

LUANA PEREIRA MONTEIRO

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO VEGETAL DE *Croton urucurana* Baill EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

M775d Monteiro, Luana Pereira, 1981-
2015 Determinação da atividade citotóxica do extrato vegetal de *Croton urucurana* Baill em linhagens de células tumorais / Luana Pereira Monteiro. - Vicosa, MG, 2015.
xiv, 86f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.76-86.

1. *Croton urucurana*. 2. Produtos naturais. 3. Toxicologia. 4. Leucemia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 589.69

LUANA PEREIRA MONTEIRO

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO
VEGETAL DE *Croton urucurana* Baill EM LINHAGENS DE CÉLULAS
TUMORAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de julho de 2015.

Patrícia Ap. Fontes Vieira

Virgínia Ramos Pizziolo

Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Aparecida e Faustino, e aos meus avós José Damasceno e Luzia, Jesus (in memoriam) e Clara.

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Como é bom poder agradecer aqueles que nos ajudaram em algum momento de nossas vidas... É difícil encontrar palavras para descrever a alegria que sinto de ter concluído mais essa etapa da minha vida, porém mais difícil ainda é encontrar palavras que possam agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me deram suporte para que eu pudesse chegar até aqui.

À Deus que me deu determinação e força para que eu vencesse mais essa etapa, me direcionando e acreditando que eu era capaz ao me lançar mais esse desafio, não me desamparando jamais,

Aos meus pais que sempre me apoiaram, me incentivaram a seguir em frente, com muito amor, carinho e zelo, sempre acreditando na minha capacidade (mesmo quando às vezes até eu duvidava!),

À Mãe Luzia, minha amiga, companheira e confidente. O amor e o carinho que você sempre dedica a mim me dão forças para seguir em frente e nunca desistir,

A Universidade Federal de Viçosa bem como ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de crescimento e aperfeiçoamento científico,

À Prof.^a Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, amizade, companheirismo e principalmente por ter confiado em mim contribuindo grandiosamente na minha formação profissional e pessoal,

À Prof.^a Patrícia Fontes Vieira por ter aceitado participar da banca, mas principalmente por ser essa amiga tão especial e querida, sempre participando de momentos especiais da minha vida,

À Prof.^a Virgínia Ramos Pizziolo pela participação na banca avaliadora,

Aos meus sobrinhos Carlos Eduardo e Mateus que me deram a felicidade de ser tia e a grandeza de sentir um amor tão puro e especial. Desejo que o caminho de vocês seja repleto de conquistas, alegrias, realizações e muita responsabilidade,

Aos demais familiares, tios e primos, pelo apoio e carinho de sempre, em especial à Tia Dorinha e família, Igor e Fabiana, Vívian, Tio Fabinho e Cláudia,

Ao Eduardo Monteiro, pela força e apoio desde o início do Mestrado, mas principalmente por ser esse tio tão carinhoso e especial,

À minha querida amiga, Vanessa Terra por inúmeros momentos que passamos juntas, por tudo de bom e ruim que compartilhamos da vida uma da outra. Você é a minha irmã de coração e de alma! Tenho certeza que sempre estaremos juntas....

Aos meus queridos amigos Valdneá Dalvi, Adriano Valentin, Livia Constâncio, Prímula Vieira, Ítalo Coutinho por estarem sempre presentes na minha vida, apoiando e partilhando coisas boas e momentos agradáveis dos quais nunca me esqueço e que me fazem muito bem, vocês são os melhores amigos que alguém pode ter....

Aos amigos da Pós-Graduação Dalila Leal, Patrícia Coelho, Luciana Ângelo e Leandro Gusmão por serem tão queridos e especiais, cada um a sua maneira, e que possamos ainda partilhar das conquistas uns dos outros nessa jornada que iniciamos juntos, e em especial agradeço ao querido amigo Duílio Soares que nessa etapa final foi primordial a sua amizade, a sua atenção e o seu companheirismo, espero que possamos estar sempre juntos nessa parceria profissional, muito obrigada por tudo!!!! Agradeço também a Priscila Niquini que tanto me ajudou no momento que eu mais precisei.

A Gabriela Alves e ao Ronaldo Silva quero agradecer por serem pessoas tão especiais que tenho o privilégio do convívio, carinho, risadas, festas, de todos os momentos que partilhamos e que ainda iremos partilhar juntos.... a amizade de vocês é fundamental para mim, muito obrigada pelo apoio de hoje e de sempre!!!

Aos queridos amigos Vita, Agostinho, Betinha, Júlio, Janaína, Deivison, Beatriz, Fátima, Glauber, Maria da Paixão, Marco Aurélio, Luís Otávio por sempre estarem presentes em momentos tão especiais,

À Geisla Teles Vieira pela contribuição indispensável na execução deste trabalho,

Ao funcionário do Laboratório de Biofármacos José Geraldo Pinto pelo apoio nas análises,

A FAPEMIG por ter financiado a bolsa de pesquisa,

Enfim....

À todos fica a minha enorme gratidão, pois sem as conversas, encontros, discussões, trocas, sorrisos, lágrimas e, muitos e muitos cafés eu nada seria!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Ix
LISTA DE TABELAS	Xi
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	Xii
RESUMO	Xiii
ABSTRACT	Xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Pesquisa em produtos naturais	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Família Euphorbiaceae	5
2.2 Gênero <i>Croton</i>	6
2.2.1 Caracterização Geral	6
2.2.2 Uso Medicinal	7
2.2.3 Diversidade Química	8
2.2.3.1 Metabólitos Secundários	9
2.2.3.1.1 Terpenóides	10
2.2.3.1.1.1 Monoterpenos	12
2.2.3.1.1.2 Sesquiterpenos	13
2.2.3.1.1.3 Diterpenos	14
2.2.3.1.2 Óleos Essenciais	17
2.2.3.1.3 Flavonóides	18
2.2.3.1.3.1 Atividade anticarcinogênica dos flavonóides	20
2.2.3.1.4 Alcalóides	24
2.3 Vincristina	25
2.4 <i>Croton urucurana</i> Baill	27
2.4.1 Descrição Botânica	27
2.4.2 Uso Popular	30
2.4.3 Atividades Biológicas de <i>Croton urucurana</i>	31
2.5 Câncer	33
2.5.1 Câncer e o crescimento celular	37
2.5.2 Ciclo celular e carcinogênese	38
2.5.3 Câncer e processo inflamatório	41
2.5.4 Apoptose	43

2.5.5 Leucemia	47
2.5.6 Linhagem de células leucêmicas	48
3. OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo Geral	52
3.2 Objetivos Específicos	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Material Vegetal	53
4.2 Preparação do extrato vegetal	53
4.3 Linhagem e cultivo celular	54
4.4 Ensaio de MTT	54
4.5 Ensaio de LDH	55
4.6 Avaliação da apoptose por Microscopia de fluorescência	55
4.7 Controle Positivo	56
4.8 Análise Estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1 Determinação da viabilidade celular das células U937 e THP-1 tratadas com extrato de <i>Croton urucurana</i> (MTT)	57
5.2 Avaliação da viabilidade celular pela liberação da lactato desidrogenase (LDH)	61
5.3 Avaliação do mecanismo de morte celular induzida pelo composto testado (microscopia de fluorescência)	63
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das espécies do gênero <i>Croton</i> .	7
Figura 2: Representação esquemática das rotas de biossíntese de formação de metabólitos secundários	10
Figura 3: Esquema de formação dos principais grupos de terpenos	11
Figura 4: Exemplos de monoterpênos detectados em espécies de <i>Croton</i>	13
Figura 5: Exemplos de sesquiterpenos encontradas em espécies de <i>Croton</i>	14
Figura 6: Representação das estruturas do fitol(1), retinol(2) e retinal(3)	15
Figura 7: Exemplos de diterpenos comuns para as espécies de <i>Croton</i>	16
Figura 8: Estrutura molecular de um flavonóide	19
Figura 9: Estrutura da morina	21
Figura 10: Estrutura básica da norlaudanosolina	24
Figura 11: Alcalóides de diferentes subgrupos encontrados em <i>Croton</i>	24
Figura 12: Estrutura da Taspina	25
Figura 13: Estrutura da Vincristina	26
Figura 14: <i>Croton urucurana</i> Baill	29
Figura 15: Látex de <i>Croton</i>	31
Figura 16: Esquema do processo de formação de células cancerígenas	34
Figura 17: Processo de metástase	35
Figura 18: Passo a passo do processo de carcinogênese	36
Figura 19: Esquema do ciclo celular	39
Figura 20: Destinos das células durante o ciclo celular	41
Figura 21: Inflamação normal e neoplásica	43
Figura 22: Vias envolvidas no mecanismo bioquímico da apoptose	45
Figura 23: Diferenciação celular hematopoiética e linhagens de células leucêmicas	50
Figura 24: Efeito citotóxico do extrato de <i>Croton urucurana</i> e do composto Morina contra as células humanas U937 e THP-1	58

Figura 25: Efeito citotóxico do composto Vincristina (controle positivo) contra as células humanas U937, THP-1	60
Figura 26: Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica)	64
Figura 27: Porcentagem de apoptose induzida pelo extrato de <i>C.urucurana</i> nas linhagens neoplásicas U937, THP-1	65
Figura 28: Porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina nas linhagens neoplásicas U937, THP-1	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mecanismos gerais da quimioprevenção	23
Tabela 2: EC ₅₀ (µM) dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT	59

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

- BE** brometo de etídio
- CDK's** quinases dependentes de ciclinas
- CIM** Concentração mínima inibitória
- CG** Cromatografia gasosa
- CG-EM** Cromatografia gasosa - Espectrometria de massas
- DMSO** dimetilsufóxido
- EC₅₀** índice de citotoxicidade 50%
- Fas/FasL** via da regulação da proliferação celular e do crescimento tumoral
- FPP** farnesilpirofosfato
- FNTr** receptores de fator de necrose tumoral
- GPP** Geranyl-difosfato
- GGPP** geranylgeranylpirofosfato
- INT** 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2-tetrazolium cloro
- IPP** unidades de isopreno
- LA** laranja de acridina
- LDH** desidrogenase láctica
- LPP** linalil-PP
- MCP** Programa de Morte Celular
- MTT** brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- NPP** neril-PP
- nM** nanomolar
- QPN** Química dos Produtos Naturais
- STAT3** ativador de transcrição 3
- μM** micromolar

RESUMO

MONTEIRO, Luana Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho, 2015.
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO VEGETAL DE *CROTON URUCURANA* BAILL EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS.
Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadora: Virgínia Ramos Pizziolo

O câncer é uma doença caracterizada pelo aumento descontrolado da proliferação celular. Em geral ocorrem paralelamente ao aumento do crescimento e perda da diferenciação celular. Assim as células cancerígenas perdem suas características originais de diferenciação e se tornam atípicas. As leucemias são neoplasias malignas que acometem as células do sangue e tem origem na medula óssea. São cânceres de grande incidência e de difícil tratamento, havendo, portanto, uma constante procura por terapias mais eficientes. O presente trabalho investigou a ação citotóxica do extrato hidroalcolico de *Croton urucurana* em células leucêmicas humanas U937 e THP-1. As linhagens de células U937, THP-1 foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço (1×10^6 cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com extrato nas concentrações finais de 50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM e 800 µM para os testes de viabilidade celular com MTT (-3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazol). Após 48h a viabilidade foi avaliada pelo MTT e o sobrenadante utilizado para dosagem da enzima Lactato Desidrogenase (LDH). Microscopia de fluorescência foi usada para avaliar a apoptose. O extrato foi capaz de induzir apoptose em ambas as linhagens de células testadas nas concentrações 400 e 800 µg/mL ($p \leq 0,05$). O aumento percentual da morte celular por apoptose foi associado a alterações no potencial de membrana mitocondrial sugerindo o envolvimento da via intrínseca de ativação da apoptose.

ABSTRACT

MONTEIRO, Luana Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **ASCERTAINMENT OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE *Croton urucurana* Baill VEGETAL EXTRACT IN TUMOUR CELLS LINEAGE.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-adviser: Virgínia Ramos Pizziolo

Cancer is a disease characterized by the uncontrolled rise of in the cellular proliferation. In general, it occurs in parallel to the increased growth and loss of cellular differentiation. Thus, the cancer cells lose their original properties of this cellular differentiation and become atypical. The leukaemia is a malign bone neoplasia, which affects the blood cells and have its source in the bone marrow. They are called cancers with great incidence and tough treatment, being, therefore a constant search for more efficient therapies. The present study investigated the toxic action of the hydro alcoholic extract of the *Croton urucurana* in leukaemic cells U937, THP-1 which were plated in volume of 100 μ L/pool (1×10^6 cels/mL) in plaques of 96 pools, treated in extracts in the final concentrations of 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M and 800 μ M for the tests of cellular viability with MTT (-3-(4,5-dimethyl-2-thiazole) 2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide). After 48h the viability was tested by the MTT and the supernatant used to dosage the lactate dehydrogenase (LDH). The fluorescent microscopy was used to evaluate the apoptosis. The extract was capable to induce the apoptosis in both lineages of the tested cells, in the concentrations of 400 and 800 μ g/mL ($p \leq 0,05$). The percentage increase of the cellular death by apoptosis was associated with alterations in the mitochondrial membrane potential, which suggests an involvement in the intrinsic activation path of the apoptosis.

1. Introdução

1.1 A pesquisa em Produtos Naturais

A utilização de plantas medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das antigas formas de prática medicinal da humanidade. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação de propriedades terapêuticas (BUTLER, 2008; KINGSTON, 2011). Sendo que por um longo tempo, minerais, plantas e produtos de origem animal foram as principais fontes de drogas (CARVALHO & SILVEIRA, 2010). A natureza sempre despertou no homem grande fascínio, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico (VIEGAS, 2007).

Muitas pessoas utilizam plantas para o tratamento de várias doenças inclusive para o câncer, embora muitas das suposições quanto a eficácia contra o câncer possam ser vistas com certo ceticismo, devido ao fato de ser uma doença específica. Porém muitos extratos ou substâncias isoladas de plantas vêm sendo testadas a fim de confirmar as suposições atribuídas às plantas como possuidoras de atividade biológica comprovando assim o seu uso (CRAGG; NEWMAN, 2009). Para tanto podemos citar como exemplos os alcalóides Vincristina e Vimblastina obtidos a partir de *Catharantus roseus*, para linfomas e leucemia infantil, e o diterpeno taxol da *Taxus brevifolia*, para o câncer ovariano, mamário e pulmonar (GURIB-FAKIM, 2006).

A partir do século XVII houve um grande desenvolvimento teórico e tecnológico proporcionando o advento da química e da farmacologia (após os trabalhos de Lavoisier), culminando no isolamento de princípios ativos dos fitoterápicos, como o da morfina por Serturmer em 1806 (SCHULTES & HOFFMANN, 2000). As plantas permanecem como principais fontes de recursos para os mais diversos males até o século XX, quando são fundadas algumas das atuais indústrias farmacêuticas e a distribuição e o uso de drogas sintéticas passa a fazer parte do cotidiano das práticas medicinais ocidentais. A evolução científica da química dos produtos naturais (QPN) no Brasil teve seu marco histórico na fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), implantada e estruturada por pesquisadores de excelência, como Otto R. Gottlieb, de onde surgiram grupos consolidados e atuantes na área por todo o país. Pesquisas datadas do ano 2000 estimavam que cerca de 80% dos países em desenvolvimento encontravam nas plantas medicinais a primeira opção no tratamento de doenças (SALATINO, 2007).

O impacto dos Produtos Naturais no processo de desenvolvimento de novos compostos (fármaco, aditivo alimentar, ou inseticida) nas últimas duas décadas é inquestionável. A pesquisa na área de produtos naturais tornou-se um fato de relevância e grande valorização em todos os países desenvolvidos, principalmente devido à possibilidade de descoberta de vários princípios ativos que poderão ser utilizados para fins terapêuticos (VEIGA- JUNIOR, 2005). As plantas medicinais já estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico, devido a possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos, devido a diversidade de seus constituintes (CUENDET & PEZZUTO, 2008).

O potencial farmacológico de uma espécie está direta e positivamente relacionado ao potencial econômico representando forte argumento para a conservação das áreas nativas, uma vez que a extinção de espécies com elevado potencial terapêutico denotaria uma perda significativa para a medicina (SILVA & MOCELIN, 2007).

Dentro deste contexto de pesquisa em produtos naturais, o Brasil possui vantagens, tais como a maior biodiversidade de plantas, rica diversidade étnica e cultural, tradição de uso das plantas medicinais com conhecimento transmitido oralmente por gerações, além de tecnologia para validar cientificamente este conhecimento. Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos ativos e somente 1.100 espécies foram avaliadas, o que demonstra um amplo campo de pesquisa nesta área (VASCONCELLOS, 2002).

Desta forma, é cada vez mais válido o aprimoramento e a ampliação nos estudos químicos e farmacológicos dos recursos vegetais com conhecidas propriedades terapêuticas, para que se possa influenciar a pesquisa no sentido de saber que só é possível compreender as propriedades terapêuticas de uma planta a partir do conhecimento de seus constituintes bem como compreender as propriedades terapêuticas de seus constituintes através do conhecimento integral e complexo da planta (ALONSO, 2007).

Considerando a necessidade presente em se descobrir novos e efetivos agentes medicinais, o gênero *Croton* surge como uma fonte de princípios ativos. Entre as indicações da medicina popular pode-se citar a sua utilização no tratamento de câncer (SILVA, 2009). Esta espécie já vem sendo estudada por

pesquisadores há alguns anos e o seu potencial terapêutico tem sido comprovado em diversos modelos experimentais e vários artigos científicos já foram publicados. O que mais motiva o uso de *Croton urucurana* é a possibilidade comprovada por estudos preliminares de sua atividade frente a células tumorogênicas leucêmicas U937 e THP-1 com o uso de sua gama de metabólitos secundários (SALATINO, 2007).

2. Revisão de Literatura:

2.1 Família Euphorbiaceae

Dentre as muitas espécies vegetais que fornecem novas substâncias químicas com grande potencial, destacam-se aquelas da família *Euphorbiaceae*. É uma família botânica pertencente à ordem *Malpighiales* subdivisão Espermatófitas, divisão Magnoliophyta, superclasse Magnoliopsida, classe Eudicotidonea, clado Rosidae I (APGIII, 2009), sendo uma das mais diversificadas e complexas entre as *Angiospermae* com cerca de 290 gêneros e 8000 espécies, constituindo a sexta maior família depois das *Asteraceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Orchidaceae* e *Rubiaceae* (LIMA, 2009)

As plantas da família *Euphorbiaceae* podem apresentar-se como espécies arbóreas, arbustivas, subarbustos e ervas com folhas alternas simples ou compostas estipuladas. Caracterizam-se ainda por apresentarem látex (visível quando a planta é submetida às injúrias mecânicas) (SOUZA & LORENZI, 2008). Espécies de notável importância econômica são abundantes na família, compreendendo desde plantas ornamentais como *Euphorbia milli* Des Moul., a coroa-de-cristo, e *Codiaeum variegatum* (L.) A. Juss., o louro variegado (SOUZA & LORENZI, 2008) até espécies de importância cultural brasileira como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e a seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). Entre as plantas da família *Euphorbiaceae* com uso medicinal amplamente encontrado na literatura etnofarmacológica podem ser destacadas *Phyllanthus niruri* L., quebra-pedra, *Jatropha gossypifolia* L., pinhão-roxo, *Ricinus communis* L., mamona, além de diversas espécies do gênero *Croton* L. (LORENZI & MATOS, 2002).

2.2 Gênero *Croton*

2.2.1 Caracterização Geral

Croton L., pertencente à subfamília *Crotonoideae*, é o segundo maior e mais diverso gênero da família *Euphorbiaceae*, com cerca de 1.200 espécies (GOVAERTS, 2000; BERRY, 2005). Apresenta distribuição pantropical, ocorrendo predominantemente nas Américas, embora algumas espécies atinjam a África, Ásia e Oceania. Os principais centros de diversidade do gênero encontram-se na América do Sul, Antilhas e México (Figura 1).

Entre as principais características do gênero destaca-se a inflorescência espiciforme, flores femininas com pétalas reduzidas, estames encurvados no botão, tipo de indumento (estrelado, uniforme ou simples) e látex não-leitoso, que possibilita distingui-lo de outros gêneros da subfamília *Crotonoideae* como, por exemplo, *Hevea* e *Manihot* (LIMA, 2009). Este gênero compreende ervas, árvores e arbustos, os quais estão descritos em diferentes farmacopéias.

Várias espécies desempenham papel importante na terapêutica tradicional com plantas medicinais, e com cerca de 300 espécies, o Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, que está representado nos mais variados ambientes e tipos vegetacionais (Berry, 2005).

