concentração de 100 μM (Figura 22), em relação ao controle de ROS basal (células sem tratamento).

Figura 22 - Efeito do BvF C na indução de ROS em CCRF-CEM.

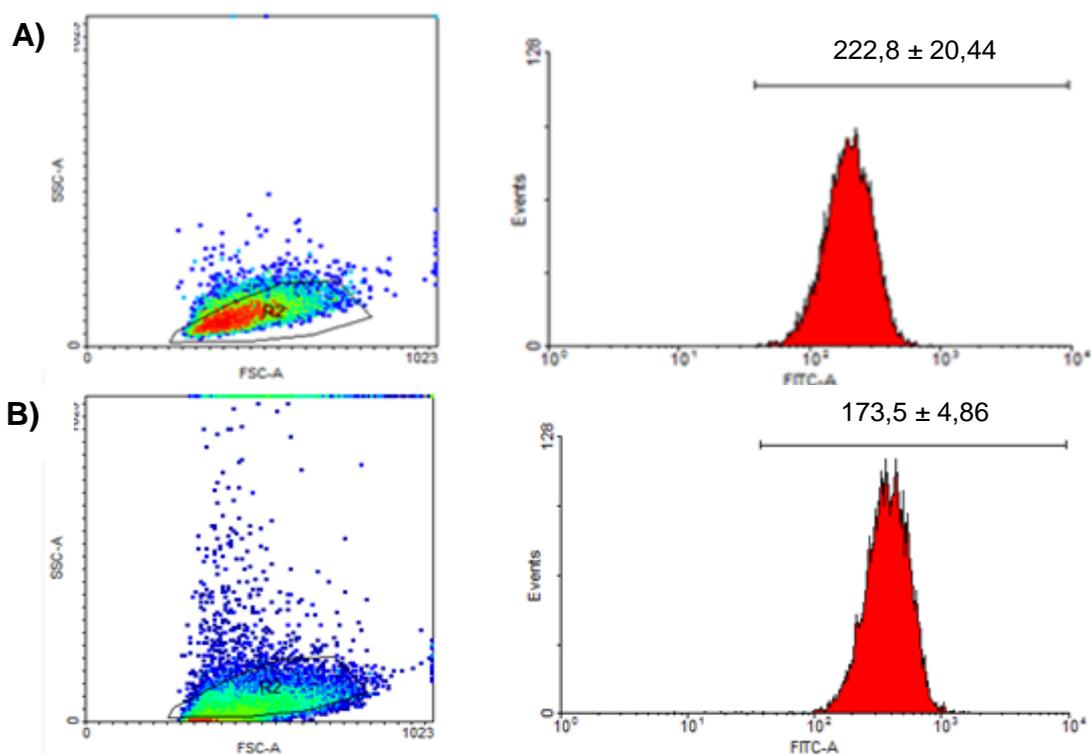


NOTA: Gráfico representando a acumulação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) após 24h de tratamento. CCRF-CEM – leucemia linfoblástica T. CELLS: células sem tratamento + DCF (controle basal); DX: doxorubicina (0,5 μg/ mL) + DCF; H2O2 (50 μM) + DCF (controle pró oxidante); H2O2 (100 μM) + DCF (controle pró oxidante); AG: ácido gálico (50 mM) + DCF (controle antioxidante); AG: ácido gálico (100 mM) + DCF (controle antioxidante); BvF C (110 μg/ mL) + DCF. Valores representados como média aritmética ± erro padrão da média, análise de variância pelo teste *One-Way ANOVA* e o teste *t* de *Student* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Kewls*, com nível de significância selecionado para $p < 0,05$, onde ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$, em relação ao controle de células sem tratamento.

Fonte: Autora 2015.

Esse aumento de ROS provocado pelo tratamento com o peróxido de hidrogênio (100 μM) ocasionou a morte das células. Pôde-se observar o aumento do tamanho e da granulosidade destas (Figura 23-B), enquanto que o tratamento com o extrato clorofórmico aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, mas não levou à morte celular (Figura 23-A).

Figura 23 - Representação da acumulação de ROS em CCRF-CEM.



NOTA: Efeito da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) após 24h de tratamento. CCRF-CEM – leucemia linfoblástica T. **A)** Ao lado esquerdo: Representação em *dotplot* (Granulosidade x tamanho) do tratamento com a fração clorofórmica (BvF C), na concentração de 110 µg/ mL. À direita: Histograma representando a fluorescência emitida pela presença de ROS intracelular. **B)** Ao lado esquerdo: Representação em *dotplot* (Granulosidade x tamanho) do tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na concentração de 100 µM. À direita: Histograma representando a fluorescência emitida pela presença de ROS intracelular.

Fonte: Autora 2015.

6 DISCUSSÃO

Devido aos mais variados efeitos farmacológicos de *Bowdichia virgilioides* já descritos, além da atividade genotóxica do extrato aquoso bruto da folha em estudos *in vivo* realizados pelo nosso laboratório (SOUZA, 2012), esse trabalho avaliou, qualitativamente, os metabólitos secundários presentes no extrato e nas suas frações, além de avaliar o potencial anticâncer em algumas linhagens tumorais humanas e de que forma interferem na proliferação dessas células. A avaliação do efeito do extrato em cultura primária de células mononucleares de sangue periférico humano foi importante para se estabelecer uma comparação da ação do extrato em células normais.

