



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HELBER ALVES NEGREIROS

**PERFIL TOXICOGENÉTICO E ANTITUMORAL DO ALFA-TERPINEOL EM
TESTES NÃO CLÍNICOS**

Fevereiro - 2019

TERESINA PI

HELBER ALVES NEGREIROS

**PERFIL TOXICOGENÉTICO E ANTITUMORAL DO ALFA-TERPINEOL EM
TESTES NÃO CLÍNICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Orientador (a): Prof^o. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

Fevereiro – 2019

Teresina/PI

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do CCS

N385p Negreiros, Helber Alves.
Perfil toxicogenético e antitumoral do alfa-terpineol em testes não clínicos /
Helber Alves Negreiros. -- Teresina, 2019.

123 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

"Orientação: Dr. João Marcelo de Castro e Sousa."

Bibliografia

1. Óleos essenciais. 2. Monotepenos. 3. Citotoxicidade. 4. Genotoxicidade.
5. Atividade antitumoral. I. Título.

CDD 615.1

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

HELBER ALVES NEGREIROS

**PERFIL TOXICOGENÉTICO E ANTITUMORAL DO ALFA-TERPINEOL EM
TESTES NÃO CLÍNICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Orientador)

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros - Picos

Profa. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Examinador Interno)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas | *Campus* Ministro Petrônio Portella - Teresina

Prof. Dr. Felipe Cavalcante Carneiro (Examinador Interno)

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros - Picos

Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima (Examinador externo)

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros - Picos

Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes (Examinador Externo)

Departamento de Biofísica e Fisiologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella - Teresina

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José, de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof.^a. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.^a. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

Dedico este trabalho a Deus, pois até aqui me sustentou; à minha família, pelo imenso incentivo e apoio, aos meus colegas de trabalho pela força e compreensão e, aos demais amigos e companheiros de laboratório pelo suporte por todo meu percurso até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Único e Inefável que é digno de receber a honra e a glória, a força e o poder, ao Rei eterno imortal, invisível, mas real, a Ele ministro o louvor, obrigado Deus;

Aos meus amados pais, Nemias de Sousa Negreiros e Iêda Alves Negreiros, minha querida e saudosa Avó Francisca Lima Rodrigues e meus estimados irmãos Walber Alves Negreiros e Kelber Alves Negreiros por toda base, amor, cuidado, incentivo e dedicação, tendo a certeza de que nunca desistiram de mim;

À minha amada esposa Elaine Karla Araújo Negreiros por ter suportado todo ônus da pesquisa, fazendo com alegria o que sabe de melhor: ser companheira;

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes, do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, através do Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes, e dos demais integrantes do corpo docente deste Programa de Pós-Graduação;

As minhas incríveis amigas Marlene Farias, Ana Rafaela Pereira, Layde Corrêa, Kariely Gonçalves e Rauene Sousa do Laboratório de Pesquisa I do campus Senador Helvídio Nunes de Barros. Também, em especial a Maria Luiza Lima Barreto do Nascimento, Lubna Karine Beserra Santos e José Victor de Oliveira do Laboratório de Genética Toxicológica, LAPGENIC;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Ao meu orientador e amigo, Prof^o. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa pela pessoa e profissional que é além de ser um super-power-big-mega-plus orientador dedicado, presente e que me incentivou a ingressar no mundo da pesquisa, bem como acreditou em meu potencial, somando assim com meu crescimento intelectual.

... Muito Obrigado !!!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	Dihidrocloridrato de 2, 2'- azobis 2 - metilpropinamida
AC	Alterações cromossômicas
AE17	Células cancerígenas de pulmão de rato
AKT	Proteína Quinase B
AP	Apoptose
A431	Carcinoma epidermóide (câncer de pele não melanoma)
A549	Carcinoma do pulmão humano
Bcl-XL	Linfoma de células B extra-grandes
Bcl-2	Família das proteínas linfoma de células B2
BEL-7402	Células de hepatoma
BN	Células binucleadas.
B16-F10	Linhagem celular tumoral murina
CBMN	Micronúcleos com bloqueio de citocinese
CL₅₀	Concentração Letal Média
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
C-6	Glioma de rato
DL₅₀	Dose letal mediana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXO	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBS	Soro bovino fetal
FD	Frequência de danos