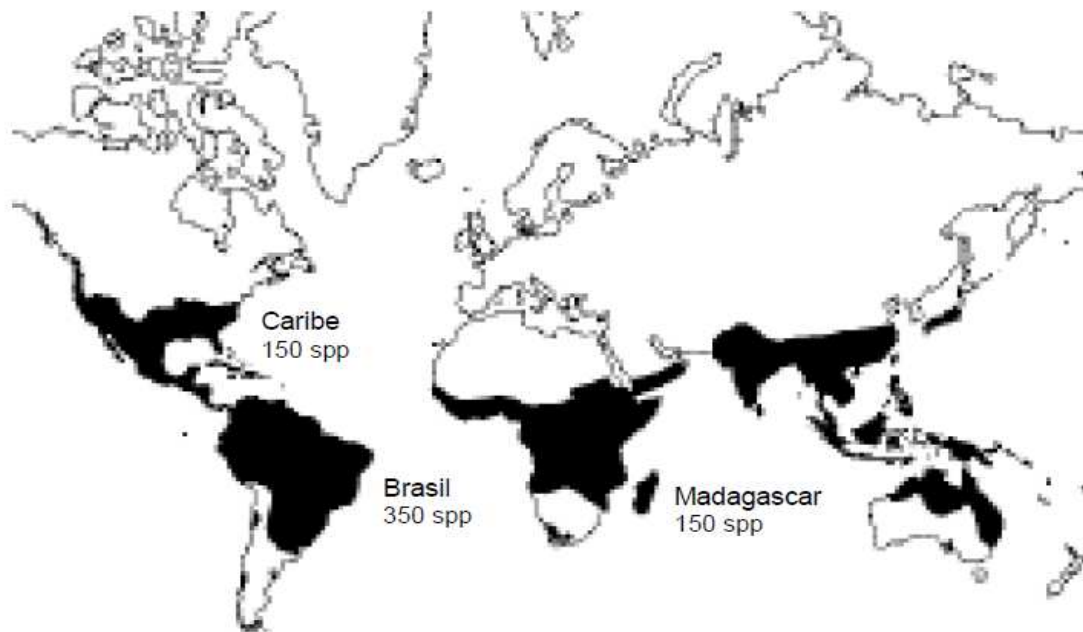


Figura 1: Distribuição das espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas do gênero *Croton*

L. Fonte: BERRY, 2005.

A maioria das espécies de *Croton*, notadamente as herbáceas e as arbustivas, tem crescimento rápido. De acordo com a mais bem sucedida teoria da ecologia bioquímica, plantas de crescimento rápido investem preferencialmente em defesas qualitativas, ou seja, em substâncias com atividade fisiológica, como alcalóides e terpenos. Não é surpreendente, portanto, que *Croton* seja uma fonte abundante de metabólitos secundários, com ampla diversidade de atividade farmacológica (SALATINO, 2007).

2.2.2 Uso medicinal

A variedade de uso medicinal da espécie de *Croton* nas diferentes regiões do mundo é proporcional a toda variabilidade inerente ao gênero. Cascas, folhas, raízes e sementes são utilizadas no tratamento de uma série de males. Em geral

preparações com as espécies de gênero *Croton* são usadas como inseticida, estimulante, vermífugo, diurético, antisséptico, purgativo, analgésico, antipirético e cicatrizante. Da mesma forma preparações de espécies de *Croton* são aplicadas no tratamento de tumor, câncer, epilepsia, inflamação, malária, diarreia, tuberculose e em uma série de sintomas gastrointestinais (PALMEIRA, 2006).

Devemos dar destaque também para as espécies produtoras de óleos, atualmente vem sendo publicados vários trabalhos tratando das propriedades dos óleos, as quais podem destacar atividade gastroprotetiva, miorelaxante, antiespasmódica, antinociceptiva e sobre alterações comportamentais (RODRIGUES, 2009).

2.2.3 Diversidade Química

Muitas espécies de *Croton* apresentam grande potencial econômico, principalmente para a indústria farmacêutica, devido à alta incidência de metabólitos secundários, (RANDAU, 2004; TIEPPO, 2006; SALATINO, 2007).

Estudos sobre o potencial farmacológico dos extratos ou componentes isolados das espécies de *Croton* são relevantes, tendo-se em vista a diversidade de uso na medicina popular tradicional ou terapias alopáticas. Do ponto de vista da quimiotaxonomia, a grande variedade de compostos encontrados nessas plantas pode prover também características diagnosticas de determinados grupos ou espécies (GUPTA, 2008).

A diversidade inerente ao gênero se reflete na descoberta de novas estruturas como, por exemplo, novas classes de terpenos, como os diterpenos (HELUANI, 2000) e alcalóides (ARAUJO JUNIOR, 2005). A fitoquímica de *Croton* abrange ainda, óleos vegetais e flavonóides (HELUANI, 2005). Óleos voláteis são

comuns entre as espécies de *Croton*. Entre os muitos componentes desses óleos foram identificados monoterpenos como cineol e linalol, sesquiterpenos como cariofileno, fenilpropanoides, eugenol e anetol (SALATINO, 2007).

Várias espécies de *Croton* possuem látex de coloração vermelha como no *Croton urucurana*, onde são encontradas proantocinidinas (taninos catequínicos) e alcalóides. Do látex de *C.lechleri* e *C.palanostigma Klotzsch* é extraído um alcalóide, a taspina, juntamente com a lignana, a única relatada até hoje no gênero. Os alcalóides mais freqüentemente encontrados em *Croton* são benzilisoquinolínicos, tais como os encontrados em Ranunculales (como isoboldina e glaucina) (PIETERS, 1993).

2.2.3.1 Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários são caracterizados como um grande número de compostos orgânicos de ocorrência restrita a grupos taxonômicos, não obrigatoriamente necessários a processos básicos de crescimento do organismo, mas com caráter essencial em sua sobrevivência e interação com o ambiente, principalmente em relação à patógenos, herbívoros, polinizadores e dispersores podendo não ser produzidos dependendo das condições ambientais ou da fase de vida do indivíduo (ANSELMO, 2014; TAIZ & ZEIGER, 2004).

As principais classes de metabólitos secundários, tanto em número de compostos como em importância farmacológica e ambiental são os terpenóides, óleos voláteis, flavonóides e alcalóides (SALATINO, 2007).

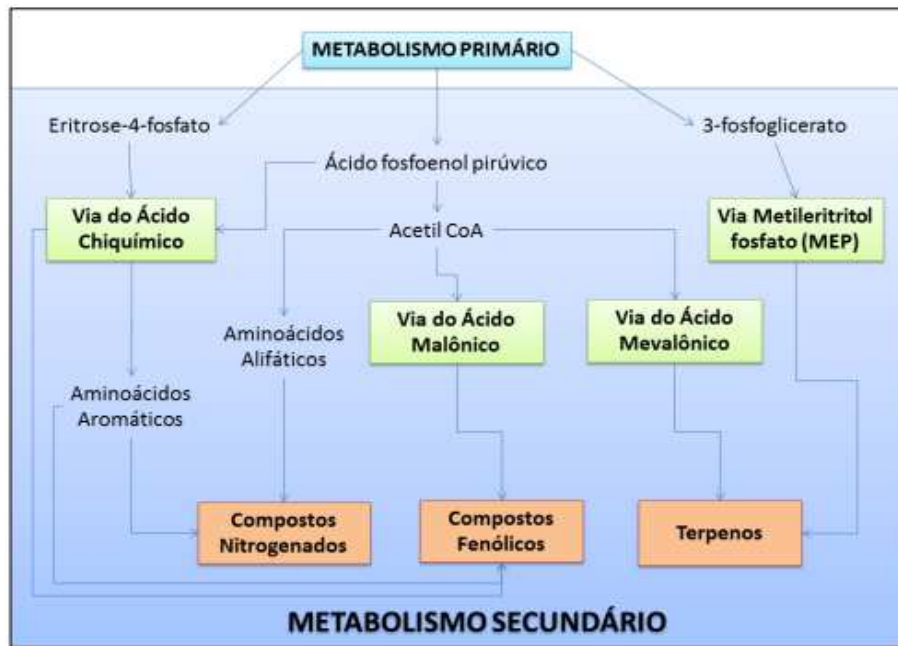


Figura 2: Representação esquemática das rotas de biossíntese de formação de metabólitos secundários. Fonte: Salatino, 2007.

2.2.3.1.1 Terpenóides

Os terpenóides constituem o grupo mais complexo e diversificado de metabólitos secundários e o segundo maior grupo em termos de relevância farmacológica. São classificados quanto ao número de unidades de isopreno em sua estrutura, podendo ser observados em maior destaque os monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) e os carotenóides (40 C) (DEWICK, 2009) (Figura 3).

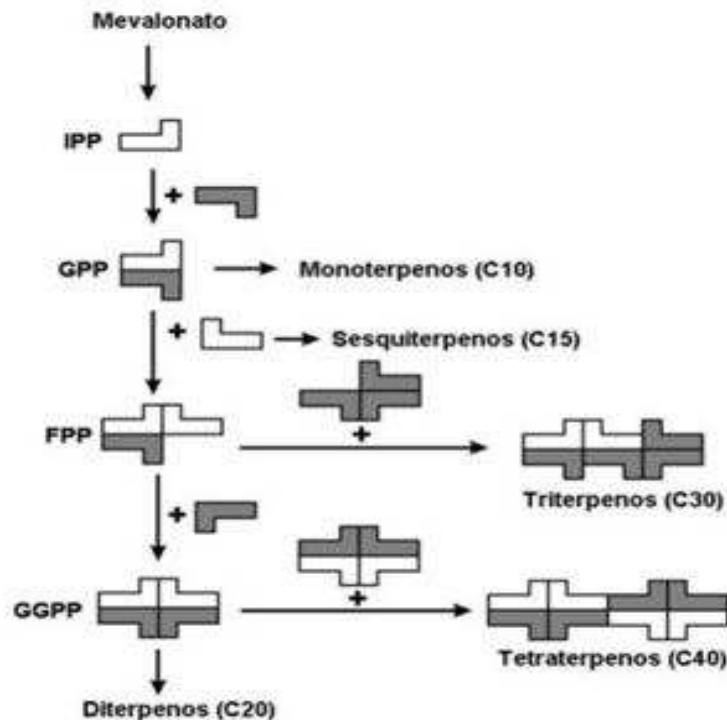


Figura 3: Esquema de formação dos principais grupos de terpenos. O isopreno é representado como uma unidade básica, em analogia a bloquinhos de brinquedo “lego”. A união de duas unidades de isopreno (IPP) dá origem ao geranylpirofosfato (GPP), que é o precursor dos monoterpenos. A adição de mais um IPP gera o farnesilpirofosfato (FPP), o qual dá origem aos sesquiterpenos. A adição de mais um IPP a um FPP origina o geranylgeranylpirofosfato (GGPP) que é o precursor dos diterpenos. A união de dois FPP dá origem ao triterpeno. Fonte: DEWICK, 2009.

Os terpenos desempenham funções distintas nas plantas produtoras: transporte de elétrons (quinonas), componentes de membranas, regulação subcelular, pigmentos fotossintéticos (carotenóides), hormônios, compostos de defesa, fotoproteção, e termotolerância (HARTMANN, 2007).

Todos os organismos são capazes de sintetizar algum tipo de terpenóide, porém as Angiospermas conseguem sintetizar todas as classes (COLOMA, 2011).

Terpeno é a classe de metabólito secundário predominante em *Croton*. Diterpenos e óleos voláteis são as classes de metabólitos secundários mais estudados, porém os diterpenos se apresentam mais característicos e diversificados no grupo, apresentando uma grande gama de esqueletos, como: clerodanos, neoclerodanos, cembranóides, halimanos, cauranos (SALATINO, 2007).

2.2.3.1.1.1 Monoterpenos

Dos constituintes ativos dos óleos voláteis, os de maior importância são os monoterpenos, normalmente caracterizado por 90% do seu total. Os primeiros compostos que tiveram as suas estruturas moleculares elucidadas foram o borneol (em 1840), o linalol (em 1853), o limoneno (em 1870), o geraniol (em 1871), e o cineol (em 1884). Até 1998, já haviam sido isolados 1946 monoterpenóides. A unidade básica dos monoterpenos é o geranyl-difosfato (GPP), sintetizados a partir da fusão de duas unidades de IPP, por uma união do tipo “cabeça-cauda”. O GPP pode sofrer isomerização em linalil-PP (LPP) ou neril-PP (NPP), formando estruturas básicas de diferenciação dos monoterpenos. (VERPOORTE & ALFERMANN, 2000).

São subdivididos quanto a sua estrutura em acíclicos (geraniol, linalol e nerol), monocíclico (cineol, limoneno e mentol) e bicíclico (cânfora) de acordo com a Figura 4. A diversidade dos monoterpenos aumenta consideravelmente devido as estruturas monocíclicas e bicíclicas. Os compostos cíclicos necessitam de conformação estereoquímica de dupla ligação específica para a sua formação, presente apenas em LPP e NPP e necessitam obrigatoriamente de enzimas ciclases para a sua síntese (DEWICK, 2009).

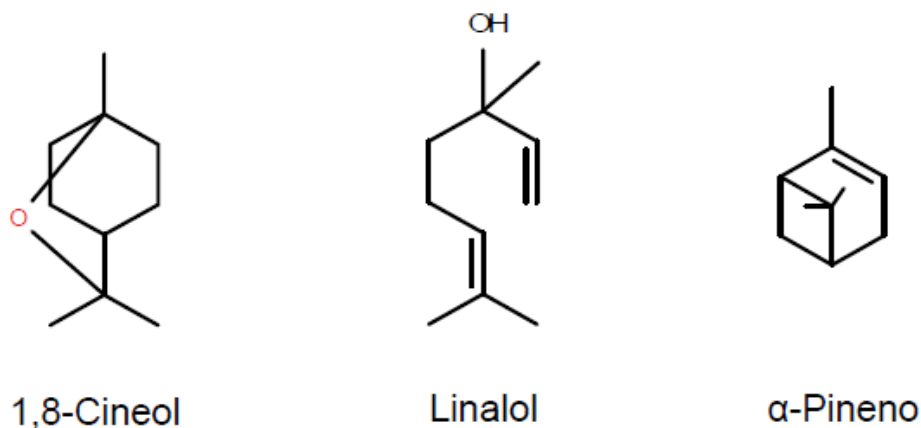


Figura 4: Exemplos de monoterpenos com atividade biológica já detectados em espécies de *Croton*. Adaptado, Fonte: Dewick, 2009

2.2.3.1.1.2 Sesquiterpenos

São formados por três unidades isoprênicas, sendo menos voláteis em relação ao monoterpene. A unidade básica do sesquiterpeno é o farnesil-difosfato (FPP) sintetizado a partir da fusão de GPP (NPP ou LPP) e IPP, também por uma união do tipo “cabeça-cauda”. Alguns sesquiterpenos atuam diretamente na interação da planta com o ambiente, como o farnesano que inibe a ecdise e muda de alguns insetos e o ácido abscísico que é responsável pela dormência de gemas e abscisão de folhas e frutos (CONNOLLY & HILL, 2005).

Existe uma série de sesquiterpenos com atividade farmacológica, como o alfa bisabolol extraído principalmente da camomila e da candeia (*Matricaria chamomilia* e *Vanillosmopsis erythropappus* respectivamente), com potencial antiinflamatório, antiespasmódico e antibacteriano (DEWICK, 2009) (Figura 5).

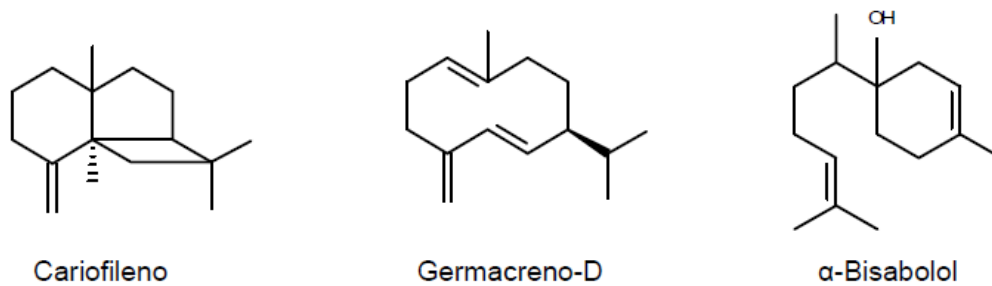


Figura 5: Exemplos de sesquiterpenos com atividades biológicas já encontradas em espécies de *Croton*. Fonte: Connoly & Hill, 2005.

2.2.3.1.1.3 Diterpenos

O grupo dos diterpenos é o mais numeroso, com mais de 8000 compostos descritos e mais de 130 esqueletos (BROCKSOM, 2012). A sua unidade básica é o geranylgeranylpirofosfato (GGPP), que é um composto resultante da fusão de FPP e IPP. Geralmente não são voláteis. Possuem um alto grau de ciclização devido aos processos similares que ocorrem em monoterpenos e sesquiterpenos. Formam a base para compostos biologicamente importantes como o fitol, retinol e retinal conhecidos como antimicrobiano e antiinflamatório (PALMEIRA, 2006) (Figura 6).

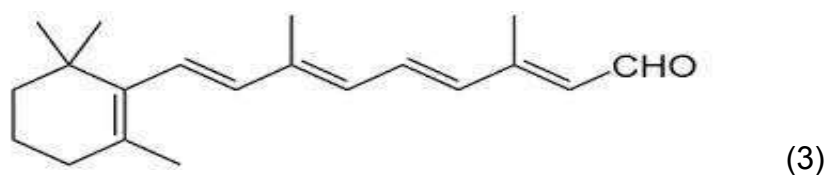
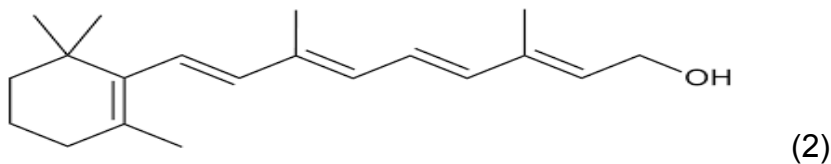
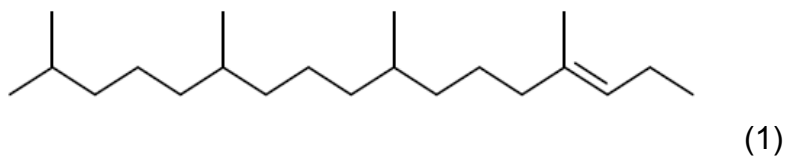


Figura 6: Representação das estruturas do fitol (1), retinol (2) e retinal (3), compostos de grande importância biológica encontradas em diterpenos. Fonte: Palmeira, 2006.

Os diterpenos são uma das classes de metabólitos secundários mais predominantes em *Croton*, apresentando uma ampla ocorrência e uma alta diversidade estrutural. De acordo com Salatino, 2007, os esqueletos estruturais mais comuns são: labdanos, cauranos, seco-cauranos, cembranóides, clerodanos, halimanos, isopimaranos, traquilobanos e ésteres de forbol representados na Figura 7.

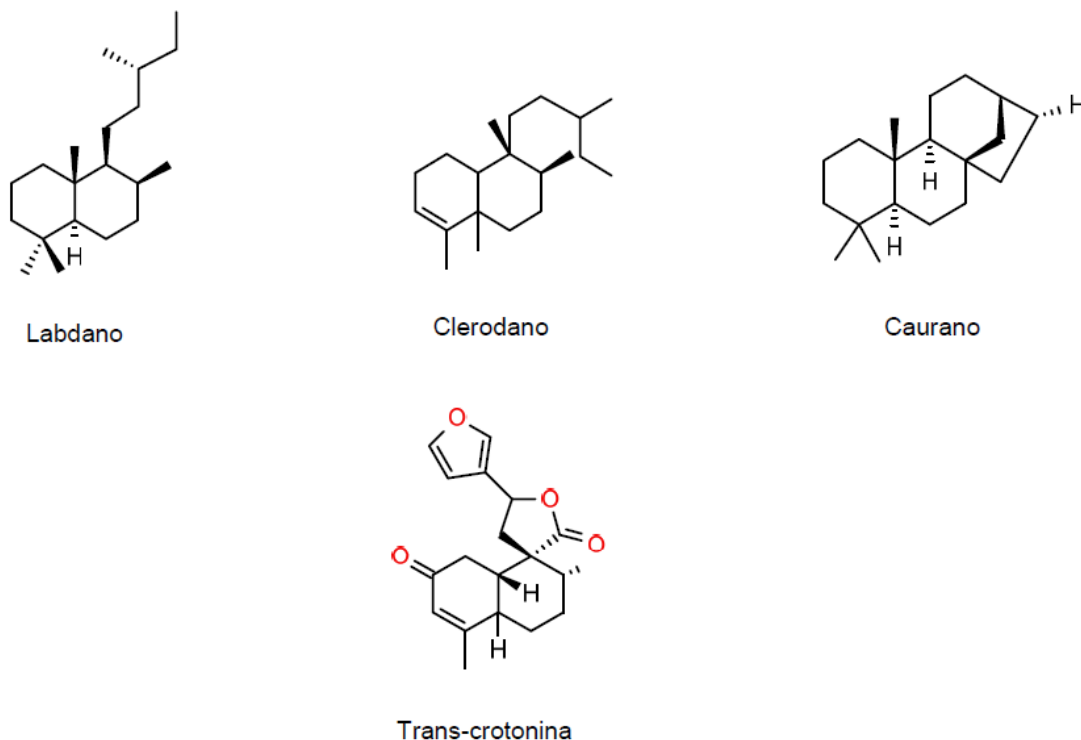


Figura 7: Exemplos de esqueletos de diterpenos comuns para as espécies de *Croton* (labdanos, clauranos e clerodanos) e a trans-crotonina, clerodano típico de *Croton* bastante estudado devido ao grande potencial da sua atividade biológica e farmacológica. Fonte: Salatino,2007.

As classes de diterpenos com maiores potenciais farmacológicos e que merecem maior destaque são: os clerodanos, que possui ação antibacteriana, antiviral e antitumoral (CAMPOS, 2010) e os furano-clerodanos com atividade antimicrobiana (BAYOR, 2009). Destaca-se também crototroponas e sarcopetalanos, ambos com atividade antidepressiva, antinociceptiva, antitumoral, promotores de inflamação (HELUANI, 2000).

