



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TACIANA MICHELE DE LIRA MOURA

**BIOENSAIO DE VERNONIA CONDENSATA BAKER (ASTERACEAE) EM
MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Recife
2018

TACIANA MICHELE DE LIRA MOURA

**BIOENSAIO DE VERNONIA CONDENSATA BAKER (ASTERACEAE) EM
MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivone Antônia de Souza

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M929b Moura, Taciana Michele de Lira.
Bioensaio de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) em modelo experimental *in vivo* / Taciana Michele de Lira Moura. – 2018.
65 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antônia de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-graduação em Patologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Câncer. 2. Carcinoma de Ehrlich. 3. *Vernonia*. 4. Camundongos. I. Souza, Ivone Antônia de (Orientador). II. Título.

616.994 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2019-180)

TACIANA MICHELE DE LIRA MOURA

**BIOENSAIO DE VERNONIA CONDENSATA BAKER (ASTERACEAE) EM
MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em: 31/ 08 /2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^o Dr. Gustavo Pina Godoy (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria da Conceição Cavalcanti de Lira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuc

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao nosso Deus, pai todo poderoso que está comigo em todos os momentos e me pega no colo naqueles dias mais difíceis, por me conceder a graça de finalizar este trabalho e ultrapassar todos os obstáculos ao longo desses dois anos e meio. Aos meus pais, Rosa (*in memoriam*) e Ednaldo (*in memoriam*), por sempre acreditarem em mim quando podia abraçá-los e por me guiar, hoje, onde quer que estejam. Obrigada por tudo e por todo amor que ainda hoje sinto! Ao meu irmão, Ítalo, por cuidar de mim, me dar forças quando elas pareciam ir embora e por acreditar e me mostrar que eu seria capaz. Te amo.

A minha tia Cida e minha vovó Da paz, por sempre me tratarem como uma princesa, me darem aquele colo que apenas ele consola em todos os momentos de aflição. Obrigada, meus amores. Ao amor da minha vida, Gyuliano, que sempre me deu forças, acreditou e me encorajou em todos os meus sonhos... agora estamos formando uma família e esperando nossa maior prova de amor e razão de viver. Te amo demais! Agradeço, também, a minha amiga-irmã, Ana Clarissa, por todo apoio desde o início de minha vida acadêmica. Obrigada por acreditar em mim, me dar forças, me abraçar e puxar minhas orelhas quando necessário.

Agradeço à minha orientadora Profa. Ivone Antônia de Souza por toda paciência, carinho, compreensão, amizade. Obrigada, também, por todos os ensinamentos. Minha imensurável gratidão por sua orientação. Sem sua ajuda não chegaria até aqui.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Patologia e a todos que o compõem: Professora Manuela, Margarete (obrigada pela paciência e toda ajuda!), Sylvania por toda ajuda com a confecção das lâminas e a todos os professores e colegas de turma. Professora Tássia que, pacientemente, me ajudou com as análises estatísticas e orientações e sugestões em todo meu trabalho. Gratidão!

Todos os amigos do Laboratório de Cancerologia Experimental, em especial, Raíra, por tanta dedicação e empenho em me ajudar e contribuir para meu trabalho. Gratidão! A toda equipe do LEAF (UFPE), em especial, ao professor Fernando, por tanta dedicação e prazer em nos ensinar em pouco do tanto que sabe. Obrigada!

Ao professor Mario Ribeiro por se dispor em ajudar, com toda paciência e educação me orientou e auxiliou na leitura das minhas análises histológicas. Muito Obrigada!

Obrigada a todos meus familiares e amigos que sempre estiveram comigo nessa jornada. Vocês são muito importantes para mim

RESUMO

Os produtos naturais têm recebido destaque nos últimos anos, devido ao enorme potencial terapêutico e preventivo que diversas plantas têm demonstrado. O câncer tem origem multifatorial e, atualmente, as modalidades de tratamento dessa doença provocam efeitos secundários significativos. A *Vernonia condensata* Baker, planta medicinal abordada no presente estudo, já é claramente aplicada em disfunções gastrointestinais e apresentam propriedades antioxidantes. O estudo em questão visa contribuir para a compreensão da atividade antitumoral de *Vernonia condensata* Baker e verificar os efeitos tóxicos agudos da utilização da planta. Realizou-se o estudo fitoquímico da planta para detecção de compostos bioativos. A toxicidade foi avaliada por meio do ensaio *in vitro* com *Artemia salina* Leach, utilizado para determinação da CL50; a análise *in vivo* utilizou o protocolo da OECD 423 para estabelecer a DL50. Avaliação da Atividade antitumoral foi realizada utilizando-se camundongos albinos Swiss fêmeas divididas em 4 grupos com 5 animais (Controle negativo, padrão, e tratamentos 100 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente), os quais foram inoculadas células tumorais do Carcinoma de Ehrlich. Diversos metabolitos secundários foram encontrados no estudo fitoquímico da planta, corroborando com informações já descritas na literatura; o ensaio da toxicidade não demonstrou efeitos secundários tóxicos com CL50 > 1000µg e DL50 ≥ 2000 mg/kg. A análise histológica, também, confirmou a ausência de danos aos órgãos pulmão, rins, baço no grupo controle e pequenas alterações hepáticas (congestão de vasos, hepatócitos binucleados e proliferação de células de Kupffer no grupo tratado com 2000 mg/Kg. Na avaliação antitumoral, pode-se perceber a diminuição da invasividade tumoral á medida em que se analisava o grupo controle com os grupos tratados (100 e 200 mg/kg), bem como, ao comparar os grupos tratados entre si (100 mg/kg com 200 mg/kg) demonstrando, então, presença de inibição tumoral, menor invasividade e menos quantidade de necrose tecidual à medida que se aumentava a dose do extrato de *Vernonia condensata* Baker. O extrato bruto hidroetanólico de *Vernonia condensata* Baker demonstrou ausência de toxicidade sendo assim, viável para estudos experimentais *in vivo* (animais). Bem como, demonstrou eficácia na inibição tumor com menor invasividade das células neoplásicas e redução da quantidade de necrose tecidual. A realização de novos estudos se faz importante, na busca de

identificar outras linhagens celulares sobre as quais o extrato seja efetivo. Possivelmente, estudos in vitro com linhagens de células tumorais humanas.

Palavras-chave: Câncer. Carcinoma de Ehrlich. Vernonia. Camundongos.

ABSTRACT

Natural products have received prominence in the last years, due to the enormous therapeutic and preventive potential that several plants have demonstrated. Cancer has a multifactorial origin and, currently, the treatment modalities of this disease cause significant side effects. *Vernonia condensata* Baker, a medicinal plant addressed in the present study, is already clearly applied in gastrointestinal dysfunctions and has antioxidant properties. The present study aims to contribute to the understanding of the antitumor activity of *Vernonia condensata* Baker and to verify the acute toxic effects of the use of the plant. The phytochemical study of the plant was carried out to detect bioactive compounds. Toxicity was assessed by the *in vitro* assay with *Artemia salina* Leach, used for determination of LC50; the *in vivo* analysis used the OECD 423 protocol to establish the LD50. Antitumor activity was performed using female Swiss albino mice divided into 4 groups with 5 animals (Negative control, standard, and treatments 100 mg / kg and 200 mg / kg, respectively), which were inoculated with Carcinoma tumor cells from Ehrlich. Several secondary metabolites were found in the phytochemical study of the plant, corroborating with information already described in the literature; the toxicity test showed no toxic side effects with LC50 > 1000µg and LD50 > 2000 mg / kg. Histological analysis also confirmed the absence of damage to the lungs, kidneys, spleen in the control group, and small liver changes (vessel congestion, binucleated hepatocytes and proliferation of Kupffer cells in the 2000 mg/kg group.) In the antitumor evaluation (100 and 200 mg / kg), as well as the groups treated with each other (100 mg / kg and 200 mg / kg) / kg), thus demonstrating the presence of tumor inhibition, less invasiveness and less tissue necrosis as the dose of *Vernonia condensata* Baker extract increased. The crude hydroethanolic extract of *Vernonia condensata* Baker showed no toxicity, which is feasible for experimental studies *in vivo* (animals), as well as demonstrated efficacy in tumor inhibition with less invasiveness of neoplastic cells and reduction of q The realization of new studies is important in the search to identify other cell lines on which the extract is effective. Possibly, *in vitro* studies with human tumor cell lines.

Keywords: Cancer. Carcinoma of Ehrlich. *Vernonia*. Mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Foto da <i>Vernonia condensata</i> Baker.....	21
Figura 2- Folha de <i>Vernonia condensata</i> baker	22
Figura 3 – Excicata da <i>Vernonia condensata</i> coletada na UFPE	28
Figura 4 – Fluxograma do protocolo da toxicidade aguda de acordo com o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001).....	31
Figura 5 – Corte histológico dos órgãos dos animais do grupo controle (soro fisiológico).....	46
Figura 6 – Corte histológico - fígado dos animais do grupo tratado com EBHVC 2000 mg/Kg.....	47
Figura 7 - Imagens da análise histológica do corte do fígado dos animais do grupo SF.....	51
Figura 8 - Imagens da análise histológica do corte de pulmão e rins dos animais do grupo SF.....	52
Figura 9 – Corte histológico do rim de animal tratado com padrão Cisplatina.....	53
Figura 10– Imagens das análises histológicas dos cortes dos tumores do grupo SF.....	54
Figura 11– Corte histológico do tumor no grupo SF e CIS.....	54
Figura 12- Corte histológico dos tumores dos grupos tratados com EBHVC.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Metabólitos identificados no extrato hidroetanólico de <i>V. condensata</i> Baker.....	36
Tabela 2 - Número de <i>Artemia salina</i> vivas e mortas no teste da CL ₅₀ utilizando o extrato hidroetanólico bruto de <i>V. condensata</i> em cada grupo analisado.....	38
Tabela 3- Sinais clínicos observados em camundongos após administração do extrato de <i>Vernonia condensata</i> Baker por via oral.....	40
Tabela 4- Média e desvio padrão do consumo de água e ração e peso dos animais e órgãos avaliados dos grupos controle e tratado no teste de toxicidade oral.....	44
Tabela 5- Média ± desvio padrão das massas dos órgãos avaliados e do tumor segundo os grupos de estudo da atividade antitumoral.....	48
Tabela 6- Valores do IT% para o grupos controle tratamentos avaliados.....	50
Gráfico 1- Mortalidade do microcrustáceo <i>A. salina</i> frente ao EBHVC.....	39
Gráfico 2- Médias da massa corporal dos grupos utilizados no teste da atividade antitumoral.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VCB	<i>Vernonia condensata</i> Baker
EBHVC	Extrato bruto hidroetanólico de <i>Vernonia condensata</i> Bake
ETOH 70%	Álcool 70%
CB	Centro de biociências
CHCl ₃	Clorofórmio
COBEA	Colégio Brasileiro para Experimentação animal
CEUA	Comitê de Ética no uso de animais
CL ₅₀	Concentração letal 50
CONSEA	Conselho Nacional de Experimentação animal
DL ₅₀	Dose letal 50
Kg	Kilograma
mg	miligramas
mL	Mililitros
OMS	Organização Mundial de Saúde
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
TWI	Porcentagem de inibição tumoral
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals
SINTOX	Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
CB	Centro de Biociências

SNC	Sistema Nervoso Central
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Caracterização do problema	14
1.2	Justificativa	16
1.3	Hipóteses	16
1.4	Objetivos	16
1.4.1	Objetivo Geral	16
1.4.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Neoplasia e câncer	18
2.2	Tumor de Ehrlich	19
2.3	<i>Vernonia condensata</i> Baker	21
2.4	Toxicidade	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Material vegetal e preparação do extrato	27
3.2	Análise fitoquímica	28
3.3	Avaliação da toxicidade por <i>artemia salina</i> leach	29
3.4	Avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL ₅₀	30
3.5	Animais	30
3.6	Protocolo experimental	30
3.7	Acompanhamento e análise histopatológica	32
3.8	Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	32
3.8.1	Animais	32
3.8.2	Protocolo experimental do estudo antitumoral <i>in vivo</i>	33
3.9	Tratamento	33
3.10	Análise histopatológica	34
3.11	Análise estatística	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Análise fitoquímica de <i>vernonia condensata</i> Baker	36
4.2	Toxicidade de <i>vernonia condensata</i> baker em <i>artemia salina</i> leach	37
4.3	Toxicidade aguda	40
4.4	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	48
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

O uso de plantas medicinais para a cura de doenças tem registro desde as primeiras civilizações. Nos primórdios, a utilização de plantas medicinais ocorria de maneira instintiva, pois não havia conhecimento sobre as razões das doenças, tampouco dos benefícios das plantas para determinada enfermidade, tudo se baseava em experiências. Com o passar do tempo começou-se a descobrir o uso de determinadas plantas para o tratamento de doenças específicas, dessa maneira, o tratamento medicinal com o uso de plantas passou de algo puramente empírico para uma prática fundamentada em fatos (PETROVSKA, 2012).

Os produtos naturais tem recebido destaque nos últimos anos, devido ao enorme potencial terapêutico e preventivo que diversas plantas têm demonstrado. Dentre as mais diversas enfermidades que têm sido alvo para a aplicação da terapia natural, o câncer vem tomando notoriedade, provavelmente, por se tratar de uma doença de elevada incidência e mortalidade em todo mundo (SOLOWEY et al., 2014).

Estudos pré-clínicos vêm demonstrando que o câncer tem origem multifatorial e seu processo de desenvolvimento ocorre em fases distintas. Atualmente as modalidades utilizadas no tratamento dessa doença consistem em quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e cirurgia, porém, a maioria dos quimioterápicos provocam efeitos adversos significativos (THOMAS, 2016).

O valor medicinal das plantas está nas substâncias químicas ativas que nelas se encontram. Essas substâncias possuem o poder de produzir efeitos importantes no corpo humano (HASSAN et al., 2013). Os constituintes químicos ativos mais importantes das plantas são: alcaloides, flavonoides, e compostos fenólicos (HASSAN et al., 2013; SILVA, et al., 2013; SOLOWEY et al., 2014). Diante da enorme variedade de plantas medicinais existente em todo mundo, destaca-se as espécies *Vernonia condensata* Baker.

Vernonia é o maior gênero de plantas florescentes na família das *Astereceae*, que inclui mais de 1500 espécies que estão amplamente distribuídas na região tropical e subtropical da África, Ásia e América (KIPLIMO, 2016; VICENTE, 2009). Esse grupo

de plantas já vem sendo investigado dentro da etnofarmacologia, por seu enorme potencial anti-inflamatório, analgésico, antioxidante e hepatoprotetor, destacando-se pelo seu efeito contra alterações do aparelho gastrointestinal, dentre outros. (VICENTE, 2009; SILVA, et al., 2013; KIPLIMO, 2016).

A *Vernonia Condensata* Baker, planta medicinal abordada no presente estudo, já é claramente aplicada em disfunções gastrointestinais, doenças inflamatórias, além de apresentar propriedades analgésicas e antioxidantes. Porém, apesar de suas ações etnofarmacológicas já relatadas na literatura, pouco se pesquisou acerca de sua eficácia anti-câncer, tanto desta espécie como dos compostos isolados a partir dela, em tumor presente em modelo animal (SILVA, et al., 2013; HASSAN et al., 2013; AFONSO et al., 2015).

