UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL.

GILBRAIR PAULO DE CARVALHO.

Avaliação *in vivo* da atividade antitumoral extrato bruto etanolico e fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides*

FLORIANÓPOLIS.
2012.

GILBRAIR PAULO DE CARVALHO.

Avaliação *in vivo* da atividade antitumoral extrato bruto etanolico e fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª. Drª. Rozangela Curi Pedrosa.

FLORIANÓPOLIS.
2012.

GILBRAIR PAULO DE CARVALHO.

Avaliação *in vivo* da atividade antitumoral extrato bruto etanolico e fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides.*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como pré-requisito parcial para a obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Florianópolis,.....de.....de 2012.

_____

Profa. Dra. Maria Marcia Imenes Ishida
(Coordenadora do Curso)

Banca Examinadora:

_____

Profa. Dra. Leila da Graça Amaral
(UFSC)

_____

Profa. Dra. Maria Marcia Imenes Ishida
(UFSC)

_____

Prof. Dr. Tadeu Lemos
(UFSC)

Dedico este trabalho à minha mãe,
à minha esposa,
e toda minha família,
às pessoas mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho é, sem dúvida, fruto de muito trabalho, resultado de uma construção coletiva minha, de minha orientadora e de todas as pessoas que fazem parte da minha vida. Ele não seria possível sem o meu empenho, e principalmente sem o apoio, o carinho, a confiança, os conselhos, a dedicação e a amizade de todos vocês. Muitos talvez nem saibam e nem irão saber que são importantes, talvez nem irão ler esse trabalho, mas com certeza fazem parte da minha formação como pessoa e por isso contribuíram para a sua realização.

Agradeço primeiramente à minha mãe Arlete Salete Pertile, que me deu a vida e sempre acreditou nos meus sonhos, incentivando, dando carrinho, atenção, se preocupando comigo, com minhas viagens e com o meu bem estar, você foi, é e sempre será muito importante para mim, o seu amor e a sua confiança me fez acreditar que era possível e que vale a pena acreditar nos sonhos...

À minha orientadora Rozangela Curi Pedrosa por acreditar em mim e orientar-me a tal ponto de conseguir realizar uma pesquisa acadêmica. Além dela agradeço toda sua equipe do LABIOEX, que me receberam muito bem, acompanharam e me auxiliaram na realização dos experimentos e da parte teórica do trabalho, fica minha gratidão a todos vocês em especial a Karina, a Mirelle, a Nadia Mota, a Nadia Falcão, a Marjorie, a Valdelucia e ao Eduardo, sem dúvida a contribuição de vocês foi essencial no meu crescimento como pesquisador e como pessoa.

À Jucele de Moraes, pessoa à quem eu amo muito e escolhi para ficar do meu lado, como minha esposa, por me aturar todo esse tempo, pelas muitas noites e madrugadas em que passei em claro estudando, pelas viagens que fiz com o ônibus lotado de mulheres, pelo tempo que deixei-a de lado para me dedicar aos estudos, pelas tantas vezes que pedi para baixar o volume da televisão e do rádio para que pudesse estudar, a sua companhia nas viagens, e principalmente ao amor demonstrado nesse período, apesar das tantas brigas que tivemos.

Gilvalter e Gilvania meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e sempre disponíveis quando necessário para viabilizar meus estudos, obrigado por estarem presentes nessa jornada.

E a toda a minha família, que mesmo não compreendendo muito o que eu faço, sempre me apoiaram.

Aos meus amigos queridos, que sempre estiveram por perto, mesmo quando estavam longe.

Não posso deixar de agradecer aqui à turma de Biologia Ensino a Distância, pelas festas, pelas risadas, pelas viagens, por tornarem o curso que achei que seria mais difícil, muito mais leve e divertido. Sentirei saudades...

Um agradecimento especial a minhas colegas Aline, Edriane, Jane, e Josiane, juntos conseguimos nos enriquecer e criar um vínculo de estudo e de amizade que com certeza será pelo resto de nossas vidas, só a amizade que construímos já é um marco em minha vida.

Um agradecimento especial ao Pedro e a Neusa que me acolheram em sua casa no tempo que eu precisei ficar em Florianópolis para realizar os experimentos.

Não poderia deixar de agradecer uma pessoa muito especial, que apesar de ficar pouco tempo com nossa turma, sempre esteve disponível nos momentos que mais precisei, fica aqui os meus agradecimentos a tutora Ana.

Agradeço aos professores que fizeram parte desse processo educativo, por todos os momentos vividos junto a vocês, nas aulas, no polo, nas viagens, nas práticas, nas festas e nas vídeo conferencias.

Quero do fundo do coração agradecer todos que de uma forma ou outra participaram dessa jornada, o Lucas, a Letícia, o Gentil, a Fátima, a Anna, a Ivonete, o Jairo, o kauan, meu pai Sebastião, enfim se for citar o nome de todos faltará espaço e ainda cometerei a injustiça de deixar alguém fora.

A tudo que me inspira e me dá forças, a Deus, à natureza, à paz,... à vida!

Muito obrigado!

“Na verdade não consigo entender, o que você tanto estuda, hora está estudando plantas, hora estuda animais, hora estuda insetos, hora o corpo humano, hora as doenças[...]”

Arlete Salete Pertile, 2012.

RESUMO

O uso de plantas medicinais no combate a varias doenças é uma alternativa terapêutica empregada na medicina popular há muitos anos. A falta de uma terapia capaz de regredir totalmente a evolução do câncer tem despertado o interesse na pesquisa de plantas medicinais que possuam indicações populares para o combate desta doença. A *Vernonia scorpioides* é uma planta medicinal, nativa do Brasil, popularmente usada no tratamento de várias doenças, inclusive o câncer. Neste contexto, o presente trabalho propôs avaliar a atividade antitumoral do extrato bruto etanolico e fração cloroformica da *Vernonia scorpioides*, utilizando modelos experimental *in vivo*. As avaliações morfológicas e histocitológicas realizadas nas amostras obtidas de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com extrato bruto etanolico não apontaram atividade antitumoral, entretanto, os animais tratados com fração cloroformica na concentração de 50mg/kg/dia durante 9 dias, apresentaram menor ganho de peso corporal, e de circunferência abdominal, menor volume de líquido ascítico, aumento na proporção de células viáveis/células inviáveis, quando comparado com o grupo de controle negativo. Diante do efeito antitumoral promovido pela menor fração cloroformica testada, avaliou-se o tipo de morte celular promovida pelos tratamentos. A citometria de fluxo revelou que o provável tipo de morte celular induzida pelo tratamento é apoptose, isso porque à maioria das células apresentaram apoptose tardia. Dessa forma, conclui-se que a fração cloroformica quando administrada na concentração de 50mg/kg/dia, apresentou efeito antitumoral *in vivo*, sobre células do carcinoma ascítico de Ehrlich.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Vernonia scorpioides*, câncer, efeito antitumoral, apoptose.

ABSTRACT

The use of medicinal plants to fight various diseases is an alternative therapy used in folk medicine for many years. The lack of a therapy able to completely regress the development of cancer has raised interest in the study of medicinal plants that have indications popular for combating this disease. The *Vernonia scorpioides* is a medicinal plant native to Brazil, popularly used for treating various diseases, including cancer. In this context, the present study was to investigate the antitumor activity of the ethanolic crude extract and chloroform fraction from *Vernonia scorpioides*, using in vivo experimental models. The morphological evaluations and histocitológicas performed on samples obtained from mice bearing Ehrlich ascites tumor treated with ethanolic crude extract did not show antitumor activity, however, animals treated with the chloroform fraction concentration of 50mg/kg/day for 9 days, gained less of body weight, waist circumference, lower ascitic fluid, increased number of viable cells / viable cells, compared to negative control group. Given the antitumor effect promoted by the lower chloroform fraction tested, evaluated the type of cell death promoted by the treatments. Flow cytometry showed that the likely type of cell death induced by apoptosis treatment is, that because the majority of cells had late apoptosis. Thus, it is concluded that the chloroform fraction when administered at a concentration of 50mg/kg/day, had antitumor effect in vivo on cells of the Ehrlich ascites carcinoma.

Keywords: Medicinal plants, *Vernonia scorpioides*, cancer, antitumor effect, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fatores de risco do Câncer..... 18

Figura 2- A: *Vernonia scorpioides.* (Lam.) Pers.; B: Detalhe do capítulo. Fotos: S.E. Martins, adaptado de Souza (2007); C: Folha; D: Capítulo imaturo; E: Corola; F: Cipsela com pápus; G: Brácteas involucrais; H: Detalhe do lacínio. Adaptado de Souza *et al* 1995, apud Souza (2007)..... 30

Figura 3: Compostos isolados e caracterizados a partir das folhas e inflorescências da *Vernonia scorpioides.* Hirsutinolídeos (A, B, C, D) e Glaucolídeo (E)..... 31

Figura 4. Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* (50, 100 e 150 mg/kg/dia) em camundongos em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, com base na variação da circunferência abdominal..... 41

Figura 5. Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides.* (50, 100 e 150 mg/kg/dia) em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, com base na variação da circunferência abdominal..... 41

Figura 6. Citometria de fluxo da *Vernonia scorpioides.* A (Controle negativo); B (50mg/kg/dia de extrato bruto etanólico); C (100mg/kg/dia de extrato bruto etanólico); D (150mg/kg/dia de extrato bruto etanólico) em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE..... 42

Figura 7. Citometria de fluxo da *Vernonia Scorpioides.* A (Controle negativo); B (PI Positivo); C (Anexina Positivo); D (50mg/kg/dia de fração cloroformica); E (100mg/kg/dia de fração cloroformica); F (150mg/kg/dia de fração cloroformica) em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade terapêutica das principais espécies de Vernonia..... 29

Tabela 2. Efeito do extrato bruto de *Vernonia scorpioides.* A (50mg/kg/dia); B (100 mg/kg/dia) e C (150 mg/kg/dia) sobre parâmetros morfocitológicos em camundongos em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE sobre os parâmetros morfológicos dos animais..... 40

Tabela 3. Efeito da fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides.* A (50mg/kg/dia); B (100 mg/kg/dia) e C (150 mg/kg/dia) sobre parâmetros morfocitológicos em camundongos em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE sobre os parâmetros morfológicos dos animais..... 40

Tabela 4. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidos após o tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, nas concentrações de 50mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 150mg/kg/dia..... 43

Tabela 5. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidos após o tratamento com fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides* em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, nas concentrações de 50mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 150mg/kg/dia..... 44

LISTA DE SIGLAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer.
UV	Ultra violeta.
WHO	World Health Organization.
CEE	Centro de Estudos Etnobotãnicos e Etnofarmacológicos.
AVC	Acidente Vascular Cerebral.
L	Linné
TAE	Tumor Ascítico Ehrlich
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
EB	Extrato Bruto
ESC	Extrato Supercritico
V	*Vernonia*
VS	*Vernonia scorpioides*
LABIOEX	Laboratório de Bioquímica Experimental
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta frequência
SAL	Solução Salina
CP	Controle Positivo
DOXO	Doxorrubicina
CN	Controle Negativo
i.p.	Via intraperitoneal
PBS	Tampão Salina
CCB	Centro de Ciências Biológicas
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de próton
CLAE	Cromatina líquida de alta eficiência
Hex	Hexano
COX-2	Ciclooxigenase-2
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
EtOH	Extrato etanólico
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio

$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
CO_2	Dióxido de Carbono
$CHCl_3$	Clorofórmio
AcOEt	Acetato de etila
MeOH	Metanol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 17
1.1. Câncer..... 17
1.1.1. Aspectos gerais..... 17
1.1.2. Principais causas..... 17
1.1.3. Epidemiologia..... 18
1.1.4. Tratamento..... 19
1.1.4.1. Efeitos adversos e colaterais dos quimioterápicos..... 20
1.2. Medicina popular..... 21
1.2.1. Plantas medicinais..... 22
1.2.2. Plantas medicinais utilizadas no Brasil para o tratamento do câncer..... 23
1.2.2.1. *Annona muricata* L..... 24
1.2.2.2. *Brassica Campestris*..... 24
1.2.2.3. *Bidens pilosa* Linné..... 24
1.2.2.4. *Caseira sylvestris* Swartz..... 25
1.2.2.5. *Cordia verbenácea*..... 26
1.2.2.6. *Croton celtidifolius*..... 27
1.2.2.7. *Dondonea viscosa*..... 27
1.2.3. Familia Asteraceae (Compositae)..... 28
1.2.3.1. *Vernonia scorpioides*..... 29