2.2.3.1.2 Óleos Essenciais

Óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, grama, raízes, rizomas e caules de plantas. Geralmente são odoríferas, lipofílicas e líquidas (TISSERAND & BALACS, 1999).

Várias espécies de *Croton* apresentam nos óleos essenciais constituintes ativos formados principalmente por terpenóides como os monoterpenos e sesquiterpenos. Os compostos voláteis podem apresentar diferentes funções químicas, tais como: álcool (p.ex. linalol, mentol e citronelol), aldeído (p.ex. citral e citronelal), ácido (p.ex. benzóico), fenol (p.ex. eugenol, timol e carvacrol), cetona (p.ex. cânfora, mentona) ou éster (p.ex. cineol, eucaliptol e safrol) (DEWICK, 2009).

Em termos farmacológicos os óleos essenciais possuem uma grande gama de propriedades terapêuticas medicinais já comprovadas, tais como: antibacteriana, antisséptica, antihelmíntica, antiinflamatória (SANTOS, 2005), anticancerígena e antinociceptiva (SYLVESTRE, 2006; COMPAGNONE, 2010).

Várias espécies de *Croton* possuem óleos voláteis com atividades fisiológicas, sendo empregadas na medicina tradicional no tratamento de úlceras gástricas, inflamações, dores de cabeça, diabetes, dores musculares e alguns tipos de câncer (COMPAGNONE, 2010).

Em destaque, o óleo volátil de *Croton urucurana*, que é composto predominantemente por sesquiterpenos, apresenta atividade antioxidante, antiinflamatória e anticâncer (SIMMIONATO, 2007).

Em função da diversidade do potencial farmacológico das espécies, pesquisas visam a elucidação dos componentes voláteis de *Croton* foram conduzidas ao longo das últimas décadas (BAKKALI, 2008).

2.2.3.1.3 Flavonóides

Compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal (e sua síntese não ocorre na espécie humana). Tais compostos não nutritivos apresentam atividade antioxidante, anti-mutagênica e anticancerígena (UDINN, 2010).

Todos os flavonóides possuem a estrutura $-C_6-C_3-C_6-$ sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. A estrutura básica dos flavonóides consiste em moléculas de 15 carbonos distribuídas em dois anéis aromáticos interligados via carbono heterocíclico do pirano, que pode conter um grupo carbonila, denominado anel C (Figura 8). Os anéis aromáticos são denominados A e B. A posição do anel B é a base para distinguir a classe dos flavonóides (posição 2 do anel heterocíclico) e a posição 3 a subclasse dos isoflavonóides (ROSS & KASUM, 2002).

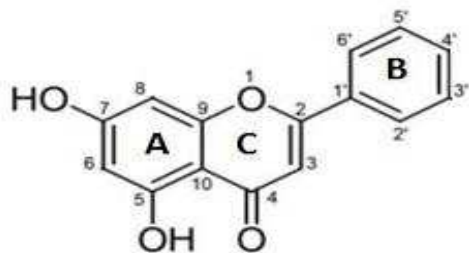


Figura 8: Estrutura molecular de um flavonóide. O anel A é derivado do ácido acético (acetil-Coa) e malonato (carbonos de 5 até 8), enquanto o anel B e os três carbonos da ponte são derivados do ácido chiquímico via biossíntese do aminoácido fenilalanina (carbonos 2 até 4 e 1' até 6'). Os flavonóides são classificados pelo grau de oxidação dos três carbonos que formam a interligações com os anéis. Fonte: Udinn, 2010.

Os flavonóides apresentam uma grande diversidade química, e essa grande diversidade de estruturas resulta de ampla variação de combinações de grupo metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica dos flavonóides (YAN, 2011). Devido a esta grande diversidade, os pesquisadores e a indústria de alimentos vem mostrando nos últimos anos muito interesse no estudo de flavonóides e de suas propriedades (MANACH, 2004).

Destacam-se ainda os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa (constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos), atividade antiinflamatória, e de efeito vasodilatador, ação antialérgica, atividade antiproliferativa, anti-hepatotóxica, antiucero gênica, atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (ARAÚJO, 2011).

2.2.3.1.3.1 Atividade anticarcinogênica dos flavonóides

Produtos naturais, incluindo os flavonóides, foram usados mundialmente por centenas de anos como medicina tradicional para prevenir e tratar várias formas de doenças incluindo o câncer. Diferentes estudos mostram que os efeitos dos flavonóides sobre as doenças humanas são mediadas visando múltiplas vias de sinalização celular. A ingestão diária de flavonóides é associada a vários efeitos benéficos como antioxidantes, antiviral, antiinflamatório, ação hepatoprotetora, prevenção de doenças cardiovasculares e efeitos antitumorais (AMADO, 2011; QUISPE, 2005).

A atividade antioxidante e antitumoral dos flavonóides é conhecida e estudada por diversos grupos de pesquisa. Esta atividade esta relacionada a quantidade de grupamentos hidroxila que os compostos possuem. Flavonóides com 3 a 6 hidroxilas possuem os efeitos mais evidenciados, sendo a posição C3 responsável pela potência da ação antioxidante (que é determinada pela sua capacidade de doar elétrons dos grupos hidroxil). De maneira geral, quanto maior for o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H⁺ e elétrons. Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como a quercetina e a morina possuem forte atividade antioxidante quando comparadas com alfa-tocoferol e ácido ascórbico (monoidroxilados) (AGATI, 2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam os flavonóides como moléculas supressoras da carcinogênese, e alguns tem a capacidade de interagir sobre a gênese do câncer, bloqueando o estágio de promoção através da inibição da síntese da ornitina-descarboxilase. As classes que tem apresentado a atividade antitumoral são: chalconas, flavanonas, flavanóis, flavonas, flavonóis e isoflavonas (HUNG, 2010).

O flavonóide morina (Figura 9) é um exemplo de molécula supressora da carcinogênese (neste trabalho usado como controle positivo) sendo um dos principais componentes das tradicionais ervas medicinais. Estudos indicam diversas atividades antioxidantes desse composto, que protegem as células contra os danos dos radicais de oxigênio. A atividade antioxidante da morina é direcionada para captura e inibição dos grupos OH e do ânion superóxido. Ela inibe a xantina oxidase (enzima geradora de radicais livres) moderadamente, exerce função através da regulação da ativação ou modificação da estrutura de enzimas, têm ação quelante de alguns íons metálicos (ex.: Fe^{2+}) na formação do radical oxil, como modulador a atividade de algumas enzimas metabólicas incluindo o citocromo P450 e como agente quimiopreventivo contra a carcinogênese *in vitro* e *in vitro*. (ATTOUB, 2011).

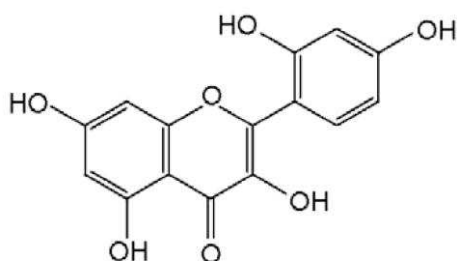


Figura 9: Estrutura da morina. Fonte: ATTOUB, 2011.

Vários estudos classificam os flavonóides como inibidores de câncer por apresentarem atividades antioxidantes através da habilidade de remover compostos reativos ou de influenciar no seu estado redox, modular a via de transdução de sinais envolvida na proliferação celular, bloquear a angiogênese, modular enzimas necessárias ao metabolismo de procarcinogênicos e detoxicação de carcinógenos (PICK, 2011).

PLUEBA, 2005 relatou a capacidade antiproliferativa de flavonóides genisteína por inibirem o dano oxidativo da DNA induzido por irradiação ultravioleta. Outros pesquisadores relatam que a propriedade antioxidante dos flavonóides faz com que eles inibam vários tipos de câncer (KHLEBNIKOV, 2007).

A capacidade de induzir a apoptose foi demonstrada por HUNG, 2010 em ensaios *in vitro* onde foi demonstrado que o flavonóide didimina, cuja propriedade antioxidante é alta, apresentou atividade antiproliferativa e apoptótica em células tumorais de pulmão. Já a merestina, aumenta a ativação das caspases iniciadoras-8/-9 e das caspases efetoras-3/-7, moléculas que participam das cascatas enzimáticas que promovem a morte celular por apoptose em carcinoma de colorretal (PICK, 2011).

Uma das características mais importantes dos flavonóides, responsáveis pela propriedade preventiva de câncer é a sua interação inibitória com as enzimas P450 e CYP1, o que impede a formação de produtos carcinogênicos com conseqüente bloqueio da carcinogênese. Os efeitos enzimáticos de ativação procarcinogênica, presente na família CYP1 do citocromo P450, associados à rota metabólica de flavonóides, tem sido importante foco de estudo para prevenção de câncer durante a última década (ANDROUTSOPOULOS, 2010).

Nos últimos anos, várias pesquisas foram direcionadas para elucidar mecanismos moleculares de flavonóides em vias relacionadas com tumorigênese e progressão tumoral. Os flavonóides podem ser por si só substrato para enzimas CYP 1 podendo causar a inibição do crescimento de células tumorais pela formação de produtos de conversão farmacologicamente mais ativos. Esse mecanismo desempenha importante papel no crescimento celular e apoptose e está relacionado com diferentes tipos de câncer (AMADO, 2011). Na tabela 3 são

apresentados vários mecanismos de ação dos agentes quimiopreventivos, muito deles descritos em flavonóides, como o flavonóide morina.

Mecanismo de ação descrição dos agentes químicos	
Antimutagênese	
Inibição da recarga de carcinógeno	Ligantes de ácidos biliares
Inibição da bioativação do carcinógeno	Inibidores da enzima Citocromo P450
Detoxificação do carcinógeno	Indutores dos sistemas GSH e GST hepáticos
Bloqueio da ligação carcinógeno-DNA	Inibidores da enzima Citocromo P450
Aumento dos níveis de reparo do DNA	Indutores da enzima Poli (ADP-ribosil) transferase
Antiproliferação / Antiprogessão	
Modulação da atividade de fatores de crescimento e hormônios	Antagonistas de receptores hormonais, inibidores da aromatase de esteróides, inibidores da esteróide a5-reductase e IGF-I*
Inibição da atividade de oncogenes	Inibidores da transferase da proteína Farnesil
Inibição da atividade de oncogenes	Inibidores da atividade da ornitina descarboxilase
Indução de diferenciação	Indutores de TGF- β
Recrutamento da resposta imunológica	Inibidores de COX, indutores de linfócitos NK e células de Langherans
Aumento da intercomunicação celular	Indutores de expressão da conexina 43
Resgate da função supressora tumoral	Indutores da expressão do gene p53
Indução de apoptose	Indutores de TGF- β , inibidores de Telomerase, ativadores de Caspases
Inibição da angiogênese	Inibidores de COX-2 e Trombomodulina
Inibição da degradação da membrana basal	Inibidores de Colagenases tipo IV
Inibição da síntese de DNA	Inibidores de Glicose-6-fofato desidrogenase

Tabela 1: Mecanismos gerais da quimioprevenção. Fonte: AMADO, 2011.

2.2.3.1.4 Alcalóides

Alcalóides são substâncias de natureza básica, com nitrogênio heterocíclico derivadas de aminoácidos e com distribuição limitada entre plantas, fungos e animais (ESTRADA, 2011).

Em *Croton* são típicos os alcalóides benzilisoquinólicos, derivados de tirosina encontrados em *Magnoliales*, *Ranunculales* e *Laurales*. A partir de um precursor comum, a norlaudanosolina (Figura 10), sucessivas oxidações fenólicas dão origem aos diferentes subgrupos de alcalóides benzilisoquinólicos: proaporfina, aporfina, protoberberina, morfinandienona, morfina entre outros (HESSE, 2002) (Figura 11).

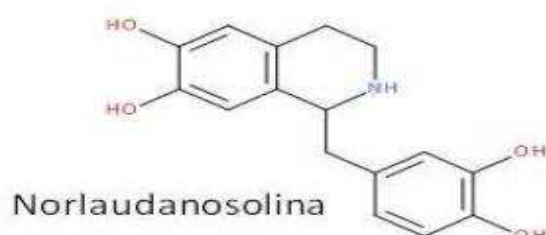


Figura 10: Estrutura básica da norlaudanosolina, precursor comum dos alcalóides.

Adaptado Hesse, 2002.



Figura 11: Alcalóides de diferentes subgrupos encontrados em *Croton*. Adaptado Salatino, 2007.

Em revisão sobre os alcalóides do gênero *Croton*, SALATINO, 2007, relatou a presença de um novo grupo de alcalóide, a Taspina (Figura 12), encontrada no látex de *C. draco*. MILANOWSKI, 2002 sugere que esse alcalóide de estrutura pouco usual seja derivado de magnoflorina.

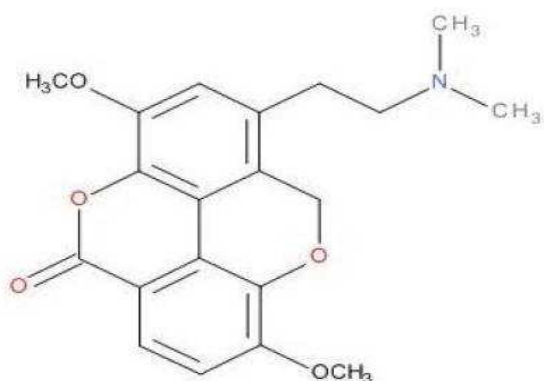


Figura 12: Estrutura da Taspina. Fonte: Salatino, 2007.

2.3 Vincristina

A vincristina (Figura 13) é um alcalóide dimérico encontrado na Vinca (*Vinca rosea* L.), pertencente a classe de antitumorais mais utilizados atualmente. Sua atividade citotóxica está baseada na habilidade de inibir a dinâmica e arranjo de microtúbulos, ligando-se a tubulina inibindo a sua proliferação em microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico paralisando assim a divisão celular, inibindo o crescimento da célula tumoral durante a metáfase (estágio importante de divisão nuclear da célula) (BRANDAO, 2010).

É amplamente utilizado na medicina como agente único ou combinado a outros quimioterápicos (ADAMS, 2003).

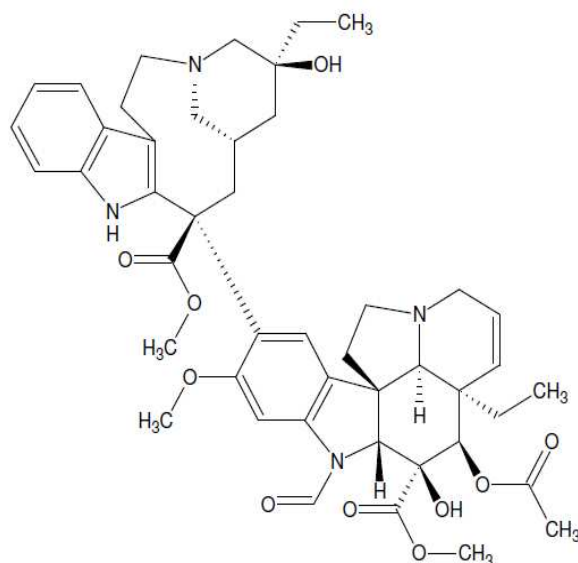


Figura 13: Estrutura da Vincristina. Fonte: Brandão, 2010.

Devido ao fato da Vincristina atuar exclusivamente durante a metáfase, a exposição dos sítios tumorais ao fármaco durante longos períodos de tempo pode tornar-se uma grande vantagem na terapia anti-câncer. Assim sendo um maior número de células tumorais estariam expostas ao fármaco durante o ciclo celular sensível ao mesmo (BRANDAO, 2010).

É metabolizada pelo fígado, eliminado por excreção biliar nas fezes e administrado exclusivamente por via endovenosa, sendo que o seu extravasamento acarreta em necrose acentuada da área atingida pelo quimioterápico (ADAMS, 2003).

Uma forma eficiente de prolongar o tempo de exposição das células cancerosas ao fármaco é incorporá-lo em carreadores para a liberação prolongada no organismo. Um bom exemplo de carreador é o lipossomo (BRANDAO, 2010).

A incorporação da Vincristina, uma base fraca, em lipossomas pode ser realizada através da promoção de um gradiente de pH. Nesse procedimento o meio interno do lipossomo conterá a Vincristina em suas duas formas, protonada e não protonada. Em sua forma protonada, a Vincristina é impermeável a membrana, e na sua forma não protonada ela pode se difundir através da membrana até o momento em que as concentrações do composto alcancem o equilíbrio do meio interno e externo do lipossomo (MORIYAMA, 2012).

Neste trabalho, a Vincristina foi utilizada como fármaco referência e como controle positivo.

2.4 *Croton urucurana* Baill

2.4.1 Descrição Botânica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Malphigiales

Família: Euphorbiaceae

Subfamília: Crotonoiedae

Gênero: *Croton*

Espécie: *Croton urucurana* Baill

Croton urucurana Baill é uma árvore de 4 a 15 metros de altura, copa aberta e caule claro, com até 20 cm de diâmetro (Figura 14). Os ramos jovens são tomentosos, os adultos pubérulos, indumento alvacento e ferrugíneo, tricomas estrelados, resina avermelhada, cor sangue. As folhas medem 7,5-13,5 cm x 5-

10,5 cm, palmatinervas, cordadas a oval-lanceoladas, membráceas, face adaxial ferrugíneo-tomentosa, nas folhas jovens, pubérula nas adultas, face abaxial tomentosa, tricomas estrelados, alvacenta, ferrugínea nas nervaduras, margem inteira, base cordada ou auriculada. Apresenta ápice acuminado, pecíolo de 6-9 cm de comprimento, tomentosos, com 2 a 4 glândulas pateliformes no ápice, estípulas com 1,0-1,5 cm de comprimento, foliáceas (MILO, 2002).



Croton urucurana Baill.
(sangue-de-drago)



Croton urucurana Baill.
(sangue-de-drago)

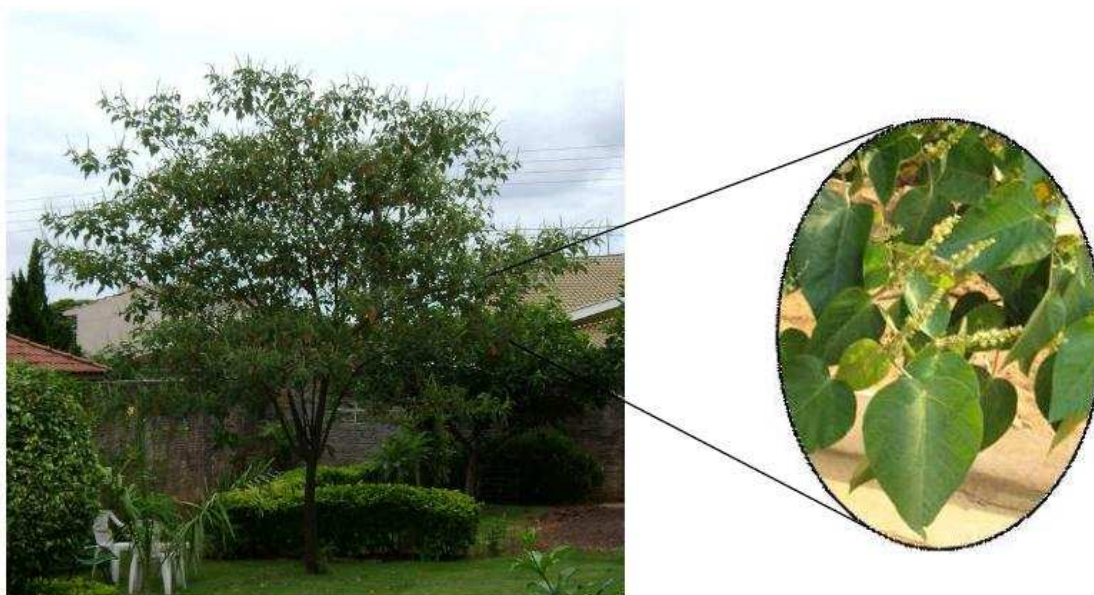


Figura 14: *Croton urucurana* Baill. Fonte: Di Stasi, 2003.

As inflorescências medem de 10 a 25 cm de comprimento, em forma de racimos. As flores são esbranquiçadas, estaminadas e pistiladas, reunidas em fascículos ou estaminadas em cima das pistiladas. O fruto mede de 5-6,5 mm de diâmetro, é globoso, pubescente, muricado, mericarpos pouco acentuados, cálices persistente durante o amadurecimento. As sementes medem 3,5-4,0 mm de comprimento, são de cor castanha, estriada na face dorsal (PAOLI, 1995).

Exclusiva ou predominante de matas ciliares ou de várzeas, ocorrendo em solos permanentemente muito úmidos, encharcados ou brejosos, sujeitos a inundações periódicas, sendo pouco frequentes nas matas de terra firme, e, portanto, indicada para plantios mistos em áreas ciliares degradadas. É uma árvore comumente encontrada no Paraguai, norte da Argentina, sul do Brasil e no Uruguai. (MILO, 2002; RAO, 2007).