HCl	Ácido clorídrico
HCT116	Linhagem celular de câncer de cólon humano
HeLa	Células do câncer cervical
HepG2	Hepatocarcinoma humano
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
ID	Índice de danos
IDN	Índice de divisão nuclear
IDNC	Índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade
IKKbeta	Ínibidor do fator nuclear kappa-B quinase da subunidade beta
IM	Índice mitótico
IP	Iodeto de propídio
JAK3	Janus quinase 3
JNK1	Janus quinase 1
LA	Laranja de acridina
MAPK8	Proteína cinase 8 ativada por mitógeno
MCF	Microscopia Confocal de Fluorescência
MN	Micronúcleos.
MRC-5	Fibroblasto normal humano
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa B
ORAC	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
S180	Sarcoma 180

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TE	Tempo de exposição
TR	Tamanho das raízes
T-47D	Células de câncer de mama humano
7-AAD	7-aminoactinomicina D
8-OHdG	8-hidroxi-deoxiguanosina
8-oxoGua	8-oxoguanina

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Isômeros comuns de terpineol, alfa, beta, gama, delta e terpinen-4-ol.....21
- Figura 2.** Divisão esquemática do corpo da dissertação.....23

LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 3:** Estrutura química de alguns constituintes monoterpênicos presentes em óleos essenciais.....32
- Figura 4:** Estrutura química do alfa-terpineol.....33
- Figura 5:** Biotransformação do alfa-terpineol em ratos.....34
- Figura 6:** Método esquemático utilizado para análise das células meristemáticas do *Allium cepa*.....42
- Figura 7:** Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae*.....43
- Figura 8:** Classificação de danos do DNA. Imagem visualizada em microscópio óptico por coloração com prata.....44
- Figura 9:** Vários parâmetros que podem ser analisados através do ensaio de CBMN.45

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Efeitos do alfa-terpineol diante de células tumorais e normais de camundongos. A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio MTT após 48 h de incubação de alfa-terpineol (5-500 µg/mL) em células B16-F10 (A) e células de macrófagos murinos (B). Veículo (DMSO 0,1%) e Doxorubicina (DOXO) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.....78
- Figura 2.** Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do alfa-terpineol sobre as raízes e células meristemáticas de *Allium cepa*.....80
- Figura 3.** Apoptose e necrose induzidas pelo alfa-terpineol em linfócitos humanos após 72h de exposição.....82
- Figura 4.** Avaliação da capacidade citotóxica do alfa-terpineol em células MRC-5 (fibroblasto normal de humano) através da marcação fluorescente em microscópio confocal.....83
- Figura 5.** Avaliação da atividade hemolítica do monoterpeneo alfa-Terpineol.....84

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao alfa-terpineol (100, 250 e 500 µg/mL).....104
- Figura 2:** Variação quantitativa dos tipos de dano (D0-D4) para o teste cometa em células de sarcoma 180 tratadas com alfa terpineol nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL.....106
- Figura 3:** Fragmentação de DNA de S180 avaliado por eletroforese em gel de agarose tratados com alfa terpineol nas concentrações de 100 E 500 µg/mL por 24h.....107
- Figura 4.** Apoptose e necrose induzidas pelo alfa-terpineol em cultura primária de S180, após 72h de exposição pelo teste de CBMN.....108
- Figura 5.** Perfil fotomicrográfico da linhagem de Sarcoma 180 tratados com alfa-terpineol (100, 250 e 500 µg/mL) analisadas por meio do teste de CBMN. Coloração com giemsa a 10% e aumento de 1000X ao microscópio óptico. BN: células binucleadas. MN: micronúcleos. AP: apoptose.....109
- Figura 6.** Citotoxicidade do alfa-terpineol (100 µg/mL) em linhagem de Sarcoma 180 analisadas por meio de Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) dupla coloração por iodeto de propídeo e laranja de acridina.....110
- Figura 7:** Avaliação da capacidade citotóxica do alfa-terpineol em células de S180 através da marcação fluorescente em microscópio confocal de fluorescência (MCF)..111
- Figura 8:** Determinação da citotoxicidade do alfa-terpineol, em diferentes concentrações, em células de sarcoma 180 através de citometria de fluxo por marcação de Anexina V PE e 7-AAD.....112
- Figura 9:** Mecanismo de ação do alfa-terpineol através do impedimento ou redução da translocação do NF-κB para o núcleo.....116

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1: Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizadas na terapia do câncer.....	28
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1. Descrição das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a serem utilizadas no estudo.....	76
---	----

Tabela 2. Atividade tóxica do alfa-Terpineol em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em <i>Artemia salina</i>	79
---	----

Tabela 3. Efeitos genotóxicos (índice de dano e frequência de dano) e avaliação de apoptose em células de linfócitos humanos através do bioensaio cometa versão alcalina	81
---	----

Tabela 4. Mutagenicidade e citotoxicidade causados pelo alfa-terpineol em linfócitos após 72h de exposição avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).....	82
--	----