Apesar de solventes com alta polaridade, como a água, e solventes com polaridade muito baixas, ou apolares, como hexano e diclorometano, não serem bons extratores (LIU et al., 2000), a extração da folha foi feita com água, com o objetivo de testar o extrato da mesma forma em que ele é popularmente consumido, como chá. A água não foi um extrator tão eficiente, onde se obteve um rendimento de apenas 2,63% (Tabela 1, página 46). Apesar de ser considerada o extrator universal, em combinação com outros solventes orgânicos, é possível criar uma solução moderadamente polar, favorecendo a extração de polifenóis (LAPORNIK; PROŠEK; WONDRA, 2005; LIYANAPATHIRANA; SHAHIDI, 2005). Nossos resultados estão de acordo com a literatura onde, na partição com o solvente hexano não se obteve nenhum rendimento e a partição com metanol:água resultou no maior rendimento obtido.

Muitos estudos já foram realizados com espécies da família Fabaceae devido a vasta gama de espécies com propriedades terapêuticas. Alguns trabalhos publicados comprovaram algumas atividades farmacológicas de *B. virgilioides* (Quadro 2, página 34), embora ainda sejam poucos os que avaliam a presença dos constituintes presentes na planta. Flavonas foram isoladas de raízes frescas dessa espécie, além de alguns componentes voláteis. Nesse mesmo trabalho, o geraniol (um álcool terpênico) e o carofileno (um sesquiterpeno) foram isolados dos frutos e alcalóides e terpenos foram isolados da casca do caule dessa espécie (ARRIAGA; GOMES; BRAZ-FILHO, 2000).

Dentre os metabólitos secundários presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, como flavonoides (PRADO, 2009). Entretanto, apenas um trabalho realizado com a folha de *B. virgilioides* foi publicado, onde o extrato aquoso da folha mostrou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (THOMAZZI et al., 2010). Os alvos de pesquisas relacionadas com as atividades farmacológicas e compostos químicos presentes nessa espécie, geralmente são partes da planta como raízes, casca e frutos. Em um estudo com a casca de *B. virgilioides*, foi possível isolar dois isoflavonóides e uma isoflavona, conhecida como calicosin (JUCK et al., 2006). Além de flavonóides, alcaloides também já foram isolados. Barbosa e colaboradores (2004) isolaram um novo alcaloide, conhecido como bowdichine, da casca de *B. virgilioides*. Triterpenóides (como o lupeol), estigmasterol, sitosterol (éster de esteroide) e um novo composto chamado de bowdenol (dihidrobenzofuranóide), foram isolados da casca do caule de *Bowdichia virgilioides* em um trabalho realizado por Melo e colaboradores, (2001). *In vivo*, o extrato bruto da casca mostrou atividade antinociceptiva (SILVA et al., 2010) e anti-inflamatória (THOMAZZI et al., 2010).

Estudos de toxicidade com a casca mostraram que, dentre outras espécies da família Fabaceae que foram estudadas, a espécie *B. virgilioides* possuía uma interessante atividade *in vitro* e *in vivo* contra malária (DEHARO et al., 2001). Estudos do nosso laboratório indicam uma atividade genotóxica do extrato aquoso da casca *in vivo*, quando se utilizou uma concentração 10 vezes maior que a DI_{50} (16,04 mg/ kg) em camundongos Swiss (MATOS, 2012).

Apesar de não existirem, até o presente momento, dados publicados relatando possíveis constituintes da folha de *B. virgilioides*, há publicações com outras espécies da família Fabaceae que mostram a presença de classes de metabólitos secundários que também foram encontrados no presente estudo, corroborando com nossos resultados. Flavonas foram encontradas e isoladas em um estudo com folhas de *Caesalpinia ferrea* Mart (NAWWAR et al., 2014); Spindola e colaboradores (2014) identificaram flavonoides e taninos condensados no extrato da folha de *Cassia australis*; alcaloides, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos, taninos, saponinas, esteroides e flavonoides foram encontrados nas espécies *Lonchocarpus cyanescens* e *Leptoderris micrantha* (SONIBARE; OKE; SOLADOYE, 2014). Lactonas como cumarinas também foram isoladas na espécie *Sophora interrupta* (RAMMOHAN et al., 2014), bem como chalconas (cetonas aromáticas) de

folhas *Flemingia grahamiana* (GUMULA et al., 2014). De acordo com a prospecção fitoquímica realizada com o extrato bruto da folha e suas frações, a maioria dos metabólitos secundários encontrados são taninos (compostos fenólicos) e saponinas (glicosídeos), presentes nos 4 extratos, seguido dos flavonoides, que só não foram detectados no extrato BvF Ac, triterpenóides, catequinas e xantonas (Quadro 3, página 47).

O extrato bruto aquoso da folha e a fração clorofórmica, demonstraram um potencial anticâncer frente a algumas linhagens tumorais testadas. O extrato bruto (EABF) mostrou uma significativa inibição da linhagem de adenocarcinoma pulmonar (A549), nas concentrações de 1,8 a 30 µg/ mL, sendo tão efetivo quanto o quimioterápico utilizado para esse tipo de neoplasia a cisplatina (40 µg/ mL), apesar de essa inibição não chegar a inibir 50% da viabilidade (Figura 11-A, página 49). Esse é um dado importante, pois, por se tratar de um extrato bruto, com vários compostos presentes, ele foi tão efetivo quanto um composto puro. De acordo com a concentração de 50 µg/ mL (para extratos brutos) adotada pelo *National Cancer Institute* dos Estados Unidos – NCI - (SKEHAN et al., 1990), o EABF pode ser considerado um extrato promissor.