É conhecida popularmente com os seguintes nomes: Sangue da água, sangue de drago, sangue de grado, capixingui, urucurana, lucurana, tapexingui, tapixingui. Entre as espécies do gênero *Croton*, além de *Croton urucurana*, existem outras que também são popularmente conhecidas como sangue de dragão: *C. lechleri*, *C. salutaris*, *C. palanostigma*, *C. draconoides*, *C. erythrochilus* entre outras (DI STASI, 2003; VANACLOCHA e CANIGUERAL 2003; GUPTA, BLEALEY e GUPTA, 2008). O nome de sangue de dragão é utilizado para designar resinas e exudatos de cor avermelhada, obtidos de plantas de diferentes gêneros: *Croton* (Euphorbiaceae), *Dracaena* (Dracaneaceae), *Daemonorops* (Palmaceae) e *Pterocarpus* (Fabaceae) (GUPTA, BLEALEY e GUPTA, 2008).

2.4.2 Uso Popular

A medicina popular atribui inúmeras propriedades medicinais à planta: são utilizadas para tratar câncer, hemorragias internas, no tratamento de aftas bucais, cicatrizante de úlceras, feridas externas e micoses superficiais. Também é utilizada no tratamento de bronquites, asma, anemia, transtornos renais, disenterias, reumatismo, infecções vaginais, no tratamento de dor de dente entre outros usos (GURGEL, 2005; TEIXEIRA, 2012).

As partes da planta utilizadas com fins medicinais são: entrecasca, folhas, casca do caule e látex ou resina da casca do caule (MACIEL, 2002). Sua casca quando ferida libera uma seiva vermelho sangue (Figura 15), razão pela qual algumas espécies de *Croton* são conhecidas como Sangue de Drago ou Sangra d' água. Após a "sangria" do látex ocorre o acúmulo de uma goma no local do corte. Preparações de *Croton urucurana* são usadas popularmente de forma oral

ou tópica. No primeiro caso são usadas contra a disenteria, tratamento de câncer, reumatismo e dor. Topicamente é usada diretamente sobre a ferida, ulcerações e dermatites (MILO, 2002; RAO, 2007).

Estudos farmacológicos realizados com *Croton urucurana* descrevem a capacidade de cicatrização de feridas e ulcerações, atividade antidiarréica, anticâncer, antiinflamatória, antioxidante, antireumática, antifúngica e antibacteriana (SIMIONATTO, 2007).



Figura 15: Látex de *Croton*. Fonte: Gurgel, 2005.

2.4.3 Atividades Biológicas de *Croton urucurana*

O primeiro estudo descrito na literatura em relação à atividade antimicrobiana de *Croton urucurana* foi o trabalho realizado por PERES, 1997, Os autores avaliaram a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* do extrato etanólico aquoso, algumas frações e as

substâncias puras, catequina e ácido acetil aleurítico isolados da casca do caule dessa espécie.

Já GURGEL, 2005, demonstrou a atividade antifúngica do látex de *Croton urucurana* contra fungos causadores de micoses de peles: os dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*.

A atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial da casca do caule de *Croton urucurana* foi avaliada por SIMIONATTO, 2007.

Os microrganismos mais sensíveis ao óleo foram *S. epidermidis* e *E. coli* (CIM= 1,25 mg/mL) enquanto que os mais resistentes foram *B. subtilis* e *C. albicans* (CIM= 10 mg/mL). Foi detectada atividade antioxidante por Cromatografia gasosa (CG) e por Cromatografia gasosa - Espectrometria de massas (CG-EM) que revelaram os principais compostos da fração com melhor atividade antioxidante: α -bisabolol (38,3%), α -eudesmol (9,3%) e guaiol (8,2%).

GURGEL, 2005 verificou a atividade antidiarréica do látex de *Croton urucurana*, detectando um potente efeito inibitório da diarreia induzida por óleo de rícino. Também foi avaliado o modelo de secreção intestinal em ratas, induzido pela toxina colérica. O látex de *Croton urucurana* (600 mg/kg) produziu uma significativa inibição da secreção intestinal. A quimioterapia pode provocar diarreia por atuar sobre as células sadias que recobrem internamente o intestino delgado e o intestino grosso, fazendo com que a eliminação de fezes seja de maneira mais rápida. A diarreia também pode ser causada por reações com o antígeno hospedeiro em pacientes que receberam transplante de medula óssea.

A atividade antihemorrágica da casca do caule de *Croton urucurana* foi avaliada por ESMERALDINO, 2005 através de duas metodologias: análise gráfica

computadorizada do halo de hemorragia e quantificação da hemoglobina no halo hemorrágico. Foi demonstrado que o extrato aquoso da casca do caule de *Croton urucurana* antagoniza a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*, e que as proantocianidinas estão envolvidas nessa atividade.

Vários compostos com atividade analgésica foram identificados na casca do caule e na entrecasca de *Croton urucurana*: campesterol, β -sitosterol, stigmasterol, ácido acetil aleurítico, catequina, galocatequina e glicosídeo de sitosterol (PERES, 1997). A comparação entre a potência analgésica dos extratos e dos compostos puros sugere que existem outros compostos com maior potência e que provavelmente se encontram em uma proporção muito pequena, ou que exista um sinergismo entre os princípios ativos.

Espécies de *Croton* são fonte abundante de substâncias ativas contra o câncer, tais como os diterpenoides (clerodanos e diterpenos acíclicos) e alcalóides (como a taspina) (SALATINO, 2007).

2.5 Câncer

Câncer é o nome dado a uma patologia decorrente de mutações gênicas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos que vem a promover uma desordem no equilíbrio fisiológico das células levando a um crescimento desordenado de células (Figura 16) que invadem os tecidos e órgãos podendo se espalhar por outras regiões do corpo (HUNG, 2010). A esse processo de células cancerígenas se espalharem pelo organismo dá-se o nome de metástase (Figura 17). Câncer é conceituado como um complexo processo que leva ao crescimento desordenado das células para formar um tumor, que em alguns casos, invade os

tecidos adjacentes e se propaga por processo de metástase, podendo formar tumores secundários em outras partes do corpo (MOORE & LIFE, 2011).

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (AMADO, 2011).

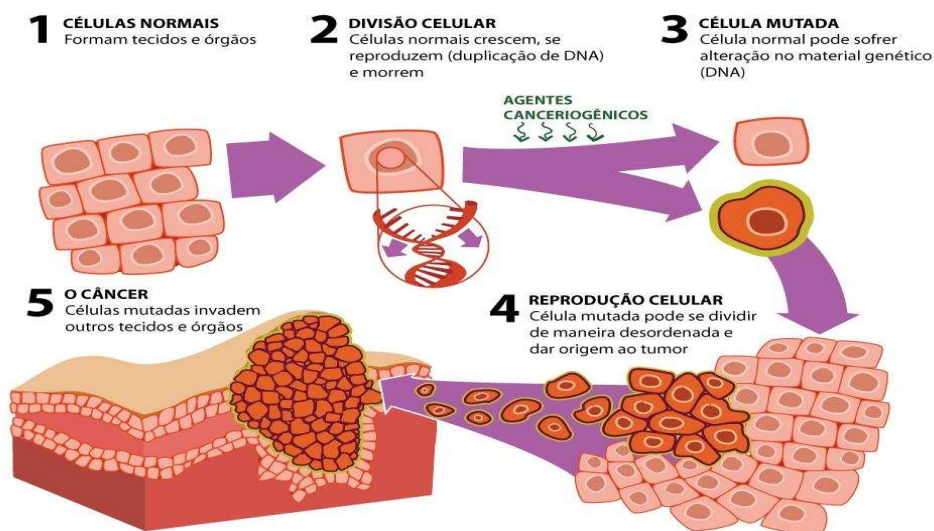


Figura 16: Esquema do processo de formação de células cancerígenas, Fonte: INCA,

2014.

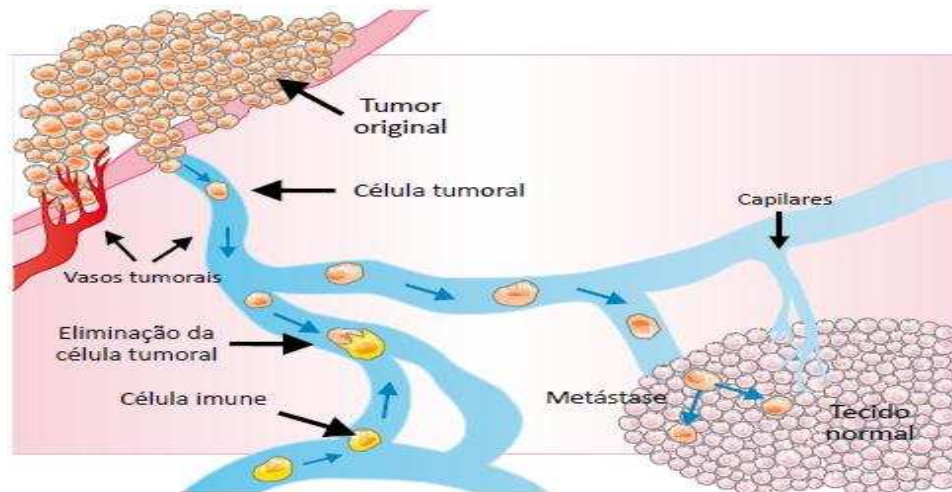


Figura 17: Processo de metástase, quando as células cancerosas se espalham pela corrente sanguínea ou linfática e formam colônias em outros locais. Fonte: cancer.org

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (QIAN, 2011).

O processo de formação do câncer (carcinogênese) ocorre de forma lenta, podendo levar vários anos até que a célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por alguns estágios antes de chegar ao tumor (Figura 18), sendo eles: (1) Estágio de iniciação, sendo o primeiro estágio da carcinogênese, onde as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos promovendo alterações em alguns genes, (2) Estágio de promoção: é o segundo estágio da carcinogênese, onde as células já estão geneticamente alteradas, (3)

Estágio de progressão: terceiro e último estágio e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células já alteradas (INCA 2015).

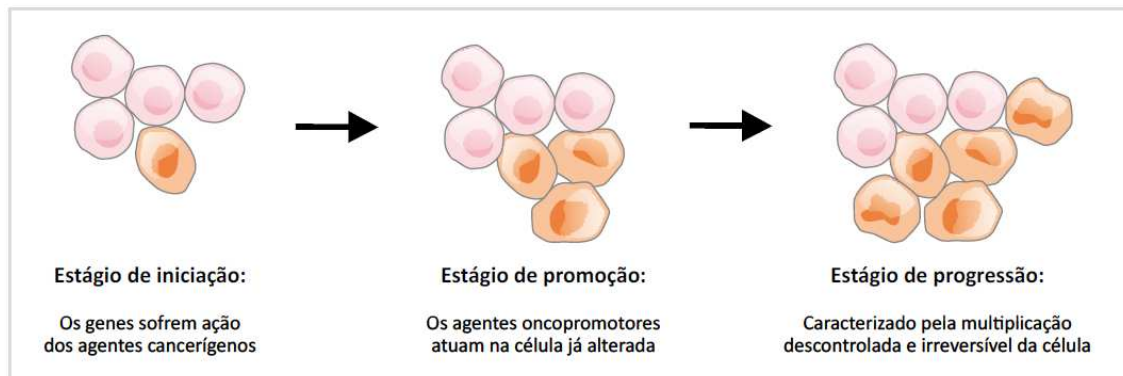


Figura 18: Passo a passo do processo de carcinogênese, Fonte: INCA, 2015

A organização mundial de saúde estimou que, no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos de incidência de câncer e 17 milhões de morte por câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA 2015).

Frente a alta incidência de casos de câncer no mundo e seu alto grau de morbidade e letalidade aliado a falta de tratamento terapêutico eficiente no combate ao câncer, torna-se de extrema importância a pesquisa de novos compostos que apresentem características anticarcinogênicas. Grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% desta utilizam plantas ou preparações destas (YONG, 2008).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, além da rica diversidade étnica e cultural, que detém o conhecimento na utilização das ervas e plantas medicinais (RAMOS, 2008).

Nos últimos anos ocorreu um aumento no interesse científico em pesquisar compostos fitoquímicos com potencial antitumoral e de baixa toxicidade. Esses compostos agem inibindo etapas do crescimento e proliferação de células cancerígenas, ativando mecanismos bioquímicos intracelulares de efeito antitumoral, o que os torna possíveis alvos de estudos farmacológicos (VIDYA, 2010). Dentre as vantagens do uso de extratos vegetais na farmacoterapêutica, pode-se citar que estes podem ser tão ativos quanto um fármaco sintético e apresentar maior segurança de uso. Parte disso deve-se a menor concentração dos compostos ativos em drogas vegetais ou extratos se comparado a um medicamento contendo apenas um fármaco, pois frequentemente os compostos ativos atuam de maneira sinérgica entre eles e com outros componentes do fitocomplexo (RAMOS, 2008).

Sendo comprovadas as suas propriedades farmacológicas e antitumorais, esses compostos poderão no futuro ser usados como fármacos na prevenção e terapia do câncer.

2.5.1 Câncer e o crescimento celular

As características essenciais do câncer adquiridas pelas células sofreram mutações e que interferem na fisiologia normal são: inibição de apoptose ou morte celular programada, auto-suficiência quanto aos fatores de proliferação celular, insensibilidade aos inibidores de crescimento, habilidade invasiva tecidual, metástase, potencial replicativo, ilimitado e angiogênese (MOORE & LYFE, 2011).

Já as características que diferenciam as neoplasias malignas de benignas podem ser discutidas sob diferentes aspectos: diferenciação e anaplasia, taxa de crescimento, invasão local e metástase (RUSAK, 2005).

As células normais que formam os tecidos do corpo humano são capazes de se multiplicar por meio de um processo contínuo que é natural. A maioria das células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada, porém nem todas as células se comportam dessa maneira, sendo que algumas nunca se dividem, como os neurônios e outras dividem-se de forma rápida e contínua, como as células do tecido epitelial. O crescimento das células cancerosas é diferente ao das células normais. As células cancerosas ao invés de morrer, continuam a crescer de maneira incontrolável formando novas células anormais. O câncer se caracteriza pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas (FOSTER, 2008).

2.5.2 Ciclo celular e carcinogênese

O ciclo celular (Figura 19) é caracterizado por uma sequência de eventos que permite que as células cresçam e repliquem, duplicando o seu material genético e distribuindo-o igualmente as suas células filhas. Esse processo engloba duas fases principais: a intérfase e a mitose (FERREIRA, 2010).

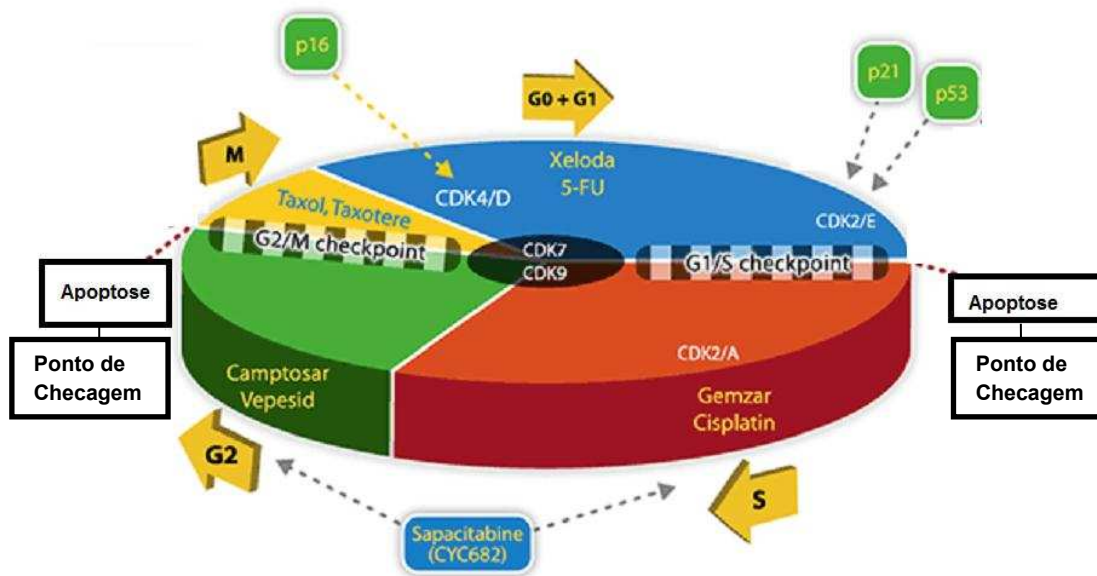


Figura 19: Esquema do ciclo celular. No ciclo celular normal a divisão da célula pode ser interrompida nos chamados pontos de checagem do processo. Fonte: Adaptado Newman e Cragg, 2012.

Na intérfase ocorre a duplicação de DNA e a preparação para a fase seguinte: a mitose, na qual ocorre a divisão celular propriamente dita. A mitose é crucial para o crescimento e diferenciação do organismo (FOSTER, 2008).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: fase M, fase G1, fase S e fase G2. A síntese de DNA ocorre na fase S, enquanto a mitose ocorre na fase M (NEWMAN & CRAGG, 2012). Na interfase, encontram-se três estágios: G1(Gap 1), S (síntese) e G2 (Gap 2). A fase em que as células estão temporária ou permanentemente fora do ciclo celular é a fase Go. Durante a fase G1 as células aumentam de tamanho sintetizando proteínas e RNA's. Um mecanismo importante de controle do ciclo celular é ativado durante esse período para poder certificar que todo material para síntese de DNA esteja adequado (FOSTER, 2008).

Na fase S ocorre a cópia idêntica da molécula de DNA. Os mecanismos que explicam a duplicação da molécula de DNA são complexos e envolvem a enzima CDK-2, responsável por fosforilar proteínas específicas envolvidas na replicação gênica. Essas proteínas ligam-se a determinados pontos da molécula de DNA e desfazem a estrutura da hélice dupla fita a fim de que seja replicada. Também se acumulam durante a fase G1 atuam na fase S e são destruídos em G2 para impedir uma nova replicação antes da mitose. Durante o intervalo entre a síntese de DNA e a mitose (G2) a célula continua a crescer e sintetizar novas proteínas (VERMEULEN, 2003).

Ao final dessa etapa, outro mecanismo de controle do ciclo celular (G2 checkpoint) verifica se a necessidade de reparos dos erros da replicação do DNA antes da célula entrar em mitose. A perda nesse controle resulta na instabilidade genômica, no acúmulo de lesões na molécula de DNA e na proliferação celular não controlada, fenômenos esses que tem sido relacionados com a progressão tumoral (ZHANG, 2011).

Nesses momentos críticos do ciclo celular a célula decide se avança para a fase seguinte continuando o processo de divisão ou se sai do ciclo iniciando o processo de morte celular por apoptose. Esse mecanismo de controle de falhas e erros na linha de montagem de uma nova célula é primordial, uma vez que qualquer defeito em um dos componentes ou operadores desse mecanismo provoca a proliferação contínua de células e é nessa fase que pode ocorrer interferência pela ação dos flavonóides retardando o ciclo celular (FERREIRA, 2010).

Durante o ciclo celular a célula pode seguir então três caminhos: divisão normal, apoptose e desenvolvimento de células tumorais (Figura 20).

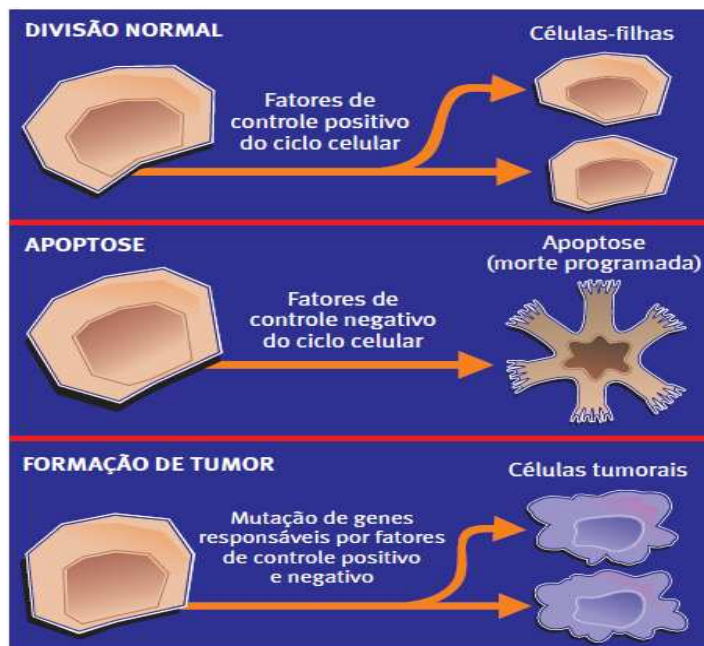


Figura 20: Destinos das células durante o ciclo celular. Fonte: Adaptado Raven, 2007.

2.5.3 Câncer e o processo inflamatório

A carcinogênese passa por vários estágios antes de chegar ao tumor: estágio de iniciação, onde agentes carcinógenos alteram as células geneticamente, estágio de promoção em que a célula alterada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual e estágio de progressão que é a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, nesse estágio, o câncer já está instalado (POLLOCK, 2006).

A associação funcional entre inflamação e câncer foi feita inicialmente por Virchow em 1858, que sustentou a teoria de que o câncer se inicia em locais acometidos por inflamações decorrentes de lesões e irritações por um longo

período de tempo, levantando a hipótese de que a resposta inflamatória favorecia a proliferação celular (POLLOCK, 2006).

Hoje entendemos que nem toda proliferação celular resulta em câncer. No entanto, esta proliferação associada a um ambiente rico em células inflamatórias e fatores de crescimento, agentes danosos ao DNA e favorável a angiogênese, se torna propício para o desenvolvimento e progressão da doença (LEIBOVICI, 2011).