Apesar de todos os esforços na busca da cura, o câncer continua em evidência entre enfermidades que mais acometem e matam a população. Além disso, os novos agentes quimioterápicos sintéticos, resultantes de estudos desempenhados nas últimas décadas, ainda não conseguiram suprir as expectativas, com relação à redução dos efeitos adversos indesejados, mesmo diante de elevados custos para seu desenvolvimento.

Estudos experimentais têm demonstrado a vantagem do uso das neoplasias transplantáveis, em comparação as demais, devido às características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia em estudo (PALERMO et al., 2003; VALADARES e QUEIROZ, 2002). Dentro dessa perspectiva, destaca-se o Tumor de Ehrlich como uma neoplasia transplantável amplamente utilizada em pesquisas experimentais por se tratar de um tumor de fácil manuseio, que pode ser inoculado por via subcutânea ou intramuscular para que sejam desenvolvidos tumores na forma e sólida, respectivamente (RIBEIRO, 2012).

As plantas medicinais apresentam-se como uma alternativa para a terapia anticâncer, devido ao seu conteúdo bioativo apresentar baixa toxicidade. Para isso, a *Vernonia condensata* Baker, com seu potencial terapêutico antiinflamatório e antioxidante, sem efeitos tóxicos significativos, desperta enorme interesse para terapias de inibição tumoral, podendo ser uma possibilidade eficaz e promissora para o tratamento do câncer.

1.1 Justificativa

O câncer, por se tratar de um problema de saúde que acomete homens e mulheres de diversas faixas etárias, etnias e classes sociais, torna-se uma epidemia com elevadas taxas de mortalidade, fato que o torna alvo na busca de terapias alternativas que sejam eficazes na inibição do crescimento tumoral e com efeitos secundários mínimos. A *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) já tem demonstrado ausências de efeitos tóxicos mínimos e potencial efeito inibitório frente à alguns tumores experimentais. por meio da descoberta de novos fitoterápicos. Assim, o estudo em questão visa contribuir demonstrando os efeitos agudos tóxicos, *in vivo*, de *Vernonia condensata* Baker, bem como, sua ação antitumoral por meio da análise histopatológica do carcinoma de Ehrlich.

1.3 Hipóteses

Hipótese 1- O uso do extrato hidroetanólico bruto de *Vernonia Condensata Baker* não causa efeitos tóxicos significativos.

Hipótese 2- O uso do extrato hidroetanólico bruto de *Vernonia Condensata Baker* apresenta atividade inibitória para o Carcinoma de Ehrlich.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Realizar a avaliação dos efeitos tóxicos agudos e análise histopatológica dos órgãos e tumores, em modelo animal, após tratamento com *Vernonia condensata* Baker.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Identificar o perfil fitoquímico do extrato hidroetanólico da espécie *Vernonia Condensata Baker*;

- Verificar a toxicidade *in vitro* do extrato frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach;

- Determinar a toxicidade aguda *in vivo* do extrato bruto seco hidroetanólico de *Vernonia Condensata Baker* segundo o método OECD;

- Analisar histopatologicamente a atividade inibitória (antineoplásica) do extrato de *Vernonia Condensata Baker* frente ao Carcinoma de Ehrlich

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasia e câncer

O termo neoplasia se define por “novo crescimento”, a definição mais aceita e próxima do termo foi feita por Rupert Willis, no qual descreve neoplasia como: massa anormal de tecido, cujo crescimento excessivo está descoordenado com o crescimento dos tecidos normais, persistindo mesmo quando interrompida a causa que o provocou (ROBBINS & COTRAN, 2013; MUNHOZ et al., 2016). A persistência do tumor, mesmo após a interrupção do fator iniciador, ocorre por alterações genéticas que são perpetuadas para as linhagens de células tumorais seguintes; essas alterações permitem que as células proliferem de forma excessiva, desregulada e autônoma, não mais obedecendo a estímulos fisiológicos de crescimento celular (ROBBINS & COTRAN, 2013).

A denominação “tumor benigno” refere-se a tumores cujas características macro e microscópicas são relativamente inofensivas, apresentam limites determinados de sua localização, incapacidade de disseminação para outras partes do corpo, comumente retirado cirurgicamente e relaciona-se com maiores taxas de sobrevivência. Ao tratar da denominação “tumor maligno” está relacionado com o termo “câncer”, devido a sua capacidade de aderir a qualquer região que se instalam. Esses tumores possuem elevado grau de invasão, destruição de estruturas adjacentes e disseminação para sítios distantes (metastizar) e, portanto, está relacionado com maiores taxas de mortalidade (ROBBINS & COTRAN, 2013; DO PRADO, 2014).

Câncer é a denominação de um conjunto de mais de cem doenças, o qual é definido como enfermidade multifatorial crônica caracterizada pelo crescimento descoordenado das células, devido a vários estímulos externos em indivíduos geneticamente susceptíveis (ROBBINS & COTRAN, 2010; MUNHOZ, 2016). Também considerado um problema de saúde pública em todo o mundo, o câncer, está entre as principais Doenças e Agravos Não Transmissíveis (DANT), sendo responsável por altos índices de adoecimento e óbito da população mundial (MUNHOZ, 2016; INCA, 2017). As transições demográficas e epidemiológicas apontam para um aumento cada vez mais significativo para a carga de câncer nas próximas décadas (FERLAY, et al., 2013).

O número de novos casos de câncer aumentou de maneira geral, em todo mundo, porém, ainda existem diferenças entre países e os tipos de câncer. Em países de baixa/média renda, o crescimento dos agravos não transmissíveis, destaque para o câncer, estão ultrapassando as doenças infecciosas no que diz respeito à demanda de serviços de saúde (GUERRA, et al.,2017; INCA, 2017).

Com incidência ainda mais elevada em países desenvolvidos, a mortalidade por câncer ainda tem se destacado com números mais elevados em países em desenvolvimento, fator possivelmente relacionado com diferenças nos perfis da doença, bem como, o acesso a diagnósticos do câncer em fase inicial, refletindo no tratamento, sobrevida e óbito após diagnóstico (RIBEIRO & NARDOCCI, 2013; INCA, 2017).

No Brasil, estima-se para 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. Essa estimativa reflete o perfil de um país que apresenta os cânceres de próstata, mama, reto, colón e pulmão, como os mais incidentes, porém, apresentando, também, elevadas taxas dos cânceres de colo uterino, esôfago e estômago; destaque para câncer de próstata nos homens (68 mil) e mama em mulheres (60 mil), como os mais frequentes (INCA, 2017).

Atualmente, para tratamento do câncer, a medicina dispõe da hormonioterapia, radioterapia, quimioterapia e a retirada cirúrgica do tumor. A escolha do tratamento depende do estadiamento da doença, podendo ser necessária a combinação de um ou mais métodos terapêuticos (ROSAS et al., 2013).

Por se tratar de uma terapêutica sistêmica, a quimioterapia apresenta eficácia na cura de diversos tumores, bem como no tratamento de metástases ainda em fase inicial. Entre os demais métodos terapêuticos, a mesma ainda é “temida”, devido aos inúmeros efeitos colaterais que, muitas vezes, vem associado ao desequilíbrio psicológico vivenciado pelo paciente durante a fase de tratamento (ROSAS et al., 2013; BONASSA, 2005).

2.2 Tumor de Ehrlich

A oncologia experimental tem fornecido diversos avanços nos estudos do câncer, bem como a compreensão de diversos mecanismos da doença, permitindo descobertas acerca da etiologia, progressão, diagnóstico e tratamento. Esse ramo da oncologia teve surgimento a partir dos chamados tumores transplantáveis e

transmissíveis. Esses tumores são mantidos em condições laboratoriais por meio da inoculação seriada em animais ou mantidos por meio de cultura de células (GUERRA, 2002).

O tumor de Ehrlich se trata de um adenocarcinoma espontâneo, mamário, originário de camundongos fêmeas, desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896. O tumor pode se desenvolver na forma sólida, quando inoculado por via subcutânea, ou na forma ascítica, quando inoculado por via intraperitoneal (DAGLI et al., 1992; MATSUZAKI, 2004; NOGUEIRA, 2008; RIBEIRO, 2012). Por essa razão é que se justifica a denominação, habitualmente usada, de forma sólida ou ascítica do tumor (GUERRA, 1983).

Esse tumor é uma neoplasia experimental transplantável que tem origem epitelial maligna, espécie-específica (EHRlich, 1906). Tem sido utilizada no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SEGURA et al., 2000; MADY, 2002; PALERMO-NETO et al., 2003; SILVA, 2003). Segundo DAGLI et al. (1989) e NERY (2004), o tumor de Ehrlich possui crescimento acelerado e agressivo, bem como elevada capacidade imunogênica, fatores que promovem uma rápida invasão dos demais tecidos.

Histologicamente, o tumor se caracteriza por apresentar extensas áreas de necrose. Estas decorrem de células neoplásicas mortas, característica bastante evidente já na primeira semana após a inoculação. Esse tumor possui poucas células inflamatórias, e estroma escasso, possui elevado índice mitótico e de invasividade, constituindo um ótimo instrumento didático para estudo e compreensão do comportamento dos tumores malignos (GUERRA, 1983).

Devido a suas características didáticas e de facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado para a chamada Oncologia Experimental, um ramo da Oncologia Comparada dedicada ao desenvolvimento dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis (DAWE, 1982). A vantagem da utilização de tumores transplantáveis, em relação aos demais, está no conhecimento prévio da quantidade e características iniciais das células utilizadas, bem como no desenvolvimento rápido da neoplasia, o que facilita e reduz o tempo do estudo (DAWE, 1982).

2.3 Vernonia condensata Baker

A espécie *Vernonia condensata* Baker (VCB) originária possivelmente da África tropical, chegou ao Brasil na era colonial, trazida por escravos, que exploravam seus efeitos analgésicos e gastroprotetor. Amplamente distribuída, predominando em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, é considerada a maior família de dicotiledoneas, relevante por suas propriedades cosméticas, aromáticas e terapêuticas. A espécie está amplamente distribuída no Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do Brasil (KIPLIMO, 2016; VICENTE et al., 2000).

Vernonia é o maior gênero de plantas florescentes na família das *Astereceae*, que estão amplamente distribuídas na região tropical e subtropical da África, Ásia e América (KIPLIMO, 2016; VICENTE et al., 2000). A família *Asteraceae* (*Compositae*) reúne cerca de 24 mil espécies atualmente descritas, tais espécies estão inseridas entre 1.600 a 1.700 gêneros (KIPLIMO, 2016). A *Vernonia condensata* Baker é um arbusto alto, muito ramificado, atingindo até 5 m de altura, apresenta folhas alternas, alongadas ou lanceoladas. Possui flores esbranquiçadas, reunidas em capítulos terminais, apresentando crescimento rápido (VICENTE, 2000).

Figura 1- Foto da *Vernonia condensata* Baker

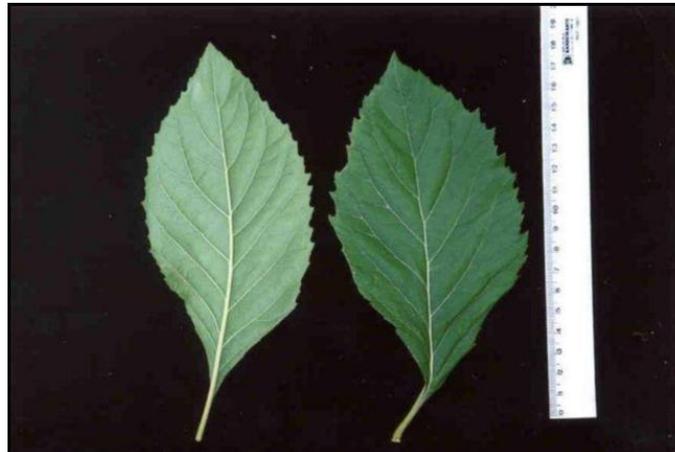


Fonte: <http://horta-medicinal.blogspot.com/2009/03/fotos-vernonia-condensata-baker-boldo.html>

As folhas de *Vernonia condensata* Baker, parte mais utilizada da planta, possuem uma forma elíptica, um ápice acuminado, com uma base cuneada, e margem dentada; tem consistência membranácea e superfície “peluda”. Outra característica das folhas e galhos, é o gosto amargo quando mastigados, o que é uma característica

importante da planta e responsável pelo principal nome popular da espécie (em inglês): “bitter leaf” (tradução: “folha amarga”) (ARENE, 1972).

Figura 2- Folha de *Vernonia condensata* Baker



Fonte: <https://plantasefrutas.com.br/boldo-seus-tipos-e-suas-utilidades/>

Segundo Cronquist (1988) a classificação da *Vernonia condensata* Baker é a seguinte: filo: Plantea, subfilo: Magnoliophyta, classe: Magnoliopsida, subclasse: Asterideae, ordem: Asterales, família: Asteraceae, gênero: Vernonia e espécie: *Vernonia condensata* Baker (Cronquist, 1988). Algumas destas espécies são utilizadas como alimento ou medicamento, por exemplo, alface (*Lactuca sativa*), chicória (*Chicorium intybus*), carqueja (*Baccharis trimera*), guaco (*Mikania glomerata*), camomila (*Matricaria chamomila*), entre outras (MARBRY, 1977).

O gênero *Vernonia* produz diferentes compostos, tais como lactonas sesquiterpênicas, que possuem várias atividades biológicas relacionadas, como atividade fungistática (KRISHNA et al., 2003) e citotóxica (KUO et al., 2003) e também atua como relaxante muscular liso (CAMPOS et al., 2003). Alguns outros compostos foram isolados de *Vernonia*, como flavonoides (HUANG et al., 2003), esteroides (TCHINDA et al., 2003) e polissacarídeos (NEGARD, et al., 2004). Os principais compostos identificados e isolados nas folhas da espécie são: lactonas sesquiterpênicas, saponinas esteroidais, flavonoides e ácidos graxos (ERASTO et al., 2006).

Vernonia condensata Baker está listada na RENISUS (Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema de Saúde fornecido pelo Ministério da Saúde), um documento que contém 71 espécies de plantas e / ou gênero tradicionalmente utilizados em medicina popular no Brasil. O Ministério da Saúde considera esta planta com uma possível aplicação farmacológica, mas ainda falta o suporte científico necessário para ser prescrito e regulamentado pelo programa de saúde governamental (RENISUS, 2010).

Diversas sinônimas populares são utilizadas, para se referir a *Vernonia condensata* Baker. No Acre, a espécie é conhecida por “boldo”. Outros nomes populares comuns são “boldobaiano”, “boldo-grande”, “boldo-da-Bahia”, “assa-peixe”, “figatil”, “macelão” e “alumã” (VICENTE et al., 2008; RIVERA, 2006; RISSO, 2008).

A família Asteraceae é de grande importância nos campos da nutrição, cosméticos e farmácia, principalmente pela produção de óleos essenciais a partir dela. No Brasil, estima-se que existam 200 espécies de *Vernonia*, algumas são tradicionalmente utilizadas para tratar distúrbios gastrointestinais (MONTEIRO et al., 2001), como as folhas frescas de *Vernonia condensata* Baker conhecida como amargura indiana (fel-de-bugre, fel-de-índio ou alumã em português). Estudos com foco nas propriedades antiinflamatória (IWALEWA et al., 2003), antipirética (GRUPTA et al., 2003), anticâncer (IZEVIGIE, 2003) e antimalárica (ABOSI, 2003) de várias espécies de *Vernonia* têm sido publicados.