Dados da Organização Mundial de Saúde (2012) revelam que o câncer de pulmão é o primeiro mais frequente entre os homens e o terceiro mais frequente entre as mulheres, além de ser o tipo de câncer que mais mata atualmente (1,59 milhões de mortes). Mais testes são necessários com o extrato bruto e com a linhagem A549, a fim de se estabelecer uma concentração mínima efetiva e quais os possíveis mecanismos pelos quais o extrato atua. Outras linhagens de tumor de pulmão, como H292, H2170, H1299, também podem ser testadas para avaliar o efeito do extrato bruto. Essa atividade anticâncer do extrato bruto da folha pode ser associada com a quantidade de flavonoides presentes. Hassan e colaboradores (2014) publicaram um trabalho que correlaciona a atividade anticâncer de plantas da família Fabaceae com flavonoides e outros compostos fenólicos presentes, utilizando as linhagens de câncer de mama (MCF-7) e cólon (HCT 116). Em outro estudo, foi demonstrado que o extrato etanólico da folha de *Abrus precatorius* (Fabaceae) foi capaz de inibir linhagens tumorais de adenocarcinoma de cólon (Colo-205), retinoblastoma (Y79), carcinoma hepatocelular (Hep-G2) e leucemia (SupT1), (GUL et al., 2013).

A fração clorofórmica (BvF C) foi o extrato capaz de inibir a viabilidade celular das três linhagens tumorais testadas. Tanto na linhagem de melanoma (Figura 12-B, página 50) quanto na linhagem de leucemia linfoblástica T (Figura 13-B, página 51), o extrato BvF C inibiu mais de 50% da viabilidade celular, mas a IC_{50} desse extrato foi calculada para a linhagem de leucemia (Figura 14, página 52) pela possibilidade de comparar os resultados obtidos nesta linhagem com os resultados em cultura primária de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Além disso, o controle quimioterápico doxorrubicina que foi utilizado na linhagem MDA-MB-435S, não foi capaz de inibir a viabilidade celular na concentração testada (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dados publicados mostram que a doxorrubicina só tem efeito sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-435S em concentrações igual ou superior a (\geq) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, corroborando com os dados obtidos neste estudo (YU et al., 2012). Novos ensaios são necessários com a MDA-MB-435S, utilizando concentrações maiores da doxorrubicina ou outras drogas quimioterápicas utilizadas para essa terapia, como o paclitaxel, além de definir a IC_{50} nessa linhagem. Não foi possível calcular a IC_{50} para os demais extratos e linhagens.

O efeito inibitório da fração clorofórmica pode estar associado à presença de flavonoides e triterpenóides, constituintes que também se encontram no extrato aquoso bruto (EABF), porém de forma mais “pura” nesta fração, enquanto nas frações acetato de etila e metanol-água não estão presentes (Quadro 3, página 47). Dados da literatura mostram que flavonoides e triterpenóides estão associados ao tratamento de diversas doenças, incluindo os mais variados tipos de câncer. Já foram descritos seu potencial anticâncer e feitas algumas especulações de como os triterpenóides podem regular fatores de transcrição e de crescimento, citocinas inflamatórias e vias de sinalização intracelular envolvidas na proliferação de células cancerígenas, apoptose e angiogênese do tumor (PATLOLLA; RAO, 2012). Flavonoides isolados de folhas de *Cajanus Cajan* (Fabaceae) foram citotóxicos contra linhagens tumorais, incluindo a linhagem de leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM), (ASHIDI et al., 2010). Saponinas também são úteis contra o câncer, embora seu uso medicinal seja comumente como antimicrobianos. Saponinas isoladas de folhas de *Glochidion glomerulatum*, mostraram moderada atividade citotóxica contra linhagens tumorais de pulmão, de cólon, de ovário e de mama - A549, HT-29, OVCAR e MCF-7, respectivamente - (THU et al, 2015). Saponinas e flavonóides

isolados de *Acacia saligna* (Fabaceae) mostraram atividade antioxidante e atividade citotóxica contra células de hepatocarcinoma (Hep-G2), (GEDARA; GALALA, 2013).

Para avaliar os efeitos desse extrato sobre a viabilidade em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), o extrato foi testado em sua IC₅₀. Quando analisado em cultura primária de PBMC pelo ensaio do MTT, a fração clorofórmica não inibiu a viabilidade celular, já o quimioterápico doxorrubicina, inibiu cerca de 30% da viabilidade quando comparado ao controle de células sem tratamento (Figura 15, página 53).

A partir desse dado, foi feita a análise da viabilidade pelo ensaio de exclusão com azul de tripan, para avaliar se, a diminuição da viabilidade celular observada na linhagem CCRF-CEM, acarretava em um aumento da morte celular. Essa análise foi feita com o extrato bruto e suas três frações. No caso do extrato bruto (EABF), como a concentração de 240 µg/ mL não mostrou nenhum efeito na linhagem CCRF-CEM, foram utilizadas as concentrações de 30, 60 e 120 µg/ mL para a os quatro extratos. Não houve uma diminuição significativa da viabilidade celular após o tratamento com o extrato bruto e frações (Figura 16, página 54) e nenhum dos quatro extratos testados levaram à morte da célula (dados não mostrados), quando analisados pelo ensaio de exclusão com azul de tripan. Quando testado em cultura primária de PBMC (Figura 17, página 55), a fração clorofórmica em sua IC₅₀ não interferiu na viabilidade celular, assim como visto no ensaio do MTT (Figura 13, página 51).