Uma explicação para a participação de células inflamatórias no processo neoplásico é que neoplasias surgem nas áreas de infecção e inflamação, simplesmente como parte da resposta normal do hospedeiro. Funcionalmente muitos agentes promotores, que direta ou indiretamente induzem a proliferação celular, recrutam células inflamatórias. O componente inflamatório do desenvolvimento neoplásico pode incluir uma diversidade de leucócitos, por exemplo: linfócitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos (Figura 21) (LU, 2006).

A hipótese mais plausível para a relação entre câncer e processo inflamatório esta na presença de prostaglandinas, associadas a ciclooxigenase, principalmente a COX-2, liberada na inflamação. A superexpressão da COX-2 favorece os mecanismo de produção tumoral, como o aumento da angiogênese, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase. Sendo que a presença da COX-2 pode ser essencial para a vascularização e crescimento do tumor (LU, 2006).

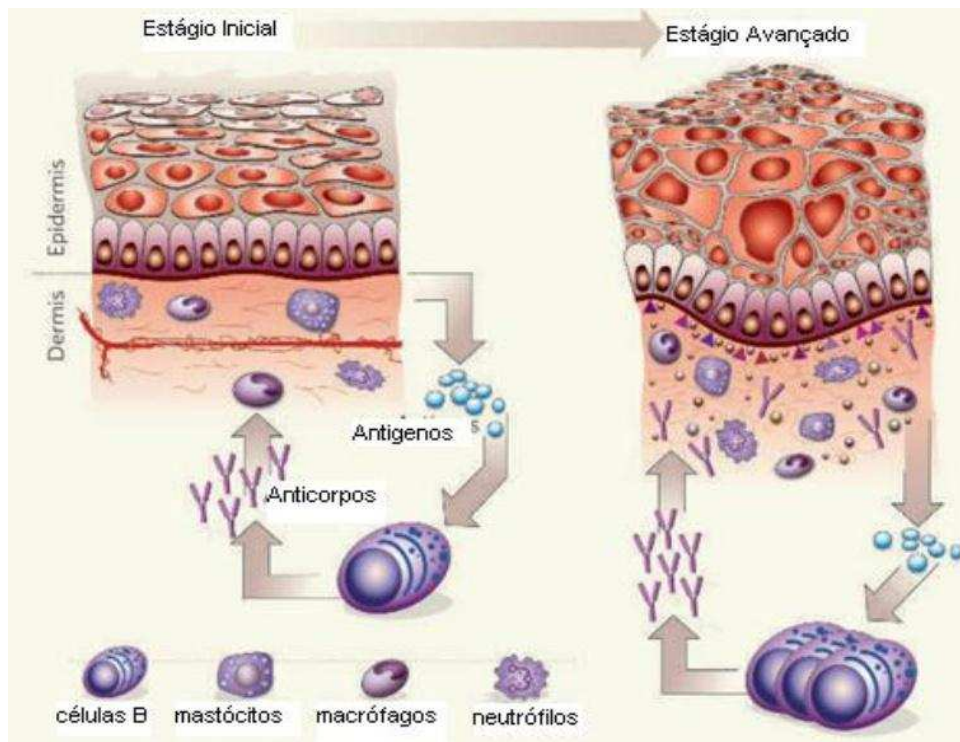


Figura 21: Inflamação normal e neoplásica. As células B produzem o sinal que inicia a inflamação. Um antígeno no ambiente do tumor estimula células B a liberar anticorpos que atingem células inativas (neutrófilos, macrófagos), que criam e mantêm a inflamação. Uma vez ativadas, células liberam fatores que podem promover o crescimento e a propagação do tumor. LU, 2006.

2.5.4 Apoptose

O mais importante processo de regulação de crescimento das células é o programa de morte celular (MCP), processo conservado que decide o destino da célula e que vem atraindo crescente atenção no tratamento do câncer (LIU, 2011).

Apoptose é o encolhimento das células que posteriormente serão fagocitadas pelas células vizinhas, podendo formar corpos apoptóticos. As alterações morfológicas observadas são conseqüências de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos. A morte fisiológica da célula, conhecida como

apoptose, desempenha papel importante na homeostasia e no desenvolvimento do organismo multicelular, livrando-se de células danificadas que podem interferir no seu funcionamento normal. O desequilíbrio entre proliferação e morte celular apoptótica resulta em uma série de doenças, como por exemplo, o câncer (PORTT, 2010).

As principais vias envolvidas no mecanismo bioquímico da apoptose são: a extrínseca e a intrínseca (Figura 22). A via extrínseca é mediada por receptores de fator de necrose tumoral (FNTr) que incluem FAS e TRAIL. A ativação desses receptores leva ao recrutamento e ativação das caspases iniciadoras. Esse processo envolve a formação e ativação de complexos sinalizador e indutor de morte, que por sua vez promove a ativação das caspases efetoras, como a caspase 3. Quando ativa, a caspase 3 é responsável por clivar os substratos da morte que levam a morte celular incluindo a fragmentação de DNA nuclear e da membrana e a outras mudanças bioquímicas (WHELAN,2010). Já na via intrínseca, a regulação ocorre via mitocôndria. O mecanismo mais amplamente estudado dessa via é a liberação de citocromo C mitocondrial resultando na formação de complexo chamado apoptosoma. A partir daí tem início uma cascata de reações envolvendo as caspases 3 e 9 que clivam substratos apoptóticos promovendo a morte celular por apoptose (LIU, 2011).

Diversas são as proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular e apoptose, sendo que cada uma delas responde a um estímulo que pode ser indução da proliferação celular, parada do ciclo celular ou morte. Vários também são os fatores que podem causar mutação nos genes que codificam estas proteínas reguladoras, onde as proteínas perdem sua função caracterizando a doença conhecida como câncer (PAROLIN; REASON, 2001).

Uma das mutações que pode ser citada é a mutação no gene *p 53* que codifica a proteína p53. Esta participa da regulação do ponto de checagem na fase G1 do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose, sendo extremamente importante para a manutenção da integridade do genoma. Ao induzir uma parada nesta fase do ciclo celular a proteína p53 permite a detecção de danos celulares podendo dar início a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose (VERMEULEN, 2003).

Estudos em mutações padrão no gene p53 podem oferecer indícios de que tanto processos biológicos internos como ataques químicos ao DNA por substâncias exógenas são importantes fontes de mutação no câncer humano. Portanto, a função da proteína p53 alterada não induz mais a parada do ciclo em G1 e a proliferação da massa tumoral segue adiante (HOLLSTEIN, 1994).

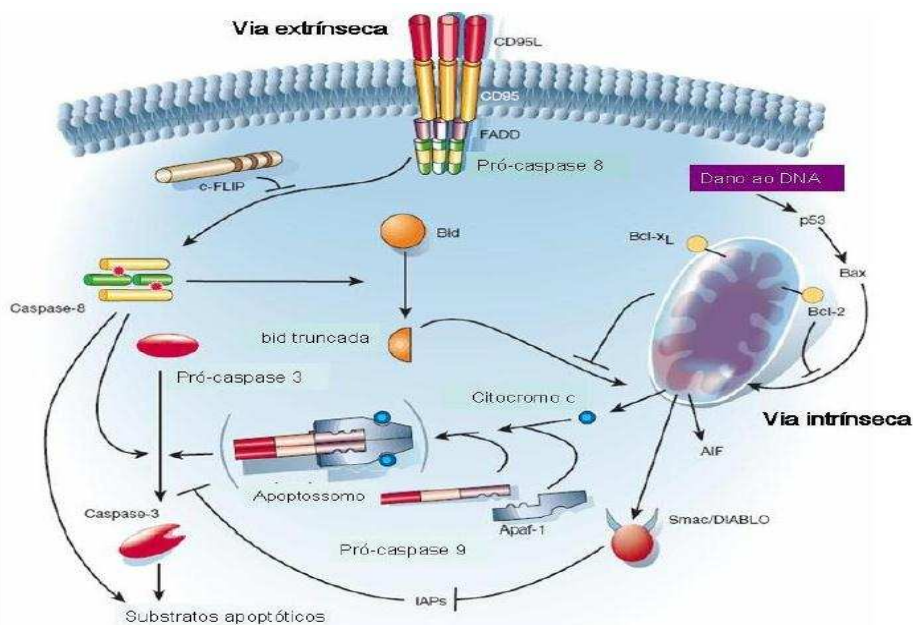


Figura 22: Vias envolvidas no mecanismo bioquímico de ativação da apoptose (Via mitocondrial e vias de receptores de morte), que terminam em um ponto comum - ativação da caspase 3 com a consequente morte celular. Fonte: HENGARTNER, 2000.

A inibição da apoptose pode ajudar a combater doenças inflamatórias, enquanto que a indução da apoptose poderá proteger de doenças autoimunes. Por fim a indução seletiva da apoptose em células malignas constituirá uma estratégia eficiente no tratamento de doenças cancerígenas (PORTT, 2010).

Nesse processo de morte celular, é de fundamental importância que se tenham estratégias de remoção de células infectadas ou mutadas. E essa remoção, pode ocorrer por um dos dois processos: apoptose ou necrose ou também por ambos. Antes acreditava-se que esses processos ocorriam independentemente um do outro, mas agora já são reconhecidos como coexistido em diversas situações de saúde ou de doença, sendo por vezes difícil de diferenciá-los. Esta dificuldade existe por se ter em ambos os processos de morte celular características comuns, mas também porque é frequente a ocorrência de necrose e apoptose em simultâneo, na mesma célula. Algumas características podem diferenciar os dois processos. Podemos citar algumas como características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Na necrose ocorre perda de integridade de membrana, lise total da célula, não requer uso de energia e é fagocitada por macrófagos. Já na apoptose não ocorre perda da integridade da membrana, fragmentação da célula em corpos apoptóticos, é um processo totalmente dependente de ATP, ativa cascatas de caspases e é fagocitada por macrófagos (WHELAN, 2010).

2.5.5 Leucemia

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente, de origem desconhecida. Tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. A medula é o local de formação das células sanguíneas e ocupa a cavidade dos ossos, sendo popularmente conhecida por tutano. Nela são encontradas as células que dão origem aos glóbulos brancos, aos glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e às plaquetas (COTRAN, 2005).

As leucemias são geralmente caracterizadas pela produção descontrolada de leucócitos anormais na medula óssea o que compromete a formação e a maturação das células normais. A leucemia mielóide tem a sua origem nas células da linhagem mielóide e a leucemia linfóide se origina de células de linhagem linfóide. Nos dois casos se observa um grande número de células neoplásicas no sangue periférico. As células leucocitárias (linfócitos, granulócitos e monócitos) são responsáveis pelas respostas imunológicas, o que aumenta o risco de infecções potencialmente graves em pacientes com leucemia (KUMAR, 2007).

Conforme o tipo celular envolvido e o estágio de maturação as leucemias, podem ser classificadas em aguda, que são caracterizadas pela rápida proliferação de células imaturas denominadas de blastos, e crônicas, que são caracterizadas por crescimento de células maduras bem diferenciadas. Assim as leucemias podem ser classificadas em leucêmicas mielocíticas (mieloblásticas) agudas, leucemias mielocíticas crônicas, leucemias linfocíticas (linfoblásticas) agudas e as leucemias linfocíticas crônicas. As leucemias são constituídas principalmente por células de linhagens leucocitárias e os fatores predisponentes

são os mesmos envolvidos nos outros tipos de neoplasias, que de forma geral, tem sua origem na lesão do DNA (CANEVAROLO, 2012).

Todos os tipos de leucemias são tratados com quimioterapia para matar células leucêmicas. É importante durante o tratamento a suplementação com zinco, uma vez que esse mineral age na formação das células vermelhas, estabilidade da membrana celular, e no crescimento, formação e diferenciação celular, e em pacientes com quadro de leucemia esse mineral é bastante deficiente (EBY, 2005).

2.5.6 Linhagens de células leucêmicas THP-1 e U937

Atualmente diversas linhagens de células de leucemia humana, bloqueadas em determinados processos de diferenciação estão disponíveis para que possam ser usadas para avaliar a função de macrófagos e monócitos. Estas células constituem uma população homogênea, o que representa uma vantagem em relação aos monócitos humanos nativos, facilitando estudos bioquímicos (YURINSKAYA, 2012).

A linhagem celular THP-1 (Figura 23) foi estabelecida por Tsuchiya em 1980 a partir de blastos de sangue de um garoto de 1 ano diagnosticado com leucemia monocítica aguda. Essa linhagem é amplamente usada como modelo experimental em estudos *in vitro* para a identificação de novas drogas contra leucemia mielóide aguda (DAIGNEAULT, 2010).

Além disso, a linhagem celular THP-1 é um modelo bem estabelecido para estudos toxicológicos, (MULLER, 2003; CORSINI, 2011) imunológicos (SMIDERLE, 2011) de “screening” para drogas antileishmanicida (GEBRE-HIWOT, 1992).

A linhagem de células monocíticas humana U937 (Figura 23) derivada do fluido pleural de pacientes com linfoma histiocítico difuso, é usada como modelo de diferenciação macrófago-monócito. Essa linhagem normalmente cresce em suspensão no meio de cultura e tem uma superfície lisa. Alguns trabalhos já utilizam essa linhagem de células como célula proliferativa (célula tumoral), como por exemplo, o trabalho que utilizou um glicosídeo cardíaco e avaliou o efeito dessa linhagem (HATTORI, 1983), o estudo sobre regulação do volume celular. Inicialmente esta linhagem de célula foi o foco de estudo para delinear a natureza da sua transformação neoplásica e as condições sob as quais a sua malignidade pudesse ser revertida (COUZZO, 2012).

Após vários estudos, de substâncias exógenas e endógenas foram identificadas como capazes de atingir uma inibição mielomonocítica específica da divisão celular, caracterizando assim a perda de capacidade proliferativa dessas células U937, acompanhadas por uma série de transformações fenotípicas. Atualmente a célula U937 é utilizada como um modelo ideal para estudar as mudanças em eventos intracelulares, que ocorrem durante a diferenciação celular de monócitos para macrócitos (LIU, 2012).

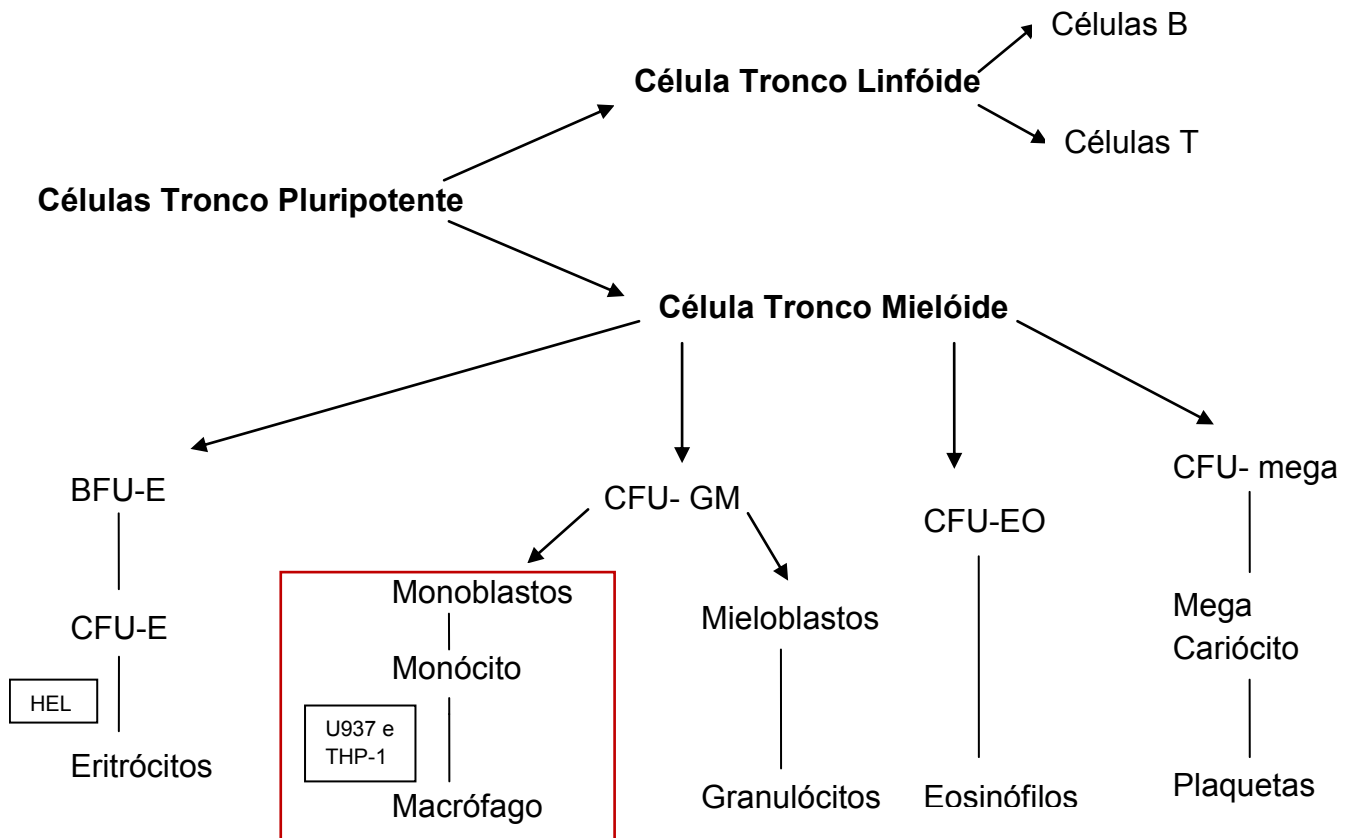


Figura 23: Diferenciação celular hematopoiética e linhagens de células leucêmicas.

Nos retângulos estão representadas algumas linhagens de células leucêmicas disponíveis e o potencial de diferenciação *in vitro* de cada uma. Em destaque as linhagens THP-1 e U937. Fonte: DAIGNEAULT, 2010.

Células leucêmicas são caracterizadas por proliferação descontrolada, sem diferenciação. Apesar disso, sob condições apropriadas, células de leucemia monocítica podem ser induzidas a diferenciação terminal em macrófagos por vários compostos como o éster de forbol. O tratamento dessas células com o agente indutor *in vitro* provoca parada na proliferação celular e adesão destas células a placa.

O processo de diferenciação é acompanhado por uma mudança drástica na morfologia celular, marcada pelo aumento do volume e grânulos

citoplasmáticos devido ao maior número de organelas como as mitocôndrias e os lisossomos (YURINSKAYA, 2012).

Como a diferenciação celular induz a parada na proliferação de células leucêmicas, a busca por compostos naturais que possam afetar a proliferação ou induzir a diferenciação de células de leucemia monocítica, constitui uma interessante abordagem terapêutica no tratamento de leucemias (DAIGNEAULT, 2010)

3. Objetivos:

3.1 Objetivo Geral:

Identificar o efeito citotóxico *in vitro* do extrato hidroalcolólico das cascas de *Croton urucurana* em células tumorais das linhagens THP-1 e U937.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar se o extrato bruto de *Croton Urucurana* reduz a viabilidade celular das linhagens U937 E THP-1, utilizando ensaio colorimétrico MTT e o ensaio por LDH,
- Avaliação de apoptose por Microscopia de fluorescência.

4. Materiais e Métodos:

4.1 Material Vegetal:

O material botânico, galhos, flores, folhas e entrecasca do *Croton urucurana* Baill foi coletado em uma área de reserva natural de Mata Atlântica, do tipo Floresta Estacional Semi Decidual, localizado nas dependências do Embaúbas Tênis Clube, no município de João Monlevade em Minas Gerais. João Monlevade está localizado na região leste do estado nas coordenadas 19° 48' 36" e 43° 10' 26" W, possuindo um clima classificado como tropical de altitude devido a sua localização a 900 metros de altitude, segundo a classificação climática de Koppen-Geiger (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2009). A planta foi identificada pelo botânico taxonomista Marcus Simão do Departamento de Biologia, UFV, e, uma exsicata foi depositada no Herbário VIC da UFV (exsicata nº 38.756).

4.2 Preparação do extrato vegetal:

O extrato vegetal foi preparado a partir das entrecascas da planta pelo método de maceração descrito por SONAGLIO, 2004. As entrecascas foram limpas mecanicamente, lavadas com água, desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos, novamente lavadas em água corrente, secas com papel absorvente e colocadas em estufa de ventilação a 40°C até peso constante. Na etapa seguinte o material foi triturado, moído e armazenado a temperatura de 4 °C .

O material em pó de *Croton urucuana* (100g) foi extraído em 1.000mL de solução de álcool etílico 50% a frio por 72 horas, ao abrigo da luz. Em seguida, o

extrato foi filtrado (bomba de vácuo), e o sobrenadante concentrado em evaporador rotativo. Este procedimento foi repetido até a exaustão do material vegetal (aproximadamente 10 vezes). Ao final, o extrato produzido foi liofilizado, sendo o rendimento de 8.2% p/p em relação ao material em pó seco.

4.3 Linhagens e cultivo celular:

As linhagens de células U937, (leucemia de origem linfóide) e THP-1 (leucemia monocítica aguda) foram obtidas do laboratório de Imunologia e Bioquímica do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. As células foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada 2 dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37°C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

4.4 Ensaios MTT:

As linhagens de células U937, THP-1 foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço (1×10^6 cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com o extrato bruto de *Croton Urucuana* nas concentrações finais de 50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM e 800 µM para os testes de viabilidade celular com MTT (-3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazol). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e umidade controlada. No tempo de 48 horas a viabilidade celular foi avaliada para MTT.