2. OBJETIVOS..... 33
2.1. Objetivo geral..... 33
2.2. Objetivos específicos..... 33

3. MATERIAIS E METODOS..... 34
3.1. Animais..... 34
3.2. Coleta caracterização e identificação da planta..... 34
3.3. Preparação dos extratos..... 34
3.4. Avaliação antitumoral *in vivo*..... 35
3.4.1 Protocolo de modelo experimental da forma ascítica do carcinoma Ehrlich (TAE), tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia*

scorpioides..... 35
3.4.2 Protocolo de modelo experimental da forma ascítica do carcinoma Ehrlich (TAE), tratamento com fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides*..... 35
3.4.3. Avaliações morfológicas..... 36
3.4.3.1. Avaliação da variação de peso..... 36
3.4.3.2. Avaliação da variação da medida da circunferência abdominal..... 36
3.4.4. Avaliações histocitológicas..... 37
3.4.4.1. Determinação do volume de células compactadas..... 37
3.5. Determinação do tipo de morte celular induzido..... 37

4. RESULTADOS..... 39

5. DISCUSSÃO..... 45

6. CONCLUSÃO..... 48

7. REFERENCIAS 49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.1 Aspectos gerais

Atualmente existem inúmeras doenças que acometem os seres humanos, muitas delas já tiveram a cura descoberta, porém, algumas exigem um trabalho maior para definir um medicamento que seja realmente eficaz e que consiga obter a cura, é o caso do câncer, que apesar de existirem muitas pesquisas em torno dessa doença, nenhuma das abordagens terapêuticas existentes na atualidade é capaz de regredir completamente as diferentes manifestações desta doença.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer INCA (2012) o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, os quais podem espalhar-se para outras regiões do corpo na forma de metástase.

De maneira geral a nomenclatura atribuída aos tumores está relacionada com o tipo de célula que o origina. Quando ocorrem em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominadas carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas, Korolkovas (1988). Assim os tumores malignos recebem nomes diferentes: carcinoma (tecido glandular), sarcoma (tecido conectivo), linfoma (gânglios linfáticos) e leucemia (glóbulos sanguíneos), que pode ser leucemia mielóide e leucemia linfóide.

1.1.2 Principais causas

Muitas doenças podem ser evitadas, entretanto, é difícil de evitar o câncer, pois o intervalo de tempo entre a exposição a um agente mutagênico e a detecção do câncer geralmente é muito longo podendo chegar a 10 anos, assim muitas vezes fica difícil de identificar a real causa do câncer, para poder evita-las, pois de acordo com Korolkovas (1988), as diferenças bioquímicas e morfológicas entre as células

normais e cancerosas são mínimas. De modo geral, o câncer pode apresentar diversas causas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas, INCA (2012). As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Deste modo, todos estão expostos de certa maneira aos fatores que podem desencadear algum tipo de câncer. Béliveau (2007), aponta diversos fatores de risco do câncer conforme apresentado na figura 1.

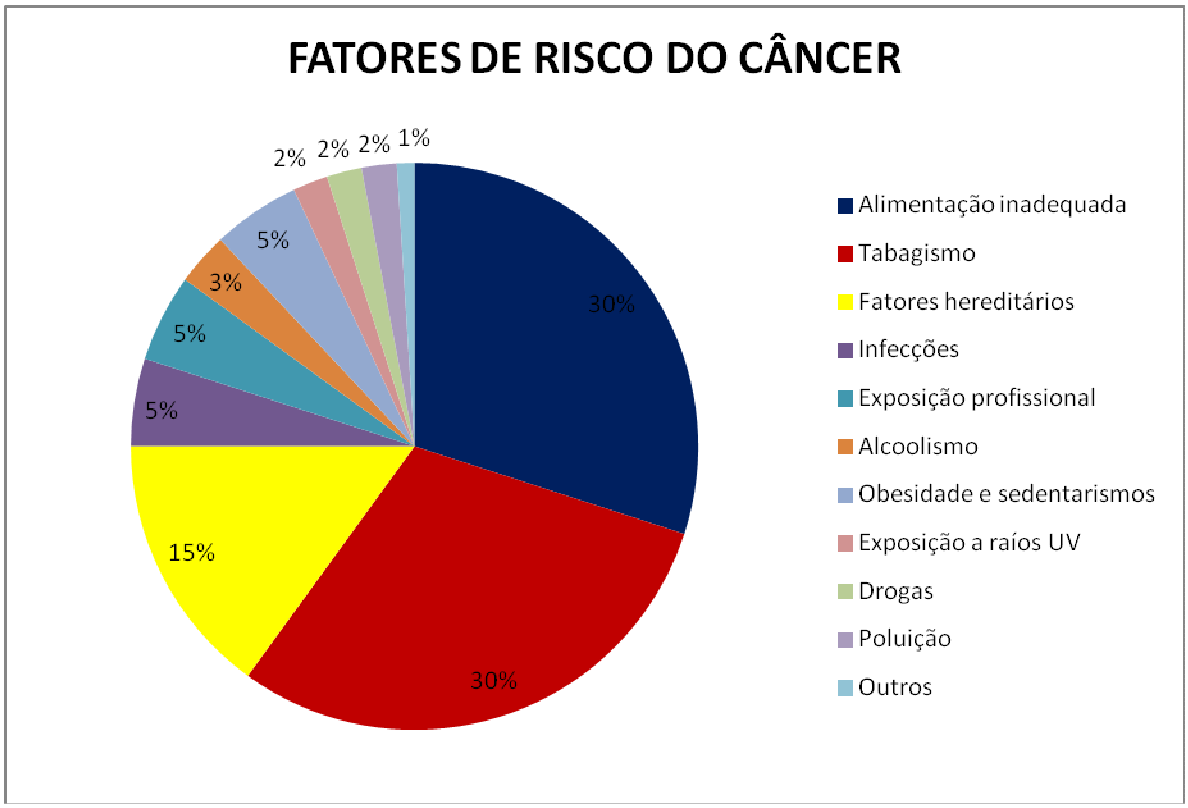

Figura 1- Fatores de risco do Câncer. Adaptado de Béliveau (2007)

1.1.3 **Epidemiologia**

Nos últimos anos, os casos de câncer têm aumentado significativamente, configurando-se como um problema de saúde pública. Segundo o INCA (2011), a

cada ano mais de 12 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer e 7,6 milhões de pessoas morrem vítimas dessa doença, se constituindo assim uma das doenças que mais mata no mundo ocidental. Informação essa confirmada pela World Health Organization -WHO (2011). O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, responsável por mais de sete milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 13% de todas as causas de morte no mundo.

No Brasil as proporções não são muito diferentes, todos os anos a incidência tem aumentado sendo que as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e aponta para a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, INCA (2012). Deste modo, esta patologia configura um problema sério, que exige atenção, pois a quantidade de casos o torna um problema de saúde pública a nível mundial. De acordo com Teixeira (2012), o controle do câncer deveria ter como base a prevenção, efetuada a partir da educação sanitária, e os governos estaduais deveriam esforçar-se na criação de diversos postos de diagnóstico por todo o país.

1.1.4 **Tratamento**

A medicina atual tem se destacado muito pelo emprego de novos medicamentos no combate a diversas doenças, no entanto, embora já existam fármacos consagrados para o tratamento do câncer, nenhuma das abordagens terapêuticas atuais é capaz de fazer regredir totalmente as diferentes manifestações desta enfermidade. Segundo Brody (2006), a maioria dos quimioterápicos (se não todas), destroem as células por um processo programado, dependente de energia, chamado de apoptose, e não por necrose. A apoptose permite ao organismo destruir uma célula de maneira limpa, sem provocar danos as células vizinhas e sem gerar reações inflamatórias no nível dos tecidos Béliveau (2007). Deste modo, a medicina convencional desenvolveu alguns tipos de tratamento para evitar o avanço do câncer.

Os tipos de tratamento convencionais de câncer atualmente são: cirurgia, radioterapia, que pode ser associado à cirurgia e a quimioterapia; quimioterapia isolada ou em associação a cirurgia e/ou radioterapia, imunoterapia e hormonioterapia. Entretanto, cada um dos tratamentos possui uma abordagem

distinta, que busca amenizar ao máximo os danos causados por essa disfunção celular. De acordo com Béliveau (2007) a quimioterapia constitui uma arma de escolha para os oncologistas, pois a administração de medicamentos por via endovenosa permite atingir as células cancerosas disseminadas no organismo, o que é impossível com a cirurgia ou a radioterapia. De acordo com Brody (2006) os objetivos da quimioterapia podem ser:

a. Curativo, para obter resposta completa, por exemplo, doença de Hodgkin.

b. Paliativo, para aliviar sintomas, mas com pouca expectativa de remissão completa (P.ex., carcinoma de esôfago com quimioterapia aplicada para melhorar a disfalgia).

c. Adjuvante, para melhorar as chances de cura, prolongando o período de sobrevida livre de doença, quando o câncer não detectável está presente, mas há suspeita de número sub-clinico de células neoplásicas (P.ex., quimioterapia para câncer de mama após a ressecção cirúrgica de todo tumor).

No tratamento através da radioterapia muda-se o alvo. De acordo com Béliveau (2007) o alvo da radioterapia é destruir as células cancerosas, submetendo-as a raio X ou gama de alta energia. É um tratamento local, aplicado sobre uma zona precisa, para preservar tanto quanto possível os tecidos sadios, pois esses raios também matam as células normais.

Já o método cirúrgico é o mais usado para tumores localizados. O alvo da cirurgia é retirar totalmente o tumor ou, em certos casos, o órgão em que ele se encontra Béliveau (2007).

1.1.4.1 Efeitos adversos e colaterais dos quimioterápicos.

O tratamento quimioterápico, afeta rapidamente as células normais em fase de divisão, em função disso, pode, comprometer a cicatrização, tende a deprimir a medula óssea, deprimir o crescimento, causar esterilidade e queda de cabelos, provocando náuseas e vômitos, Rang *et al.*, (2004). Os análogos da purina (fludarabina, pentostatina, cladribina, mercaptopurina e a tioguanina) podem interferir em vias críticas do metabolismo das purinas, podendo exercer efeito sobre a proliferação celular.

A doxorrubicina quando usada no tratamento do câncer pode causar efeitos congênitos na gravidez, ulcera na boca e nos lábios e quando administrada em altas doses pode lesar o músculo cardíaco causando insuficiência cardíaca durante o período de tratamento ACS (2012). Os agentes alquilantes deprimem a função da medula óssea, podem causar alterações gastrointestinais, depressão de gametogênese, aumento no risco de leucemia não linfocítica aguda e outras neoplasias malignas, a exemplo da cisplatina que é extremamente nefrotóxica e provoca náuseas e vômitos intensos, podendo causar perda de audição na faixa de alta frequência, neuropatias periféricas, hiperuricemia e reações anafiláticas.

Já os análogos da pirimidina são potentes agentes mielossupressores, o uso do fluorouracil pode gerar lesão do epitélio gastrintestinal e mielotoxicidade, podendo ocorrer alterações cerebelares Rang *et al.*, (2004). Além dos efeitos já citados os agentes antineoplásicos podem ainda causar fraqueza geral, perda de peso, queda de pelos do corpo, enjoo, tonteira, ressecamento da pele, descamação, dor ou ardência ao urinar, INCA (2012).

Desta forma, a pesquisa de novos fármacos, deve não apenas complementar a quimioterapia convencional e a radioterapia, mas sim uma terapia seletiva para células neoplásicas, não causando dano as células normais, com mais especificidade e com redução dos níveis terapêuticos.