Esses resultados sugerem que o extrato BvF C causa inibição da viabilidade celular sem levar a célula à morte, além de se mostrar seletivo, inibindo a viabilidade apenas de células tumorais. Estudos com extratos contendo terpenos e flavonoides também mostraram uma atividade seletiva contra células de leucemia, confirmando nossos resultados. O ácido pseudolarix B, um diterpeno isolado da casca de *Pseudolarix amabilis*, inibiu seletivamente o crescimento de células de três linhagens de leucemia humana, HL-60, CCRF-CEM e K562, mas não inibiu o crescimento de PBMC (MA et al., 2010). O tratamento feito com seis flavonoides, incluindo chalconas entre outros, na linhagem CCRF-CEM e outras linhagens tumorais mostraram que dois destes apresentaram atividade antileucêmica seletiva. Sugeriu-se que essa seletividade pode ser resultado de diferenças celulares na absorção e metabolismo de drogas, ou diferentes ativações bioquímicas e fisiológicas e na transdução de várias vias de sinalização (KUETE et al., 2013a).

As células tumorais variam nas suas respostas a diversos tratamentos, provavelmente refletindo o(s) tipo(s) particular(es) de defeito(s) que possuem, seja no reparo do DNA, nos pontos de checagem do ciclo celular ou no controle da apoptose (ALBERTS et al, 2010b), como por exemplo o tratamento com o quimioterápico doxorrubicina, onde sua citotoxicidade está ligada a produção de espécies reativas de oxigênio, entre outros radicais, os quais interagem com o DNA, proteínas e membranas celulares (CHOI et al., 2007).

Nesse sentido, buscando avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o extrato BvF C pode estar agindo - alterações no ciclo celular da linhagem leucêmica, acúmulo de EROS intracelular, apoptose e efeitos genotóxicos; que esses ensaios foram realizados. O tratamento com o extrato (IC_{50}) ocasionou um aumento da fase G1 e diminuição da fase G2/M, quando comparado com o grupo de células sem tratamento (Figura 18, página 56). Já o quimioterápico doxorrubicina levou a um aumento da fase Sub-G1 (fase que caracteriza a apoptose no ciclo celular, pois são fragmentos de DNA) e da fase G1, além de uma diminuição da fase G2/M. Em CCRF-CEM, a doxorrubicina, diminuiu a viabilidade celular, pela parada do ciclo celular (pelo aumento da fase G1 e diminuição da fase G2/M) e pela morte celular por apoptose (aumento da fase Sub-G1). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a doxorrubicina é um antibiótico citotóxico que age intercalando a dupla hélice do DNA, formando um complexo com a topoisomerase II e o DNA, provocando quebras na dupla hélice. Indiretamente, inibe a topoisomerase II, interage com as membranas celulares e mitocondriais, altera a transmissão de sinais intracelulares e gera radicais livres, desencadeando um processo de morte celular por apoptose (ANVISA, 2000). Marzena e Jozwiak (2014) mostraram em seu trabalho com a linhagem CCRF-CEM que a doxorrubicina é um eficiente agente redutor da proliferação celular, pois foi capaz de deter o ciclo celular, levando a um aumento de células na fase S, além do aumento da fase Sub-G1 (apoptose).

Sugerimos que o extrato clorofórmico, de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, induz a parada do ciclo celular, devido ao aumento da fase G1 e diminuição da fase G2/M, mas não leva à morte por apoptose, já que não foi observado um aumento da fase Sub-G1, após o tratamento de 24 horas - tempo necessário para as células completarem seu ciclo celular (DIAS et al., 2014). Essa interferência no ciclo celular pode ser devido a modulações no ponto de restrição na fase G1, que regula a passagem para as próximas fases do ciclo. Sabe-se que a

passagem de uma fase para outra é controlada por fatores de regulação nos pontos de checagem do ciclo celular (CHOI et al., 2007). Os componentes do sistema de controle do ciclo celular são membros de uma família de cinases conhecidas como *cinases dependentes de ciclinas* (Cdk's). As ciclinas D, E, A e B regulam as fases G1, G1/S, S e M, respectivamente (Quadro 1, página 20). Dentre todas as classes de ciclinas, as ciclinas do tipo D são particularmente importantes para o estudo do câncer, pois são expressas em todos os tipos de células proliferativas (MUSGROVE et al., 2011). A ciclina D1, por exemplo, é superexpressa na maioria dos casos de câncer mamário (FU et al., 2004), enquanto que a superexpressão de ciclinas D2 é observada em tumores linfóides (DESHPANDE; SICINSKI; HINDS, 2005).

A análise de danos ao DNA pelo ensaio de cometa mostrou uma predominância de classe 0 e 1 nos grupos tratados com o extrato clorofórmico, indicando que o extrato não induziu danos genômicos (Tabela 2, página 58). Apesar de ser o primeiro estudo em que se avalia *in vitro* o potencial genotóxico de extratos da folha de *Bowdichia virgilioides*, já existem trabalhos publicados com outras espécies da família Fabaceae onde não foi observado efeitos genotóxicos (MACÊDO et al., 2008; ZAMPINI et al., 2008; DIAS et al., 2014). Tal ausência de efeito genotóxico da fração clorofórmica pode ser devido aos constituintes químicos presentes, como flavonoides, triterpenóides e saponinas. O consumo de produtos naturais contendo flavonoides, triterpenóides, saponinas, esteroides e alcaloides, levou a uma redução de 40 para 58% o risco de câncer ao longo de 13 a 30 anos (NEUHOUSER, 2004). Os compostos fenólicos, além de serem conhecidos pela sua atividade antioxidantes, possuem atividade antitumoral devido a sua capacidade de inibir a gênese do tumor, bloqueando a fase de promoção (CHANG; KINGHORN, 2001). As saponinas são conhecidas por serem antimutagênicas (CABALLERO-GEORGE et al., 2004; PATEL; SHUKLA; GUPTA, 2007) e em um estudo que se avaliou um extrato rico desse metabólito, foi observado um efeito protetor ao DNA das células expostas ao quimioterápico ciclofosfamida, com atividade genotóxica conhecida (BERHOW et al., 2000). Estudos mostram que os triterpenóides não possuem atividade genotóxica (VILLASEÑOR et al., 2004).