2.4 Toxicidade

Toxicidade trata-se de uma propriedade relativa à substância química que se refere ao seu potencial de causar danos aos organismos vivos e se trata de uma função que envolve a concentração da substância química e duração da exposição (RAND & PETROCELLI, 1985). Ao se falar de toxicologia, algumas definições são consideradas, como por exemplo, toxicidade aguda e crônica. A toxicidade aguda refere-se à exposição ao agente toxicante, em um curto espaço de tempo, capaz de promover os efeitos indesejáveis, desde simples tontura até mesmo à morte. A toxicidade crônica está correlacionada a exposições repetidas, de longa duração e doses frequentemente insuficientes para provocar uma intoxicação aguda, na qual o ser humano apresentará sintomas após meses ou anos de contato com o agente

toxicante. Vale ressaltar que uma mesma substância pode provocar intoxicação aguda e, após certo tempo, desencadear uma intoxicação crônica (OGA, 2014).

O uso popular de plantas medicinais é uma prática comum em muitas comunidades e, geralmente, apresenta-se como a única alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde (AMOROZO, 2012). Devido a isto os estudos toxicológicos têm a importância de demonstrar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos (LAPA et al, 1999; CRAVEIRO et al, 2008; SILVEIRA et al., 2008).

De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), no ano de 2016, no Brasil foram registrados 363 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 41 foram na região Nordeste, não apresentando nenhum caso de óbito (SINITOX, 2016).

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos e a relação dose-resposta da substância (LUNA et al., 2005).

Dentre os ensaios de toxicidade, encontra-se o ensaio de letalidade “*in vitro*” frente à *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo de água salgada comumente utilizado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO, 2008). Os ensaios de letalidade são largamente empregados em testes toxicológicos podendo-se obter a concentração letal média (CL₅₀), ou seja, dose necessária para causar a morte de 50% de uma amostra em estudo (BEDNARCZUK et al., 2010).

De acordo com MEYER *et al.*, (1982), existe uma relação entre a toxicidade e a concentração letal média (CL₅₀) de extratos vegetais sobre a *A. salina*, sendo que, quando são encontrados valores de CL₅₀ maiores que 1000 µg/mL e não é observada a morte de mais de 50% de uma população, estes extratos não são considerados tóxicos.

Este bioensaio além de determinar a toxicidade geral, apresenta uma boa correlação com atividade citotóxica em alguns tipos de tumores sólidos. Dessa forma, este teste pode servir como indicador de compostos bioativos para atividades antineoplásica (MACLAUGHLIN et al., 1993; PARRA et al., 2001).

Dentre os métodos ou testes empregados para avaliar efeitos toxicológicos *in vivo*, o teste de toxicidade aguda permite definir o grau de toxicidade intrínseca do composto, identificar acometimento em órgãos alvos e efeitos indesejados, contribuindo para selecionar doses para estudos de longa duração (ALMEIDA, 2011).

O método da OECD (Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento) é um procedimento de toxicidade aguda, gradual, que utiliza 3 animais do mesmo sexo por etapa. Composto, em média, por 2 ou 4 etapas, definidas pelo estado de morbidez ou mortalidade em cada uma, o método permite avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio; este procedimento é reprodutível e utiliza poucos animais. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco (OECD, 2011).

Três animais são usados para cada dose a ser testada. A dose inicial deve ser selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo aquela mais propensa a produzir mortalidade com base em relatos de dose com toxicidade evidente, quando possível, ou por meio de relatos evidenciados com base na estrutura química. Na ausência de ambas recomenda-se o uso inicial da dose de 300 mg/kg (OECD, 2001).

Quando informações analisadas sugerem que a mortalidade seja improvável com o nível de dose mais alto (2000 mg/kg de peso corpóreo), o teste para se conhecer o limite deve ser realizado. Excepcionalmente, e somente quando justificado por necessidades específicas, o uso de um valor de dose maior de 5000 mg/kg pode ser considerado. O intervalo de tempo entre o tratamento dos grupos é determinado pelo início, duração e gravidade dos sinais tóxicos. O tratamento de animais com a próxima dose deve ser esperado até que se confirme a sobrevivência de um animal previamente doseado (OECD, 2001).

Os animais são observados nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, hora, 4 hora e 8 hora após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e

desaparecem são importantes, principalmente se houver tendência para atrasos nos sinais tóxicos (OECD, 2011).

Todas as observações devem ser registradas, com registros individuais para cada animal. As observações devem incluir alterações na pele e nos pêlos, olhos e membranas mucosas, respiratórias, sistemas circulatório, autonômico, nervoso central, atividade somatomotora e padrão de comportamento. A atenção deve dirigir-se a observações de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma (OECD, 2011).

Dependendo da mortalidade ou do estado de morbidez dos animais outras doses são necessárias para que se admita um critério da toxicidade aguda da substância testada. A classificação da substância administrada é feita de acordo com o Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), estimando-se sua DL_{50} (dose letal em 50% dos animais) (OECD, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo em questão é de perfil experimental comparativo controlado. Estudo desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com a colaboração do laboratório de Histotecnologia e Microscopia do Programa de Pós-graduação em Patologia da UFPE, Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE e Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (LEAF) da UFPE.

A etapa experimental do estudo foi realizada no período de abril a julho de 2018 após da aprovação do protocolo experimental pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE, registrado com nº: 0036/2017 (Anexo 1). O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2011) com doses sequenciais, seguindo a proposta de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e Conselho Nacional de Experimentação animal (CONCEA).

Durante esse período foi realizada a indução do tumor em camundongos, uso das substâncias testes, processamento e análise das teciduais e ainda, análises estatísticas dos dados, interpretação dos resultados e redação dos manuscritos.

3.1 Material vegetal e preparação do extrato

Amostras de *Vernonia condensata Baker* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, próximo ao departamento de antibióticos, em ambiente com solo pouco úmido e sombreado. Posteriormente as amostras foram identificadas pela coordenadora do herbário, a bióloga Dr^a Marlene Barbosa. A excisada da planta já existia no herbário, localizado no departamento de Botânica – Geraldo Mariz do Centro de Biociências (CB) da UFPE, sob o registro: 04464.

Figura 3 – Exsicata de *Vernonia condensata* Baker



Fonte: Dados da pesquisa

Posteriormente, as folhas foram lavadas e o processo de secagem do vegetal ocorreu em temperatura ambiente (com média de 28 ° C) durante 30 dias e posteriormente foi triturado a pó em moinho de facas. Deste material foi utilizado 370 g para a extração com água e etanol na proporção de 1:1, obtendo-se 3000 ml, após as filtrações, para as etapas seguintes. A extração ocorreu por esgotamento. Em seguida, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo sob temperatura constante de 40°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto (WAGNER & BLADT, 1996).

3.2 Análise fitoquímica

A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia em camada delgada, com utilização de placas de gel de sílica 60 (Merk), nas quais foram aplicadas 15µL do extrato previamente preparado, selecionados os sistemas de desenvolvimento cujos reveladores foram de acordo com as moléculas pesquisadas (WAGNER & BLADT, 1996).

Para pesquisa de alcalóides, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff e utilizado escopolamina como substância padrão. Para flavonóides, uma

alíquota do extrato foi solubilizado em álcool 70% (ETOH 70%), adicionado Clorofórmio (CHCl₃) e agitado para obtenção de duas fases, clorofórmica e hidroalcoólica, empregou-se uma mistura de acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético glacial : água (100: 11: 11: 26 v/v) como fase móvel e foi revelada com o reagente de NEU, com observação em câmara de U.V. (365 nm), que utilizou como substância padrão a quercetina.

Na pesquisa para flavonóides, uma alíquota do extrato foi solubilizado em álcool 70% (ETOH 70%), adicionado Clorofórmio (CHCl₃) e agitado para obtenção de duas fases, clorofórmica e hidroalcoólica, empregou-se uma mistura de acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético glacial : água (100: 11: 11: 26 v/v) como fase móvel e foi revelada com o reagente de NEU, com observação em câmara de U.V. (365 nm), que utilizou como substância padrão a quercetina.

Em relação à pesquisa de fenilpropanóides também utilizou-se a criação de duas fases, clorofórmica e hidroalcoólica, empregou-se uma mistura de tolueno: éter (1: 1) como fase móvel, revelada com KOH a 10%, observada em câmara de U.V. (365 nm) e como substância padrão a cumarina.

Para a pesquisa de terpenos empregou-se como fase móvel uma mistura, tolueno: acetato de etila (93: 7 v/v), revelada com vanilina sulfúrica a 1%, seguida de aquecimento em estufa (100°C), o surgimento de manchas com coloração roxo/verde/azul foi usado como critério diagnóstico. Na pesquisa de triterpenos empregou-se uma mistura, tolueno: clorofórmio: etanol (40: 40: 10 v/v) como fase móvel, revelada com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento em estufa (100°C), a identificação de manchas com coloração levemente rósea e avermelhada foi usado como critério de evidência. Para as Cumarinas, a fase móvel utilizada foi éter (1:1) após secagem utilizou-se o revelador KOH/EtOH e colocou sob uma luz UV, e para identificação de saponinas, uma amostra do extrato foi colocada em um tubo de ensaio e avaliado o índice de espuma após agitação vigorosa por 15 segundos.

3.3 Avaliação da toxicidade por *artemia salina* leach

A metodologia foi realizada segundo Meyer et al. (1982), com cistos de *A. Salina que* foram postos para eclodir em água do mar em incubadora, na temperatura de 25°C, com iluminação artificial, aeração constante e coberto com papel alumínio por 48 horas.

Após a eclosão, as larvas foram dispostas em tubos de ensaio com 10 larvas de metanúplios, em sua fase náuplio, com auxílio de uma pipeta Pasteur e 9 mL de água do mar, onde o extrato hidroetanólico de *Vernonia condensata Baker* foi colocado nas diferentes concentrações: 50 mg/mL, 100 mg/mL, 500 mg/mL e 1000 mg/mL, realizado uma triplicata para cada concentração.

Utilizou-se como controle negativo água do mar e artemias. Após 24hs foi realizada a contagem das espécies vivas e mortas, considerando-se todos microcrustáceos imóveis durante a observação e após uma leve agitação do frasco.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico para determinar a concentração letal média (CL₅₀) do extrato estudado. A CL₅₀ é concentração letal média para que ocorra morte de 50% das larvas. Considera-se atóxica quando a CL₅₀ for maior do que 1000 µg/mL.

3.4 Avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL₅₀

A avaliação da toxicidade aguda in vivo foi realizada por via oral de acordo com a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), utilizou-se como base o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423, 2011) para identificar a dose letal média (DL₅₀).

3.5 Animais

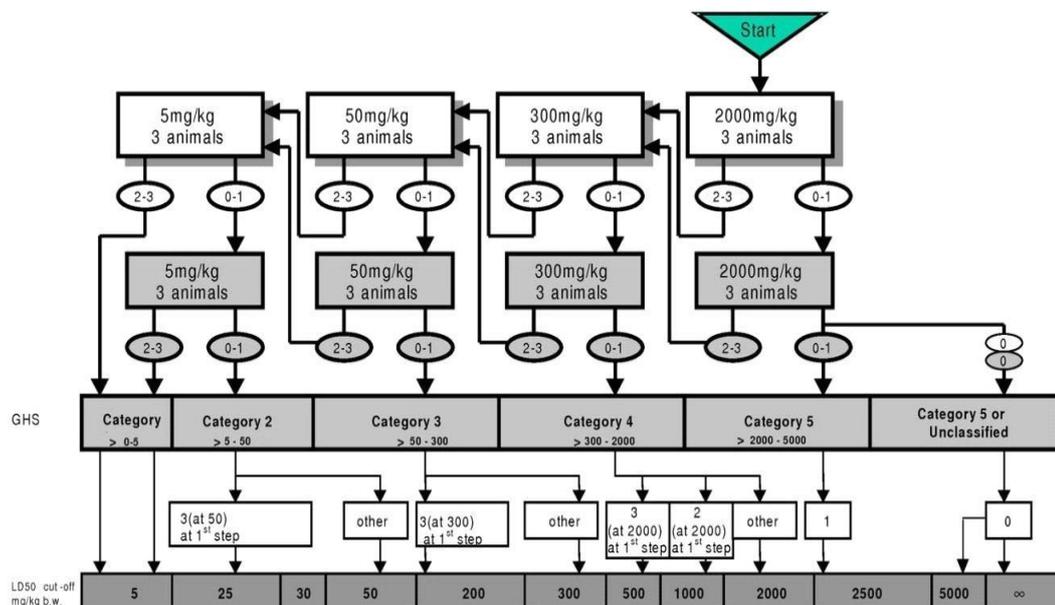
Foram utilizados camundongos adultos albinos *Swiss (Mus musculus)*, fêmeas (nulíparas e não grávidas), com aproximadamente 90 e 120 dias de idade e pesos entre 30 e 45g. Utilizou-se três animais por grupo, procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

3.6 Protocolo experimental

A avaliação da toxicidade aguda in vivo foi realizada por via oral de acordo com a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), utilizou-se como base o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423, 2011) para identificar a dose letal média (DL₅₀). A DL₅₀ é a dose letal média para 50% dos animais (morbidez e/ou mortalidade). Esse protocolo estabelece 4 níveis de dose (2000 mg/kg, 300 mg/kg, 50 mg/kg e 5 mg/kg) e é classificado segundo os critérios do Globally

Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) (figura 4). De acordo com a mortalidade e/ou estado de morbidez dos animais, em média, 2 ou 4 etapas podem ser necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Este procedimento é reproduzível e utiliza poucos animais. O método de classificação da toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco (OECD, 2001).

Figura 4 – Fluxograma do protocolo da toxicidade aguda de acordo com o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001).



São usados 3 animais do mesmo sexo (machos ou fêmeas) por etapa 0,1,2,3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa GHS: Sistema de Classificação Harmonizado (mg/kg p.c)
∞: Não classificado

Fonte: Guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001).

Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12h cada) e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, em gaiolas de polipropileno com dimensões de 20x30x12cm, forradas com maravalha. Os grupos experimentais de camundongos foram distribuídos com 3 animais por gaiolas. A alimentação foi suspensa por, no mínimo 4 horas, antes do experimento e a água liberada *ad libitum*, a alimentação foi reintegrada após 3 horas da administração.

Na primeira etapa, utilizou-se um grupo tratado com EBHVC 2000 mg/kg e um controle que receberam apenas soro fisiológico 0,9%. O EBHVC foi solubilizado em

água destilada e, aos grupos testes, foi introduzido no trato digestório dos animais, através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem). O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo CEUA. Para melhor identificação dos animais todos foram marcados para que fossem distinguidos individualmente dentro de cada grupo, bem como, cada gaiola foi identificada para a distinção entre os grupos (tratado e controle).

3.7 Acompanhamento e análise histopatológica

As alterações comportamentais dos animais foram avaliadas separadamente após a administração do extrato durante 60 minutos, periodicamente nas primeiras 24 horas e, em seguida, diariamente por um período de 14 dias, com pesagens diárias, consumo de alimento e água. As alterações comportamentais (efeitos estimulantes e depressores do sistema nervoso central e autônomo) foram registradas em protocolo específico de acordo com MALONE, 1983. Os animais foram observados quanto às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

Ao final do período de observação, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados. Foram retirados os órgãos (fígado, baço, rins e pulmão), lavados e fixados em formaldeído a 10% durante 24 horas, e posteriormente lavados com água destilada e processados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100 %), embebidos em parafina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), subsequentemente foram analisados em microscopia ótica.