1.2 **Medicina popular**

O desgaste físico causado pelo tratamento do câncer através de quimioterapia e radioterapia, e a elevada toxicidade e baixa especificidade dos agentes antitumorais somados ao crescente desenvolvimento da área farmacêutica, leva-nos a procura de novas alternativas de tratamento, pois ainda em meio a tanta tecnologia que nos cerca, e incessantes estudos, não dispomos de um fármaco que seja capaz de regredir as manifestações patológicas do câncer como um todo. Então, como alternativa de tratamento surgiu à medicina popular a também conhecida como medicina natural, que consiste no uso de plantas no combate as doenças. Segundo Brüning (1990) a Medicina Natural é sem dúvida a solução para

cuidarmos melhor de nossa saúde, reduzir custos e combater as doenças eliminando as causas.

A medicina popular de acordo com Oliveira (1985) é a prática de cura que oferece respostas concretas aos problemas de doenças do dia-a-dia. É realizada em diferentes circunstâncias e espaços (em casa, em agências religiosas de cura) e por várias pessoas (pais, tias, avós) ou por profissionais populares pela cura (benzedeiras, médiuns, raízeiros, ervateiros, parteiras). Umas das principais ferramentas utilizadas na medicina popular são as plantas medicinais cujo histórico de uso é particular em diversas civilizações.

1.2.1 Plantas medicinais

Por volta de 3000 a.c. , a China já utilizava o ginseng (*Panax ginseng*), o acônito (*Aconitum napellus*), ruibarbo (*Rheum officinale*) e a cânfora (*Cinnamomum camphora*) como produtos medicinais, Gilbert (2005). Já no Brasil a medicina popular surgiu através do uso de plantas medicinais pelos índios, que as empregava para curar doenças e esse conhecimento foi fortalecido com contribuição de imigrantes. De acordo com Brasil (2006) somos o país de maior biodiversidade do planeta, que associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas.

Em Santa Catarina, particularmente a região oeste, a colonização por diferentes povos propicia uma diversificada fonte de informação etnobotânica, que enriquece o uso da fitoterapia no combate as doenças. De acordo com Junior (1998) a Fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações farmacêuticas, sem a utilização especifica de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal.

Apesar de o Brasil possuir uma diversidade muito grande de plantas, ainda é pequeno o numero de espécie vegetal que possui estudo cientifico que comprove sua eficácia, esse é um fator que limita a produção de medicamentos oriundos de plantas. De acordo com Yunes (2007), o grande problema que ainda persiste é que

as plantas são entidades muito complexas, podendo possuir centenas de metabólicos secundários (isso sem contar os metabólicos primários, sais açúcares etc.), dos quais ainda se tem um conhecimento muito limitado.

O conhecimento sobre as propriedades terapêuticas das plantas medicinais obtidas a partir da medicina popular vem sendo acumulado durante séculos e esse conhecimento empírico simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. Soma-se a isto o fato de que grande parte das espécies vegetais utilizadas pela população do Brasil ainda não possui ação farmacológica comprovada, estudo químico realizado e nem mesmo estudos toxicológicos Bacchi (1996).

De fato muitas plantas são usadas popularmente no Brasil para combater várias doenças inclusive no combate ao câncer, porem muitas vezes sua eficácia é contestada, atribuindo-as valores mitológicos e crenças. A utilização de plantas como medicamento deve estar fundamentada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (antitumoral, antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certas espécies vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos Scopel (2005) apud Carrenho (2009). Segundo Lorenzi (2008) a validação de novos fármacos vegetais através da pesquisa é, assim, o caminho para que se possa fazer o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados a fitoterapia.

De acordo com o Centro de Estudo Etnobotânicos e Etnofarmacológicos CEE (2011) a Etnofarmacológia é a “Exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem”. Estes estudos no Brasil constituem um grande desafio, já que a variada flora brasileira tem sido progressivamente destruída e a medicina popular, uma rica mistura de conhecimentos indígenas, europeus e africanos, baseados em plantas medicinais tropicais, torna-se cada vez mais modificada pela cultura moderna Amorozo & Gely (1988).

1.2.2 Plantas medicinais utilizados no Brasil para o tratamento do câncer

1.2.2.1 *Annona muricata L.*

A *Annona muricata L.* é uma árvore de grande porte originária da América tropical amplamente cultivada em todos os países do continente americano inclusive no Brasil. É popularmente conhecida como araticum, araticum-de-comer, araticum-do-grande, araticum-manso, areticum, coração-de-rainha, corossol, fruta-do-conde, graviola, graviola-do-norte, guanaba, guanababo, jaca-de-pobre, jaca-do-pará, jaqueira-mole e pinha. Muito usada na indústria de alimentos no preparo de refrescos e sorvetes, na medicina popular é usada como antidiarréica, adstringente, vomitiva, antidiabética, espasmolítica, como agente emagrecedor e no tratamento de alguns tipos de cânceres, Lorenzi (2008). Os estudos fitoquímicos e farmacológicos das folhas de *Annona muricata L.* resultaram no isolamento duas novas acetogeninas annonaceous, a muricoreacina e a murihexocina que mostraram citotoxicidades significativas em seis linhagens celulares de tumores humanos com seletividade para o adenocarcinoma da próstata Kim *et al.*,(1998).

1.2.2.2 *Brassica campestris.*

A *Brassica campestris* é popularmente conhecida como mostarda, colza, couve, falso-nabo, ruibarbo, nabeira, nabo-branco, couve-nabeira. É uma planta herbácea anual originária do sul da Europa, que é usada na medicina popular no tratamento de dores nas costas, estados congestivos de pulmão e do coração, paralisias, inflamações nas articulações e sequelas de Acidente Vascular Cerebral (AVC) Lorenzi (2008). Estudos do pólen de abelha da planta *Brassica campestris L.* revelaram que a fração de extrato de clorofórmio a partir deste pólen é um candidato promissor no combate ao câncer, pois o mesmo apresentou citotoxicidade ao câncer de próstata humano, por desencadear apoptose nas células tumorais, Wu & Lou (2007).

1.2.2.3 *Bidens pilosa Linné.*

É uma planta herbácea anual, nativa de toda a América tropical sendo popularmente conhecida como amor-seco, carrapicho, carrapicho-de-agulha,

carrapicho-de-duas-pontas, carrapicho-picão, coambi, cuambri, cuambu, erva-picão, fura-capa, guambu, macela-do-campo, picão, picão-amarelo, picão-das-horas, picão-do-campo, picão-preto, pico-pico e piolho-de-padre. Na medicina popular é usada no tratamento de angina, diabetes, disenteria, aftosa, hepatite, laringite, verminose, diurética, febres, blenorragia, leucorréia, icterícia, infecções urinárias, vaginites e hidropsia, Lorenzi (2008). O uso da fração clorofórmica (f-$CHCl_3$) de *Bidens pilosa* em camundongos portadores do TAE, foi capaz de aumentar o tempo médio de sobrevida dos animais em até 40%, e ainda diminuir o número de células tumorais viáveis em relação ao grupo de controle negativo. Estudos fitoquímicos revelaram uma ampla constituição química da *Bidens pilosa,* os constituintes flavonóides e poliacetilênicos, têm sido relatados como sendo constante e majoritariamente identificados em amostras do vegetal, Grombone-Guarantini *et al*., (2005).

1.2.2.4 *Caseira sylvestris swartz.*

Planta comumente encontrada na America Tropical, inclusive no Brasil, Maistro *et al*.,(2004). É uma árvore de pequeno porte nativa do Brasil, sendo que a maior predominância é na região sul do Brasil. Esta espécie vegetal é popularmente conhecida como guaçatonga, guaçatunga, cafezeiro-do-mato, cambroé, cafezinho-do-mato, guaçatunga-preta, pau-de-lagarto, chá-de-bugre, varre-forno, erva-de-pontada, Lorenzi (2008). Na medicina popular é utilizada como antisséptico, anestésico tópico, antitérmico, antiulcerativo, antiofitico, tratamento de herpes, síndromes diarreicas e ainda como antitumoral, Esteves *et al*.,(2005). Ela também é usada no tratamento de queimaduras, ferimentos, injurias cutâneas, tendo a característica de ser, tônica, depurativa, antirreumática, anti-inflamatória, hemostática em mucosas, Mors (2000); Ruppelt (1991). Ainda de acordo com Panizza *et al*. (1998), a planta utilizada no tratamento de herpes labial e genital, gengivites, estomatites, aftas e feridas na boca. Morita *et al*.,(1991), relata que foram isoladas e identificadas dipertenos clerodâmicas, 20 tipos de casearinas nas folhas de *C. sylvestris*, que foram denominados com as letras do alfabeto de A à T. Dois derivados do ácido gálico, o isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE) e o metil galato-3,5- dimetil éter (MGDE) (derivados da *C. sylvestris*), demonstraram efeito

antitumoral *in vivo* sobre o tumor ascítico de Ehrlich e o carcinoma de pulmão de Lewis, Da Silva, *et al.,* (2009). Há relatos de atividade antitumoral associados da presença de biciclogermacreno, presente no óleo essencial da planta Da Silva *et al*., (2008).

1.2.2.5 *Cordia verbenacea.*

É um arbusto aromático nativo de quase todo Brasil, principalmente em áreas abertas da orla litorânea, sendo popularmente conhecido como catinga-de-barão, cordia, erva-baleeira, erva-balieira, balieira-cambará, erva-preta, maria-milagrosa, maria-preta, salicinia, catinga-preta, maria-rezadeira, camarinha, camaramoneira-do-brejo. Na medicina popular é usada como antiinflamatória, antiartrítica, analgésica, tônica, antiulcerogênica, reumatismo, artrite reumatóide, gota, dores musculares e da coluna, prostatites, nevralgias, e contusões, Lorenzi (2008). Ensaios *in vivo* com camundongos portadores do Tumor Ascitico Ehrlich demonstraram que tanto o Extrato Bruto (EB) quanto o Extrato Super Critico (ESC) apresentaram efeitos antitumorais e causaram inibição do crescimento tumoral nos camundongos, aumentaram também o número de células mortas, quando comparada ao grupo de controle negativo e ao mesmo tempo aumentaram o tempo médio de sobrevida dos animais, Parisotto (2010). Estudos fitoquímicos de plantas pertencentes a este gênero demonstraram a presença de importantes constituintes, como flavonóides, saponinas, triterpenos glicosilados, alcalóides, xantinas, fenóis, agliconas esteroidais, dentre outros Roldão (2008). Quispe-Condori *et al*.,(2007) verificaram efeito de redução no crescimento celular em diversas linhagens de células, incluindo MCF-7, quando testados extratos supercrítico (ricos em α-humuleno e trans-cariofileno) desta planta. O isolamento de dois sesquiterpenos, α-humuleno e β-cariofileno, isolados do óleo essencial de *Croton celtidifolius*, inibiram significativamente a expressão de COX-2 e óxido nítrico Fernandes *et al*.,(2007). Diminuindo assim o risco de câncer, pois a elevada expressão COX-2 em células tumorais pode causar alteração das células de adesão da matriz extracelular, desregulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e resistência da indução à apoptose Subhashini (2005).

1.2.2.6 *Croton celtidifolius Baill.*

Croton celtidifolius é uma arvoreta nativa da Mata Atlântica do Brasil, popularmente conhecida como sangue-de-adave, pau-sangue, sangue-de-drago, marmeleiro, capichingui, pau-de-sangue, tapichingui, urucurana e sangue-de-dragão, Dalbó (2010). Na medicina popular é usada para o tratamento de úlcera, reumatismo, doenças inflamatórias e antitumoral, Neiva (2008). Existem poucos estudos sobre *Croton celtidifolius*, sendo que alguns trabalhos relatam seu efeito analgésico, antioxidante e antiinflamatório Nardi *et al.*,(2006). Apesar de poucas publicações sobre o assunto, estudos revelam que plantas do gênero *Croton* demonstraram efeito relacionados à inibição tumoral, de acordo com Sandoval *et al.* (2002). Até o momento são poucas as propriedades terapêuticas já comprovadas cientificamente da *Croton celtidifolius*, segundo Nardi *et al.,*(2006), a casca desta planta é rica em proantocianidinas, que por sua vez tem evidenciado propriedades anticancerígenas por atenuar o desenvolvimento através da indução de apoptose ou inibição da proliferação celular. Além disso, alguns estudos demonstraram a presença de ciclitóis (1L-1-o-metil-mio-inositol, neoinositol e sitosterol), Mukherjee; Axt (1984) apud Biscaro (2011), catequinas, galocatequinas, Nardi *et al.*,(2003) e ainda alcalóides e saponinas Amaral; Barnes (1997) apud Biscaro (2011).