Para avaliar especificamente a indução ou não de apoptose celular, foi realizado o ensaio de apoptose por difusão em gel. Os resultados do tratamento das células CCRF-CEM com BvF C não mostrou aumento significativo da taxa de apoptose quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 20, página 60),

tendo o grupo tratado com doxorrubicina um aumento significativo da taxa de apoptose, confirmando os dados obtidos na análise do ciclo celular.

O nível de ROS intracelular observado pelo tratamento com doxorrubicina (0,5 ug/mL) e peróxido de hidrogênio (50 μ M), não foram significativos em relação ao controle sem tratamento, pois a célula tumoral já produz um nível basal de ROS aumentado em relação a células normais (Figura 22, página 61). Espécies reativas de oxigênio são subprodutos de reações metabólicas e as células tumorais tem uma atividade metabólica exacerbada, requerendo altos níveis de ATP para manter seu crescimento e proliferação, o que resulta numa atividade mitocondrial aumentada (metabolismo de energia), levando a um excessivo acúmulo de EROS intracelular (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

O tratamento com a IC₅₀ do extrato clorofórmico em CCRF-CEM, levou a um aumento significativo do acúmulo de ROS intracelular sem provocar a morte da célula, como é o caso do grupo tratado com peróxido de hidrogênio na concentração de 100 μ M, onde pode ser visto um aumento do tamanho e granulosidade celular (Figura 23, página 62). Estudos publicados também mostraram que a concentração de 50 μ M do peróxido de hidrogênio leva a um aumento da indução de ROS na linhagem CCRF-CEM, mas não é estatisticamente significativo (KUETE et al., 2013a, 2013b). Estudos relatam que esse efeito é devido à ação da catalase, que é a principal enzima responsável por proteger as células a partir do peróxido de hidrogênio, uma vez que protege completamente a célula a partir de peróxido de hidrogênio extracelular (ZHU et al., 2008).

Diversas linhagens tumorais apresentam um constante estado de estresse oxidativo e induzem a expressão de proto-oncogenes. Aparentemente, as células tumorais são resistentes à lise celular oxidante, apesar de estarem sob constante microambiente oxidativo (TOYOKUNI et al., 1995). Um dos fatores que conferem à célula uma resistência ao estresse oxidativo, é a glicólise reforçada. Em um primeiro relato, constatou-se que células cancerígenas possuem um aumento da glicólise, por um mecanismo desconhecido (KONDOH, 2008). De acordo com dados publicados, o gene supressor de tumor p53 é o que mais sofre mutações em vários tipos de câncer (ATTARDI; JACKS, 1999). Esse gene também pode melhorar a glicólise através de diferentes mecanismos; a expressão de c-Myc ativa a transcrição de diversas enzimas glicolíticas e o p53 regula negativamente a função de outras enzimas (KIM et al., 2004a).

Os níveis de ROS intracelular podem ser utilizados para monitorar o dano que as células podem suportar. Diferentes maneiras de desenvolver resistência à ROS incluem a eliminação de vias alternativas que podem evitar a acumulação de grandes quantidades sem comprometer o alto metabolismo necessário para células tumorais. Exemplos desses processos incluem o direcionamento da via glicolítica na via da pentose fosfato (PPP), (SOSA et al., 2013). Ou mesmo na regulação positiva de mecanismos de proteção aos agentes oxidantes, de forma a não comprometer o DNA e as funções bioquímicas da célula tumoral (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013). A terapia pró-oxidante é baseada na geração de espécies reativas de oxigênio para matar as células tumorais. Embora o estresse oxidativo causado por ROS promova o crescimento tumoral, ele também pode aumentar a sensibilidade ao tratamento (APPIERTO et al., 2009). Seria necessário definir os níveis de ROS em um tumor específico e sua capacidade de mudar sua via glicolítica, com o fim de se obter a morte celular (SOSA et al., 2013). Alguns quimioterápicos utilizados na terapia convencional induzem ROS, como é o caso do 5-fluorouracil (5-FLU). Esse quimioterápico interfere na replicação do DNA, inibindo a divisão celular. Entretanto, alguns estudos em animais e com pacientes tratados tem sugerido que a citotoxicidade induzida por 5-FLU está diretamente ligada à formação de ROS (AFZAL et al., 2012).

Neste contexto, mais estudos são necessários para avaliar quais possíveis vias metabólicas estão envolvidas no processo de inibição tumoral pelo extrato BvF C, além de se estabelecer biomarcadores tumorais (oncogenes, genes supressores de tumor, entre outros) para se definir o mecanismo de ação e possíveis implicações do uso da fração clorofórmica como forma alternativa de tratamento. Também se fazem necessárias mais avaliações com cultura primária para avaliar que efeito o extrato tem em células normais e estudos com modelos tumorais *in vivo*.