3.8 Atividade antitumoral in vivo

3.8.1 Animais

Os animais utilizados foram camundongos albinos Swiss, (*Mus musculus*), fêmeas com idade de 35 a 60 dias e massa médio de 45,0 g, provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos- UFPE. Foram mantidos no biotério à temperatura de 25 °C ± 2 °C, sob ciclo dia/noite (12 h claro e 12 h escuro), com livre consumo de água e alimento

durante o experimento e distribuídos em grupos de acordo com delineamento experimental.

3.8.2 Protocolo experimental do estudo antitumoral in vivo

As células do tumor experimental, carcinoma de Ehrlich, foram obtidas do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos - UFPE. As células tumorais foram mantidas em camundongos albinos Swiss fêmeas, em sua forma ascítica, com frequência de manutenção a cada 7 dias. Os animais utilizados para os testes foram divididos em 4 grupos com 5 animais em cada grupo: G1: Grupo controle negativo (solução salina); G2: Grupo Controle positivo (Cisplatina); G3: Grupo tratamento EBHVC (200 mg/kg); e G4: Grupo tratamento EBHVC (100 mg/kg). Para o transplante do tumor, as células foram retiradas de animal doador ($5,0 \times 10^6$ cél. ml⁻¹) com oito dias de implantação, através da aspiração da forma ascítica e foram introduzidas nos animais receptores, por via subcutânea na região subaxilar direita para desenvolvimento da forma sólida.

3.9 Tratamento

O tratamento foi iniciado 48 horas após o implante e durante 7 dias consecutivos. Cada grupo foi tratado com soluções administradas uma vez ao dia, por via oral, através de sonda intragástrica (gavagem), com exceção do grupo controle positivo que recebeu a solução por via intraperitoneal. O grupo controle negativo recebeu tratamento com solução salina a 0,9 % estéril; os animais do grupo controle positivo foram tratados com cisplatina (0,5 mg/kg), os animais do grupo EBHVC 200 mg/kg e 100 mg/kg, receberam solução contendo solução salina 0,9% estéril e as doses respectivas do extrato, os quais receberam, respectivamente, 10% e 5% da dose letal mediana (DL₅₀) encontrada no teste de toxicidade aguda por via oral (v.o).

No oitavo dia os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical, logo após, os tumores e órgãos foram retirados, lavados e pesados para cálculo da taxa de inibição tumoral e análise da diferença entre os grupos tratados e controle, posteriormente os órgãos foram fixados em formaldeído a 10% durante 24 horas, lavados com água destilada e processados em concentrações crescentes de

álcool (70%, 80%, 90% e 100%), embebidos em parafina e corados pela técnica Hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica subsequente.

Análises microscópicas foram realizadas em microscópio binocular modelo Kinon® L1000b-AC, e fotografias de cortes histológicos realizadas com câmera digital no modelo Samsung® marca PL 120 14.2MP com Zoom óptico de 10x e Software Motic Images Plus 2.0 para captura.

A taxa de inibição tumoral (IT%) foi calculada em comparação ao grupo controle após pesagem dos tumores, segundo a fórmula de NACHON et al., 1981:

$$TWI (\%) = C - T / C \times 100\%$$

Onde: TWI = Percentual de inibição tumoral.

C = Média dos pesos dos tumores do grupo controle.

T = Média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

3.10 Análise histopatológica

Após a eutanásia, realizou-se a incisão cirúrgica nos animais. A mesma teve proporção que se estendia do tórax até o abdômen, para a retirada do baço, rim, fígado e pulmão. Os órgãos foram lavados com água destilada e fixados em formaldeído a 10% durante 24 horas, posteriormente lavados com água destilada e processados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), embebidas em parafina e coradas pela técnica Hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica subsequente.

Análises microscópicas foram realizadas em microscópio binocular modelo Kinon® L1000b-AC, e fotografias de cortes histológicos realizadas com câmera digital no modelo Samsung® marca PL 120 14.2MP com Zoom óptico de 10x e Software Motic Images Plus 2.0 para captura.

3.11 Análise estatística

Para a análise dos dados no ensaio da A. salina, utilizou-se o modelo de Probit para determinação da CL50, foi aplicado o teste de Tukey e ANOVA one-way para análise das médias e controle, considerando $p \leq 0,05$.

Para análise dos resultados da toxicidade e da atividade antitumoral, utilizou-se o programa Microsoft Excel, exportando os dados para o software SPSS onde foi utilizado Paired t-test para a análise estatística da toxicidade; na análise da atividade antitumoral, utilizou-se ANOVA (Análise de Variância). Quando observado variação estatística significativa foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis One Way Ranks para comparação da distribuição do parâmetro de interesse entre os grupos de tratamento. Considerou-se valores $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise fitoquímica de *vernonia condensata* Baker

A análise das folhas de *V. condensata* Baker, coletada na cidade do Recife, foi realizada por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para identificação de compostos existentes no extrato. Na literatura, o estudo fitoquímico da planta já é bem elucidado, demonstrando quais os principais metabólitos secundários encontrados. A realização da abordagem fitoquímica desse estudo teve o intuito de corroborar com as informações já existentes.

A tabela abaixo demonstra os principais compostos identificados através da análise da CCD do extrato hidroetanólico de *V. condensata* Baker.

Tabela 1 – Metabólitos identificados no extrato hidroetanólico de *V. condensata* Baker

CLASSE DE METABÓLITOS	PRESENÇA/AUSÊNCIA
Alcalóides	++
Flavonóides	++
Cumarinas	–
Glicosídeos	–
Taninos	–
Terpenos	++
Triterpenos	+
Saponinas	++

Fonte: Dados da pesquisa
 Resultado negativo (-), Resultado positivo fraco (+), Resultado positivo moderado (++)
 e Resultado positivo intenso (+++)

Conforme demonstrado na tabela 1, o uso de algumas técnicas fitoquímicas para identificação de metabólitos secundários permitiu a revelação de alguns compostos presentes em *Vernonia condensata* Baker, tais como: flavonoides, alcaloides, saponinas e terpenos. Alguns metabólitos necessitaram do uso de reveladores para sua identificação semi-quantitativa por meio da CCD.

Em estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Vernonia condensata* Baker foi possível identificar a presença de diferentes metabólitos secundários, tais como: terpenóides, esteroides, ácidos graxos, flavonoides, compostos fenólicos, alcalóides, taninos e saponinas. Desses, os principais compostos já isolados das folhas de *Vernonia condensata* Baker são: Lactonas sesquiterpênicas, saponinas esteroidais, ácidos graxos e flavonoides (ERASTO et al., 2006; AFONSO SABRINA et al. 2015).

Silva et al, 2013 encontraram, em seu estudo, alguns metabólitos, como: flavonoides, saponinas e alcalóides, taninos e esteróide. O estudo de Igile et al., 1994 isolou flavonoides das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

Os resultados apresentados acima corroboram com os dados encontrados nesse estudo, quanto a presença de flavonoides, alcaloides e saponinas, divergindo apenas do estudo de Silva et al., 2013 que evidenciou a presença, também, de taninos.

Em outras pesquisas, diferentes metabólitos presentes em *Vernonia condensata* Baker foram identificados, tal como em estudo realizado por Valverde e colaboradores, 2001, foi isolado o vernosídeo B1 e identificado propriedades antiinflamatórias relacionadas a este composto.

Luo et al., 2010 detectaram esteroides glicosídicos em extrato etanólico de *V. condensata* Baker, por meio de cromatografia em camada delgada (CCD); já em outra pesquisa, também realizada por Luo et al., em 2011, foi identificada uma lactona sesquiterpênica (vernodalinol) em extrato etanólico nas folhas da mesma espécie. Outras duas lactonas sesquiterpênicas (vernolida e vernodalol) também foram isoladas das folhas de *V. condensata* Baker, por Erasto et al., 2006.

4.2 Toxicidade de *vernonia condensata* baker em *artemia salina* leach

A análise da letalidade dos compostos bioativos se faz como etapa importante para identificar a concentração em que determinados compostos se tornam tóxicos e podem se tornar letais.

O teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, se trata de um teste simples, rápido e de baixo custo, que permite a análise de um maior número de amostras processadas por vez (Ohno et al., 1997), utilizou-se esse teste para calcular a CL_{50} (concentração letal do extrato para 50% da população).

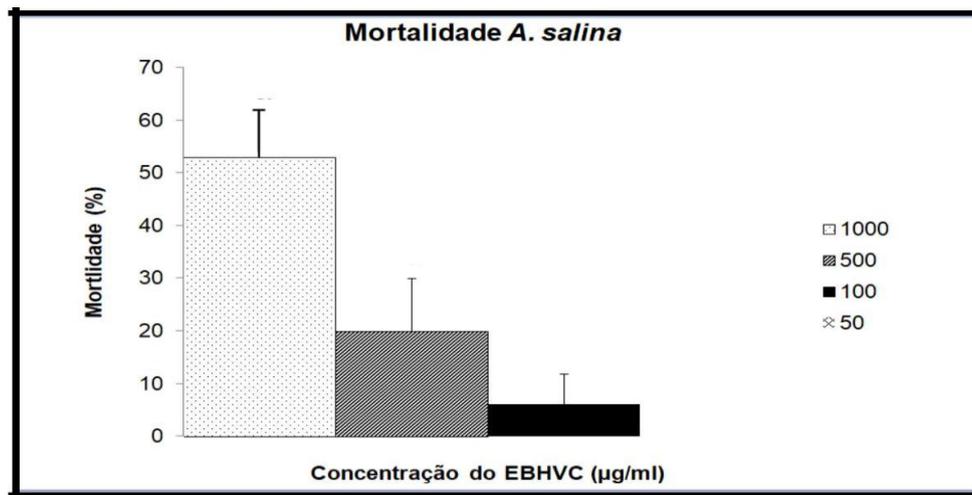
Nesse ensaio, resultados de CL_{50} menores que $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ foram considerados como tóxicos (Meyer et al., 1982). Considerou-se baixa toxicidade quando a CL_{50} foi superior a $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$; moderada para CL_{50} entre 100 a $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e muito tóxico quando a CL_{50} foi inferior $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Na tabela abaixo são apresentados os valores da mortalidade das larvas após a adição das concentrações do EBHVC em cada grupo analisado.

Tabela 2 - Número de *Artemia salina* vivas e mortas no teste da CL_{50} utilizando do extrato hidroetanólico bruto de *V. condensata* em cada grupo analisado.

Réplica	Dosagem				
	Controle	1000mg/mL	500mg/mL	100mg/mL	50mg/mL
1	10 vivas 0 mortas	5 vivas 5 mortas	9 vivas 1 mortas	10 vivas 0 mortas	10 vivas 0 mortas
2	10 vivas 0 mortas	4 vivas 6 mortas	7 vivas 3 mortas	9 vivas 1 mortas	10 vivas 0 mortas
3	10 vivas 0 mortas	5 vivas 5 mortas	8 vivas 2 mortas	9 vivas 1 mortas	10 vivas 0 mortas
Total	30 vivas 0 mortas	14 vivas 16 mortas	24 vivas 6 mortas	28 vivas 2 mortas	30 vivas 0 mortas
% de mortas	0,0%	53,3%	20,0%	6,6%	0,0%

Fonte: Dados da pesquisa

A probabilidade de mortalidade foi calculada utilizando o método de Probit, após a realização do teste realizou-se a análise de regressão linear entre o nível da dose e a probabilidade de mortalidade. Com isso, a CL_{50} encontrada foi de $1395 \mu\text{g/mL}^{-1}$, considerando-se, então, uma atividade tóxica baixa com valor da $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Na análise de dados os controles não influenciaram nos resultados, e o extrato apresentou um maior índice de mortalidade com o aumento da dose, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

Gráfico 1 – Mortalidade do microcrustáceo *A. salina* frente ao EBHVC

Fonte: dados da pesquisa

Observa-se que a mortalidade é dose-dependente, ou seja, o maior percentual de mortalidade foi no grupo de $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (53,3%) seguido da concentração de $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (20,0%) e $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (6,6%). No grupo de concentração $50 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e no grupo controle não houve mortalidade, o que indicou prevalência nula.

Em estudos realizados na família das Asteraceae, algumas plantas demonstraram resultados de toxicidade elevada. Pesquisa desenvolvida por Okuyama, et. al. 2011 utilizando extrato etanólico das folhas de *Mikania laevigata*, conhecida como “guaco”, apresentou elevada toxicidade com valor $CL_{50} = 62.6 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

De maneira semelhante, outra análise onde se estudou os efeitos de derivados da *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae), frente ao microcrustáceo, os resultados demonstraram que a maioria dos compostos apresentou efeitos tóxicos com valores de CL_{50} entre $45-70 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Rodríguez-Chávez et al.,2015). Os dados ressaltados divergem dos resultados obtidos através das análises realizadas nesse estudo.

Apesar de algumas análises realizadas com extratos de plantas da mesma família apresentarem toxicidade nesse teste, pesquisas utilizando plantas do mesmo gênero (*Vernonia amygdalina*) e com diferentes solventes (aquoso, metanol, hexano, etilacetato e butanol) não apresentaram toxicidade ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$) (AJILA, J.M. & OLOYEDE, GANIYAT, 2012).

Em estudo realizado por RAMOS (2014), onde foi utilizado extrato hidroetanólico de folhas de *Vernonia condensata* Baker, obteve-se resultado da $CL_{50} >$

1000 µg/mL⁻¹. Os resultados corroboram com os dados encontrados no presente estudo, que demonstra a baixa toxicidade do EBHVC no ensaio de *Artemia salina*.

Uma das características do bioensaio com *A. salina* Leach é ser viável e trazer resultados que norteiam demais ensaios por apresentar efeitos tóxicos semelhantes àqueles produzidos nos estudos *in vivo* (Amaral & Silva, 2008). Contudo, por ser o primeiro teste realizado nessa pesquisa, na busca substâncias com atividade antitumoral em modelos experimentais *in vivo*, auxiliou, também, na determinação da dose inicial para o ensaio de toxicidade aguda

4.3 Toxicidade aguda

Segundo a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) na existência de testes preliminares onde demonstram a baixa toxicidade de uma determinada substância, deve-se partir da dose inicial de 2000 mg/Kg para os testes da toxicidade *in vivo*.

Após a administração do extrato hidroetanólico de *Vernonia condensata* Baker, por via oral (dose inicial equivalente a 2000 mg/kg) ao grupo tratado e administração de soro fisiológico 0,9% ao grupo controle, os sinais clínicos iniciais observados foram demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 - Sinais clínicos observados em camundongos após administração do extrato de *Vernonia condensata* Baker por via oral.

Sinais Clínicos	Dose via oral (mg/kg)					
	2000					
	30 min			1 h		
	CR	TM	SM	CR	TM	SM
1. Sist. Nervoso Central						
Ausência de coord. Motora	-	-	-	-	-	-
Convulsão tônico- clônica	-	-	-	-	-	-
Parada cardiorrespiratória	-	-	-	-	-	-
Refluxo	-	-	-	+	+	-

Tabela 3 - Sinais clínicos observados em camundongos após administração do extrato de *Vernonia condensata* Baker por via oral.