4.5 Ensaio de LDH

Parte do sobrenadante das culturas foi utilizada para a dosagem da enzima Lactato Desidrogenase (LDH). A determinação da LDH é proporcional ao número de células mortas por necrose *in vitro*. Para quantificação da LDH foi utilizado o kit DOLES de mensuração. Como controle negativo todas as células foram incubadas em meio DMEM F12 (Gibco, BRL) suplementadas com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), para os extratos as células foram incubadas com DMSO a 1%.

4.6 Avaliação da apoptose por Microscopia de fluorescência:

As células foram incubadas por 12, 24, 36 horas com o extrato bruto de *Croton urucurana* e a seguir foram coradas com uma solução de 10 µg/mL laranja de acridina (Sigma) e 10 µg/mL de brometo de etídio (Sigma). Após as montagens em lâminas e lamínulas, as células foram avaliadas quanto à taxa de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência (Axioplan – Zeiss), sendo contadas em aproximadamente 300 células em vários campos escolhidos aleatoriamente, discriminando-se as células apoptóticas, necróticas e normais. Foi feito duplicata e o experimento repetido por pelo menos duas vezes. Essa análise foi realizada no laboratório de Imunologia e Bioquímica do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

4.7 Controle Positivo

O controle positivo, as células foram tratadas com o fármaco comercial Vincristina. Foi utilizado também o flavonóide Morina como controle positivo com o objetivo de analisar a atividade de um metabólito secundário e potencialmente anticancerígeno.

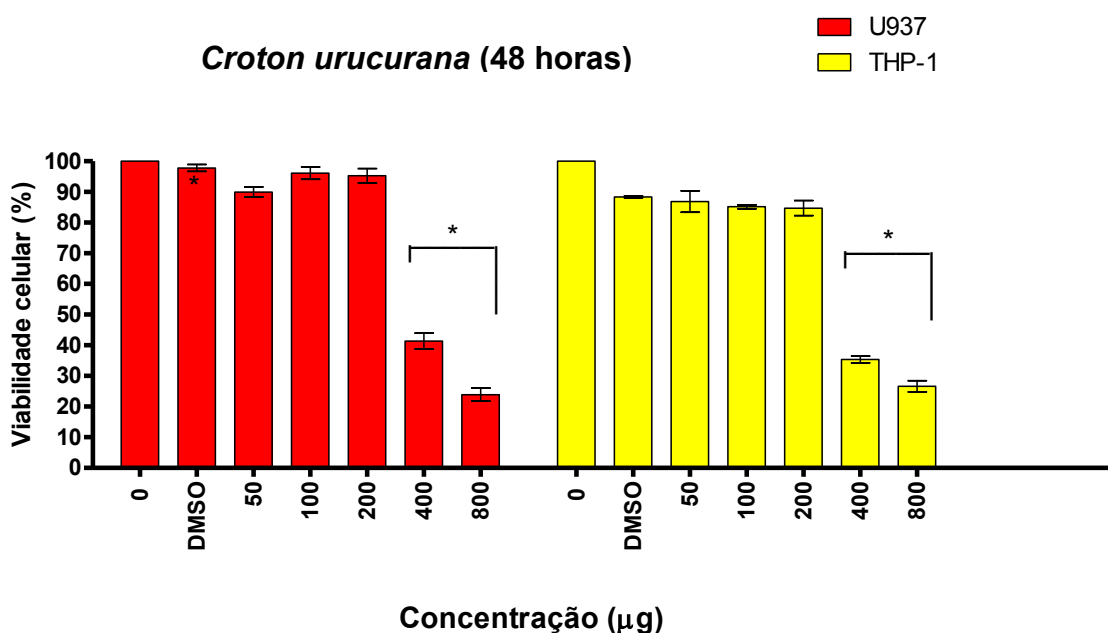
4.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão, analisados de forma independente. Os ensaios foram analisados por ANOVA- One – way- seguido de Tukey utilizando o programa Graph Pad versão 5.0. As diferenças significativas foram consideradas como $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$.

5. Resultados:

5.1 Determinação da viabilidade das células U937 e THP-1 tratadas com o extrato de *Croton urucurana* (MTT)

Para investigar o efeito citotóxico do extrato de *Croton urucurana* na viabilidade celular das linhagens leucêmicas U937 e THP-1, as células foram expostas a várias concentrações dos compostos testados por um período de tempo de 48 horas e a viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT. Pode-se verificar na figura 24, que o extrato mostrou-se capaz de reduzir a viabilidade das linhagens U937 e THP-1 de maneira concentração dependente para as concentrações 400 e 800 μM . Sendo então que a redução da viabilidade celular das linhagens leucêmicas U937 e THP-1 foi significativa em relação aos controles positivos (fármaco Vincristina e flavonóide Morina), com $p < 0.05$



■ U937
■ THP-1

Morina (48 horas)

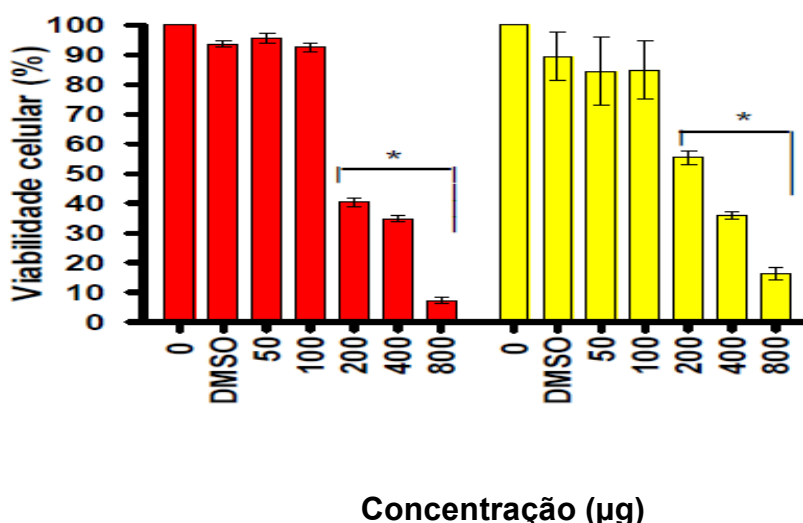


Figura 24: Efeito citotóxico do extrato de *Croton urucurana* e do composto morina contra as células humanas U937 e THP-1 após 48 horas de incubação através do ensaio colorimétrico utilizando MTT (n-3). Zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. *P<0.05; valor estatisticamente significativo em relação ao controle negativo.

Para efeito de uma melhor comparação da atividade dos compostos contra as duas linhagens de células testadas foi calculada a dose efetiva (EC_{50}) com base no teste de viabilidade utilizando o ensaio de MTT. Como observa-se na tabela 2 o extrato de *Croton urucurana* apresentou valores de EC_{50} de 402,2 μ M e 360,3 μ M para as linhagens de células testadas U937 e THP-1, respectivamente. Estes valores representam a concentração do composto capaz de matar 50% das células testadas. A EC_{50} foi determinada utilizando o programa Graph Prism 5.0 através da curva de regressão não linear a partir de dados das figuras 24 e 25.

Compostos		
Linhagens	Extrato de <i>Croton urucurana</i> (μM)	Vincristina (nM)
U937	402,2 \pm 1,06	6.46 \pm 1,13
THP-1	360,3 \pm 1,09	26,15 \pm 1,24

Tabela 2: EC₅₀ (μM) dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT.

Como controle positivo (Figura 25) foi avaliado o efeito citotóxico do composto Vincristina, para linhagens de células U937 e THP-1 na concentração nanomolar, sendo, este composto orgânico usado na terapia destas linhagens de célula carcinogênicas. Pode-se observar na tabela 2 que a Vincristina, apresentou EC₅₀ menores para as duas linhagens testadas, sendo, portanto, mais eficiente na redução da viabilidade celular. Observa-se também, na figura 25, que a Vincristina foi estatisticamente significativa para ambas as linhagens de células nas concentrações que variam de 6,25 a 100 nanomolar (nM) com valores de $p < 0.05$. Este composto orgânico é um fármaco comercial utilizado no tratamento de leucemias (BRANDAO, 2010).

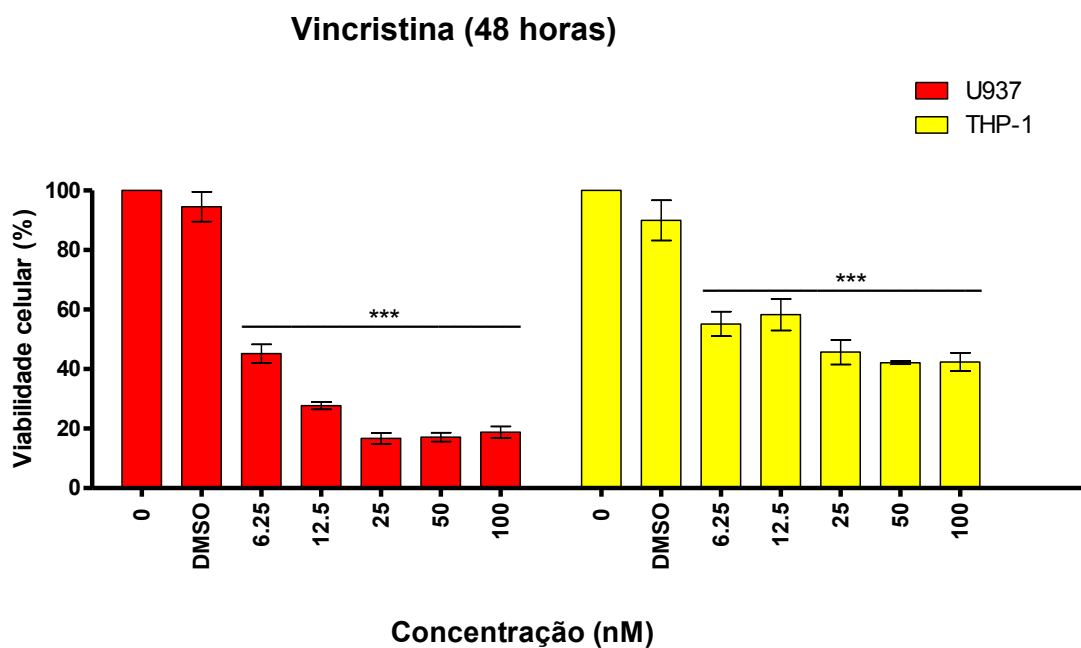
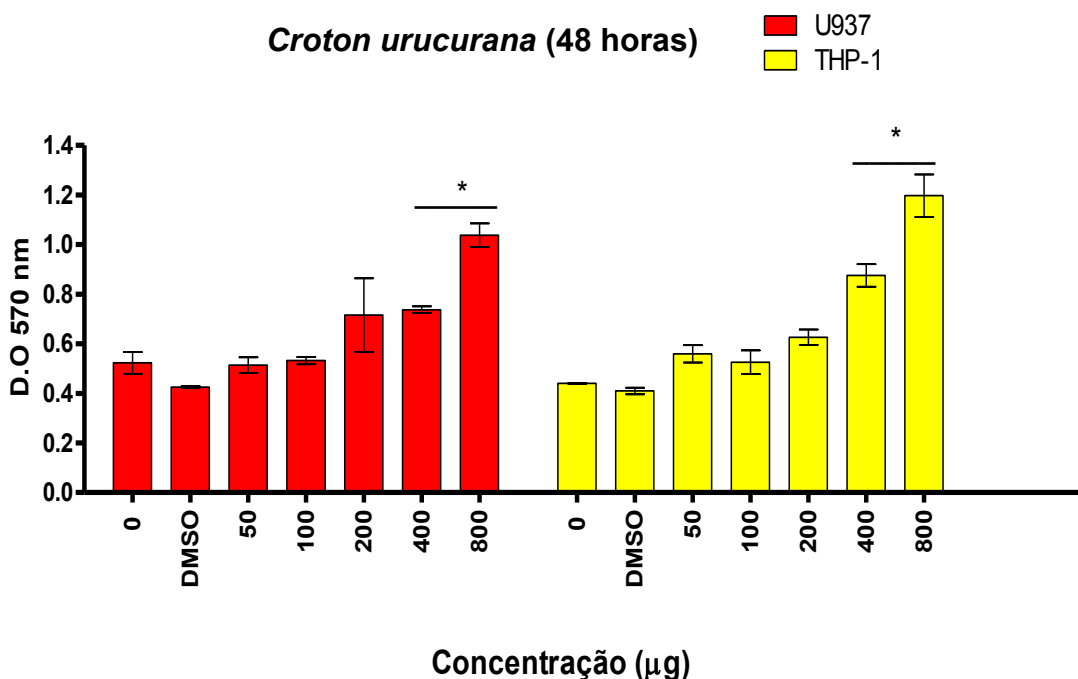


Figura 25: Efeito citotóxico do composto vincristina (controle positivo) contra as células humanas U937, THP-1, após 48 horas de incubação. A avaliação foi feita através do micro ensaio colorimétrico utilizando MTT. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. * $P < 0.05$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

5.2 Avaliação da viabilidade celular pela liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A enzima LDH liberada pelas células U937, THP-1 foi mensurada em espectrofotômetro após 48 horas de tratamento com o extrato de *Croton urucurana* em diferentes concentrações de 50, 100, 200, 400, 800 μM , respectivamente. Na figura 26 pode-se observar que as linhagens tratadas com o extrato e com o composto morina apresentaram aumento de liberação da enzima LDH nas concentrações 400 μM e 800 μM , indicando que foram capazes de induzir a liberação da enzima LDH nas linhagens de células testadas de maneira concentração dependente e que promoveram a ruptura da membrana plasmática nas maiores concentrações o que confirma a redução da viabilidade celular pelo método de MTT.



Morina (48 horas)

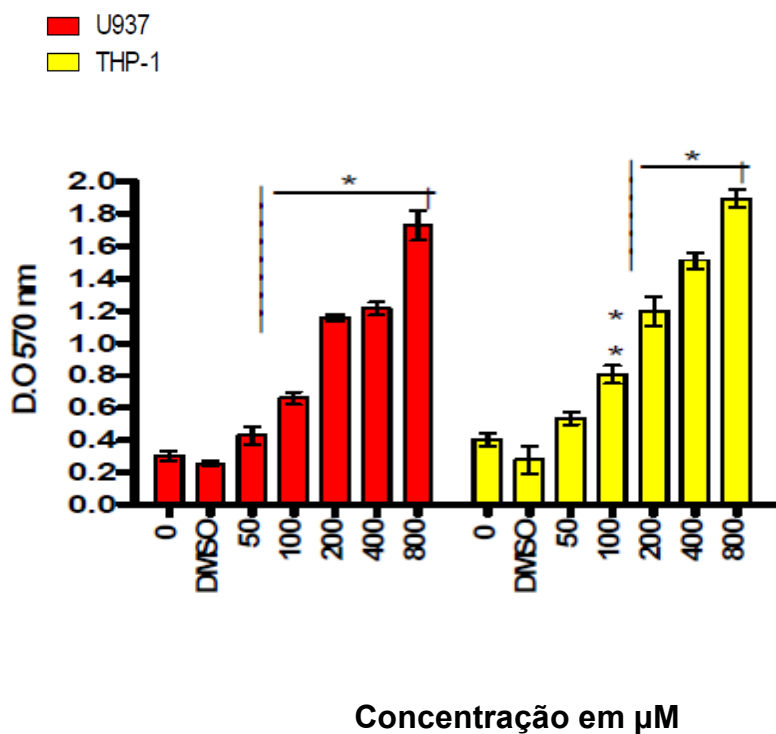


Figura 26: Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica). Células U937, THP-1, foram tratadas com diferentes concentrações do composto morina e do extrato durante 48 horas e avaliadas quanto a quantidade de LDH liberada. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. * $P < 0.05$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Apesar da presença de LDH no meio confirmar o resultado de viabilidade celular pelo ensaio de MTT, sua ausência não invalida o resultado positivo deste teste, uma vez que, as membranas das células mortas por apoptose não são rompidas.

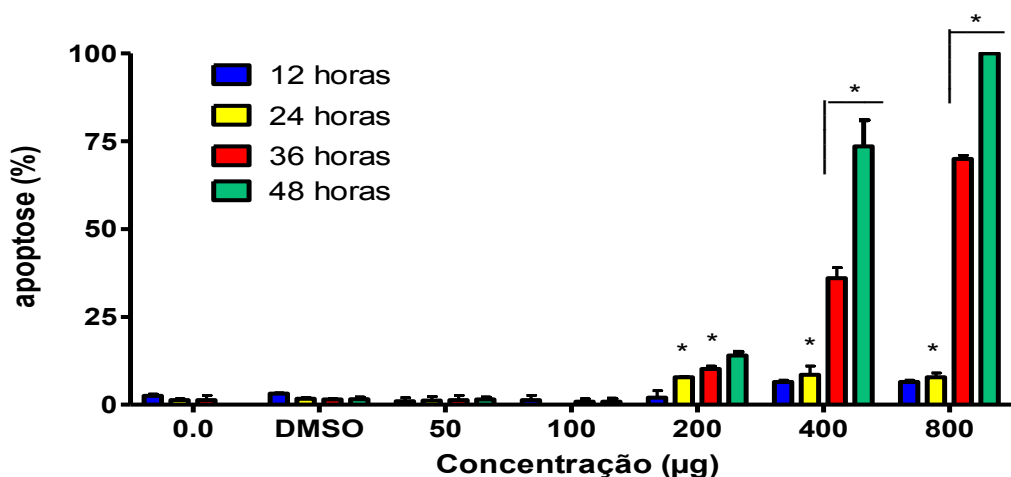
5.3 Avaliação do mecanismo de morte celular induzida pelo composto testado (Microscopia de fluorescência)

As figuras 27 e 28 mostram a porcentagem de apoptose induzida pelo extrato e pelo composto morina nas duas linhagens de células leucêmicas humanas testadas U937 e THP-1, respectivamente. Observa-se que o extrato de *Croton urucurana* e a morina foram capazes de induzir estatisticamente ao nível de 5% de significância com $p < 0.05$ a apoptose nas linhagens de célula THP-1 nas concentrações 400 e 800 μM para o período de tempo de 36 e 48 horas chegando a 75 % na concentração de 800 μM em 48 horas. Para a linhagem U937 o extrato foi capaz de induzir a apoptose nas concentrações 200, 400 e 800 μM para o período de tempo de 24, 36 e 48 horas chegando a 100 % na concentração 800 μM para 48 horas. Analisando os dois gráficos, observa-se que a linhagem U937 é mais sensível ao composto, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.

Para este ensaio foi realizada uma dupla marcação com os corantes laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE). Este é um método simples e preciso para se avaliar o tipo de morte de um determinado composto. As membranas citoplasmáticas e nucleares são permeáveis ao LA e, ao entrar em contato com esta substância as células são observadas na cor verde. Células mortas são coradas em laranja pelo BE, que só penetra em células com alteração de permeabilidade celular. Assim sendo, as membranas das células viáveis e apoptóticas precoces, que permanecem íntegras, permitem a passagem, somente do LA e se coram em verde. Por sua vez, as células necróticas e apoptóticas tardias, que apresentam perda da integridade da

membrana, permitem a passagem do BE, sendo observadas na cor vermelha (LIU, 2012).