1.2.2.7 *Dodonea viscosa*

É uma arvore de pequeno porte que pode ser encontrada de São Paulo ao Rio Grande do Sul, na costa litorânea desde a restinga até o alto da Serra do Mar, é popularmente conhecida como vassoura-vermelha, vassourão-vermelho, faxina-vermelha, erva-de-veado, vassoura do campo, Lorenzi (2009). Na medicina popular de acordo com Reitz (1980), ela é usada no tratamento de doenças como cólicas flatulentas, reumatismo, gota, febre e várias doenças venéreas. Além disso, atribui-se a ela propriedades adstringente, sudorífica, purgativa e é usada também para curar tumores, segundo Mors (2000). Estudos com o extrato das raízes da planta *Dodonea viscosa* levaram ao isolamento de duas novas saponinas oleanane do tipo triterpenóide e dodoneasides A e B, esses compostos demonstraram atividade antiproliferativa em células de câncer de ovário humano Cao *et al.*,(2009). A

Dodonea viscosa possui grandes concentrações de flavóides como quercetina e isoramnetina, Gentie *et al.*,(2002).

1.2.3 Familia Asteraceae (Compositae).

A família Asteraceae (Compositae), abrange cerca de 1100 gêneros incluindo 25000 espécies, representadas na sua grande maioria por ervas, arbustos e subarbustos, Barroso (1986). Nesta família está presente o gênero Vernonia, que é um dos maiores e mais importante gênero da família Asteraceae, contendo cerca de 1500 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a África e a América do Sul, os locais onde há maior predominância da planta Miserez *et al.*, (1996). No Brasil existe muitas espécies de Vernonia, tamanho quantidade que somada ao conhecimento popular, difunde cada vez mais o uso dessas plantas no tratamento de muitas doenças. Segundo Cabreira (1980), no Brasil existe cerca de 200 espécies de gênero Vernonia, o uso desse gênero na medicina popular não se restringe ao Brasil. Onde são usados no tratamento de distúrbios gástricos, diarreia e cefaleia, comenta Monteiro *et al.,*(2001) apud Carrenho (2009).

As plantas do gênero Vernonia são utilizadas em várias partes do mundo, para diferentes tratamentos de enfermidades, pois são diversos os constituintes químicos presentes nessas plantas, que tem apresentado grande importância farmacologia, de acordo com Awaad (1999). Segundo Vagionas *et al.,* (2007) as plantas do gênero Vernonia são ricas em glândulas oleíferas e apresentam atividades microbiana e inseticida. Além disso, diversos compostos bioativos tem sido isolados, como lactonas sesquiterpênicas (anticâncer e anti plasmódica) Erasto (2006); Pillay (2007); glicosídeos esteróidais (anti-inflamatório), Liu (2009). A família se destaca pela grande quantidade de constituintes químicos que possui, como alcaloides, cumarinas, saponinas, flavanóides, esteroides, lignóides, triterpenos. Mas são os terpenóides denominados lactonas sesquiterpênicas os compostos característicos da família Asteraceae, Picman (1986); Awe *et al.*,(1998); Carvalho *et al.*,(1998); Barbosa-Filho *et al.*, (2008) apud Carrenho (2009). Assim Picman (1986), apud Carrenho (2009) relata as principais espécies de Vernonia e suas variadas atividades biológica na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Atividade terapêutica das principais espécies de Vernonia

Espécie vegetal	**Atividade terapêutica**
Vernonia colorata	Erupções cutâneas.
V. kotschyana	Erupções cutâneas.
V. guianensis	Antihelmintica, afrodisíaca, antídoto para envenenamento, malária e icterícia.
V. canescens	Hemorragia e inflamação.
V. deppeana	Auxilia na dor estomacal.
V. leiocarpa	Tratamento de asma.
V. patens	Vermífugo.
V. cinérea	Antibacteriana.
V. amygdalina	Apresentou inibição total do crescimento do *Sclerotium rolfsii* e infecções pós-emergentes.
V. condensata	Distúrbios gastrointestinais.

Fonte dos dados: Adaptado de Picman (1986) apud Carrenho (2009).

1.2.3.1 *Vernonia scorpioides*

A *V. scorpioides* (Figura 2) é popularmente conhecida como assa-peixe, piracá, enxuga, erva-de-são-simão, erva-de-preá, capichingui, capichingui-de-bicho, nogueira Rauh (2008). Pertence à família Asteraceae, é nativa do Brasil e considerada como uma importante invasora de pastagens, principalmente nas planícies litorâneas, onde pode formar densos aglomerados Lorenzi (2000). A *V. scorpióides* é uma espécie perene, subarbustiva, com ramos numerosos, lanuginosos medindo entre 1 e 2m de altura, folhas curtas pecioladas, ovaladas, agudas no ápice e atenuadas na base, inteiras nas margens, verdes e glabas na página superior, e pardacento hirsutopubescente na página inferior, membranosas Correa (1978); Reitz (1980). As inflorescências são terminais, em cimeiras

escorpiódes de capítulos sésseis e suas flores são violáceas em número de 20 a 30 por capítulo Lorenzi (1982).

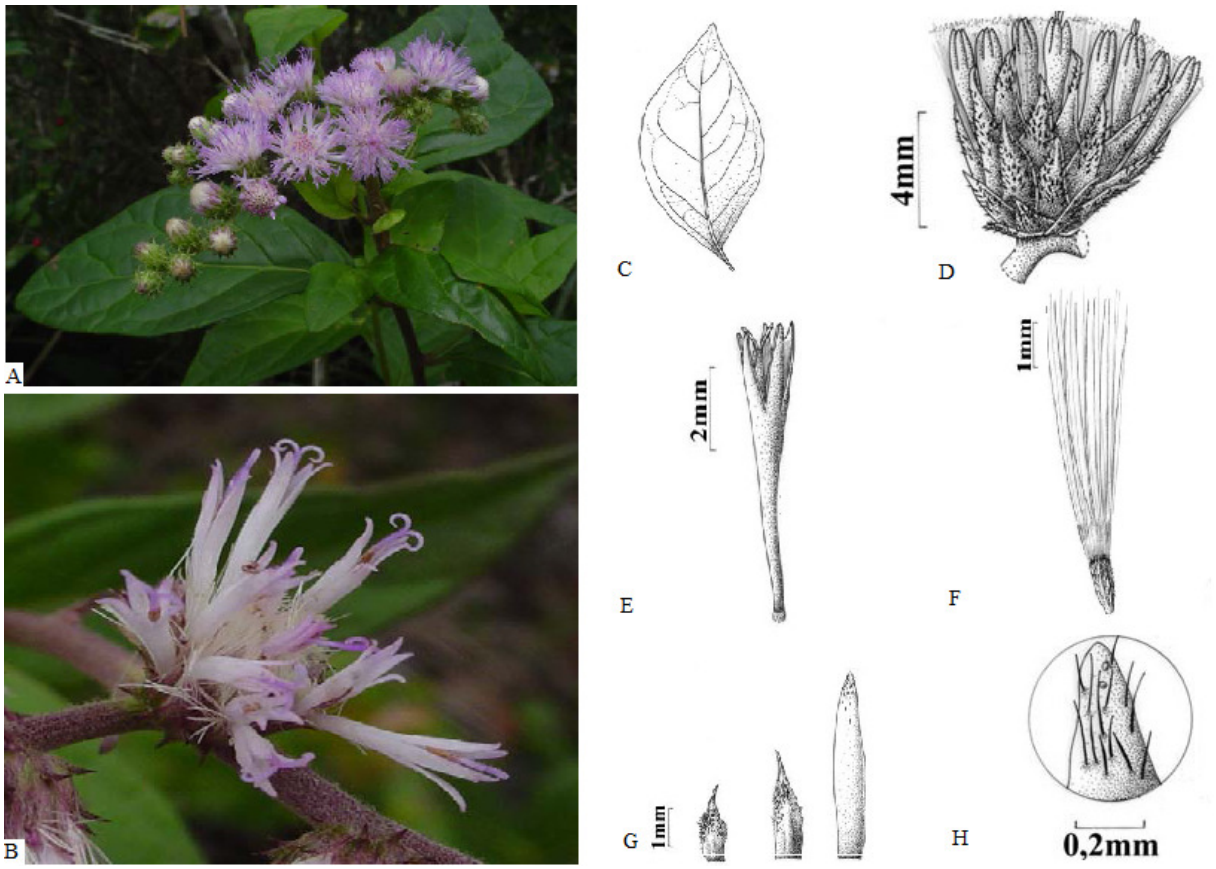

Figura 2: A: *Vernonia scorpioides.* (Lam.) Pers.; B: Detalhe do capítulo. Fotos: S.E. Martins, adaptado de Souza (2007); C: Folha; D: Capítulo imaturo; E: Corola; F: Cipsela com pápus; G: Brácteas involucrais; H: Detalhe do lacínio. Adaptado de Souza *et al*(2005) apud Souza (2007).

Tradicionalmente esta planta é utilizada por via tópica no tratamento de várias doenças, incluindo ulceras crônicas, alergias, irritações, pruridos e edemas provocados por traumatismos ou infecção, nevralgia, processos inflamatórios e lesões cutâneas em geral Cabreira (1980); Moraes (1997). A composição química da *V. scorpioides* ainda não está bem descrita, entretanto essa planta está sendo objeto de diversos estudos, até o momento foi verificado que as partes aéreas da planta possuem um óleo essencial cuja composição inclui germacreno D, transcariofileno, limoneno, Δ-cardineno, biciclogermacreno, β-pineno, β-mirceno, α copaeno, α-

humuleno e aloaroaromadendreno Toigo *et al.*,(2004) apud Rauh (2008). De acordo com Buskühl (2007) apud Rauh (2008), algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas a partir da fração diclorometano, como hirsotinolídeos e glaucolídeo (Figura 3), apresentam atividade citotóxica *in vitro* sobre algumas linhagens celulares (HeLa, L929,B16F10), sendo essa ação decorrente tanto do processo de necrose quanto de apoptose.

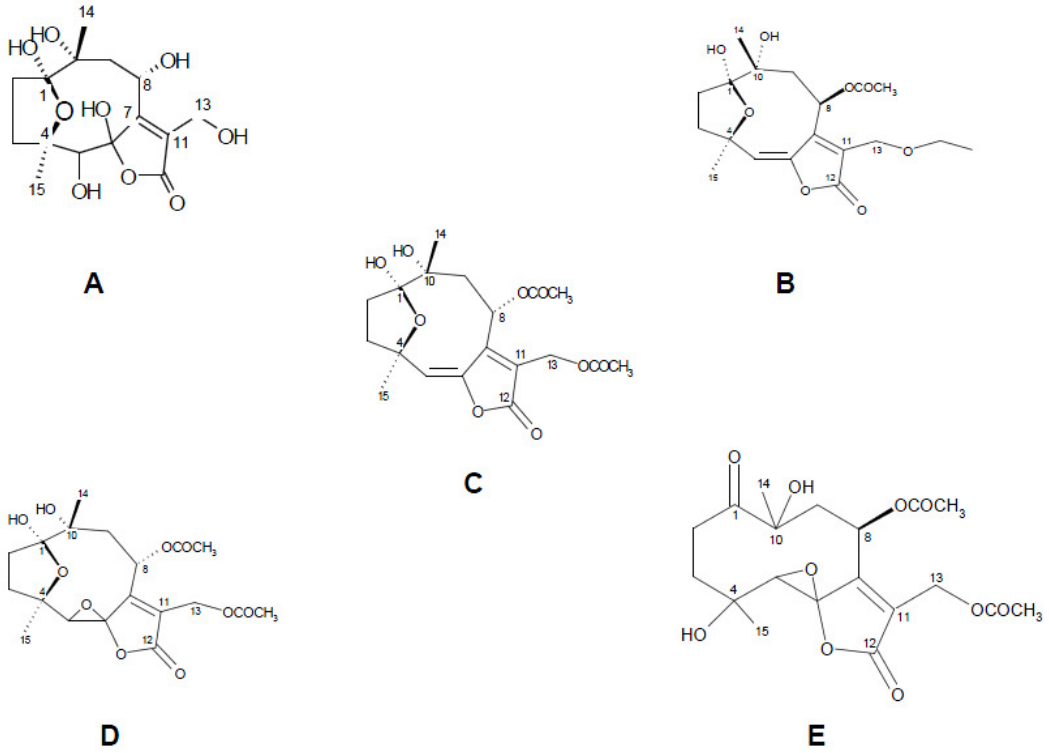

Figura 3: Compostos isolados e caracterizados a partir das folhas e inflorescências da *Vernonia scorpioides.* Hirsutinolídeos (A, B, C, D) e Glaucolídeo (E). **Fonte:** Buskühl (2007) apud Rauh (2008).