1.1 Efeitos estimulantes							
Agressividade	++	++	+	+	-	-	
Ambulação aumentada	+	+	+	+	+	+	
Autolimpeza	-	-	-	-	-	-	
Bocejo	-	-	-	-	-	-	
Ereção de cauda	+	+	+	+	+	+	
Espasmos	+	+	+	-	+	-	
Frêmito vocal	-	-	-	-	-	-	
Inversão de marcha	+++	+++	++	++	+	++	
Movimento circular	-	-	-	-	-	-	
Movimento das vibrissas	-	-	-	-	-	-	
Movimento estereotipado	+++	+++	+++	++	++	++	
Reação de fuga	++	++	+++	++	++	++	
Sacudir a cabeça	-	-	-	-	-	-	
Tremores grosseiros	-	-	-	-	-	-	
1.2 Efeitos depressores							
Ambulação diminuída	-	-	-	-	-	-	
Ataxia	-	-	-	-	-	-	
Cauda em straub	-	-	-	-	-	-	
Perda do reflexo auricular			++	+	+	-	-
Ptose palpebral			-	-	-	-	-
Prostração			-	-	-	+	+
Resposta ao toque diminuída			-	-	-	-	-
2. Sist. Nervoso Autônomo							
Cianose			+	+	+	+	-
Contorções			++	++	++	+	+
Diarreia			-	-	-	-	-
Distensão abdominal			-	-	+	-	+
Diurese			-	-	-	-	-
Edema de focinho			+	+	+	-	+
Excreção fecal			+	+	-	-	-
Piloereção			++	++	++	+	-
Taquipneia			+	+	+	-	-
Salivação			-	-	-	-	-
3. Mortalidade (%)			0	0	0	0	0

- (sem efeito); + (efeito leve); ++ (efeito moderado); +++ (efeito acentuado). CR- cabeça e rabo marcado; TM tronco marcado; SM- sem marca.

Fonte: dados da pesquisa. Adaptada de MALONE; ROBICHAUD (1983).

De acordo com os dados demonstrados na tabela acima, observou-se que os efeitos mais pronunciados foram os efeitos estimulantes, tais como: estereotipia, inversão de marcha, reação de fuga, ambulação aumentada, agressividade, ereção de cauda e espasmos.

O comportamento estereotipado complexo e o aumento da ambulação, observado nos camundongos tratados com o extrato, sugere uma possível atividade sobre o sistema nervoso central (SNC), considerando que, a atividade locomotora espontânea e o movimento repetitivo estão relacionados com os níveis de excitabilidade desse sistema (DA COSTA JÚNIOR et al., 2011).

Diversos autores já relataram a capacidade de alguns metabólitos secundários extraídos de plantas demonstrarem atividades nesse sistema (ALMEIDA et al., 2012; GIRARD, 2003; MUSTAD, 2014; SILVA et al, 2017). Alguns metabólitos encontrados no EBHVC são conhecidos por terem influência à nível do SNC. Um exemplo seria a classe dos alcaloides que foram encontrados nessa pesquisa e que, em estudo realizado por Quintans-Júnior et al. (2004) com *Prosopis juliflora* (Sw), demonstrou alterações comportamentais como: piloereção, hiperatividade (aumento da ambulação), irritabilidade e tremores.

O aumento da ambulação é um comportamento ligado a uma boa coordenação do animal, Prut e Belzung (2003) já haviam relatado em seus estudos que sinais como locomoção aumentada podem ser um indicativo de um efeito estimulante. Nesta pesquisa foi demonstrada uma exacerbação desse comportamento após a administração do extrato por via oral em camundongos.

Os terpenos também atuam estimulando a geração do segundo mensageiro Trifosfato de Inositol (IP3), que mobiliza o Cálcio intracelular, levando a excitotoxicidade celular. Adicionalmente, colaboram com o processo de consolidação de memória e também apresentam resultados na redução do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, aumentando assim, o tempo de latência para início do sono (MACLENNAN et al., 2002; PASSOS et al, 2009). Esses fatos podem ter contribuído e influenciado no aumento da ambulação, e de forma geral nas características de estimulação do SNC.

MacLennan, Darlington e Smith (2002) afirmaram que os terpenos constituem o grupo de metabólitos com ações sobre o SNC. Em seu estudo, os diterpenóides encontrados no extrato de *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*) atuaram na modulação de sistemas neurotransmissores, tais como: serotoninérgicos, noradrenérgico, dopaminérgico e colinérgico, aumentando o fluxo sanguíneo.

Baseado nesse fato pode-se pressupor que esses transmissores tenham contribuído para alguns efeitos apresentados pelos animais como: formação do edema de focinho e aumento da frequência respiratória.

Como observado na tabela 3, não foi constatado estado de morbidez ou morte tanto ao final dos 60 minutos quanto do 14^o dia de experimento. Através dos resultados obtidos com a análise da toxicidade por via oral, o extrato hidroetanólico de *Vernonia condensata* Baker foi classificado, seguindo os critérios do Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), na categoria 5 (>2000 – 5000), onde a DL₅₀ ficou estabelecida em ≥ 2000 mg/kg, de acordo com

A investigação da toxicidade aguda constitui o primeiro passo para análise toxicológica de fármacos à base de plantas (Déciga-Campos, 2007). De maneira geral, modelos animais fornecem uma boa previsibilidade para toxicidades humanas, de cerca de 70-80% (Kola et al., 2004).

Os estudos de toxicidade aguda demonstram a relação dose/resposta e permitem a determinação da DL₅₀ (dose letal média), que é útil para a identificação da toxicidade da substância. A resposta tóxica apresentada por uma substância está relacionada à dose administrada ou absorvida pelo indivíduo, o tempo e frequência de exposição, além da via de administração utilizada (Barros; Davino, 2008). A DL₅₀ é a “dose única de uma substância capaz de causar 50% de mortalidade dos animais tratados” (Sá; Almeida, 2006).

O teste de toxicidade aguda, por via oral, realizada por Monteiro et al., (2001) demonstrou resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo. Monteiro realizou o teste oral com extrato aquoso de *Vernonia condensata* Baker, o qual apresentou baixa toxicidade, sem mortes e nenhum outro sinal de toxicidade até a dose mais elevada de 5000 mg/kg.

Amole et al. (2006) testaram extratos de folhas de *Vernonia amygdalina* em ratos e não encontraram nenhum efeito tóxico durante estudo em ratos; enquanto que Abdullahi et al. (2011) realizaram testes com extrato metanólico de folhas de *Vernonia glaberrima* (pertencente a família das Asteraceae) em camundongos e encontraram DL₅₀ de 1265 mg, também não encontraram efeitos tóxicos, o que demonstrou segurança no uso do extrato para doses farmacologicamente ativas. O meio extrator metanólico também foi utilizado por Yoga Latha et al. (2011) e Rajamurugan et al. (2011) para avaliar a toxicidade do extrato de folhas de *Vernonia cineria* em camundongos, o qual não demonstrou ação tóxica com valor de DL₅₀ maior que 2000 mg/kg .

Em estudos com *Vernonia condensata*, o extrato aquoso, administrado por via oral, não causou a morte ou algum indício de toxicidade com dose de até 5.000 mg/Kg, em testes realizados com ratos, corroborando a segurança no uso da planta nas doses utilizadas (SILVA et al., 2006). Risso et al., 2010 seguindo o protocolo da OECD 423, utilizou folhas secas para preparação do extrato em diferentes solventes para teste de toxicidade oral em ratos, demonstrando valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg, para o extrato aquoso, e etanólico, apresentando uma margem de segurança semelhante ao estudo em questão, porém, no mesmo estudo, o extrato diclorometano demonstrou-se como o mais agudamente tóxico com DL₅₀ 500 mg/kg.

A atoxicidade dessas plantas pode explicar o sucesso dessas espécies no uso popular para tratamentos medicinais, tais como: hepatoprotetor, gastroprotetor, antiinflamatório, etc.

De acordo com Beutlher et al. (2001), é possível que plantas de diferentes variedades possam ter resultados de toxicidade diferentes umas das outras quando comparadas, pois, muitas vezes essas plantas são classificadas apenas quanto à espécie e não quanto à variedade. Lapa et al, (1999) ainda retrataram o fato de que além das características genéticas da planta, a síntese das substâncias químicas é controlada por fatores ambientais como ecossistema, iluminação, calor, constituição do solo, umidade, dentre outros.

Após a realização do protocolo experimental foi determinada a massa dos órgãos retidados e calculadas as médias \pm desvio padrão (DP) dos animais dos grupos 2000 mg/kg e Sf0,9%

Na tabela 4 observa-se a média e desvio padrão do ganho de peso, peso dos órgãos e consumo alimentar do grupo controle e tratado. Observou-se que houve maior média do consumo de água e ração no grupo controle, sendo estatisticamente significativo (p-valor = 0,046 para ambos).

Tabela 4 - Média e desvio padrão do consumo de água e ração e peso dos animais e órgãos avaliados dos grupos controle e tratado no teste de toxicidade oral.

Fator avaliado	Sf 09% Média \pm DP	2000 mg/Kg Média \pm DP	p-valor	Teste utilizado
Ganho de peso Médio	0,381 \pm 1,393	1,892\pm0,657	0,248	Teste de Mann-Whitney
Água	14,286\pm0,000	9,571 \pm 0,000	0,046	Teste de Mann-Whitney

Ração	11,786±0,000	6,179±0,000	0,046	Teste de Mann-Whitney
Fígado	2,023±0,171	1,902±0,524	0,423	Paired t-test
Baço	0,244±0,020	0,328±0,125	0,652	Paired t-test
Rins	0,481±0,109	0,392± 0,03	0,796	Paired t-test
Pulmão	0,568± 0,159	0,725±0,242	0,487	Paired t-test

*se p-valor < 0,05 a distribuição do fator avaliado difere entre os grupos avaliados.
Fonte: Dados da pesquisa

Após a avaliação grupo a grupo observou-se que não houve diferença significativa quanto ao peso dos órgãos avaliados entre os dois grupos (2000 mg/kg 45 e SF), porém, observa-se um aumento no peso total, bem como, peso do baço e pulmão do grupo tratado (2000 mg/kg) em relação ao grupo controle (SF 0,9%). Desmarchelier e colaboradores (1999) evidenciaram a importância da avaliação do peso corporal como um indicador de efeitos adversos que possam ser causados por drogas e produtos químicos.

Outras pesquisas que também avaliaram o peso corporal foram desenvolvidas por Costa (2013) e Alves (2007), onde os animais demonstraram uma tendência de ganho de peso ao longo do experimento. Para esse fator Jahn e Günzel (1997) explicaram que o ganho de massa corporal também deve ser considerado como uma resposta tóxica, e que muitas vezes este fato está associado à redução de tempo na vida reprodutiva (pelo menos nas fêmeas).

Em estudo realizado por Barbastefano (2007), onde foram avaliados os efeitos antiulcerogênicos de *Vernonia polyanthes*, observou-se que nenhuma das frações utilizadas promoveu alterações significativas no peso dos animais e no peso dos órgãos após 14 dias de tratamento consecutivos, demonstrando uma baixa toxicidade das frações nas suas doses efetivas.

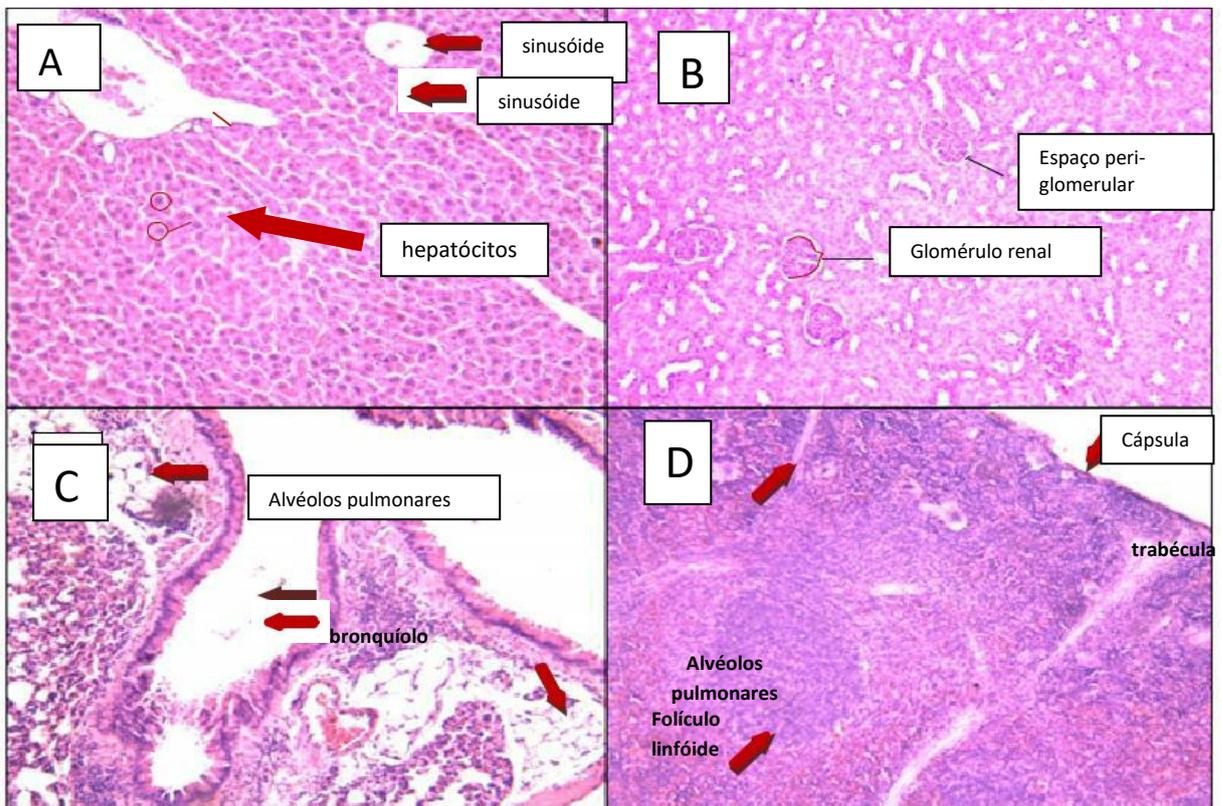
Bezerra et al. (2008) relataram que a toxicidade pode ser também avaliada investigando a variação de massa dos órgãos e destaca como os principais órgãos afetados em caso de intoxicação são fígado e rins, por serem os órgãos responsáveis pela desintoxicação do organismo, e nesses casos podem ter seus volumes ou massas aumentadas.

Tal fato coincide com dados encontrados nesse estudo, onde o peso do fígado no grupo tratado foi maior do que o peso no grupo controle, conforme já demonstrado na tabela 4.

Ainda no sentido de identificar possíveis alterações causadas pelo EBHVC, realizou-se a análise histopatológica dos órgãos, onde foi possível observar algumas informações importantes.

A análise histológica para a toxicidade aguda do grupo controle (soro fisiológico), revelou que o fígado, rins, pulmão e baço apresentaram respectivamente: veia centro lobular preservada, núcleos hepatócitos preservados e com preservação dos sinusóides hepáticos; glomérulos e túbulos renais conservados, e espaço periglomerular conservado; alvéolos preservados, brônquios e bronquíolos terminais preservados; preservação da cápsula, trabécula e linfonodos com sinusóides esplênicos preservados, conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5 – Corte histológico dos órgãos dos animais do grupo controle (soro fisiológico).