Croton urucurana (U937)



Croton urucurana (THP-1)

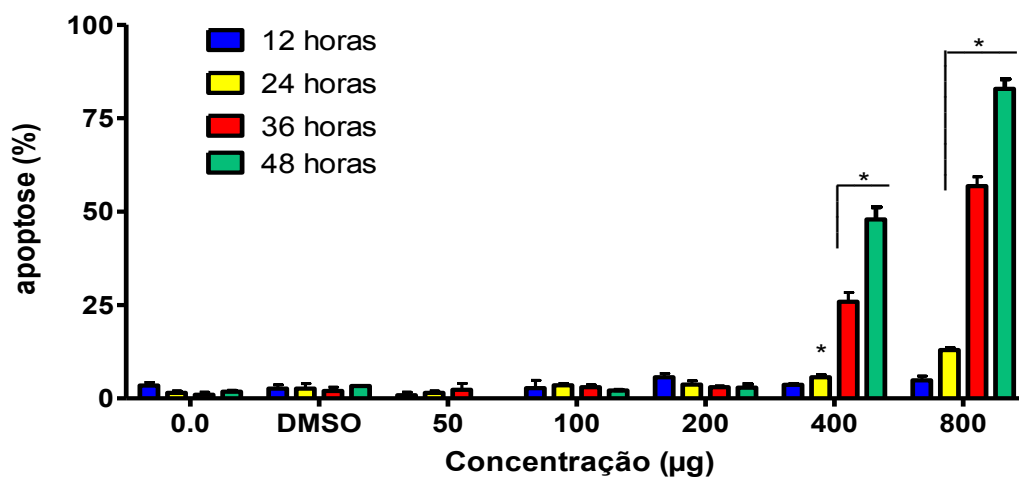
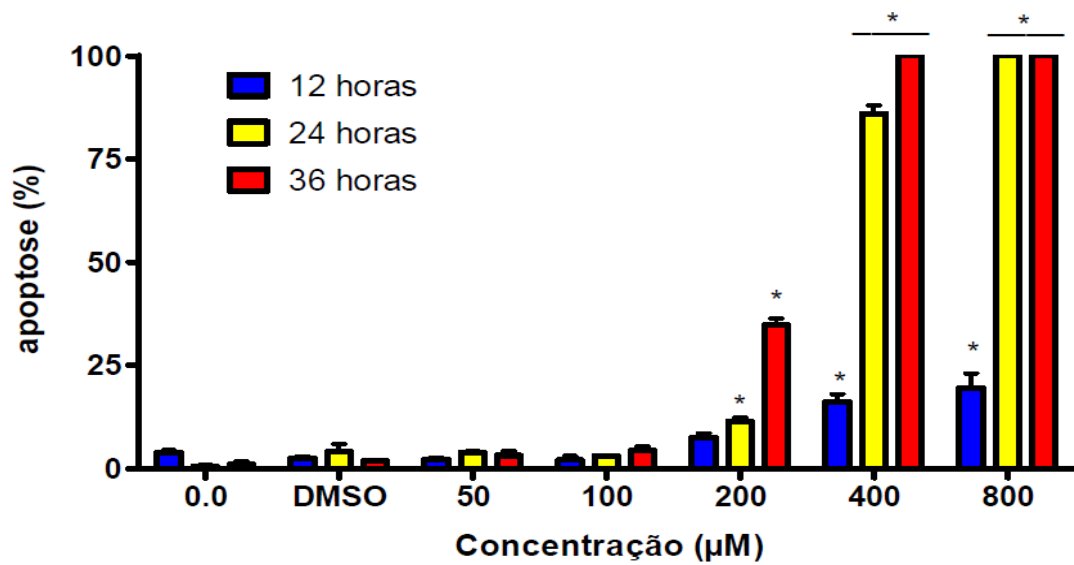


Figura 27: Porcentagem de apoptose induzida pelo extrato de *Croton urucurana* nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em quatro tempos diferentes, 12, 24, 36 e 48h. O zero significa controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. *P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

MORINA (U937)



MORINA (THP1)

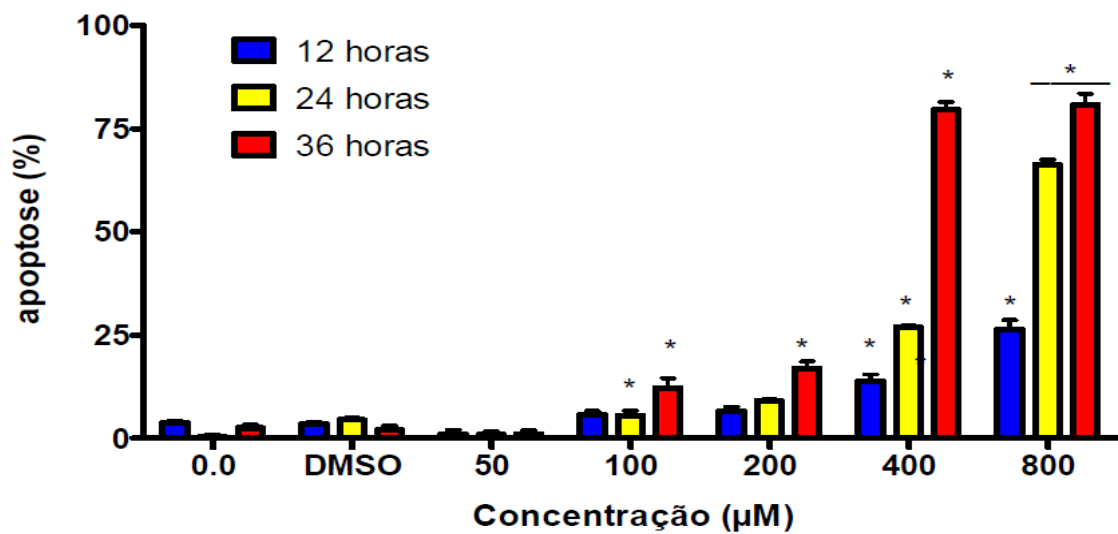


Figura 28: Porcentagem de apoptose induzida pelo flavonóide morina nas linhagens neoplásicas U937, THP-1 determinada por microscopia de fluorescência em quatro tempos diferentes, 12, 24, 36 e 48h. O zero significa controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 0,2%. *P<0.05, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

6. Discussão:

6.1 Determinação da viabilidade das células U937 e THP-1 tratadas com o extrato de *Croton urucurana* (MTT)

Estudos realizados com algumas espécies de *Croton* têm revelado várias atividades farmacológicas e constituintes químicos como terpenóides, flavonóides e alcalóides (Palmeira Júnior, 2006). Os flavonóides são compostos polifenólicos que tem atraído a atenção da comunidade científica como moléculas responsáveis pela prevenção do câncer por uma infinidade de mecanismos bioquímicos, suprimindo a carcinogênese em *in vitro* e em modelo animal (RAMOS, 2007).

O material comprovadamente citotóxico é representado por aquele que libera um elemento ou composto químico em quantidade suficiente para causar a morte celular. A morte celular é causada pela inibição das vias metabólicas. O número de células afetadas indica a dose e a potência da substância analisada capazes de matar as células. O conceito de dose liberada do composto tóxico é considerado equivalente a dose absorvida pelas células (REUTER, 2008).

O ensaio de MTT é então utilizado para determinar a viabilidade celular, avaliando a capacidade de inibir o desenvolvimento de células tumorais, verificando a atividade de uma enzima mitocondrial - a succinato desidrogenase. É quantificado o quanto de MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH formando cristais de formazan, de cor azul, indicando assim a presença ou não de atividade mitocondrial nas células (apenas células viáveis metabolizam este sal). Dessa maneira a quantidade de formazan medida por espectrofotometria é diretamente proporcional ao número de células viáveis (REUTER, 2008).

O efeito do extrato de *Croton urucurana* na viabilidade de linhagens celulares tumorais pode fornecer importantes informações a respeito do processo de crescimento e morte celular que poderão ser utilizados estrategicamente no desenvolvimento de uma nova forma terapêutica de quimioterápicos para uso em humanos.

Observa-se então que o extrato de *Croton urucurana* e o composto morina reduziram significativamente a viabilidade das linhagens de células tumorais U937 e THP-1 através do ensaio colorimétrico utilizando MTT de maneira concentração dependente em 48 horas de tratamento para as doses de 400 e 800 µg (extrato bruto de *C.urucurana*) e doses de 200, 400 e 800 µg (para o composto morina) quando comparados com células não tratadas, como observado na figura 27, comprovando assim a sua capacidade citotóxica. O DMSO (dimetilsulfóxido) veículo utilizado para diluição dos compostos, não alterou a viabilidade celular das linhagens testadas.

Vários trabalhos têm mostrado que flavonóides inibem a carcinogênese modulando os reguladores de apoptose, ativando caspases-3, -8, e -9 (OLA, 2011).

O ciclo celular é uma sequência de eventos que permite a célula crescer e replicar (FOSTER, 2008). Seu controle envolve proteínas reguladoras do ciclo celular chamadas de ciclinas; quinases dependentes de ciclinas (CDK's) e inibidores de CDK como a p53, p21 e p27 (ARAUJO, 2011). Qualquer alteração de uma proteína específica do ciclo celular pelo flavonóide pode afetar o crescimento e proliferação de células cancerígenas (RAMOS, 2008). Além disso,

a regulação do ciclo celular (checkpoint) durante a progressão G₁/S e G₂/M são importantes alvos para os flavonóides (ARAUJO, 2011).

O flavonóide morina é capaz de inibir a proliferação celular em vários tipos de células carcinogênicas inibindo o ciclo celular na fase S em vários tumores como carcinoma oral e hepatócitos em humanos (KUO, 2007).

O extrato de *Croton urucurana* possui uma quantidade apreciada de compostos fenólicos segundo SALATINO, 2007. Estudos comprovam que os flavonóides de espécies de *Croton* induziram o bloqueio no ciclo celular na fase G₂/M e promoveu apoptose pela via intrínseca em células leucêmicas (KUO, 2007), devido ao fato do composto morina ser capaz de suprimir a ativação da STAT3 (transcrição 3) por fosforilação ou pela retenção nuclear e inibir a ligação da STAT3 com a molécula de DNA. O flavonóide morina tem efeito em várias quinases e fosfatases que atuam na via de ativação da STAT3 (GUPTA, 2001). Foi demonstrado que a morina inibe o acúmulo de quinases em células cancerígenas e que os grupos hidroxila presentes no anel B do flavonol foi essencial para a inibição da ativação da STAT3 (GUPTA, 2013).

Para efeito de uma melhor comparação da atividade citotóxica do extrato contra as diferentes linhagens de células testadas foi calculado o índice de citotoxicidade 50% (EC₅₀) com base no teste de viabilidade, MTT (concentração do composto capaz de induzir morte em 50% das células tratadas), ou seja, a concentração capaz de matar ou reduzir a viabilidade celular em 50%. A EC₅₀ foi determinada utilizando o programa Graph Prism versão 5.0 através da curva de regressão não linear, a partir dos dados das figuras 24 e 25. A partir das curvas dose resposta, demonstrou-se que o extrato de *Croton urucurana* apresentou os

menores valores de EC_{50} para as linhagens de células testadas, sendo, portanto, o composto de menor concentração capaz de matar 50% das células testadas, como demonstrado na tabela 2.

6.2 Avaliação da viabilidade celular pela liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A fim de confirmarmos o efeito dos compostos sobre a viabilidade das linhagens testadas, foi realizado um ensaio para mensurar a enzima desidrogenase láctica (LDH), liberada no sobrenadante de células tratadas com os compostos após 48 horas de tratamento.

O teste de LDH (lactato desidrogenase) é um marcador de membrana íntegra e o principal objetivo da quantificação da enzima LDH é indicar a existência de uma severidade aguda ou danos teciduais crônicos, e também o monitoramento de doenças progressivas (como o câncer), podendo ser usada em diagnóstico diferenciais para ajudar na detecção de órgãos afetados.

A LDH é uma enzima citosólica que está presente no interior de células saudáveis, e quando a membrana é danificada há um contato da LDH com o meio externo. Este teste detecta a presença da LDH no meio indiretamente devido à reação de redução do sal Tetrazolium INT que depende do LDH para que a reação ocorra. Esta enzima pode ser detectada pela ação catalítica e indireta de conversão do 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H tetrazolium cloro (INT) em outro corante solúvel em água, formazana. O LDH permite analisar o número de total de células viáveis, isto correlacionado com a proliferação das mesmas. Entretanto, quando há indução de danos celulares por agentes químicos, pode ocorrer o aumento da permeabilidade da membrana celular, liberando a LDH no meio. Justifica-se então usar esse teste como

acompanhamento de pacientes com câncer (especialmente linfoma), uma vez que as células cancerosas têm maior taxa de renovação com a presença das células destruídas ocasionando elevação nos níveis de LDH (KELDERMAN, 2014).

Os resultados obtidos com esta técnica corroboram os resultados obtidos pelo ensaio com MTT, deste modo, o aumento na dosagem da enzima LDH de maneira concentração dependente confirmou o efeito citotóxico do extrato de *Croton urucurana* frente às linhagens neoplásicas testadas (Figura 25).

Possivelmente, com esse resultado podemos dizer que houve a ruptura da membrana plasmática nas maiores concentrações do extrato de *Croton urucurana*, o que indica a redução da viabilidade celular pelo método MTT, sendo que a sua presença sugere morte celular por necrose. Entretanto este resultado pode ser visto de outra maneira, uma vez que células em apoptose *in vitro* podem posteriormente entrar em necrose.

6.3 Avaliação do mecanismo de morte celular induzida pelo composto testado (Microscopia de fluorescência)

Esta avaliação foi realizada com a finalidade de se determinar o mecanismo de morte celular induzida pelos compostos orgânicos.

Para compreensão do mecanismo de ação do extrato de *Croton urucurana* e do composto morina para o ensaio de MTT, avaliou-se de forma quantitativa e qualitativa o possível mecanismo de morte celular induzida pelos compostos por microscopia de fluorescência nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas para o extrato de *Croton urucurana* e nos tempos de 12, 24, 36 horas para a morina. Os resultados de indução de morte celular por apoptose para as linhagens de células

cancerígenas testadas são apresentadas nas figuras 27 e 28. Avaliando-se as diferentes concentrações nos tempos estudados, observou-se que, de forma geral, a indução da apoptose é um processo tempo e concentração dependentes.

A apoptose como já foi descrita, é um tipo de morte celular programada que é verificada em diversas situações fisiológicas bem como em patologias relacionadas ao câncer, desordem neurodegenerativas e doenças auto-imunes (PARK, 2013). O processo de apoptose se caracteriza por uma série de alterações morfológicas, pela participação das caspases, liberação de citocromo c mitocondrial e fragmentação nuclear (OLA, 2011). Vários estudos comprovam que a maioria dos fármacos antitumorais promoveu a morte das células cancerígenas (PARK, 2013). Uma das características mais importantes do câncer é o crescimento contínuo da massa tumoral. Hoje se sabe que todos os tumores malignos adquiriram a capacidade de crescer além dos limites impostos as células normais. Desse modo as taxas de proliferação e de morte celular podem ser consideradas fatores determinantes no seu crescimento (KAPOOR, 2012).

Estudos comprovam que a maioria dos fármacos antitumorais promoveu a morte de células cancerígenas através da apoptose. Desse modo, compostos que promovem a apoptose como via de indução de morte celular são fortes candidatos a fármacos com ação antitumoral (ONRUBIA, 2012).

Flavonóides são compostos promissores, pois atuam como moléculas supressoras da carcinogênese em função de suas propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antiinflamatórias (JASH & BRAHMACHARI, 2013).

É bem conhecido que as mitocôndrias desempenham um importante papel na regulação da apoptose (PORTT, 2010). A apoptose pode ser dividida em vias mitocôndrias- dependente e independente, via intrínseca e extrínseca,

respectivamente. No entanto, disfunções mitocondriais, incluindo perda de potencial de membrana mitocondrial, a permeabilidade, transição e liberação do citocromo C da mitocôndria para o citosol, estão associados a apoptose (PORTT, 2010). Assim o tratamento com morina pode induzir apoptose pela via intrínseca em células leucêmicas (KUO, 2007; LIU, 2011).

Como podemos observar na figura 28, a porcentagem de apoptose induzida pelo composto morina em linhagens de células tumorais humanas (U937 e THP-1). Observa-se no gráfico que o composto morina foi capaz de induzir a apoptose nas linhagens de células U937 nas concentrações 200, 400 e 800 μM no período de tempo de 24 e 36 horas chegando a 100% para a linhagem U937 na concentração 800 μM em 36 horas. O percentual de apoptose também é estatisticamente significativo para a linhagem THP-1, apesar de menos sensível ao composto, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.

Pode-se dizer então que a apoptose é capaz de proteger contra o câncer por ter a capacidade de remover células geneticamente danificadas do meio celular (PORTT, 2010; ARAÚJO, 2011). Sendo assim, resistência a apoptose é uma alternativa de sobrevivência do câncer (ARAÚJO, 2011). Portanto a incapacidade de uma célula se submeter a apoptose pode adiar o desenvolvimento dessa doença permitindo que células tumorais se dividam e se acumulem além de não permitir que seja feita a eliminação de fatores mutantes genéticos que podem levar a um potencial efeito maligno. Em vista disso, estudos apontam que a resistência a apoptose pode ser adquirida de diferentes formas e em vários estágios da formação do tumor (KUO, 2007).

Frente a todos esses conhecimentos, a apoptose na prática clínica vem sendo considerada alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada. Portanto a elucidação de alguns mecanismos moleculares de apoptose abriu possibilidades de modulação desse processo e desse modo substâncias novas com possível efeito antitumoral tem sido avaliadas frente ao seu potencial em induzir a morte de células tumorais (DIX, 2008).

Na figura 27 podemos observar que a porcentagem de apoptose induzida pelo extrato de *Croton urucurana* nas linhagens U937 e THP-1. Observa-se que o extrato foi capaz de induzir a apoptose nas células U937 nas concentrações de 400 e 800 µg/ml no período de tempo de 36 e 48 horas chegando a 100% para a linhagem U937 em 48 horas. O percentual de apoptose também é estatisticamente significativo para as linhagens THP-1, apesar de serem menos sensíveis ao extrato, nas mesmas concentrações e períodos de tempo.

Estudos publicados vêm demonstrando que agentes anticâncer podem induzir a apoptose via sistema de Fas/FasL (via essencial na regulação da proliferação celular e do crescimento tumoral). Fas é um receptor de superfície celular que expressa a morte citoplasmática e que pertence a subfamília receptor de necrose tumoral (FULDAS, 2006). Vários mecanismos bioquímicos poderiam explicar esse efeito, tais como o bloqueio de da ativação de carcinógenos através do aumento da síntese de enzimas envolvidas na etapa de reparo do DNA e intercepção de carcinógenos antes de sua reação com o DNA (AMBER, 2011).

A morte celular de células tumorais é resultado da ativação das vias das caspases 3 e 9 capazes de inibir a metástase e a angiogênese, promovidas por agentes antitumorais (OLA, 2011). Os flavonóides são compostos promissores e

exibem diversas atividades biológicas prevenindo a iniciação de cânceres e inibindo a progressão tumoral. Várias pesquisas demonstraram que os flavonóides apresentam propriedades quimioprotetoras contra o câncer apresentando efeitos antiproliferativos, induzindo o bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, indução de inibidores de CDK via p53 e inibição de radicais livres (SHIN, 2009; HUANG, 2010). Estes mecanismos poderiam explicar o efeito citotóxico do extrato bruto de *Croton urucurana* contra as linhagens leucêmicas testadas.

Estudos sugerem que os flavonóides possuem propriedades antioxidantes, podendo fornecer proteção de curto a longo prazo contra o estresse oxidativo, pois possuem a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio, por doar hidrogênio, promovendo a ação de diversas enzimas que participam de um potente mecanismo antioxidante de defesa celular que protegem contra o estresse oxidativo ao catalisar uma variedade de reações que neutralizam células carcinógenas (LEE, 2012).

Estudos recentes comprovaram que flavonóides de espécies de *Croton* induziram o bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M e promoveu apoptose pela via intrínseca em células leucêmicas (KUO, 2007).

Frente a isso foi observado que o extrato bruto de *Croton urucurana* promoveu alto percentual de apoptose e reduziu a viabilidade celular para as linhagens U937 e THP-1 testadas, como mostrado na figura 26 e 27.

7. Conclusão:

O presente estudo demonstrou que o extrato de *Croton urucurana* apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de célula leucêmicas humanas U937 e THP-1, diminuindo significativamente a viabilidade celular, de maneira concentração dependente e as concentrações apresentando EC₅₀ de 402,2 µM para linhagem U937 e EC₅₀ de 360,3 µM para linhagem THP-1 mostraram-se mais eficientes. Os resultados permitem concluir que possivelmente esses compostos induziram a morte celular por apoptose, sendo, o composto morina mais ativo para as células leucêmicas de maneira tempo concentração dependente e o extrato de *Croton urucurana* mais ativo para a linhagem U937 também de maneira tempo e concentração dependente, chegando a 75% na concentração 800 µM em 48 horas para a linhagem THP-1 e 100% nas concentrações 200µM 400µM e 800µM também em 48 horas para a linhagem U937. Sendo assim, a linhagem U937 é mais sensível a ação do composto de *Croton urucurana*.

Os resultados obtidos sugerem que o extrato de *Croton urucurana* é um promissor na busca por novos agentes antineoplásicos. No entanto outros testes devem ser realizados a fim de elucidar as vias de indução de apoptose promovida por este composto nestas linhagens neoplásicas.

8. Referências Bibliográficas

ABDON, A.P.V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO DE SOUZA, A.N.; MORAIS, S.M.; SANTOS, C.F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of medical and biological research**, v.35 (10), p. 1215-1219. 2002.

ADAMS, H.R. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 8 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2003.

AGATI, T.; TATTINI, M. Múltiplos Papéis funcionais de flavonóides em fotoproteção. **New Phytologist**, v.186, p.786-793.2012.

ALONSO, J., **Tratado de Fitofármacos e Nutracêuticos**. Editora Corpus, Rosário-Argentina, 2007

AMADO, N.G.; FONSECA, B.F.; CERQUEIRA, D.M.; NETO, V.M.; ABREU, J.G. Flavonoids: potencial Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Sciences**, v.89, n.15-16, p. 545-554. 2011.

AMBER, J.; BERDMAR, Z.F.; PULIDO, M.V.; PEYRAS, S.D.; MILLAN, M.M.; MORANGA, A.A.; SERRANO, A.M.; CASTRO, M.D.L. Apilot study on the DNA- protective, cytotoxic, and apoptotic-inducing properties of olive-leaf extracts. **Mutation Research**, v.723, p. 165-170, 2011.

ANDROUTSOPOULOS,V.P.; PAPAKIRIAKOU, A.; VOURLOUMIS, D.; TSATSAKIS, A.M.; SPANDIDOS, D.A. Dietaryflavonoids in cancer therapy and prevention:substrats and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. **Pharmacology & Therapeutic**, v.126, p.9-20.2010

ANSELMO, J.S.; LIMA, R.A. Identificação de metabólitos secundários no extrato etanólico das folhas de *Solanum jamaicense* (Solanaceae) e seu potencial fungicida sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.11, n.1, p.11-20, 2014.

ARAÚJO, J.R.; GANCALVES, P.; MARTEL, F.Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. **Nutrition Research**. v. 31 p.77-87. 2011.