7 CONCLUSÃO

- ✓ O extrato bruto (EABF) diminuiu a viabilidade celular da linhagem tumoral A549 nas concentrações de 1,8 a 30 µg/ mL, quando analisados pelo ensaio do MTT, após do tratamento por 24 horas;
- ✓ As frações BvF Ac e BvF MA não mostraram nenhum efeito nas linhagens tumorais testadas;
- ✓ A fração BvF C mostrou diminuição da viabilidade celular, pelo ensaio do MTT, das linhagens:
 - ✓ A549, em todas as concentrações testadas;
 - ✓ MDA-MB-435S, nas concentrações de 15 a 120 µg/ mL;
 - ✓ CCRF-CEM, nas concentrações de 60 e 120 µg/ mL.
- ✓ A fração BvF C não mostrou nenhum efeito em células mononucleares de sangue periférico (PBMC);
- ✓ Nenhum dos extratos mostrou diminuição da viabilidade celular quando analisados pelo ensaio de exclusão com azul de tripan;
- ✓ A fração BvF C, na linhagem tumoral CCRF-CEM:
 - ✓ Não induziu a formação de micronúcleos;
 - ✓ Não provocou danos ao DNA;
 - ✓ Não levou a morte celular por apoptose;
 - ✓ Interferiu no ciclo celular, levando a um aumento da fase G1 e diminuição da fase G2/M;
 - ✓ Aumentou o acúmulo de ROS intracelular.

8 PERSPECTIVAS

Como perspectiva do trabalho, temos a realização de análises da expressão de genes marcadores de câncer em linhagens tumorais, além da realização de estudos fitoquímicos dos extratos, para a separação e identificação destes compostos.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, S. et al. Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, p. 301–307, 2012.
- AGRA, I. K. R. et al. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85(3), p. 945-954, 2013.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed, Porto Alegre, RS, p. 1062, 2010a.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed, Porto Alegre, RS, p. 1206, 2010b.
- ALVES, A. R., SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem**, USP, v. 37, p. 85-91, 2003.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* KUNT. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 16, supl., p. 638-641, 2006.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de Dados de Medicamentos**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/base>. Acesso em 5 de Junho de 2015, às 22:22:13. 2000.
- APPIERTO, V. et al. PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 824–831, 2009.
- ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; BRAZ-FILHO, R. Constituents of bowdichia virgilioides. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 211–212, 2000.
- ASHIDI, J. S. et al. Ethnobotanical survey and cytotoxicity testing of plants of South-western Nigeria used to treat cancer, with isolation of cytotoxic constituents from *Cajanus cajan* Millsp. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 501–512, 2010.
- ATTARDI, L. D.; JACKS, T. The role of p53 in tumour suppression: Lessons from mouse models. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 1999.
- BACCHI, E. M. Ação antiúlcera e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 1, p. 93-100, 1986.
- BARBOSA -FILHO J. M. et al. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **J Asian Nat Prod Res**, v. 6, p. 11-17, 2004.

- BARROS, W. M. et al. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K stem bark. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 82, n. 3, p. 609–616, 2010.
- BASKAR, R. et al. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–9, 2012.
- BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochemical Society**, v. 31, n. 6, p. 1441–1444, 2003.
- BERHOW, M. A. et al. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 1, p. 11–22, 2000.
- BEZERRA-SILVA, P. C. et al. Extract of *Bowdichia virgilioides* and maackiain as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 160-164, 2015.
- BONELLI, P. et al. CDK/CCD and CDK alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. **BioMed Research International**, ID 361020, 2014.
- BORST, P. et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 16, p. 1295–1302, 2000.
- BORST, P.; ELFERINK, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 537–592, 2002.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009.
- BROWN, G. D. Sensing necrosis with Mincle. **Nature immunology**, v. 9, n. 10, p. 1099–1100, 2008.
- CABALLERO-GEORGE, C. et al. Evaluation of bioactive saponins and triterpenoidal aglycons for their binding properties on human endothelin ETA and angiotensin AT 1 receptors. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 729–736, 2004.
- CALEY, A.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery**, 2012.

- CAREW, J. S. et al. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 17, n. 8, p. 1437–1447, 2003.
- CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Mechanisms of action of methotrexate. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, 2013.
- CHANG, L. C.; KINGHORN, A. D. Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents. **Bioactive Compounds From Natural Sources**, London, 577-614, 2001.
- CHOI, E. H. et al. Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1873–1881, 2007.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: Topical issues. **Mutagenesis**, 2008.
- CONCEIÇÃO, H. R. et al. Estrutura Etária de *Bowdichia virgilioides* Kunth em um Fragmento de Mata Atlântica, Reserva Jequitibá, Elísio Medrado-Bahia, Brasil, 2010. **Reunião Regional da SBPC no Recôncavo da Bahia**. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livo/reconcavo/resumos/203.htm>>. Acesso em 27 de junho de 2015.
- COPELAND, W. C. et al. Mitochondrial DNA alterations in cancer. **Cancer investigation**, v. 20, n. 4, p. 557–569, 2002.
- CRUZ, G. L. **Livro Verde das Plantas Medicinais e Industriais do Brasil**. Helmus, Belo Horizonte, p. 779, 1965.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2005.
- DALKIC, E. et al. Cancer-drug associations: A complex system. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.
- DANIEL, P. T. et al. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America**. Leukemia Research Fund, U.K, v. 15, n. 7, p. 1022–1032, 2001.
- DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91–98, 2001.
- DESHPANDE, A.; SICINSKI, P.; HINDS, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2909–2915, 2005.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais - verdades e mentiras**. Unesp, São Paulo, p. 19-27, 2007.