Pagno *et al.*(2006), investigaram o efeito da fração diclorometano sobre o TAE, em camundongos, e demonstraram a atividade antitumoral e citotóxica dessa fração. Kreuger *et al.* (2009), demonstraram que o uso da subfração da *V. scorpioides* em modelo de Sarcoma 180 causou a remissão total do tumor tratado. A administração do extrato hidroalcóolico desta planta administrado intraperitonial em animais, confirmaram as propriedades antiinflamatórias e antitumorais da *V. scorpiodes,*

Dreux (2005). Estudos revelam que a atividade antitumoral da planta *V. scorpioides* é eficaz quando em contato direto com as células tumorais, chegando a eliminar o tumor por completo Pagno (2004) apud Carrenho (2009); Blind; Moya (2005). Entretanto, quando administrada por via oral ou por via endovenosa a atividade antitumoral é ineficaz ou inexistente Pagno (2004); Pacheco; Junior (2005) apud Carrenho (2009).

2.OBJETIVO

2.1.Objetivo Geral

O presente trabalho pretendeu avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do extrato bruto etanolico e fração clorofórmica de *Vernonia scorpiodes* em carcinoma de Erlich. Bem como fazer um estudo preliminar sobre o tipo de morte celular induzida pelo tratamento.

2.2.Objetivos Específicos

Para atingir tal objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* do extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides*, utilizando o modelo do tumor ascítico de Erlich.
- Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* da fração cloroformica de *Vernonia scorpioides*, utilizando o modelo do tumor ascítico de Erlich.
- Avaliar o tipo de morte celular induzida pelo tratamento através do ensaio de citometria de fluxo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados para este projeto, camundongos Balb-C Isogênicos (*Mus muscullus*), machos (com peso de 20 ± 2 g), com aproximadamente 2 (dois) meses de idade, obtidas através de reprodução controlada pelo Biotério Setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) da UFSC. Os animais foram alojados em caixas plásticas (30 x 17 x 13 cm), cada qual contendo 6 (seis) indivíduos, forradas com maravalha, trocadas a cada 3 (três) dias. Os camundongos foram mantidos em condições ideais controladas (de temperatura 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, aproximadamente 60% umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libidum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo de intenção PP00774.

3.2. Coleta, caracterização e identificação da planta

A planta *Vernonia scorpioides* foi coletada no Viveiro de Plantas Medicinais da Universidade do Vale do Paraíba, em São José dos Campos, SP. Foram coletadas amostras das partes aéreas dessa planta e encaminhadas ao laboratório responsável pela preparação de extratos vegetais. O tratamento das amostras foi realizado pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Maria Helena Rossi do Instituto Biológico de São Paulo. Exsicata da planta utilizada foi identificada pela professora Walderez Moreira Joaquim e encontra-se depositada no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Biológico São Paulo com a denominação de MH,VS-1. O material foi limpo e seco em estufa a 40ºC, posteriormente moído em moinho de facas.

3.3. Preparação dos extratos

O extrato bruto etanólico e fração cloroformica da *Vernonia scorpioides* foram produzido pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Maria Helena Rossi do Instituto Biológico de São Paulo. As partes aéreas da planta selecionada foram secas, moídas e submetidas à maceração com etanol a frio por 3 dias, três vezes consecutivas. O solvente foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se

o extrato bruto etanólico (EtOH). O extrato EtOH foi aplicado numa coluna de sílica 60 e feita uma filtração rápida sob vácuo, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se desta forma os frações Hex, $CHCl_3$, AcOEt e MeOH. Importante notar que no presente trabalho somente foram testados o extrato bruto etanólico e a fração cloroformica, devido ao rendimento do processo de extração e também a necessidade de redução do número de animais a serem utilizados nos ensaios *in vivo*.

3.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

3.4.1 Protocolo do modelo experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich(TAE), tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides*.

Neste modelo experimental, foram utilizados camundongos Balb/c, pesando 20 ± 2 g e distribuídos em seis diferentes grupos experimentais (n= 6): I) controle negativo-CN (TAE + solução salina-SAL); II) controle positivo-CP: TAE + Doxorrubicina; III) grupo tratado com extrato bruto de *Vernonia scorpioides* na concentração de 50mg/kg/dia);IV) grupo tratado com extrato bruto de *Vernonia scorpioides* na concentração de 100mg/kg/dia; V) grupo tratado com extrato bruto de *Vernonia scorpioides* na concentração de 150mg/kg/dia; Inoculou-se em todos os camundongos, 5 X 10^6 células tumorais no peritônio em condições assépticas. O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero (0). O tratamento dos animais iniciou-se 24 h após a inoculação das células do TAE, administrando-se doses de extrato bruto de *Vernonia scorpioides* (50mg/kg, 100mg/Kg e 150mg/Kg) ou doxorrubicina (1,2 mg/kg), durante 9 dias consecutivos. Os animais do grupo I receberam 50 µl de uma solução de solução salina diariamente durante o mesmo período de tratamento. Todos os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.).

No décimo dia, os animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado o líquido ascítico para a realização das análises.

3.4.2 Protocolo do modelo experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich(TAE), tratamento com fração cloroformica de *Vernonia scorpioides*.

Neste modelo experimental, foram utilizados camundongos Balb/c, pesando 20 ± 2 g e distribuídos em seis diferentes grupos experimentais (n= 6): I) controle negativo-CN (TAE + solução salina-SAL); II) controle positivo-CP: TAE + Doxorrubicina; III) grupo tratado com fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* na concentração de 50mg/kg/dia);IV) grupo tratado com fração cloroformica *Vernonia scorpioides* na concentração de 100mg/kg/dia; V) grupo tratado com fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* na concentração de 150mg/kg/dia; Inoculou-se em todos os camundongos, 5 X 10^6 células tumorais no peritônio em condições assépticas. O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero (0). O tratamento dos animais iniciou-se 24 h após a inoculação das células do TAE, administrando-se doses de fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* (50mg/kg, 100mg/Kg e 150mg/Kg) ou doxorrubicina (1,2 mg/kg), durante 9 dias consecutivos. Os animais do grupo I receberam 50 µl de uma solução de solução salina diariamente durante o mesmo período de tratamento. Todos os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.).

No décimo dia, os animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado o líquido ascítico para a realização das análises.

3.4.3 Avaliações morfológicas

3.4.3.1 Avaliação da Variação de Peso

Para avaliar a variação de peso dos camundongos, foi calculada a diferença entre o peso final (após os 9 dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (peso que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0). Os resultados obtidos foram expressos em gramas Kviecinski *et al.*,(2008).

3.4.3.2 Avaliação da Variação da Medida da Circunferência Abdominal

Para se determinar a variação da circunferência abdominal dos camundongos, foi calculada a diferença entre a medida final (após os 9 dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal dos animais. Os resultados obtidos foram expressos em centímetros Kviecinski *et al.*,(2008).

A inibição do crescimento tumoral foi calculado a partir da variação da circunferência abdominal obtida com os animais controle negativo e tratados após 9 dias de tratamento, através da seguinte fórmula:

Inibição do crescimento tumoral (%) = variação da circunferência abdominal no final do tratamento – variação da circunferência abdominal no inicio do tratamento / variação da circunferência abdominal apresentada pelo grupo controle negativo no final - inicio do tratamento X 100, Kviecinski *et al.*,(2008).

3.4.4. Avaliações histocitológicas

3.4.4.1 Determinação do volume de células compactadas

O líquido ascítico foi retirado utilizando tubos falcon graduados, o volume de células compactadas foi determinado após a centrifugação a 1000 rpm por 5 min dos tubos preenchidos com todo líquido retirado dos animais Kviecinski *et al.*,(2008).

3.5 Determinação do tipo de morte celular induzido

O tipo de morte celular induzido pelo extrato bruto etanolico e fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection da BDPharmingen (San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Para a execução deste ensaio, foram retiradas alíquotas de líquido ascítico dos camundongos previamente tratados contendo 5 X 10^6 células/mL. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS (3X) e ressuspensas em 200 µl do tampão de ligação (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$) previamente diluído na proporção 1:10 em água destilada. Foram adicionados 5 µl de anexina V, seguidos de incubação no escuro pelo tempo de 15 min. Por fim, foram adicionados 5 µl de iodeto de propídeo e realizada a análise no citômetro de fluxo. A intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e do iodeto de propídeo foram mensuradas utilizando um filtro de excitação à 488 nm e de emissão na faixa de 515-545 e 564-606 nm, respectivamente Bdpharmigen™(2011).

Para a calibração do citômetro, foram utilizados três controles: controle normal (constituído por células retiradas de camundongos portadores do TAE e não tratados, a fim de se descontar a autofluorescência emitida pelas mesmas), controle

positivo para apoptose (constituído por células retiradas de camundongos portadores do TAE e tratados com doxorrubicina na concentração de 1,2mg/Kg) e controle positivo para necrose (constituído por células retiradas de camundongos portadores do TAE não tratados e posteriormente congeladas em freezer -80ºC por 20 minutos após a sua lavagem). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Winmdi.

O tipo de morte celular induzido pelos tratamentos foi classificado da seguinte maneira: células marcadas apenas com anexina V foram consideradas em apoptose inicial; células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo foram consideradas em apoptose tardia; já células marcadas apenas com iodeto de propídeo foram consideradas necróticas. Os resultados foram expressos como percentual de células em apoptose inicial e tardia e em necrose.

4. RESULTADOS

Nas tabelas 2 e 3 estão apresentados os valores dos parâmetros morfológicos (variação do peso corporal, variação da circunferência abdominal) e histocistológicos (volume de células compactadas e células inviáveis / células viáveis), após o tratamento dos animais com extrato bruto etanolico e fração cloroformica de *Vernonia scorpioides*, doxorrubicina e solução salina a 10% (veículo de diluição dos extratos-controle negativo). Como pode-se observar, o melhor resultado foi observado para fração cloroformica na concentração de 50mg/kg/dia de *Vernonia scorpioides*, onde em comparação com o controle negativo o tratamento foi capaz de diminuir a variação de peso, diminuir também a variação da circunferência abdominal, bem como a diminuição do volume de células compactadas, aumentando a relação de células inviáveis em relação as células viáveis, deste modo, evidenciando efeito antitumoral *in vivo* sobre as células do carcinoma de Ehrlich. Entretanto o tratamento realizado com o extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* descrito na tabela 2, não se mostrou eficaz, ficando muito parecido com o controle negativo.

Ao término dos experimentos realizados *in vivo* durante 9 dias, um estudo comparativo entre os tratamentos com o extrato bruto etanolico conforme figura 4, onde observa-se que não houve inibição do crescimento tumoral induzido pelos tratamentos com diferentes concentrações do extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* em camundongos transplantados com o Tumor Ascítico Ehrlich.

Tabela 2. Efeito do extrato bruto etanólico de *Vernonia scorpioides.* A (50mg/kg/dia); B (100 mg/kg/dia) e C (150 mg/kg/dia) sobre parâmetros morfocitológicos em camundongos em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE sobre os parâmetros morfológicos dos animais.