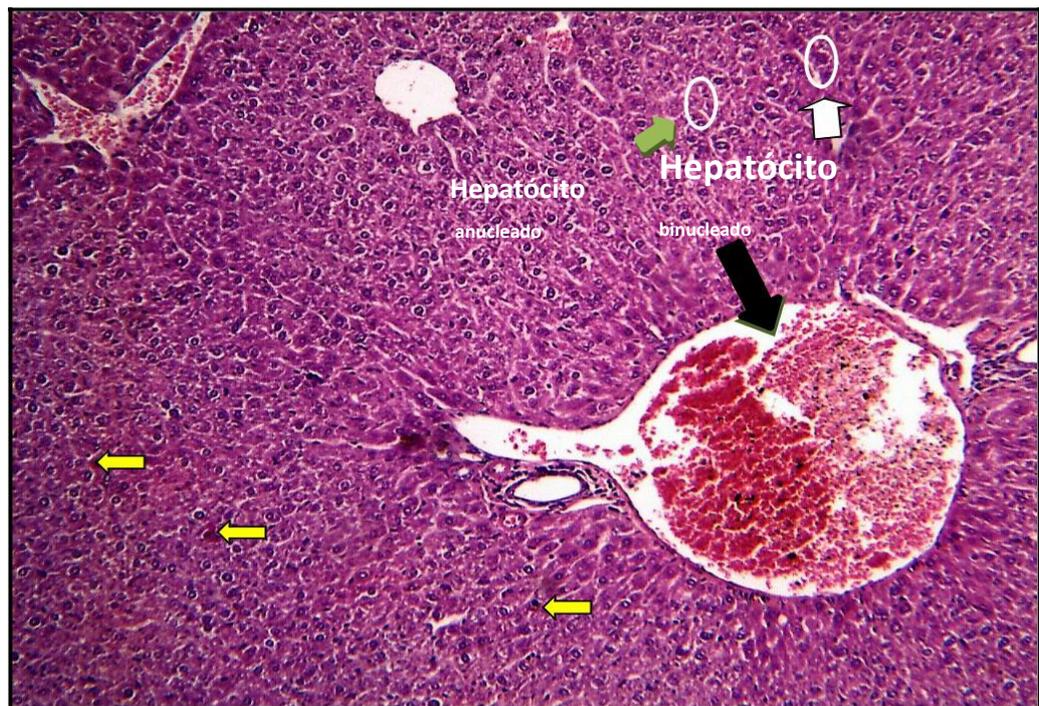


Fonte: dados da pesquisa
 A – fígado; B – rim; C – pulmão; D – baço.
 Coloração HE (hematoxilina-eosina); aumento de 10x.

Apesar da maioria dos órgãos (baço, rins e pulmão) do grupo tratado com EBHVC (2000 mg/Kg) não apresentarem alterações, pode-se perceber algumas modificações presentes na análise do fígado.

Observou-se no corte histológico do fígado, do grupo tratado 2000 mg/Kg, leve congestão de grandes vasos, hepatócitos binucleados e anucleados, bem como, foi possível observar a presença de proliferação das células de Kupffer (Figura 6), o que pode significar um dano hepático, mas também uma tentativa de regeneração desse órgão.

Figura 6 – Corte histológico - fígado dos animais do grupo tratado com EBHVC 2000 mg/Kg.



Fonte: dados da pesquisa

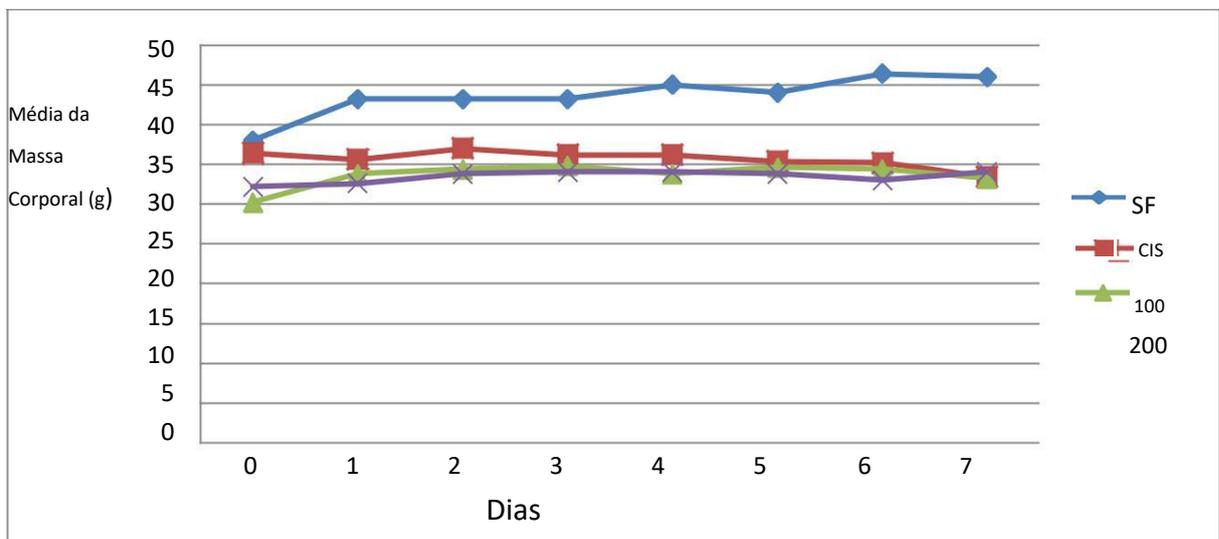
Seta verde – hepatócito anucleado; seta branca – hepatócito binucleado; seta preta - congestão grande vaso; seta amarela – células de Kupffer
Coloração HE (hematoxilina-eosina); aumento de 40x

Monteiro e colaboradores (2001) realizaram um estudo no intuito de investigar o potencial de toxicidade aguda, bem como, embriotoxicidade e mutagenicidade do chá das folhas de *Vernonia condensata* Baker. A pesquisa demonstrou que, além da baixa toxicidade (DL50 >5000 mg/ Kg), os animais não demonstraram nenhuma alteração patológica nos órgãos após 14 dias de tratamento por via oral, corroborando com achados encontrados nesse estudo que não demonstrou alterações na maioria dos órgãos (baço, rins e pulmão) analisados, diferindo, apenas, quanto às alterações hepáticas encontradas nos animais do grupo tratado.

4.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

Na análise da atividade antitumoral, após 36 h da inoculação do tumor, os animais foram tratados por 7 dias com o extrato e os seus pesos foram acompanhados durante esse tempo. Os valores das médias dos pesos dos grupos Solução Fisiológica a 0,9 % (SF), padrão Cisplatina (CIS), tratado EBHVC 100 mg/kg (100MG) e EBHVC 200 mg/kg foram calculados e estão demonstrados no gráfico 2.

Gráfico 2 - Médias da massa corporal dos grupos utilizados no teste da atividade antitumoral



Fonte: dados da pesquisa

SF: Grupo tratado com Solução Fisiológica 0,9%. CIS: Grupo tratado com Cisplatina 0,5 mg/kg
100MG: Grupo tratado com EBHVC dose 100 mg/kg. 200MG: Grupo tratado com EBHVC dose 200 mg/kg.

Após a obtenção do peso dos órgãos dos animais tratados, foram calculados as médias e o valor de p, por meio da análise de variância ANOVA e os resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão das massas dos órgãos avaliados e do tumor segundo os grupos de estudo da atividade antitumoral.

Fator Avaliado	Grupo avaliado				P	Teste utilizado
	SF09 Média \pm DP	CIS Média \pm DP	100MG Média \pm DP	200MG Média \pm DP		
Fígado	2,428 \pm 0,437	2,407 \pm 0,082	2,315 \pm 0,399	2,476 \pm 0,185	0,872	ANOVA One Way Repeated Measures

Baço	0,291±0,0378	0,198±0,047	0,364±0,12	0,334±0,0805	0,022	ANOVA One Way Repeated Measures
Rins	0,403±0,16	0,288±0,048	0,251±0,054	0,265±0,0203	0,128	ANOVA One Way Repeated Measures
Pulmão	0,358±0,0758	0,417±0,069	0,392±0,124	0,367±0,0975	0,755	ANOVA One Way Repeated Measures
	SF09 Mediana±EP	CIS Mediana±EP	100MG Mediana±EP	200MG Mediana±EP	P	
Tumor	1,454±0,527	0,565±0,093	0,545±0,073	0,511±0,107	0,008	(Kruskal- Wallis One Way Ranks)

Fonte: Dados da pesquisa

Se $p < 0,05$ a distribuição do fator avaliado difere significativamente entre os grupos avaliados.

A massa dos órgãos dos animais após o teste de atividade antitumoral foi analisada e conforme apresentado na tabela 5, apenas as massas do baço ($p = 0,022$) e do tumor ($p = 0,008$) obtiveram diferença estatística na comparação entre os grupos. Após esse resultado foi utilizado o método Holm-Sidak para comparação grupo a grupo.

Observou-se que a divergência das massas do braço ocorreu principalmente quando comparados o grupo CIS com os demais grupos, havendo também divergência entre o grupo SF quando comparado aos grupos 100mg e 200mg. Quanto ao tumor após análise grupo a grupo foi comprovado que os grupos CIS, 100mg e 200mg tiveram redução significativa da massa tumoral quando comparados ao grupo SF, mostrando assim um efeito antitumoral positivo, tanto nos animais tratados com o padrão (CIS), quanto aos tratados com EBHVC.

Como o EBHVC demonstrou diferença significativa entre as massas dos tumores foi calculado o percentual de Inibição Tumoral (IT%). Os percentuais de IT% para o Carcinoma de Ehrlich dos grupos padrão (cisplatina), tratado EBHVC 100 mg/kg e tratado EBHVC 200 mg/kg, foram determinados em relação ao grupo SF e estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Valores do IT% para os grupos controle e tratamentos avaliados

Tratamento	IT%
Cisplatina 0,5 mg/Kg	70.94%
EBHVC 100 mg/Kg	70.88%
EBHVC 200 mg/Kg	76.89%

Fonte: dados da pesquisa

O IT% assim como a média das massas tumorais apresentou dados promissores quando comparamos os resultados dos grupos tratados com o EBHVC e os tratados com o padrão Cisplatina. As duas concentrações do extrato demonstraram resultados semelhantes ao padrão, apresentando um efeito dose dependente em relação à taxa de inibição.

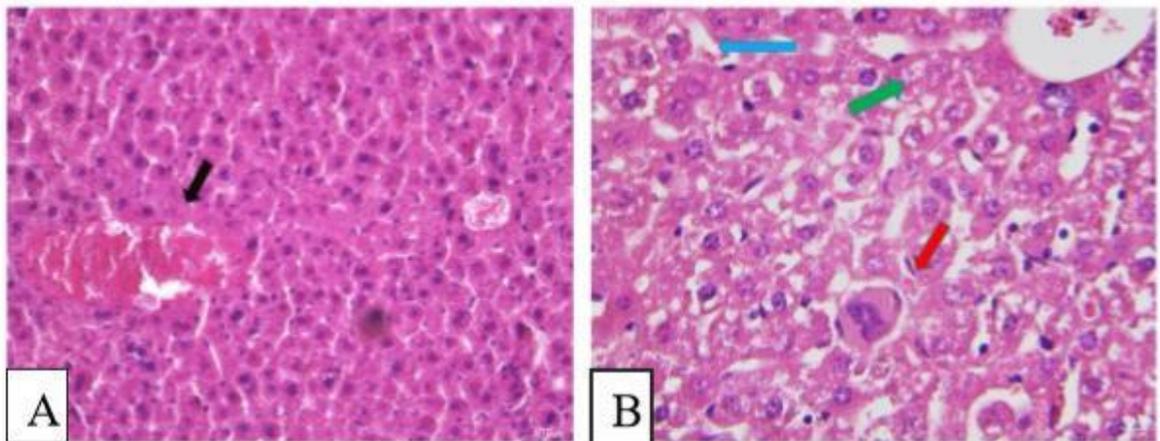
No teste para atividade antitumoral realizado nessa pesquisa, os animais tiveram sua massa corporal acompanhada durante todo o tratamento. Os pesos dos grupos tratados mantiveram uma constância. Nos grupos SF e CIS observa-se uma leve alteração das massas corpóreas com o decorrer dos dias. No grupo SF houve um aumento na massa dos animais isso pode ser justificado pelo rápido desenvolvimento dos tumores nos camundongos pertencentes a esse grupo.

Quando se observa a tabela 5, verifica-se que esse grupo foi o que apresentou maior valor de massa tumoral apresentando uma média de 1, 454 g e mostrando-se estatisticamente diferente dos demais grupos. Já o grupo CIS apresentou um leve decréscimo de massa, esse é um fato considerado comum, pois segundo autores como Tayarani-Najaran e colaboradores (2013) a perda de massa corpórea é um dos principais efeitos colaterais do uso de antineoplásicos, e se dá muitas vezes como consequência as náuseas e vômitos causados por esses medicamentos.

Foi realizada também a análise histológica dos órgãos e tumores dos animais que participaram do ensaio da atividade antitumoral. Após a análise histológica do

fígado dos animais do grupo controle foi possível observar tumefação celular e presença de granulomas. Os hepatócitos apresentavam granulações citoplasmáticas com algumas vacuolizações, núcleos aumentados, hepatócitos binucleados e anucleados e congestão de vasos. (Figura 7).

Figura 7 - Imagens da análise histológica do corte do fígado dos animais do grupo SF.

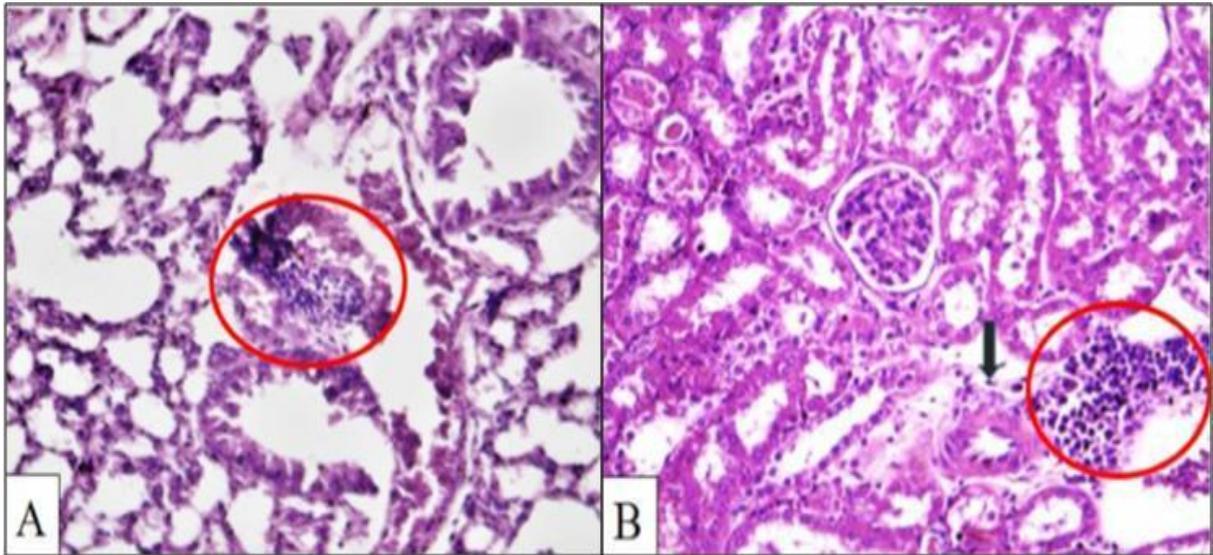


Fonte: Dados da pesquisa

- (A)– Seta preta apresenta intensa congestão do vaso hepático.
 (B)– Em B corte histológico de fígado demonstra tumefação celular com áreas de necrose, onde há perda da morfologia celular.
 Seta azul demonstra hepatócito binucleado; seta verde apontando para hepatócitos anucleados e seta vermelha apresentando megacariócito.
 Imagens coradas por HE e com aumento microscópico em 20x.