DIAS, B. F. S. A Implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: Desafios e Oportunidades. Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. **Base de Dados Tropical**, 1996.

DIAS, A. C. S. et al. Protective effects of the antileishmanial extract of *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. (Fabaceae) against cyclophosphamide-induced damage. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 9044-9055, 2014.

DIN, W. M. et al. Antibacterial effects of ellagitannins from *Acalypha wilkesiana* var. *macafeana* hort.: Surface morphology analysis with environmental scanning electron microscopy and synergy with antibiotics. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 9, p. 1313–1320, 2013.

ESTEVAM, C. S. et al. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 299-303, 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2000.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181-182, p. 411–416, 2002.

FU, M. et al. Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions. **Endocrinology**, 2004.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008.

GEDARA, S. R.; GALALA, A. A. New cytotoxic spirostane saponin and biflavonoid glycoside from the leaves of *Acacia saligna* (Labill) H. L. Wendl. **Natural Product Research**, p. 324-329, 2013.

GHAVAMI, S. et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 8, p. 497–510, 2009.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931–47, 2013.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular **Pharmacological reviews**, 2000.

GUL, M. Z. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts--an in vitro study. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 53, 2013.

GUMULA, I. et al. Flemingins G-O, Cytotoxic and Antioxidant Constituents of the Leaves of *Flemingia grahamiana*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 2060-2067, 2014.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 331–341, 2002.

HAMAYUN, M. Traditional uses of some medicinal plants of Swat Valley, Pakistan. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 6, p. 636–641, 2007.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research/DNAging**, 1992.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45–51, 2003.

HASSAN, L. E. A. et al. Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000.

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, 2000.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. P-glycoprotein and multidrug resistance: structure-activity relationships of modulators. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 4, p. 276–285, 2003.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2012. **O que é o câncer?** Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 10 de junho de 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2014. **Incidência do câncer no Brasil.** Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em 6 de junho de 2015.

JACKSON, A. L.; LOEB, L. A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2001.

JIN, S. et al. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. **Journal of cell science**, v. 120, n. Pt 3, p. 379–383, 2007.

JUCK, D. B. F. et al. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. **Natural product research**, v. 20, n. 1, p. 27–30, 2006.

KEITH, W. N. et al. Drug insight: Cancer cell immortality-telomerase as a target for novel cancer gene therapies. **Nature clinical practice. Oncology**, v. 1, n. 2, p. 88–96, 2004.

KERR J. F. R., WYLLIE A. H., C. A. R. Apoptosis : a Basic Biological Phenomenon With Wide-. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KESKIN, O. et al. Characterization of anticancer agents by their growth inhibitory activity and relationships to mechanism of action and structure. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 15, n. 2, p. 79–98, 2000.

KIM, J. et al. Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 13, p. 5923–5936, 2004a.

KIM, J.-Y. et al. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 1, p. 113–124, 2004b.

KIM, R. et al. Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. **Cancer gene therapy**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2007.

KONDO, S. et al. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. **Free radical biology & medicine**, v. 27, n. 3-4, p. 401–410, 1999.

KONDOH, H. Cellular life span and the Warburg effect. **Experimental Cell Research**, 2008.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity and modes of action of four Cameroonian dietary spices ethno-medically used to treat Cancers: *Echinops giganteus*, *Xylopia aethiopica*, *Imperata cylindrica* and *Piper capense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 245–253, 2013a.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity and modes of action of the methanol extracts of six cameroonian medicinal plants against multidrug-resistant tumor cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013b.

KUMARAVEL, T. S. et al. Comet Assay measurements: A perspective. **Cell Biology and Toxicology**, 2009.

KUMIMOTO, H. et al. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 2, p. 228–231, 2004.

- LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214–222, 2005.
- LIU, F. F. et al. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 8, p. 3364–3371, 2000.
- LIYANAPATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, 2005.
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. **Journal of Insect Physiology**, 1964.
- LOPES, G. et al. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo. Plantarum, p. 368, 1992.
- MA, G. et al. Selective inhibition of human leukemia cell growth and induction of cell cycle arrest and apoptosis by pseudolaric acid B. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 9, p. 1333–1340, 2010.
- MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso - Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2004.
- MACÊDO, M. F. S. et al. Determining the genotoxicity of the aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v. 18, p. 509-516, 2008.
- MALEK, A. et al. HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 2, p. 348–356, 2008.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews (Cancer)**, v. 2, p. 143-148, 2002.
- MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. beta-Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell biology international reports**, v. 9, n. 9, p. 783–789, 1985.
- MARZENA, S.; JOZWIAK, Z. Genotoxic effect of doxorubicin-transferrin conjugate on human leukemia cells. **Mutation Research**, v. 771, p. 53-63, 2014.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, ed 2, 1997.

MATOS, H. C. Avaliação dos efeitos genotóxicos do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH. **Monografia (Curso de Biologia)**. Universidade Federal de Alagoas, 2012.

MCDONALD, E. R.; EL-DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). **International journal of oncology**, v. 16, n. 5, p. 871–886, 2000.

MELO, F. N. et al. Bowdenol, a new 2,3-dihydrobezofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*. **Nat Prod.**, v. 15, p. 261-266, 2001.