Tabela 5. Avaliação oxidante/antioxidante do alfa-Terpineol em diferentes tratamentos com H_2O_2 utilizando linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutadas em enzimas antioxidantes. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).....	85
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Efeitos genotóxicos (índice de dano e frequência de dano) e avaliação de apoptose em células de sarcoma 180 através do bioensaio cometa versão alcalina.....	118
---	-----

Tabela 2. Mutagenicidade e citotoxicidade causados pelo alfa-terpineol em Sarcoma 180 após 72h de exposição avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.....	111
--	-----

SUMÁRIO

ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3 REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1 O uso de plantas medicinais e a investigação de suas atividades farmacológicas	25
3.2 Câncer e atividade antitumoral	29
3.3 Óleos essenciais	30
3.4 Monoterpenos e alfa-terpineol	31
3.5 Toxicologia de compostos naturais	35
3.6 Bioensaios para avaliação toxicogenética <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	37
3.6.1 Ensaio para estudos de viabilidade celular.....	38
3.6.2 Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	40
3.6.3 Teste de <i>Allium cepa</i>	41
3.6.4 Teste do disco central em <i>S. cerevisiae</i>	42
3.6.5 Ensaio cometa versão alcalina.....	43
3.6.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).....	44
3.6.7 Ensaios de avaliação da viabilidade celular e determinação de apoptose/necrose em linhagens celulares.....	46
3.6.8 Linhagem de células cancerígenas de Sarcoma 180	48
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO I	66
RESUMO	67
ABSTRACT	68
1 INTRODUÇÃO	68
2 METODOLOGIA	69
2.1 Produtos químicos	69
2.2 Animais	70
2.3 Cultura de células	70

2.4 Ensaio de viabilidade celular MTT	70
2.5 Determinação da citotoxicidade em macrófagos	71
2.6 Bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	71
2.7 Teste de <i>Allium cepa</i>	72
2.8 Ensaio cometa	72
2.9 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)	73
2.9.1 IDN e IDNC dos grupos testados no teste de CBMN	73
2.10 Quantificação da apoptose usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) com dupla coloração por iodeto de propídio e laranja de acridina	74
2.11 Hemólise	75
2.12 Teste do disco central em <i>S. cerevisiae</i>	75
2.12.1 Linhagens de leveduras utilizadas.....	75
2.13 Análise estatística	77
3. RESULTADOS	77
3.1 Avaliação da citotoxicidade do alfa-terpineol em MTT	77
3.2 Avaliação da toxicidade do alfa-terpineol em <i>Artemia salina</i>	78
3.3 Efeitos toxicogénicos do alfa-terpineol em <i>A. cepa</i>	79
3.4 Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade do alfa-terpineol	81
3.5 Avaliação da mutagenicidade do alfa-terpineol	81
3.6 Quantificação da apoptose usando dupla coloração por iodeto de propídio e laranja de acridina	83
3.7 Efeito hemolítico do alfa-terpineol	83
3.8 Avaliação do poder oxidante/antioxidante do alfa-terpineol em <i>S. cerevisiae</i>	84
4. DISCUSSÃO	86
5. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
CAPÍTULO II	95
RESUMO	96
ABSTRACT	97
1. INTRODUÇÃO	97
2. MÉTODOS	99

2.1 Reagentes químicos utilizados no estudo	99
2.2 Cultura primária de Sarcoma 180.....	99
2.3 Teste de viabilidade celular por azul de tripan em cultura primária de S180.....	99
2.4 Teste de genotoxicidade de ensaio cometa	99
2.5 Análise de Fragmentação de DNA Usando Eletroforese em Gel de Agarose.....	100
2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).....	100
2.6.1 Teste de citotoxicidade pelo IDN e IDNC dos grupos testados no teste de CBMN	101
2.7 Quantificação da apoptose usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) com dupla coloração por iodeto de propídio e laranja de acridina	102
2.8 Teste da viabilidade celular por citometria de fluxo	102
2.9 Análise estatística	103
3. RESULTADOS.....	103
3.1 Citotoxicidade pela viabilidade por azul de tripan em células de Sarcoma 180.....	103
3.2 Genotoxicidade e citotoxicidade do alfa-terpineol pelo teste cometa.....	104
3.3 Efeitos apoptóticos do alfa-terpineol por fragmentação de DNA em gel.....	105
3.4 Efeitos citogenéticos do alfa-terpineol em S180 avaliados por CBMN	106
3.5 Efeitos apoptóticos e necróticos do alfa-terpineol usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF).....	109
3.6 Efeitos citotóxicos do alfa-terpineol pela viabilidade celular por citometria de fluxo.....	110
4. DISCUSSÃO.....	112
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
6. REFERÊNCIAS.....	116
ANEXO A – Carta de aceite para manutenção do Sarcoma 180	121

Perfil toxicogenético e antitumoral do alfa-terpineol em testes não-clínicos. HELBER ALVES NEGREIROS. Orientador: Dr. João Marcelo de Castro e Sousa. 121p. Qualificação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2019.