Na análise do pulmão e rins, pode-se observar a presença de células infiltradas com características de malignidade, apresentando-se quase sempre ao lado de um vaso (Figura 8), tornando-se um indicador de metástase e de que sua disseminação aconteceu através da corrente sanguínea. O maior número de focos de células invasivas foi encontrado no pulmão (Figura 8A), o que nos faz considerar a proximidade com o local de implantação do tumor como principal explicação para o fato, seguido dos rins (Figura 8B), que é o órgão responsável pela filtração sanguínea. O pulmão apresentou reatividade no endotélio das artérias, congestão e hemorragia; também foi visto uma desarrumação do tecido pulmonar juntamente com a presença das células neoplásicas demonstrando uma expansão desse cenário. O rim, por sua vez demonstrava vasos reativos, infiltrado perivascular de células mononucleadas e degeneração hidrópica.

Figura 8 - Imagens da análise histológica do corte de pulmão e rins dos animais do grupo SF.



Fonte: Dados da pesquisa

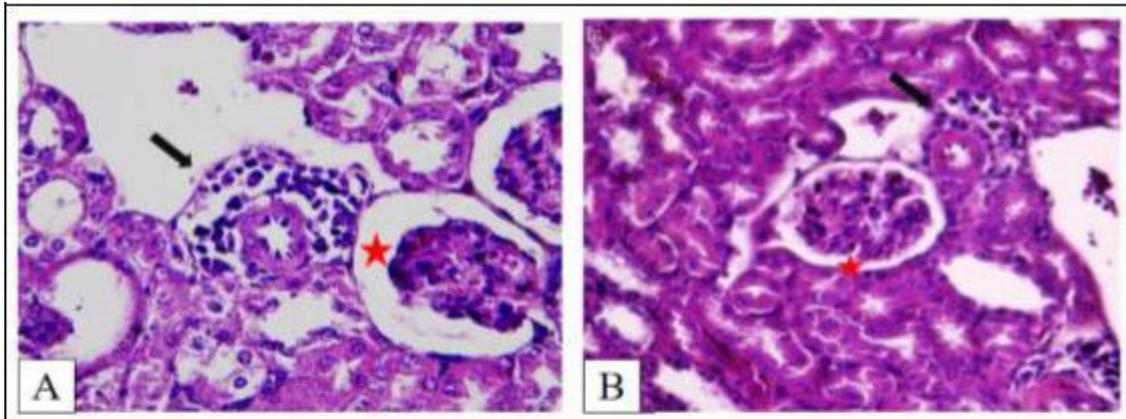
A – o círculo vermelho aponta conjunto de células infiltradas com características de malignidade em corte de tecido pulmonar.

B – em corte de tecido renal o círculo vermelho aponta conjunto de células infiltradas com características de malignidade; seta preta aponta para vaso reativo.

Lâminas coradas por HE e com aumento do microscópico em 20x.

Os órgãos dos animais tratados com o padrão cisplatina apresentaram nódulos de células metastáticas apenas no pulmão e nos rins, porém o fígado e rins demonstram altos sinais de citotoxicidade, apresentando graves alterações teciduais. Nos rins além dos infiltrados celulares, o corte histológico demonstrou atrofia dos glomérulos com aumento do espaço peri-glomerular (Figura 9A), acentuada degeneração hidrópica e áreas de necrose, dilatação cística dos túbulos com intensa presença de cilindros hialinos.

Figura 9 – Corte histológico do rim de animal tratado com padrão cisplatina e com EBHVC 100mg/Kg.



Fonte: Dados da pesquisa

A – Corte histológico de rins do grupo Cisplatina (CIS).

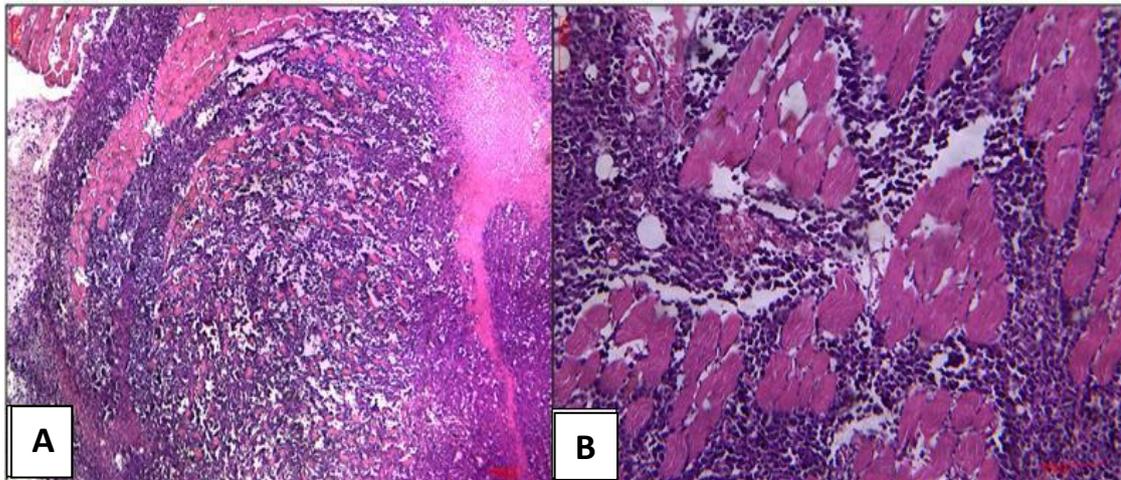
B – Corte histológico de rins do grupo tratado com EBHVC *As estrelas representam o espaço peri-glomerular dos rins. *As setas pretas demonstram infiltrado celular mononuclear ao lado de vasos.

Aumento microscópico em 20x. Lâminas coradas por HE.

Os danos hepáticos e renais severos causados nos órgãos dos animais do grupo CIS podem ser explicados pelo fármaco padrão utilizado. A cisplatina é uma droga antineoplásica padrão que forma ligações covalentes com as proteínas plasmáticas e é amplamente distribuída para os tecidos, principalmente rins e fígado. Apesar de possuir uma farmacocinética favorável, foi observado que causava, assim como grande parte dos antineoplásicos, reações adversas importantes, destacando-se a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Nos rins foram propostos alguns mecanismos de ação da cisplatina: apoptose, necrose, inflamação e estresse oxidativo, que causam redução da taxa de filtração glomerular, lesão tubular proximal e aumento de sais. No fígado, esse antineoplásico aumenta as transaminases, altera o metabolismo energético do órgão, causa enrijecimento da membrana hepática, peroxidação lipídica, dano oxidativo à cardiolipina e morte celular hepática (VISACRI, 2017).

De maneira geral, a análise dos órgãos dos grupos tratados com 100 mg/Kg e 200 mg/Kg não apresentaram alterações significativas. Em relação aos tumores dos do grupo controle, os mesmos apresentaram massa tumoral com bastante área de infiltração e necrose de coagulação, como demonstrado na figura 10.

Figura 10 – Imagens das análises histológicas dos cortes dos tumores do grupo SF.



Fonte: dados da pesquisa

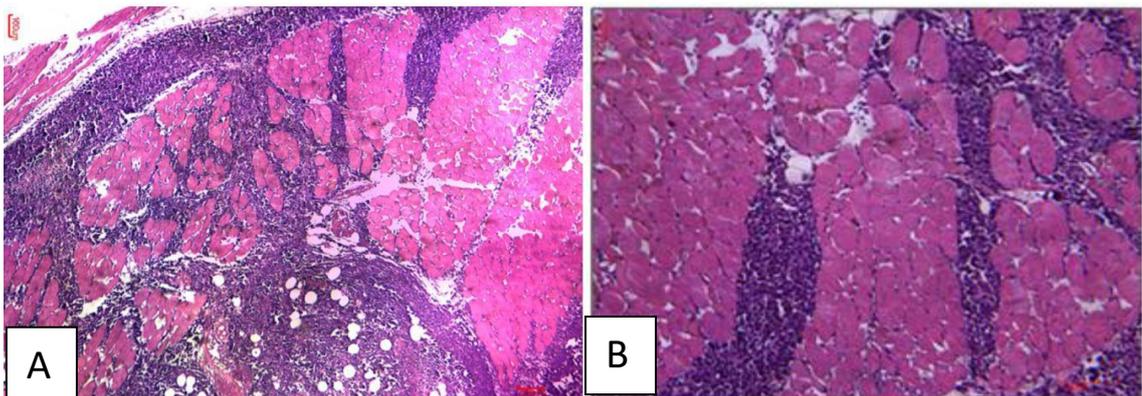
A – tumor infiltrando tecido muscular aumento do microscópio em 40x

B – tumor infiltrando tecido muscular aumento do microscópio em 100x

Lâminas coradas por HE

O tumor do grupo CIS (Figura 11B) apresentou o mesmo padrão celular encontrado no grupo SF, porém apresentava formato celular mais variado. Essa descrição assemelha-se as características do tumor de Ehrlich descritas no Manual Básico de Cancerologia Experimental: Tumor de Ehrlich (SILVA; FREITAS; DOMINGUES,2017).

Figura 11 – Corte histológico do tumor no grupo SF e CIS.



Fonte: dados da pesquisa

A – tumor do grupo SF; massa tumoral mais infiltrada, maior quantidade de necrose.

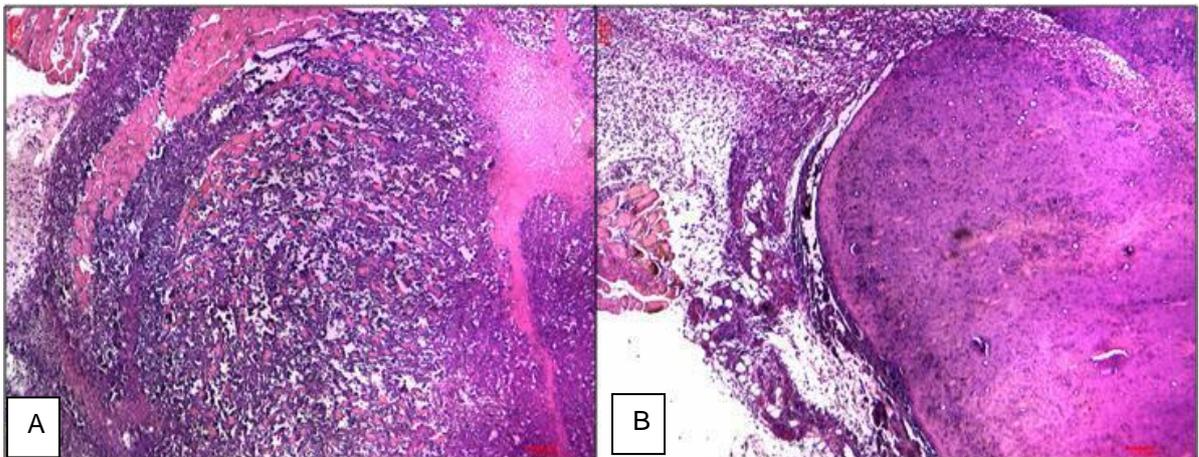
B – tumor do grupo CIS com células de núcleo picnótico, menor infiltração e menor crescimento tumoral.

Aumento de 40x. Lâminas coradas por HE.

Na análise dos grupos tratados 100 mg/Kg e 200 mg/Kg, pode-se perceber certa evolução no que diz respeito ao efeito do extrato frente à inibição tumoral,

conforme demonstrado na figura 12. No grupo tratado com EBHVC 100 mg/Kg (Figura 12A), pode-se perceber vários núcleos em picnose, tumor compacto, porém, com infiltração, embora esta esteja mais contida quando comparada com o grupo SF. No grupo que recebeu tratamento com EBHVC 200 mg/Kg (Figura 12B), nota-se um tumor confinado, que não infiltra tecido muscular, presença de células menos diferenciadas, células mais jovens, quase não há presença de necrose, um padrão um pouco mais semelhante ao encontrado no grupo cisplatina.

Figura 12 – Corte histológico dos tumores dos grupos tratados com EBHVC.



Fonte: dados da pesquisa.

A – tumor do grupo tratado com EBHVC 100 mg/Kg.

B – tumor do grupo tratado com EBHVC 200 mg/Kg. Aumento de 20x . Lâminas coradas por HE.

Esses resultados são vistos de forma positiva já que os grupos tratados com EBHVC apresentaram resultados promissores na redução da massa tumoral (tabela 5), aumento na taxa de inibição (tabela 6) e histologicamente não apresentaram toxicidade hepática e renal como encontrado no controle CIS.

A busca por novas terapias que possam melhorar a qualidade de vida a quem sofre com o câncer é uma luta constante. E como visto, os produtos naturais apresentam-se como uma estratégia viável para a busca de novas ferramentas que possam ser utilizadas com esse fim. Como exemplos de compostos anticâncer desenvolvidos a partir desses produtos temos vindesina, vinorelbina, etoposida, docetaxel e topotecan (BEZERRA et al., 2008; TAYARANINAJARAN et al., 2013).

Uma pesquisa com resultados semelhantes aos nossos foi realizada por Pagno e colaboradores (2006) ao analisar o extrato de *Vernonia scorpioides*, mesmo gênero da planta utilizada nesse estudo, frente ao Carcinoma de Erlich em sua forma ascítica.

Quando os animais eram tratados imediatamente (via intraperitoneal) após a inoculação das células tumorais, o resultado obtido foi supressão de 100% dessas células e redução do volume ascítico; quando o tratamento era iniciado 3 dias após o desenvolvimento do tumor a supressão foi em torno de 80% e 60% de redução do volume ascítico. Os grupos controle tratados com solução salina apresentaram maior volume de células tumorais e volume ascítico.

Relatórios anteriores mostram que baixas concentrações de extratos de folhas solúveis em água de uma planta comestível nigeriana, *Vernonia amygdalina* (VA), retardou de forma potente as atividades proliferativas de células cancerígenas da mama humanas, *in vitro*, dependente da concentração. A exposição das células à concentrações crescentes de VA (10, 100 e 1000 µg / mL) inibiu o crescimento celular em aproximadamente 14% ($P < 0,05$), 22% ($p < 0,05$) e 50% ($p < 0,005$).) respectivamente (GRESHAM et al, 2008)

O extrato aquoso apresenta uma toxicidade muito baixa, sendo que nenhuma morte ou outros sinais de toxicidade pudessem ser detectados Também foram realizadas necropsias nos ratos (14 dias após a ingestão) e nenhuma alteração patológica foi constatada (DE CARVALHO, 2012).