Parâmetro	Controle Negativo	Controle Positivo	Extrato bruto etanólico (mg/kg/dia)		
			A	B	C
Variação do peso corporal (g)	7,78 ± 1,05	-0,19 ± 0,66***	9,58 ± 1,04	8,86 ± 1,15	9,70 ± 1,54
Variação da circunferência abdominal	1,60 ± 0,40	-0,65 ± 0,22***	2,83 ± 0,34	2,58 ± 0,26	3,06 ± 0,34
Vol. de células compactadas (mL)	4,66 ± 0,52	-	4,41 ± 0,97	3,58 ± 0,74	4,66 ± 1,03
Células inviáveis / células viáveis	0,03	-	0,05	0,04	0,05

Nota: Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 6. (***) representa a diferença estatística ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) nos grupos tratados com o extrato bruto etanólico de *Vernonia scorpiodes* em relação ao controle negativo tratado somente com solução salina. C. Positivo: grupo controle positivo tratado com doxorrubicina (1,2 mg/kg). A-(Tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* na concentração de 50mg/kg/dia), B-(Tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* na concentração de 100mg/kg/dia) e C-(Tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* na concentração de 150mg/kg/dia).

Tabela 3 Efeito fração cloroformica de *Vernonia scorpioides.* A (50mg/kg/dia); B (100 mg/kg/dia) e C (150 mg/kg/dia) sobre parâmetros morfocitológicos em camundongos em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE sobre os parâmetros morfológicos dos animais.

Parâmetro	Controle Negativo	Controle Positivo	Fração clorofórmica (mg/kg/dia)		
			A	B	C
Variação do peso corporal (g)	10,03 ± 0,29	-0,12± 0,35***	7,69 ± 3,12	10,48± 0,96	9,84 ± 0,03
Variação da circunferência abdominal	2,66 ± 0,08	-0,76± 0,01***	1,87 ± 1,06	3,14 ± 0,42	2,47 ± 0,18
Vol. de células compactadas (mL)	4,40 ± 1,14	-	4,00 ± 1,81	5,50 ± 1,22	5,00 ± 2,26
Células inviáveis / células viáveis	0,008	-	0,028	0,019	0,013

Nota: Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 6. (***) representam diferença estatística ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) nos grupos tratados com a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* em relação ao controle negativo tratado somente com solução salina. C. Positivo: grupo controle positivo tratado com doxorrubicina (1,2 mg/kg), A-(Tratamento com a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* na concentração de 50mg/kg/dia), B-(Tratamento a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* na concentração de 100mg/kg/dia) e C-(Tratamento a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* na concentração de 150mg/kg/dia).

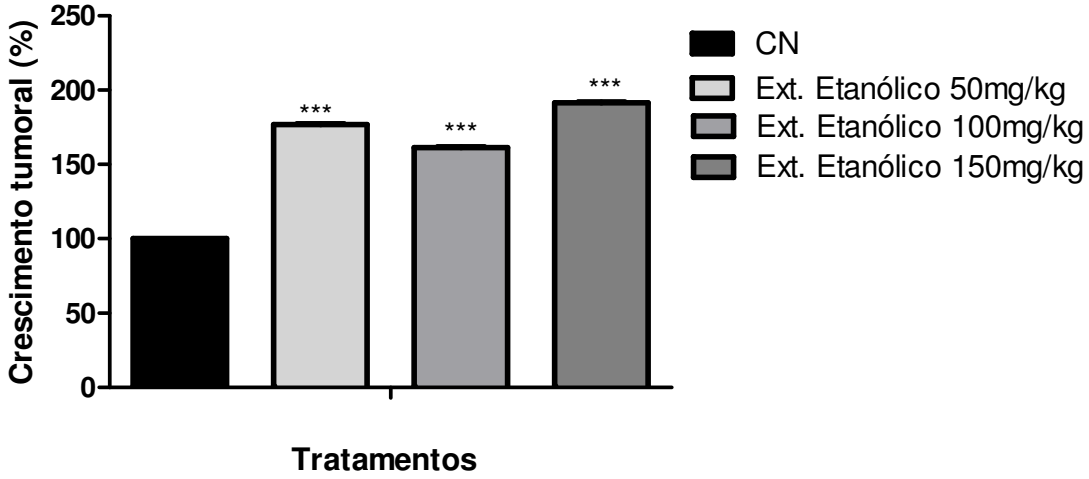

Figura 4. Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com extrato bruto etanolico de *Vernonia scorpioides* (50, 100 e 150 mg/kg/dia) em camundongos em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, com base na variação da circunferência abdominal. (***) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (CN). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=6.

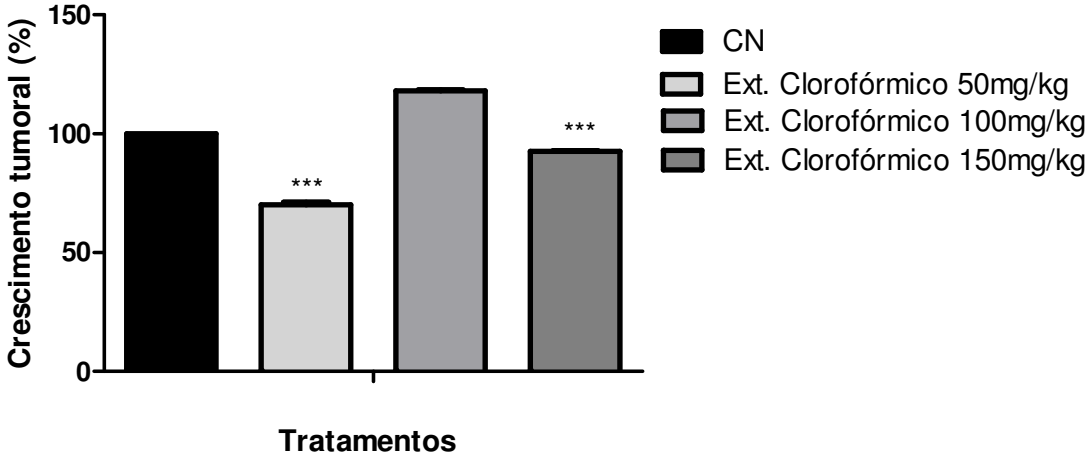

Figura 5. Inibição do crescimento tumoral induzido pelo tratamento com a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* (50, 100 e 150 mg/kg/dia) em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, com base na variação da circunferência abdominal. (***) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (CN). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=6.

Por outro lado os experimentos realizados *in vivo* durante 9 dias, um estudo comparativo entre os tratamentos com a fração cloroformica foi realizado conforme figura 5, onde observa-se que a inibição do crescimento tumoral induzido pelos tratamentos com a fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides* em camundongos portadores do Tumor Ascítico Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal, foi maior na concentração de 50mg/Kg.

As analises de citometria (Figura 6) para determinação do possível tipo de morte celular envolvidos no tratamento de camundongos transplantado com o tumor ascitico de Erlich com o extrato bruto etanólico demonstraram que o numero de células apotóticas(Tabela 4) foram pouco significativo confirmando os dados obtidos com a medida da inibição do crescimento do tumor.

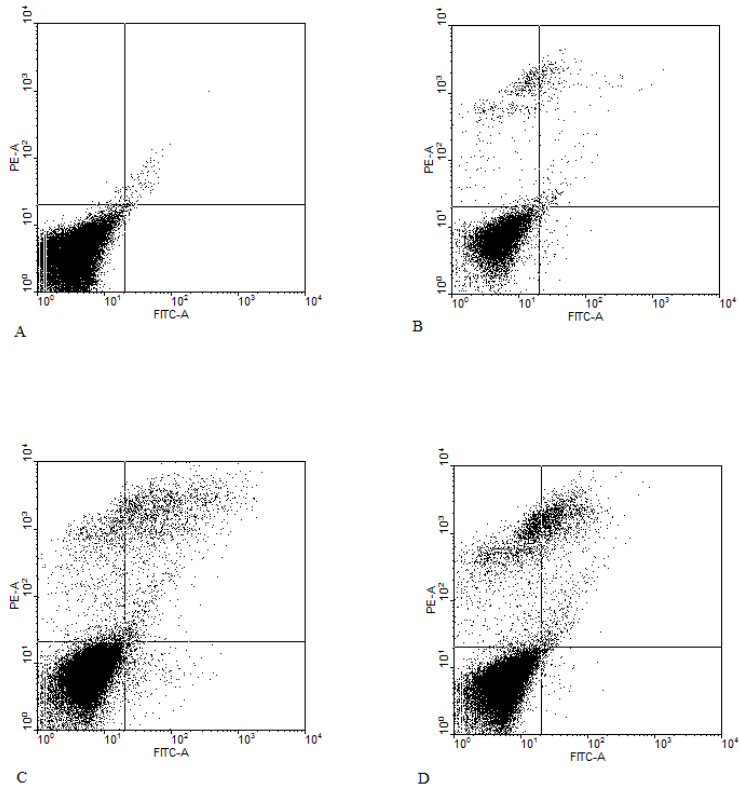

Figura 6. Citometria de fluxo da *Vernonia scorpioides.* A (Controle negativo); B (50mg/kg/dia de extrato bruto etanólico); C (100mg/kg/dia de extrato bruto etanólico); D (150mg/kg/dia de extrato bruto etanólico) em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE.

Tabela 4. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidos após o tratamento com extrato bruto etanólico de *Vernonia scorpioides* em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, nas concentrações de 50mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 150mg/kg/dia.

Tratamentos	**Percentual de células viáveis (%)**	**Percentual de células necróticas (%)**	**Percentual de células apoptóticas (%)**		
			Apoptose Inicial	**Apoptose Tardia**	**Total de células Apoptóticas**
CTL	99,47	0,10	0,13	0,29	0,42
50 mg/kg/dia	91,69	4,82	0,79	2,71	3,50
100 mg/kg/dia	89,81	3,42	1,14	5,63	6,77
150 mg/kg/dia	89,23	5,30	0,48	4,99	5,47

Os resultados obtidos com o ensaio de determinação do tipo de morte celular induzido pela fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* são ilustrados na figura 7 e descritos na tabela 5. Os dados obtidos referem-se aos tratamentos das células do carcinoma de Ehrlich com fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* nas concentrações de 50, 100 e 150mg/kg/dia após 9 dias de tratamento, além dos controles positivo e negativo e anexina positivo. Foi observado que o melhor resultado foi apresentado pelo tratamento com 50mg/kg/dia, onde o mesmo apresentou um total de 96,03% de células apoptoticas sendo que destas 95,49% apontam para apoptose tardia, assim, apresentou um baixo percentual de células viáveis, ou seja, apenas 2,58% das células estavam vivas deste modo, evidenciando possível atividade antitumoral da fração cloroformica de *Vernonia scorpioides*. O fato intrigante é que curiosamente os tratamentos com frações maiores (100 e 150mg/Kg/dia) que na lógica deveriam apresentar um resultado melhor, não apresentaram resultados significativos, ou seja, não tiveram atividade apoptótica relevante.

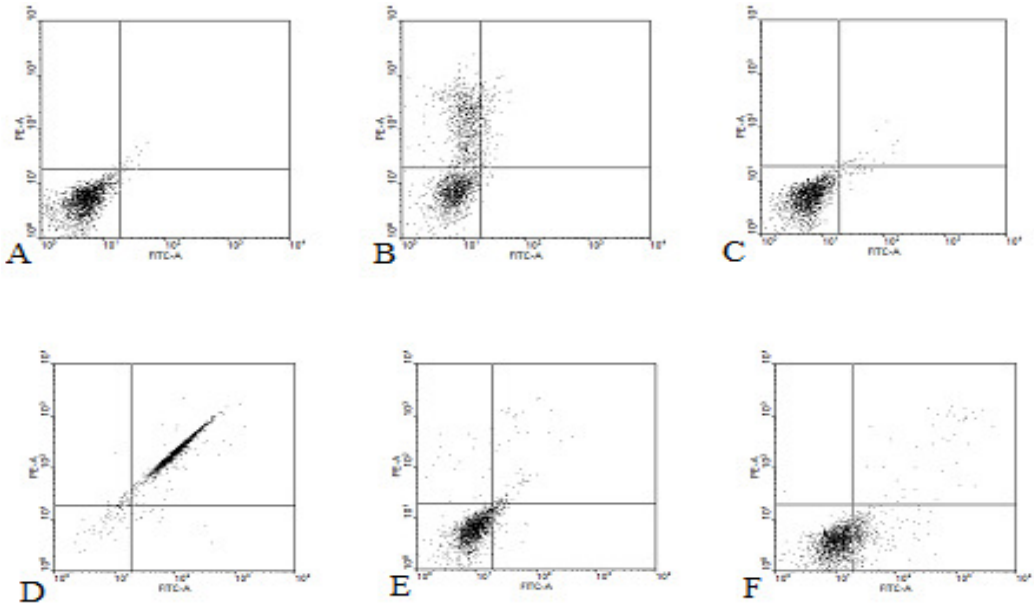

Figura 7. Citometria de fluxo da *Vernonia Scorpioides.* A (Controle negativo); B (PI Positivo); C (Anexina Positivo); D (50mg/kg/dia de fração cloroformica); E (100mg/kg/dia de fração cloroformica); F (150mg/kg/dia de fração cloroformica) em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE.