ARAUJO-JUNIOR, V.T.; DA SILVA, M.S.; DA CUNHA, E.V.L.; AGRA, M.D.; ATHAYDE FILHO, P.F.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J.M. Muscicapines,a new class of guaiane-tipe sesquiterpene alkaloids from *Croton musicapa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**,v.16 p.553-557. 2005.

APG III (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the ordens and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 161: 105-121. 2009.

ATTOUB, B.; HASSAN, A.H.; AWAD, S.; BRACKE, M.; PETROIANU, G. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin, morin in human epithelioid cancer cells. **European journal of pharmacology**, v. 651, p.18-25, 2011.

BAYOR, M.T., GBEDEMA, S.Y. ANNAN, K. The antimicrobial activity of *Croton membranaceus*, a species used in formulations for measles in Ghana. **J Pharm Phyt**, 1(4), p. 47-51. 2009.

BAKKALI, F. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, n.2, p 446-475, 2008.

BERRY, P.E.; HIPPI, A.L. Molecular phylogenetic of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu strict) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany** v.92 p. 1520-1534. 2005.

BRANDAO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p. 1359-1369.2010.

BROCKSOM, T.J.; DONATI, M.C.; ULIANA, M.P.; DE SOUZA, D.P. Chemical Constituents of Essential Oils as Raw Materials in the Synthesis of Bioactive Compounds, in Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological, and Therapeutic Aspects. **Nova Science Publishers**, v.3, p. 23-49. 2012.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: Natural products – derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, p.475-516, 2008.

CAMPOS, M.C.O.; SALOAMAO, K.; CASTRO-PINTO, D.B.; LEON, L.L.; BARBOSA, H.S.; MACIEL, M.A.M. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, 107(5), p. 1193-1204. 2010.

CANEVAROLO, Rafael Renatino, **Metabolômica da resistência ao metotrexato na leucemia linfóide aguda**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas–UNICAMP, Campinas, 2012.

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, v.48, n.2, p.219-237, 2010.

COLEY, P.D.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. **Resource availability and plant antiherbivore defense Science**, v. 230(4728), p. 895-899. 1985.

COLOMA, A.G.; BALBOA, C.L.; REINA, O.S.M.; FRAGA, B.M. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.*10p. 245-260,2011.

COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, R.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUAREZ, A.I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Methods**, v.2, p.101-108. 2010.

CONNOLLY, J.; HILL, R.A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v.17 p. 463-482, 2005.

CORSINI, E.; AVOGRADO, A.; GALBIATI, V.; DELL'AGLI, M.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; GERMOLEC, D.R. In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n.2, p. 108-116. 2011.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional** 6 ed Guanabara. Rio de Janeiro 1251p. 2005.

COUZZO, F.; RACITI, M.; BERTELLI, L.; PARENTE, R. Pro- death and pro-survival properties of ouabain in U937 lymphoma derived cells. **Journal of experimental and clinical cancer research**, p.31-95.2012.

CRAGG, G.; NEWMAN, D.J. Biodiversidade um componente essencial na descoberta de novos fármacos. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed Itajaí UNIVALI, p. 53-81,2009.

CUENDET, M.; PEZZUTO, J.M. Antitumor alkaloids in clinical use or in clinical trials. In: FATTORUSSO, E.; TAGLIATELLA-SCAFATI, O. Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. Weinheim: **Wiley-VHC Verlag GmbH & Co**.2008.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J.A.; MARRIOT, H.M.; WHYTE, M. K.B.; DOCKRELL, D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA- stimulated THP-1 cells and Monocyte Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v.5, n. 1.2010.

DEWICK, P.M. **Medical Natural Product – A biosynthetic approach**. 3rd edition. Jonh Wiley & Sons, Ltd, Chichester 546 pp. 2009.

DI STASI, LC.; HIRUMA LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora UNESP. 2003.

DIX, M.M.; SIMON, G.M.; CRAVATT, B.F. Global mapping of thetopography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. **Cell** v.134 p. 679–691. 2008.

EBY, A.G. Treatment of acute lymphocytic leukemia using zing adjuvant chemotherapy and radiation – a case history and hipotesis.**Medical Hipotesis**, v. 64, p. 1124-1126. 2005.

EDWARDS-JONES, G.; DAVIES, B.; HUSSAIN, S. Ecological economics. **Blackwell**, Oxford.2000.

ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jacaraca*, using techniques to quantify hemorrhagic activity.**Phytomedicine** v. 12, p. 570-576. 2005.

ESTRADA, E.I. Actividad antioxidante de alcalóides de *Erythrina americana* Miller. *Revista Fitotecnia Mexicana*, v.34, p.241-246.2011.

FERREIRA, L.M.R. Cancer metabolism: the Warburg effect today, review. **Experimental and Molecular Pathology**, v.89, n.3, p.372-380. 2010.

- FOSTER, I. Acell cycle defect, **Radiography**, v.14, p.144-149. 2008.
- FULDAS, S.; DEBATIN K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, **Oncogene**, v. 25 p. 4798–4811. 2006.
- FURLAN, C.M. Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cong. E *Psidium guajava* L. (Tese de doutorado) **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, SP. 2004.
- GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G.; CROFT, S.L.; FROMMEL, D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line THP-1. **Acta Tropical**, v.51, n.3-4, p. 237-245. 1992.
- GOVAERSTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. World checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae) v.2 Euphorbiaceae: Croton to Excoecariopsis . **Royal Botanical Gardens**, Kew. 2000.
- GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRON, R.; MARTIN, M.L.; SAN ROMAN, L. Quercetin3,7-dimethyl ether: a vasorelaxante isolated from *Croton schideanus* Schlecht. **Pharmacy and Pharmacology** 54:1373-1378. 2002.
- GUPTA, D.; BLEALEY B.; GUPTA, R. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.338-361. 2008.
- GUPTA, P.C.; DUTTA, B.; PANT,D.; JOSHI, P.; LOHAR, D.R. In vitro antibacterial activity of *Artemisia annua* Linn. Growing in India. **Internacional Journal of Green Pharmacy**, v.3,n.3, p. 255-258. 2009.
- GUPTA, S.C.; PHROMNOI, K.; AGGARWAL, B.B.Morin inhibits STAT3 tyrosine 705 phosphorylation in tumor cells through activation of protein tyrosine phosphatase SHP1. **Biochemical Pharmacology**, v.85, p.898-912.2013.
- GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.; CECHINEL FILHO.; RAO,V. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**. V.97, p. 409-412. 2005.
- GURIB-FAKIN, A. Review Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, n.17, p.1-93, 2006.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plants secondary metalolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846.2007.
- HATTORI, T.; PACK, M.; BOUGNOUX, P.; CHANG, Z.L.;HOFFMAN, T. Interferon-induced Differentiation of U937 cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.72, p. 237-244.1983.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p. 770-776.2000.
- HELUANI, C.S.; CATALÁN, C.; HERNANDEZ, L.R.; BURGUENO-TAPIA, E.; JOSEPH-NATHAN, P. Three new diterpenoids based on the novel sarcopetalane skeleton from *Croton sarcopetalanus*. **Journal of Natural Productsz**, v.63:2220225. 2000.

HELUANI, C.S.; LAMPASONA, M.P.; VEJA, M.I.; CATALAN, C.A.N. Antimicrobial activity and chemical composition of the leaf and root oils from *Croton hieronymi* Griseb. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.351-353. 2005.

HOLLSTEIN, M.; RICE, K.; GREENBLATT, M.S. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.17, p.3551-3555,1994.

HUANG, J.H.; HUANG, C.C.; FANG, J.Y.; YANG, C.; CHAN, C.M.; WU, N.L., KANG S. W.; HUNG C. F. **Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes.** *Toxicology In Vitro*. v. 24 p. 21–28. 2010.

HUNG, J.; HSU Y.; KO.Y.; TSAI Y.; YANG C.; HUANG, M.; KU P. Didymin a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas- mediated apoptotic pathway im human nom-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**. V.68, p. 366-374. 2010.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009.

INCA, Ministério da Saúde. **Incidência do câncer na Brasil**. Disponível em www.inca.gov.br. Acesso em 28 de maio de 2015.

JASH, S.K & BRAHMACHARI, G. Recent progress in the research of naturally occurring flavonoids: a look through. **Journal Organic Biomolecular Chemistry**, v.134, p.29-36.2013.

KAPOOR, R.; KAKKAR, P. Protective Role of Morin, a Flavonoid, against HighGlucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis inPrimary Rat Hepatocytes. **Plos One**, v.7, e 41663. 2012.

KELDERMAN, S.; LORIGAN, P.; RENN, A.; HOSPERS, GA.; FURNESS, A.; Lactato desidrogenase como critério de seleção para o tratamento em melanoma metastático. *Cancer Immunol Immunother*, v.63, p.449-458.2014.

KINGSTON, D.G. Modern natural products drugs discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v.74, p.456-511, 2011.

KHLEBNIKOV, I.; SCHEPETKIN, I.A.; DOMINA, N.A.; KIRPOTINA, L.I.; QUINN, M.T., Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Andrei, Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p.1749-1770.2007.

KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. **Patologia Básica**. Rio de Janeiro. KUO, H.; CHANG, L.; LIN, Y.; LU, H.; YANG, J.; LEE, J.; CHUNG, J.2007. Morin the Growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. **Anticancer Research**, v.27, p.395-406. 2007.

KUO, H.; CHANG, L.; LIN, Y.; LU, H.; YANG, J.; LEE, J.; CHUNG, J. Morin Inhibits the Growth of Human Leukemia HL-60 Cells *via* Cell Cycle Arrest and Induction of Apoptosis through Mitochondria Dependent Pathway, **Anticancer Research** v. 27 p. 395-406, 2007.

LAHLOU, M. Essencial oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. **Flavour and fragrance Journal**, v. 19, p. 159-165.2004.

LEE, D.H.; PARK, H.S.; KANG, S.R. Flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. Induced G2/M phase arrest and apoptosis in human gastric cancer AGS Cells. **Evidence Based Complementary and alternative medicine**, p.01-12. 2012.

LEIBOVICI, D. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression and survival. **Journal Clin Oncol**, v.23, p.5746-5756.2006.

LIMA, L.R. Estudos Taxonomicos em *Croton* seção Lamprocroton (Mull Arg.) Pax (Euphorbiaceae). **Tese de doutorado. IB-USP**. 2009.

LIU, D.; CHEN, X.Y.; XIONG, R.P.; NING, Y.L.; LI, P.; PENG, Y. Dexamethasone inhibits U937 cells adhesion via the down regulation of ROCK-1 activity. *Biochimica Polonica*, v.557-560. 2012.

LIU, J.; LIN, M.; YU, J.; LIU, B.; BAO, J. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutic. **Cancer Letters**, v. 300, p. 105-114. 2011.

LIU, L.; MA, H.; YANG, N.; TANG, Y.; GUO, J.; TAO, W.; DUAN, J. A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: Structure-activity relationship. **Trombosis Research**, v.126, p. 3678-3685. 2010.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Nature**, v.6, p.860-867,2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINDE, F.A.; LUNA COSTA, A.M.; FARIAS, R.A.F.; COLUS, I.M.S.; GRZYMBERG, N.F. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of ethnopharmacology** 70:41-55. 2000.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, p.429-38, 2002

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p. 727-747. 2004.

MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. London: **Academic Press**. 1982.

MILANOWSKI, D.J.; WINTER, R.E.K.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. **Journal of natural products**. V.65, p. 814-819.2002.

MILO, B et al. Characterization of a Fucoarabinogalactan, the Main Polysaccharide from the Gum Exudate of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, Espanha, n. 65, p. 1143-1146. 2002.

MOORE, N.; LIFE, S. Quiescent, slow-cycling stem cell proliferation in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. **Journal of Oncology**, p. 1-11. 2011.

MORIYAMA, B.; HENNING, S.A.; LEUNG, J.; FALADE-NWULIA, O.; JAROSINSKI, P.; PENZAK, S.R.; WALSH, T.J. Adverse interactions between antifungal azoles and vincristine: review and analysis of cases. **Mycoses**, v.55, p.290-297. 2012.

MULLER, G.; ROSNER, H.; ROHRMANN, B.; ERLER, W.; GESCHWEND, G.; GRAFE, U.; BURKERT, B.; MOLLER, U.; DILLER, R.; SACHSE, K.; KOHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cells line THP-1 . **Toxicology**, v.184, n.1, p. 69-82.2003.

NEWMAN, D.J. and CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-35, 2012.

OLA, M.S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H.,; Role of Bcl-2 family proteins and caspases in theregulation of apoptosis, Mol. **Cell Biochemistry** v. 351 p.41–58. 2011.

ORUBIA, M.; CUSIDO, R.M.; RAMIREZ, K.;HERNANDEZ-VASQUEZ, L.; MOYANO, E.; BONFILL, M.; PALAZON, J. Bioprocessing of plant in vitro systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites:paclitaxel and its derivatives. **Current Medical Chemistry**, v.12, n.7, p.887-890. 2012.

PALMEIRA JUNIOR, S.F.; CONSERVA, L.M.; SILVEIRA, E.R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16:1420-1424. 2005.

PALMEIRA JUNIOR, S.F.; CONSERVA, L.M.; SILVEIRA, E.R. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 p.397-402. 2006.

PAOLI, A.A.S.; FREITAS, S.; BARBOSA, J.M.A. Caracterização morfológica dos frutos, sementes e plântulas de *Croton floribundus* spreng e *Croton urucurana* Baill (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17 n.1, p.57-68. 1995.

PARK, H. Y.; KIM, G.; KNOW, T. K.; HWANG, H. J.; KIM, N. D.; YOO, Y. H.; CHOI, Y. H. Apoptosis induction modulation of the Bcl-2 family of proteins and MAPKs signaling pathway, **Mutation Research**, v. 751, p. 101-108, 2013.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivo de Gastroenterologia**, v.38, n.2, p.138-144.2001.

PERES, M.T.L.P et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology, Brasil**, v.56, p. 223-226. 1997.

PICK, A.; MULLER, H.; MAYER, R.; HAENISCH, B.; PAJEVA, I.K.; WEIGT, M.; BONICH, H.; MULLER, C.E.; WIESE, M. Structure-activity relationship of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Biorganic & Medical Chemistry**, v.19, p.2000-2012. 2011.

PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A.; CALOMME, M.; BERGHE, D.V. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South-American dragons blood (*Croton* spp) as an inhibitor of cell-proliferation. **Journal of Natural Products**, v.56, p.899-906. 1993.

PLUEBA, P.; CORREA, S.X.; GUERRERO, R.; FELICIANO, A.S. Phenybutanoid derivatives from *Croton schiedeanus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p. 849-854. 2005.

POLLOCK, R.E. Manual de Oncologia Clínica 8ª Ed. São Paulo: **Fundação Oncocentro de São Paulo**, p.10. 2006

PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M.T. Anti-apoptosis and cell survival a review. **Biochimica et Biophysica. Acta**, v. 18, n. 3, p. 238-259. 2010.

QIAN, B.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; XIAOYIN, Z.. YU, H. CHEN, K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. **Lung Cancer**, v. 73, p. 138-146. 2011.

QUISPE, A.; ZAVALA, D.; ROJAS, J.; GOYA, L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of human hepatoma cell line (HepG2). **Journal Agric.Food Chem**, v.53, p. 1271-1280. 2005.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.18 p.427-42. 2007.

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways . **Molecular Nutrition Food Research**, v.52, p.507-526.2008.

RANAU, K.P.; FLORENCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S.; Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K e *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.89-96. 2004.

RANAU, K.P.; FLORENCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S.; Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespásmica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2. 2002.

RAO, V.S. Dragon's blood from *Croton urucurana* Baill attenuates. **Journal of Ethnopharmacology**, Brasil, n.113, p. 357-360.2007.

RAVEN, Peter H., 1936 – **Biologia vegetal** / Peter H. Raven, Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn ; [coordenação da tradução Jane Elizabeth Kraus ; revisão técnica Jane Elizabeth Kraus, Neuza Maria de Castro ; tradução Ana Claudia de Macêdo Vieira... et al.]. – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 830 p. 2007.

REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M.; AGGARWAL, B.B.; DIEDERICH, M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 76 p.1340-51. 2008.

RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v.16, p.1052-1055. 2009.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic effects, and Safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p.19-34. 2002.

RUSAK, G.; GUTZEIT, H.; MULLER, J.L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycles progression and apoptosis of human acute leukemia cells. **Nutrition Research**, v. 25, p. 141-153. 2005.

SALATINO, A; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton species* (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18(1),p. 11-33. 2007.

SANTOS, P.M.L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R.M. Flavonoides O- glicosilados de *Croton campestris* St Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 321- 325. 2005.

SCHULTES, R.E.; HOFMANN, A. Plantas de los dioses. México DF: **Fondo de cultura econômica**, 2000.

SILVA, D.M.; MOCELIN, K.R. O cuidado de enfermagem ao cliente portador de feridas sob a ótica do cuidado transcultural. **Nursing (São Paulo)**, v. 9, n. 105, p. 8188, 2007.

SHIN, E. K.; KWON, H. S.; KIM, Y. H.; SHIN, H. K.; KIM, J. K. **Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases.** *BiochemistryBiophysic Research Community*. v.381 p. 502–507. 2009.

SILVA, K.C. **Estudos Adicionais Sobre a Composição Química de Extrato Clorofórmico da *Drimys brasiliensis* e Avaliação Citotóxica de células Hela (tumorigênicas) e L929 (linhagem não tumorigênica).** Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde. UNIVALE 2009.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; MOREL, A.F.; ROPPI, N.R.; RAPOSO JUNIOR, J.L.; STUKER, C.Z. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazil Chemical Society**, v.18 (5), p. 879-885. 2007.

SMIDERLE, F.R.; RUTHES, A.C.; VAN ARKEL, J.; CHANPUT, W.; IACOMINI, M.; WICHERS, H.J.; VAN GRIENSVEN, L. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative**, v. 58, p.11-20.2011.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5. ed, 1. reimpr. Porto Alegre: EDUFRGS; Florianópolis: EDUFSC, p.289-326. 2004.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. (2.Ed.) Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.99-102. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 ed, Porto Alegre. Editora Artmed, 719 páginas. 2004.

TEIXEIRA, E. H., et al. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives of oral biology**, v. 57, 550 - 555, 2012.

TIEPPO, M.; PORAWSKI, M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, A.J.; COLLADO, P.S.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; MARRONI, N.P. Croton cajucara Benth. Leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protect against oxidative stress induced by paraquat. **Biological & Pharmaceutical bulletin**, v. 29, p. 161-165. 2006.

TISSERAND, R.; BALACS, T. Essencial Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals, **Churchill Livingstone: London**. 1999.

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cells line THP-1. **International Journal of Cancer**, v.26, n.2, p.171-176.1980.

UDDIN, N.; SIDDIQUI, B.S.; BEGUM, S.; BHATTI, H.A.; PARVEEN, S.; VELVHETI, V.; GOVINDAN, R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. **Journal thoracic oncology**, v. 2, p. 07-09. 2010.

VANACLOCHA, B.; CANIGUERAL, S. **Fitoterapia**. Vademecum de Prescripcion. 4 ed. Editora Masson. 2003.

VASCONCELLOS, A.G.; BRANQUINHO, F.B.; SANCHEZ, C.; LAGE, C.L.S. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2002.

VERPOORTE, R. & ALFERMANN, A.W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. **Kluwer Academic Publishers**. 2000.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v.36, p.165-175.2003.

VIEGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p.519-528.2005

VERMEULEN, K.; BERMEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36,p. 165-175. 2003.

VIDYA, P.R.; SENTHIL, M.R.; MAITREYI, S.; RAMALINGAM, K.; KARUNAGARAN, D.; NAGINI, S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cell through p53 induction and NF-KB inhibition. **European Journal Pharmacology**, v. 649, n.1-3, p. 84-91. 2010.

VEPOORTE, R, & ALFERMANN, A. W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. **Kluwer Academic Publishers**. 2000.

VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-INNOWAX2007. **Química Nova**, v.30(8),p. 2031-2034. 2007.

VERPOORTE, R., Some phytochemical aspects of medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.25, p.43–59. 1989.

ZHANG, R.; KANG, SS.; PARK, J.W. Morin protected cells against c- radiation-induced oxidative stress. **Based Clinical Pharmacologic Toxicological**, v. 108, p.63-72. 2011.

YAN, R.; CAN, Y.; CHEN C.; DAI, H. YU S.; WEI J. LI, H. YANG B. Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. **Fitoterapia**. V.82, p.841-848. 2011.

YONG, C.D.; ANDERSON, S.M. Sugar and fat- that's where it's at: metabolic changes in tumors. **Breast Cancer Research**, v.202, p. 1-9.2008.

YURINSKAYA, V.E.; MOSHKOV, A.V.; WIBBERLEY, V.W.; LANG, F.; MODELB, M.A.; VERENINOV, A.A. Dual response of human leukemia U937 cells to hypertonic Shrinkage: Initial Regulatory Volume Increase (RVI) and Delayed Apoptotic Volume Decrease (AVD). **Cells Physiol Biochem**, v.30, p. 964-973.2012.

WHELAN, R.S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, R.N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. **Annual Reviews of Physiology**, v. 72, p. 45-59. 2010.

WHO — World Health Organization, **Quality control methods for medicinal plant materials**, Geneva, 1992.

WEBSTER, G.L. A Provisional Synopsis of the Sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae) **Taxon**, v. 42, p.793-823. 1993.