MORIN, P. J. Drug resistance and the microenvironment: Nature and nurture. **Drug Resistance Updates**, 2003.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MS. Instituto Nacional do Câncer, 2011. **ABC do Câncer**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em 15 de agosto de 2015.

MS. SIM, 2013 . **Sistema de Informação sobre Mortalidade**. Disponível em: <<http://sim.saude.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 15 de agosto de 2015.

MUSGROVE, E. A. et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 8, p. 558–572, 2011.

NAWWAR, M. et al. Three new di-O-glycosyl-C-glucosyl flavones from the leaves of *Caesalpinia ferrea* Mart. Z. **Natuforsch C.**, v. 69, p. 357-362, 2014.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutrition and cancer**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 2004.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196–209, 2011.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 810–816, 2000.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592–603, 2004.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, p. 170-196, 1989.

OLTERSDORF, T. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 677–681, 2005.

PATEL, D.; SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review). **International Journal of Oncology**, 2007.

PATLOLLA, J. M. R.; RAO, C. V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment : Current Status and Future Prospects. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, p. 147–155, 2012.

PELICANO, H. et al. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. **J Biol Chem**, v. 278, n. 39, p. 37832–37839, 2003.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 7, n. 2, p. 97–110, 2004.

PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 94–95, 1999.

PFUHLER, S. et al. Genetic toxicity assement: Employing the best science for human safety evaluation part iv. **Toxicological Sciences**, p. 237-240, 2007.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade de São Paulo, 2009.

PROGRAMMED, A. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

RAMOMMOHAN, A. et al. A new di-C-prenylated coumarin from *Sophora interrupta*. **Natural Product Research**, v. 9, p. 82-85, 2015.

RANG, H, P. et al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, ed 7, p. 240,724, 2012.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**, 2001.

REED, M. **Principles of cancer treatment by surgerySurgery**, 2009.

- RICCARDI, F. et al. First-line chemotherapy with liposomal doxorubicin plus cyclofosfamide in metastatic breast cancer: A case report of early and prolonged response. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 773–778, 2013.
- ROCHA, L. et al. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1381–1385, 1994.
- RODRIGUES, M. O. et al. Volatile Constituents and Antibacterial Activity From Seeds of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 3, p. 286–288, 2009.
- ROESSNER, A. et al. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology Research and Practice**, v. 204, n. 7, p. 511–524, 2008.
- SAIGG, N. L.; SILVA, M. C. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 69-89, 2009.
- SAMPAIO, L. S. V. et al. Ácido sulfúrico na superação da dormência de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* h. b. k. - Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 184-190, 2001.
- SANTOS, J. L. et al. Protective effect of a hydroethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 2014.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, 1991.
- SCHIMMEL, M.; BAUER, G. Proapoptotic and redox state-related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. **Oncogene**, v. 21, n. 38, p. 5886–5896, 2002.
- SHAH, U. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 16–23, 2013.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11–30, 2013.
- SILVA, J. P. et al. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 2, p. 348–351, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS, ed. 6, p. 13-15; 410-412, Porto Alegre, 2007.
- SINGH, N.P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**, vol. 256, p. 328–337, 2000.
- SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014.

- SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, 2013.
- SOUZA, T. P. M. Avaliação dos efeitos genotóxicos do extrato aquoso bruto da folha de *Bowdichia virgilioides* KUNTH. **Monografia (Curso de Farmácia)**. Universidade Federal de Alagoas, 2012.
- SOUZA, V. H. et al. Avaliação do potencial antidiabético de cinco plantas medicinais em ratos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 609-612, 2009.
- SPINDOLA, K. C. W. et al. Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae). **Parasites and Vectors**, 2014.
- SWIFT, L. P. et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer Research**, v. 66, n. 9, p. 4863–4871, 2006.
- SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, 2006.
- SZKARADEK, N. et al. Anticonvulsant evaluation of aminoalkanol derivatives of 2- and 4-methylxanthone. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 1190–1198, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, ed 3. Porto Alegre: Armed Editora, 2004.
- THOMAZZI, S. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 451–456, 2010.
- THU, V. K. et al. Oleanane-type saponins from *Glochidion glomerulatum* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry**, 2015.
- TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- TOYOKUNI, S. et al. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS letters**, v. 358, n. 1, p. 1–3, 1995.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. DE S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2006.

VAFSA, O. et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: A mechanism for oncogene-induced genetic instability. **Molecular Cell**, v. 9, n. 5, p. 1031–1044, 2002.

VASILEVSKAYA, I.; O'DWYER, P. J. Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. **Drug Resistance Updates**, 2003.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, 2005.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p. 131-149, 2003.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VILLASEÑOR, I. M. et al. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 53–56, 2004.

WALKER, J. M. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, p. 121-122; 143-145, New York, 2012.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

WASZKIELEWICZ, A. M. et al. Synthesis and evaluation of pharmacological properties of some new xanthone derivatives with piperazine moiety. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 15, p. 4419–4423, 2013.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plant. **Secondary products from plant tissue culture**, Oxford, 1990.

WHO. **GLOBOCAN** - Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2013. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.

YU, G. et al. Silencing Prion Protein in MDA-MB-435 Breast Cancer Cells Leads to Pleiotropic Cellular Responses to Cytotoxic Stimuli. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

ZAMPINI, I. C. et al. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 330-335, 2008.

ZHOU, Y. et al. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4098–4104, 2003.

ZHU, H. et al. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. **Cardiovascular Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 71–85, 2008.

ZÖRNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, 2001.