Tabela 5. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidos após o tratamento com fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides* em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE, nas concentrações de 50mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 150mg/kg/dia.

Tratamentos	**Percentual de células viáveis (%)**	**Percentual de células necróticas (%)**	**Percentual de células apoptóticas (%)**		
			Apoptose Inicial	**Apoptose Tardia**	**Total de células apoptóticas**
CTL	98,69	0,15	0,44	0,71	1,15
50 mg/kg/dia	2,58	1,39	0,54	95,49	96,03
100 mg/kg/dia	90,25	1,11	5,23	3,40	8,63
150 mg/kg/dia	78,50	0,06	19,32	2,12	21,44

5- DISCUSSÃO

Segundo a WHO (2011),o câncer é responsável por mais de 7 milhões de mortes por ano, representando cerca de 13% de todas as mortes do mundo, e é considerado um importante problema de saúde pública. Apesar de incessantes esforços das pesquisas cientificas e clinicas na área, na medicina atual não existe uma abordagem terapêutica capaz de fazer regredir totalmente as diferentes manifestações desta enfermidade sem que haja efeitos colaterais ao paciente. Na medicina popular existem muitas plantas que são usadas no combate desta doença, porem a eficácia das plantas utilizadas é contestável, pois muitas delas são atreladas a conhecimentos populares, sem que haja uma comprovação cientifica de suas propriedades medicinais. A *V. scorpioides* objeto de estudo deste trabalho, é utilizada na medicina popular no tratamento de entre outras doenças, as afecções cutâneas, e ao câncer, Moraes (1997); Cabreira (1980).

Desta forma, o estudo da atividade antitumoral da *V. scorpioides* seria interessante para comprovação da eficácia desta espécie vegetal no combate ao cancer, afim de validar as propriedades a ela atribuída quando do seu uso popular, que tradicionalmente lhe atribui o poder de cura de doenças relacionadas com o câncer. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antitumoral da *V. scorpioides* em carcinoma de Erlich.

Várias espécies do gênero Vernonia são utilizadas na medicina popular, e a partir deste gênero vários compostos já foram isolados, tais como flavonóides, esteróides e polissacarídeos, Nergard *et al.*,(2004); Huang *et al.*, (2003); Tchinda *et al.,(*2003) apud Rauh,(2008). Um exemplo é o estudo do extrato de folhas de *Vernonia amydalina*, onde o extrato aquoso apresentou uma potente inibição da síntese de DNA, sugerindo que a planta tenha o poder de prevenir e eliminar o câncer, Izevbigie (2003) apud Rauh (2008).

Aos flavonoides também é atribuída entre outras, a atividade antioxidante, sendo que essa é decorrente da capacidade desses compostos atuarem como sequestradores de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio Sadik *et al.*,(2003) apud Rauh (2008). Segundo Pérez; Garcia(1996), nas doenças inflamatórias os

níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) estão aumentadas. Estudos revelam que o Extrato Etanólico de *Vernonia Scorpioides* (EEVS), tem uma capacidade de reduzir os níveis teciduais de ROS maior do que o ácido α-lipóico, um potente oxidante, Ho et al.,(2007) apud Rauh (2008). O fato do EEVS entre outras funções ser capaz de inibir a formação de ROS durante o processo inflamatório leva a possibilidade de que compostos presentes no EEVS podem apresentar atividades que atuem na prevenção de doenças relacionadas com um desequilíbrio do estado oxi-redutivo em nível de referência celular, como por exemplo o câncer de pele Rahul (2008).

O gênero Vernonia produz metabólicos típicos da família Asteraceae, alguns, já tiveram investigação cientifica comprovando seus poderes, é o caso das lactonas sesquiterpênicas (LS), que possuem atividade citotóxica já descrita Kuo *et al.,*(2003); Pagno *et al*.,(2006). Em estudos prévios o óleo de *V. scorpioides* apresentou elevado teor do sesquiterpeno (E)-cariofileno cerca de 30,6%, Albuquerque (2008). Além disso, algumas LS demonstraram atividade citotóxica em culturas de células de melanoma Buskühl (2007); Pagno *et al.,* (2006) apud Rauh (2008). Segundo Kumari (2003) as propriedades citotóxicas antitumorais atribuídas a Vernonia se devem a presença de lactonas sesquiterpênicas. Chem *et al*. (2007) relata que estudos demonstram que as lactonas sesquiterpênicas são responsáveis pela ativação de caspases envolvidas na apoptose. De acordo com Buskuhl (2007); Kreuger *et al*. (2009) a ação antitumoral, pode ser em parte, devido a Lactonas sesquiterpênicas contidas no extrato, aos quais já apresentam atividade antitumoral já descrita na literatura.

Apesar de tudo, o mecanismo exato que leva as lactonas sesquiterpênicas terem atividade antitumoral *in vivo* ainda não está bem elucidada Rozenblat *et al*. (2008). Nos tumores, a resistência aos quimioterapicos é principalmente atribuída ao dano ao DNA e a incapacidade da célula de reparar este dano, desencadeando o processo apoptótico Rozenblat *et al*., (2008). O mecanismo de ação antitumoral mais recente evidenciado na literatura para as lactonas sesquiterpênicas é a inibição do Fator Nuclear Kappa B (NF_Kappa B), responsável pela ativação de diversos genes, inclusive os genes responsáveis pela inibição da multiplicação celular e pela apoptose Muller *et al*.,(2004).

Recentes estudos mostram que muitos fármacos antineoplasicos ou agentes quimioterapicos atuam diretamente prevenindo a promoção e progressão do tumor por dano direto ao DNA Chem *et al.*,(2007).

Portanto, vários autores já identificaram o efeito das lactonas sesquiterpênicas em várias linhagens de células tumorais, interferindo na progressão do ciclo celular e induzindo a morte celular por apoptose Song et al.,(2005); Chen et al.,(2006);Tabopta et al.,(2007);Chang-long et al.,(2008); Anderson et al.,(2008); Rezeblat et al.,(2008) apud Carrenho (2009).

Os resultados obtidos com o presente trabalho não evidenciaram a atividade antitumoral *in vivo* do extrato bruto etanolico da *Vernonia scorpioides* uma vez que os tratamento com doses crescente do extrato (50, 100 e 150 mg/kg/dia) não foi capaz de inibir o crescimento do tumor ascitico de Erlich implantado em camundongos. Curiosamente, a fração cloroformica da *Vernonia scorpiodes* na menor concentração testada (50 mg/kg/dia) apresentou importante atividade antitumoral uma vez que causou significativa redução do crescimento do tumor bem como elevado índice de células tumorais em apoptose inicial e tardia. Entretanto, ao se elevar a concentração da fração cloroformico houve uma reversão do efeito antitumoral. Tendo em vista que como foi citado anteriormente esta planta possui importante atividade antioxidante é possível especular que talvez em dose elevadas ocorra um efeito citoprotetor dos diversos flavonóides presentes na planta. Por outro lado em concentrações menores predominaria o efeito citotóxico das lactonas sesquiterpênicas o que levaria a maior citoxicidade por ativação das vias da apoptose. Portanto, melhores estudos utilizando concentrações menores de extrato bruto etanolico e fração cloroformica da *Vernonia scorpioides* seriam necessários para investigar esta hipótese.

Também é importante notar que o uso popular de *Vernonia scorpiodes* para o tratamento de tumores esta associado a preparações farmacêuticas aquosas a fresco. E os ensaios realizados no presente trabalho foram realizados com extratos etanolico e cloroformico sendo necessário a realização dos mesmo ensaios anteriormente relatados com o extrato aquoso a fresco para se averiguar o potencial antitumoral da planta.

Por fim, um estudo fitoquimico mais aprofundado, poderia isolar e identificar as substâncias presentes na *Vernonia scorpioides* a fim de determinar quais compostos teria efeito pró-apoptotico e citoprotetor.

6-CONCLUSÃO

- Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral *in vivo* demonstraram que a fração cloroformica de *Vernonia scorpioides* quando na menor concentração testada (50mg/kg/dia durante 9 dias), apresentou maior atividade antitumoral, uma vez que foi capaz de reduzir o ganho de peso e a circunferência abdominal, o volume do líquido ascítico, alem de gerar um aumento na proporção de células inviáveis/células viáveis, da média dos animais tratados e portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

- A morte celular induzida pela fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides* que apresentou melhor resultado (50mg/kg/dia durante 9 dias) foi apoptose, com predomínio da apoptose tardia.

- O tratamento com extrato bruto etanólico de *Vernonia scorpioides*, não demonstrou atividade antitumoral significativa em todas as concentrações testadas.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; LEMOS, T. L. G. ; PESSOA, O. D. L. ; NUNES, E. P.; NASCIMENTO, R. F. ; SILVEIRA, E. R.; *FLAVOUR FRAG. J.* **2007**, *22*, 249; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SOUZA, E. B.; MESQUITA, E. F.; NUNES, E. P.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R.; *J. ESSENT. OIL. RES.* **2001**, *13*, 376; COSTA, F. J.; BANDEIRA, P. N.; ALBUQUERQUE, M. R. J.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; *QUIM. Nova* **2008**, *31*, 1691.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **DOXORUBICIN.** Atualizado em 2011. Disponível em: <http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/GuidetoCancerDrugs/doxorubicin>. Acesso em 29 fevereiro 2012 13:39.

AMOROZO, M.C.M.; GELY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas, Barbacena/PA. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v.4, n.1, p.47-131, 1988.

AWAAD, A. S.; J. Pharm. Sci. 1999.

BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: Di STASI, L.C. (org.). Plantas Medicinais: arte e ciência. **Um guia de estudo interdisciplinary**. São Paulo: UNESP, 1996. CAP.12.

BARROSO, G.M.;Sistemática de Angiospermas do Brasil, Imprensa Universitária: Belo Horizonte, 1986.

BÉLIVEAU, RICHARD. Os alimentos contra o câncer: A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação/ Richard Béliveau, Denis Gingras; tradução de Lucy Magalhães: Petrópolis, RJ:Vozes, 2007. Pg 19-42.

BISCARO, FERNANDA. ESTUDO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E PRÓ-APOPTÓTICO DO LÁTEX DE *Croton celtidifolius* Baill Dissertação (Mestrado)

- Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Florianopolis, 2011.

BLIND, L. Z.; MOYA, R. F. P. Estudo da atividade antineoplásica das subfrações do extrato bruto de Vernonia scorpioides até o isolamento de uma substância pura. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2005. Monografia.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicas. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos- Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Pg 9.

BRODY, THEODORE M. FARMACOLOGIA HUMANA/EDITORES KENNETH P. MINNEMAN, LYNN WECKER; EDITOR ASSOCIADO JOSEPH LARNER, THEODORE M. BRONDY;[TRADUÇÃO VILMA RIBEIRO DE SOUZA VARGA…et al.].-Rio de janeiro: Elsevier,2006. Pg491-510.

BRÜNING, JAIME. Cuide de Sua Saúde (com tratamentos naturais), Cascavel, ASSOESTE, 1990. Pg10.

BUSKUHL, H. Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de Lactonas Sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de Vernonia scorpioides (Lam) Pers. 2007.119p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí,2007.