Luo et al. (2010) avaliaram, por meio de um ensaio biomonitorado, a atividade anticâncer (células de câncer de mama) do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* Bake. À medida que o extrato bruto foi purificado, observou-se, na última subfração obtida (mais pura), um aumento de 22,4 vezes a atividade anticâncer do extrato bruto. O vernodalinol (25 e 50 µg/mL) inibiu o crescimento (síntese de DNA) de células de câncer de mama (células MCF-7), mostrando a potencial atividade anticancerígena do composto.

Em pesquisa realizada por DE CARVALHO (2012), utilizando extrato bruto etanólico de *Vernonia scorpiodes*, na menor concentração testada (50mg/kg/dia) foi demonstrado importante atividade antitumoral, uma vez que causou significativa redução do crescimento do tumor bem como elevado índice de células tumorais em apoptose inicial e tardia. Nas concentrações mais reduzidas do extrato, predomina o efeito citotóxico das lactonas sesquiterpênicas, o que leva a maior citotoxicidade por ativação das vias da apoptose.

Com base nesses resultados é importante a realização de novos estudos, buscando identificar outras linhagens sobre as quais o extrato seja efetivo. Possivelmente, estudos in vitro com linhagens de células tumorais humanas.

5 CONCLUSÃO

O estudo em questão demonstrou a presença de várias classes de metabólitos, sendo eles: Alcalóides, flavonóides, glicosídeos, terpenos, triterpenos e saponinas.

O teste de toxicidade aguda com *Arthemisia salina* Leach demonstrou baixa toxicidade com resultado da CL_{50} de $1395 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, indicando baixa toxicidade do extrato utilizado.

A análise da toxicidade aguda por via oral não causou mortalidade e nem morbidade a nenhum dos animais que receberam as doses testadas, sendo assim classificado na categoria 5 de acordo com o GHS e sua Dose Letal₅₀ (DL_{50}) foi estipulada $\geq 2000 \text{ mg}$ ($\geq 2000-5000$). Na análise histológica dos órgãos não foram observadas alterações, demonstrando a baixa toxicidade do extrato para órgãos e tecidos.

Quanto à análise antitumoral os resultados foram promissores. O EBHVC não provocou lesões nos órgãos (pulmão, rins e baço), nas doses utilizadas quando comparado ao padrão Cisplatina e demonstrou semelhança quanto aos percentuais de inibição. Outro achado importante da pesquisa diz respeito ao grau de invasividade do tumor quando comparado as diferentes doses (100 mg/Kg e 200 mg/Kg), demonstrando menor invasão e necrose tumoral com a dose mais elevada (200 mg/Kg).

REFERÊNCIAS

AFONSO, S.; MATOS, A.C.; MARENGO, V.A.; MOREIRA, E.G.; SOARES, D. X.; KOOLENC, H. H. F.; SCARMINIO, I. S. Seasonal Effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS Fingerprints and Analgesic Activities of *Vernonia Condensata* Baker Extracts. *J. Braz. Chem. Soc.*, V.26,p. 350-358, 2015.

Ajila, J.M. & Oloyede, Ganiyat. (2012). *Vernonia amygdalina* leaf extracts: A source of noncytotoxic antioxidant agents. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v.11. p.339-350, 2006.

ALMEIDA, A. et al. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Research*, v. 1448, p. 56-62, 2012.

ALVES, N. M. Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.), Universidade de Brasília, 2007.

AMARAL, E. A., SILVA, R. M. G. Avaliação da toxicidade aguda de Angico (*Anadenanthera falcata*), Pau-Santo (*Kilmeyera coreacea*), Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e Cipo-de-São-João (*Pyrostegia venusta*) por meio do bioensaio com *Artemia salina*. Perquirêre. 5ª ed., 2008.

Arene EO. 7,24(28)-stigmastadien-3 β -ol from *Vernonia amygdalina*. *Phytochemistry*. 1972;11:2886-7.

BEUTLER, A. N. et al. Agregação de Latossolo Vermelho distrófico típico relacionada com o manejo na região dos cerrados no Estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 25, n. 1, 2001.

BEZERRA, D.P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of applied toxicology*, v.28, p.156-163, 2008.

BEZERRA, D.P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of applied toxicology*, v.28, p.156-163, 2008.

COSTA, T. N. Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do *aspidosperma subincanum* (apocynaceae) em camundongos. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

Cristina E. Okuyama , Jose J. G. Bitencourt, Daniel A. F. Oliveira, Margarete S. Oliveira¹ , Rebecca S. S. Barbosa, Alexandra C. H. F. Sawaya, Marcos N. Eberlin. EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND CYTOTOXICITY OF EXTRACTS OF *Mikania laevigata* Schultz bip (Asteraceae). *Rev. Pesq. Inov*, v.3, p. 29-35,2011.

CRONQUIST, A. *The Evolution And Classification of Flowering Plants*, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, New York, USA, 1988.

DA COSTA JÚNIOR, J.S. et al. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. *Epilepsy & Behavior*, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011.

DA SILVA, J.B.; TEMPONI, V.S; GASPARETTO, C.M.; FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.O.; PINTO, N.C.C.; RIBEIRO, A.; TASCIO, E.; VIEIRA, G.M.V.; SOUSA, O.V.; ALVES, M.S. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising Source of Antioxidant. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013.

DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L.; SALDIVA, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.97-103, 1992.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1982. p. 209.

DE CARVALHO, G. P. Avaliação in vivo da atividade antitumoral extrato bruto etanólico e fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides*. Trabalho de conclusão de curso, Santa Catarina, 2012.

DESMARCHELIER, C. et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

ENSÃO, R.P.L.; SERRALHEIRO, M. L. Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves. *Rev. bras. Farmacogn*, v.26, p. 738-743, 2016. Erasto P, Grierson DS, Afolayan AJ. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;106:117-20.

GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; MACDONALD, M.M. *et al.* Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer chemotherapy Reports*, v.2, 1972.

GIRARDI, G. Breve História das Drogas. *Revista Galileu Especial*, n. 3, p. 6-7, Ed. Globo, 2003.

GRESHAM, L. J.; ROSS, J.; IZEVBIGIE, E.B. *Vernonia amygdalina*: Anticancer Activity, Authentication, and Adulteration Detection. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 5, p. 342-348, 2008.

GRESHAM, [L.J.](#); ROSS, [J.](#); IZEVBIGIE, [E. B.](#) *Vernonia amygdalina*: Atividade anticâncer, autenticação e detecção de adulteração. *Int J Environ Res Saúde Pública*, v.5, p. 342-348, 2015.

GUERRA, J. L. & MARIANO, M. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de ehrlich. 1983. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

HASSAN, M.M.; KHAN, S.A.; SHAIKAT, A.H.; EMRAN HOSSAIN, Md.; AHASANUL HOQUE, Md.; HASMAT ULLAH MD; ISLAM, S. Analgesic and anti-inflammatory effects of ethanol extracted leaves of selected medicinal plants in animal model. *Vet World*, vol.6, n.2, p.68-71, 2013.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reproductive Toxicology*, 1997.

RAMOS, J.O. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA E DO PERFIL FITOQUÍMICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE VERNONIA CONDENSATA BAKER E VERNONIA POLYANTHES LESS. 2014. Dissertação de Mestrado. Anápolis-Goiás.

KIPLIMO, J.J. Review on the Biological Activity and the Triterpenoids from the Genus *Vernonia* (Asteraceae Family). *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, vol.11, n.3, p. 1-14, 2016.

LAMBERTINI, E.; PIVA, R.; KHAN, M.T.; LAMPRONTI, I.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; *et al.* Efeitos de extractos de plantas medicinais Bangladesh sobre a proliferação *in vitro* de linhas celulares de cancro da mama humano e a expressão do gene de alfa receptor de estrogênio, *Int J Oncol.*, vol 24, p.419-423, 2004.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 181-196, 1999.

LIN, B.F.; CHIANG, B.L.; LIN, J.Y. *Amaranthus spinosus* extrato de água estimula diretamente a proliferação de linfócitos B *in vitro*. *Int Immunopharmacol*, vol.5, p.711-722, 2005.

LUO X, OYUGI DA, LIN C, IZEVBIGIE EB, LEE KS. Isolation and characterization of the antibreast carcinoma cell growth components of *Vernonia amygdalina* extracts. *Experimental Biology and Medicine*.,235:1472-8, 2010.

MABRY, T. J.; BOHLMANN, F. Summary of chemistry of Compositae. Cap. 41, 1097-1104. In: *The Biology and Chemistry of Compositae*. Eds. Heywood, V. H.; Harbone, J. B.; Turner, B. L. Academic Press, London, 1977.

MACLENNAN, K. M.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Progress in neurobiology*, v. 67, n. 3, p. 235-257, 2002.

MATSUZAKI, P.. Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffiapaniculata* sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. 2004. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MESQUITA, D.W.O.; MESQUITA, A.S.S.1; CURSINO, L.M.C.; SOUZA, E.S.; OLIVEIRA, A.C.; PINHEIRO, C.C.S.; NOVAES, J.A.P; OLIVEIRA, J.A.A.; NUNEZ, C.V.1. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.4, p.604-613, 2015.

MEYER, B.N.; FERRIGNI N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, vol. 45, n.1, p.31-34, 1982.

MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; APPEZZATO, B. G. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. *Brazilian archives of biology and technology an international journal*, V. 49, p. 135-144, 2006.

MONTEIRO, M.H.D.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.149–157, 2011.

MUSTARD, J. A. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. *Cellular and molecular life sciences*, v. 71, n. 8, p. 1375-1382, 2014.

NERY, L. H. R., Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c. 2004, 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

NOGUEIRA, I. A. L. Atividade antitumoral e antiangiogênica de *Synadenium umbellatum* Paxin vitro e in vivo. 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia, 2008.

OJIAKO, O. A., NWANJO, H. U. Is *Vernonia amygdalina* hepatotoxic or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (18), pp. 1648-1651, 18 September 2006.

PAGNO, T.; BLIND, L.Z.; BIAVATTI, M.W.; KREUGER, M.R.O. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, p. 1483-1491, 2006.

PALERMO, J.N., MASSOCO, C.O., SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behavior and Immunity*; v.17, p.:43-54, 2003.

PASSOS, C. S. et al. Terpenoids with activity in the central nervous system (CNS). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 333, 2003.

RIBEIRO, Ana Flávia de Carvalho. Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Toxicologia e Plantas Tóxicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2012.

RISSO, W.E. Estudo da atividade antinociceptiva e análise exploratória da composição química dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker [Dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2008.

RISSO, W.F.; SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 48, p. 811-816, 2010.

RIVERA VL. Estudos fitogeográficos em *Vernonia* Schreb. sensu lato (Asteraceae) no bioma Cerrado [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.

RODRÍGUEZ-CHÁVEZ, J. L.; URRUTIA, E.C.; SICILIA-ARGUMEDO, G.; RAMÍREZ-APAN, T., DELGADO, G. Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). [Journal of Ethnopharmacology](#), v.175, p.256-265, 2015.

SILVA, A. R.; SILVA, G. L. S.; REIS, S. A; PINTO, V. O.; GUEDES, A; SANTOS, I. F. M.. Triagem fitoquímica do extrato etanólico obtido das Folhas de alumã *Vernonia condensata* Baker. I Seminário de Iniciação Científica da Rede FTC, 2013.

SILVA, E. S. et al. Alterações comportamentais em ratos administrados com preparações da *Datura suaveolens*. VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde, v. 7, n. 1, p. 33-50, 2017.

SILVA, M. S.; ANTONIOLLI, A. R.; BATISTA, A. R. et al. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, p. 815-829, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRS/ UFS. 2010.

SOBRINHO, A.C.N.; SOUZA, E. B.; FONTENELLE, R.O.S. A review on antimicrobial potential of species of the genus *Vernonia* (Asteraceae) Multiplicação in vitro e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.11, p.342-348, 2008.

SOLOWEY, E.; LICHTENSTEIN M., SALLON, S.; PAAVILAINEN, H.; LORBERBOUM, H. Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. *The Scientific World Journal*, vol 4, p. 1-12, 2014.

TAYARANI-NAJARAN, Z.; et al. Antiemetic activity of volatile oil from *Mentha spicata* and *Mentha x piperita* in chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ecancer medical Science*, v.7, 2013.

TAYARANI-NAJARAN, Z.; et al. Antiemetic activity of volatile oil from *Mentha spicata* and *Mentha x piperita* in chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ecancer medical Science*, v.7, 2013.

THOMAS, E.; GOPALAKRISHNAN, V.; SOMASAGA, R.R.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S.C. Extract of *Vernonia condensata*, Inhibits Tumor Progression and Improves Survival of Tumorallograft Bearing Mouse. *Scientific Reports*, 2016.

TOYANG, [N. J.](#); VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). [Journal of Ethnopharmacology](#), v. 146, p.681-723, 2013.

TOYANGA, N.J.; ATEHB, E.N.; DAVISB, H.; TANEC, P.; SONDEGAMD, L.B.; BRYANT, J.; VERPOORTEF, R. In vivo antiprostata tumor potential of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) tuber extract (VGDE) and the cytotoxicity of its major

compound pentaisovaleryl sucrose. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 150, p.724–728, 2013.

VALADARES. M.C., QUEIROZ M.L.S. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂NCS₂ on the hematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. *Eur J Pharmacol*; v.439,p.35-42,2002.

VALVERDE, A. L.; CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A. et al.. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 263–264, 2001.

VAN DUONG HUYEN, J.P.; DELIGNAT, S.; BAYRY, J.; KAZATCHKINE, M.D.; BRUNEVAL, P.; NICOLETTI, A.; *et al.* A interleucina-12 está associada com efeito in vivo anti-tumoral de extratos de visco em melanoma B16 de rato. *Câncer Lett*, 2006.

VICENTE MAA. Multiplicação in vitro e aclimação de plantas medicinais (*Vernonia condensata* e *Justicia pectoralis*) [Dissertação]. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; 2008.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA,W.A.B.; CARVALHO, Z.S. Multiplicação in vitro e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.11, n.2, p.176-183, 2009.

VISACRI, M. B. Avaliação do uso da acetilcisteína na atenuação das toxicidades induzidas por cisplatina em pacientes com câncer de cabeça e pescoço em tratamento com quimioterapia e radioterapia: influência do estresse oxidativo. Tese de doutorado, Campinas, 2017.

WAGNER, H.; BLADT. S. *Plant drug analysis*. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

YOUNA, U.J.; MIKLOSSYB, G.; CHAIA, X.; WONGWIWATTHANANUKITC, S.; TOYAMAD, O.; SONGSAKE, T.; TURKSONB, J.; CHANGA, L.C. Bioactive sesquiterpene lactones and other compounds isolated from *Vernonia cinerea*. *Fitoterapia.*, vol.93, p.194–200, 2014.

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 12 de abril de 2018.

Ofício nº 14/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Ivone Antonia de Souza**
Departamento de Antibióticos
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0036/2017**

Certificamos que a proposta intitulada “**Análise histopatológica de tumor em modelo animal após tratamento com extrato hidroetanólico de vernonia condensata Baker**”. Registrada com o nº **0036/2017**, sob a responsabilidade de **Prof.ª Ivone Antonia de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril 2018 - agosto 2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogenio
Nº de animais	30
Peso/Idade	25-40g / 60 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos

Atenciosamente

Pedro V. Carelli

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584