BUSKUHL H, DE OLIVEIRA FL, BLIND LZ, DE FREITAS RA, BARISON A, CAMPOS FR, CORILO YE, EBERLIN MN, CARAMORI GF, BIAVATTI MW. Sesquiterpene lactones from **Vernonia scorpioides** and their in vitro cytotoxicity. Phytochemistry. 2010 Sep;71(13):1539-44. Epub 2010 Jul 3

BUSKÜHL, H. **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxico da mistura e substâncias isoladas da *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers.,** Dissertação (Mestrado).Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, 2007.

CABRERA, A. L. e KLEIN, R. M. Compostas: 3. Tribo: Vernoniae. **Flora Ilustrada Catarinense**, p 354-355, 1980.

CAO ,et al. **Antiproliferative triterpenoid saponins of Dodonaea viscosa from the Madagascar dry forest.** J Nat Prod. 2009 Sep;72(9):1705-7

CARRENHO, LUISE ZOZULA BLIND. Avaliação dos Efeitos da Subfração acetato de Etila III de Vernonia scorpioides em modelo de melanoma murino in vivo/ Luise Zozula Blind Carrenho. Dissertação de Mestrado USP- Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia- São Paulo:2009.

CENTRO DE ESTUDO ETNOBOTÂNICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS. **Etnobotânica e etnofarmacologia**. Disponível em > http://www.cee.unifesp.br/etnofarmacologia.htm< Acesso em 14 de novembro de 2011. 16:42

CHEN, C-N.; HUANG, H.H.; WU,C-L.; LIN, C.P.C.; HSU, J.T.A.; HSIEH, H-P.; CHUANG, S.E.; LAI, G-M. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. Câncer Letters, V.246,P.237-252,2007.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.

DA SILVA, S.I.; FIGUEIREDO, P. M. S.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *C. sylvestris* on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazon**, v. 38, p.107-112, 2008.

DA SILVA, S. L. .; CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemeotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of C. sylvestris (Flarcortinaceae). **European Journal of Pharmacology**. v. 608 (1-3), p. 76-83, 2009.

DALBÓ, S.; MOREIRA, E.L.G.; NARDI, G.M.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M. Medicinal properties of *Croton celtidifolius* Baill: validation of the

popular use of sangue-de-adave. Book Drug plants, Recent Progress in medicinal Plants, vol 27, 2010. Pg 71-90.

DREUX, E. C. **Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato hidroalcóolico de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Persoons em inflamação aguda**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, 2005.

ERASTO, P.;GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J.; J. Ethnopharmacol.2006.

ESTEVES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L.M.; SCHNNEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CRAVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 191-196, 2005.

FERNANDES, ELIZABETH S et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal Of Pharmacology**, Londres, v. 569, n.3, p.228-236, 2007.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL. *Vernonia scorpioides*. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4641> acessado em 20 de março de 2012.

FRESHNEY, R. I. **Freshney's Culture of animal cell- a multimedia guide**. New York, 1999. CD-ROOM.

GETIE M, GEBRE-MARIAM T, RIETZ R, NEUBERT. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of Dodonea viscosa (Sapindaceae). RH Die Pharmazie [2002, 57(5):320-2

GILBERT, BENJAMIN. Monografia de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas/Benjamin Gilbert; José Luiz Pinto Ferreira; Lucio Ferreira Alves- Curitiba: A bifito,2005. Pg 9.

GROMBONE-GUARANTINI, M.T.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J.; TRIGO, J.R. Sesquiterpen and polyacethylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil. **Biochem.Syst.Ecol.**, v.33, p. 479-486, 2005.

HISTÓRIA CIÊNCIA SAÚDE. Manguinhos vol.17 supl.1 Rio de Janeiro jul. 2010. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-59702010000500002>. Acessado em 23 de março de 2012.

INCA. Câncer o que é 2012. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso em 19 de janeiro de 2012.

INCA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro : Inca, 2011.118 p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em 19 de Janeiro de 2012.

INCA. Perguntas e respostas sobre o câncer. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/eab1bc8043b01c65a185ad3a98a55b50/perguntas_qt.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=eab1bc8043b01c65a185ad3a98a55b50>. Acesso em 02 de março de 2012.

ITO, VANESSA MAYUMI. Concentração de tocoferois efitoesteróis a partir do destilado desodorizado de óleos vegetais através do processo de destilação molecular. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade de Campinas, 2007.

IZEVBIGIE, E.B.; BRYANT, J.L.; WALKER, A.A. novel natural inhibitor of extracellular signal-regulates kinases and human breast cancer cell gront. Experimental Biology and Medicine, V.229, P.163-169, 2004.

JUNIOR, LUZ NETO N. **Momento terapêutico fitoterápico do Hospital das Forças Armadas.** Brasília: EGGCF, 1998. Pg15.

KIM, G.S. et al. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of Annona muricata. **Phytochemistry. 49(2):565-71.1998.**

KOROLKOVAS, A; BURCKHALTER J.H.. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 3-38 p.

KOROLKOVAS, ANDREJUS. QUÍMICA FARMACÊUTICA/ ANDREJUS KOROLKOVAS, JOSEPH H. BURCKHALTER; tradução ampliada e atualizada por Andrejus Korolkovas.-[reimpr.].-Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2008. Pg618-620.

KREUGER, M.R.O., BIAVATTI, M. W., PACHECO, E. S. JUNIOR, R. R. A., BLIND, Z. B. Ação citotóxica da sub-fração 2125 de Vernonia scorpioides contra células do Sarcoma 180 em camundongos. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, n.2A, 2009.

KUMARI, G.N.K.; MASILAMANI, S.; GANESH, M.R.; ARAVIND, S.; SRIDHAR, S.R. ZALAZANIN D: a fungistatic sesquiterpene from Vernonia asborea. **Fitoterapia**, V.74, P.479-482,2003.

KUO, Y.H.; KUO, Y.J.; YU, A.S.; WU, M.D.; ONG, C.W.;YANG-KUO, L.M.; HUANG,J.T.; CHEN, C.F.,LI,S.Y. Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide_A and B, from *Vernonia cinerea.* **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 425-426, 2003.

KVIECINSKI, MAICON ROBERTO; Avaliação das Atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de Bidens pilosa L.(Asteraceae). Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia, 2007. Pg 9-10.

KVIECINSKI, M.R., FELIPE, K. B.; SCHOENFELDER,T.; WIESE, L.P.L.; ROSSI, M. H.; GONÇALEZ , E.; FELICIO, J. D.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potentioal of Bidens pilosa (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p. 69–75, 2008.

LIU, J.; LIU.Y.; SI,Y.;YU,S.;QU, J.;XU,S.; HU, Y.; MA, S.; Steroids 2009.

LORENZI, HARRI. Arvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, Vol.1/ Harri Lorenzi. _ _4. ed. _ _Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, HARRI. Arvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, Vol.2/ Harri Lorenzi. _ _2. ed. _ _Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Ervas Daninhas do Brasil**. São Paulo: Ed.: do autor, p. 108, 1982.

Lorenzi, HARRI. **Plantas daninhas do Brasil** 3ªed.,Nova Odessa:Inst. Plantarum,2000.608p.

LORENZI, HARRI. Plantas Medicinais no Brasil:nativas e exóticas/Harri Lorenzi, Francisco José de Arbreo Matos;computação gráfica Henrique Martins Lauriano. _ _2. ed. _ _Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. Pg 14-191.

LORENZI, H. **Ervas Daninhas do Brasil**. São Paulo: 2009.

MAISTRO, E.L., CARVALHO, J.C., MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay.**Toxicology *In Vitro***, v. 18, p. 337–342, 2004.

MISEREZ, F.;POTTERAT, O.; MARSTON, A.; MUNGAI, G.M.; HOSTETTMANN,K.; Phyltochemistry 1996.

MORAES, M. D. A família Astearaceae na planície litorânea de Picinguaba, **Dissertação de mestrado**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil, 1997.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from C. sylvestris Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.39 (3), p. 693-697, 1991.

MORS, W.B. ;Rizzini, C.T. & Pereira, N.A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Inc.,Algonac, Michigan, 2000. Pg 501.

MULLER, S. et al. Sesquiterpene lactone from Montanoa hibiscifolia that inhibit the transcription factor NF-Kappa B. **Jornal Natural Producto**, V.67, P.622-630, 2004.

NARDI, G. M.; FELLIPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Anti-inflamatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v. 10, p. 176-184. 2003.

NARDI, G. M.; DALBÓ, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DOVALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnophamacology.** v.107, p.73-78, 2006.

NEIVA, TEREZINHA DE JESUS CARVALHO et al. Antiplatelet activity of Croton celditifolius. Rev. Bras. Cienc. Farm. [online].2008,vol.44,n.1 pp.127-

132.ISSN 1516-9332. Disponível em HTTP://www.scielo.br/scielo.php?sript=sci_arttext&pid=51516-93322008000100014. Acessado em 17/01/2012 22:57.

OLIVEIRA, E.R.O. O que é medicina popular. São Paulo:Abril Cultural/Brasiliense. Coleção Primeiros Passos, nº31, 1985.

PAGNO, L.; BLIND, L.Z.; BIAVATTI, M.W; KREUGUER, M.R.O. Cytotoxic activity of dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich´s tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**,v. 39, p. 1483-1491, 2006.

PANIZZA, S. Plantas que curam (Cheiro de Mato). 3. ed. IBRASA, São Paulo,1998. Pg 280.

PARISOTTO, EDUARDO BENEDETTI. Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de Cordia verbenácea. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis,SC, 2010. Pg 13-14.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. A.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essências em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**. v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PILLAY, P.; VLEGGAAR, R.; MAHARAJ, V.J.; SMITH, P.J.; LATEGAN, C.A.; CHOUTEAU, F.; CHIBALE, K.; Phytochemistry 2007.

QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, P.T.V.; SATO, D.N.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A.A.; MEIRELES, A.A. Global yield of the Supercritical CO2 extraction from *Cordia verbenacea* DC - Anticancer and antimycobacterial activities. **PHARMACOGNOSY MAGAZINE**. v. 3, n. 9, p. 40-46, 2007.

RANG, H.P. et al; Farmacologia. Tradutores:Patricia Lydie Voeux, Antonio José Magalhães da Silva Moreira.-Rio de Janeiro:Elsevier,2004 Pg.793-794.

RAUH, LARYSSA KATHLIN; AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DA *Vernonias corpioides* (Lam) Persons EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas.Universidade Federal do Paraná, Curitiba,Brasil, 2008.

REITZ, R. Sapindáceas. In: Reitz, R.(Ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí,1980.Pg 156.

ROLDÃO, E.F.; WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; STASI, L.C.D. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v: 119, n.1 p:94-98, 2008.

ROZENBLAT, S.; GROSSMAN, S.; BERGMAN, M.; GOTTLIEB, H.; COHEN. Y.; DUVRAT. S. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cells lines. Biochemical Pharmacology, V.75, P.369-382.2008.

RUPPELT, B.M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folkmedicine as anti-snake venom. I. Analgesic and anti-inflammatory activities. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86 (suppl.2), 1991. Pg 203-205.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, F. M.; LAO, J.;BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. S. Sangre de grado *Croton palonostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 80, p. 121-129, 2002.

SOUZA, FÁTIMA OTAVINA DE. Asteraceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente, Cananéia, SP., 2007.

SUBHASHINI, J; MAHIPAL, S V K; REDDANNA, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, Europa, n. , p.31-43, 2005.

TEIXEIRA, LUIZ ANTONIO. O controle do câncer no Brasil na primeira metade do século XX. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2012 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702010000500002&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 20 jan. 2012.

VAGIONAS, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; GRAIKOU, K.; GORTZI, O.; CHINOU, I.; Food hem.2007.

WOLOSZYN1, NOELI. **EM BUSCA DA TERRA: Colonização e exploração de madeiras no Oeste Catarinense. Pg 3**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011) WHO programmes and projects: cancer. <http://www.who.int/cancer/en/> . Acessado em 10 de setembro de 2011.

WU, Y.D.; LOU, Y.J. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of Brassica campestris induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. Magazine Phytotheraphy Research 21(11):1087-91, 2007.

YUNES, ROSENDO AUGUSTO. Química de Produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia, Rosendo Augusto Yunes, Valdir Cechinel Filho (orgs).-1.ed.-Itajaí 2007. Pg159.