RESUMO

O alfa-terpineol é um álcool monoterpeneo constituinte de óleos essenciais de várias plantas medicinais com diferentes atividades farmacológicas. O estudo teve por objetivo a avaliação toxicogenética e antitumoral do alfa-terpineol em células tumorais murinas (B16-F10 e Sarcoma 180) bem como em células não tumorais (macrófagos murinos, linfócitos e fibroblastos humanos, hemácias e em *Allium cepa*), com aplicação de biomarcadores citogenéticos e de morte celular. A toxicidade do alfa-terpineol avaliada por *Artemia salina*, nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL mostrou-se alta nas quatro primeiras concentrações. No teste de hemólise em 1500, 750, 325 e 162 µg/mL não teve efeito hemolítico. O alfa-terpineol no teste do MTT (500, 50 e 5 µg/mL) induziu citotoxicidade pela redução da viabilidade celular de células B16-F10, porém, em macrófagos esse efeito não foi observado. No estudo toxicogenético/mutagênico em *A. cepa*, o alfa-terpineol em 10, 50 e 100 µg/mL foi citotóxico pela diminuição do tamanho da raiz e do índice mitótico, bem como mutagênico, pelo aumento do número de alterações crossômicas. Em leveduras mutadas em defesas antioxidante apenas em baixas concentrações (10, 35 e 75 µg/mL) não teve efeitos oxidantes. Em células de Sarcoma 180, o alfa-terpineol em 100, 250 e 500 µg/mL também foi citotóxico, reduzindo a viabilidade celular para 50,9; 38,53; 30,82%, respectivamente. Além disso, foi também indutor de apoptoses pela fragmentação de DNA em gel. Em células de fibroblastos – MRC5 nas concentrações de 100 e 500 µg/mL pelo teste de viabilidade por fluorescência não apresentou citotoxicidade. Em linfócitos humanos o composto foi genotóxico, pelo aumento do índice e frequência de dano nas concentrações de 250 e 500 µg/mL e nutagênico em 500 µg/mL, pelo aumento de micronúcleos, pontes e brotos nucleares no teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. De forma mais específica, em relação a morte celular, utilizando a citometria de fluxo com marcação para Anexina V e 7AAD, o número de células vivas de sarcoma diminuiu significativamente de 92% (controle negativo) para 19%, 8% e 3,5% nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, respectivamente. Ademais, por microscopia de fluorescência, a menor concentração (100 µg/mL) demonstrou efeito citotóxico nas células de sarcoma 180, quando comparado ao controle negativo. O estudo aponta que os efeitos antitumorais do alfa-terpineol podem ser explicados por mecanismos citogenéticos e moleculares indicativos de aneugenicidade/clastogenicidade e apoptoses. Assim, em perspectiva, o alfa-terpineol pode ser testado em formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chaves: Óleos essenciais. Monoterpeneos. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

Alpha-terpineol is a monoterpene alcohol constituent of essential oils of various medicinal plants with different pharmacological activities. The aim of the study was the toxicogenic and antitumor evaluation of alpha-terpineol in murine tumor cells (B16-F10 and Sarcoma 180) as well as in non-tumor cells (murine macrophages, lymphocytes and human fibroblasts, red cells and *Allium cepa*) cytogenetic biomarkers and cell death. The toxicity of alpha-terpineol evaluated by *Artemia salina* at concentrations of 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was high in the first four concentrations. In the hemolysis test at 1500, 750, 325 and 162 $\mu\text{g} / \text{mL}$ had no hemolytic effect. Alpha-terpineol in the MTT test (500, 50 and 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) induced cytotoxicity by reducing the cell viability of B16-F10 cells, but in macrophages this effect was not observed. In the toxicogenic / mutagenic study in *A. cepa*, alpha-terpineol at 10, 50 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was cytotoxic due to the decrease in root size and mitotic index as well as mutagenicity due to the increase in the number of cross-changes. In yeast mutated in antioxidant defenses only at low concentrations (10, 35 and 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$) had no oxidizing effects. In Sarcoma 180 cells, alpha-terpineol at 100, 250 and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was also cytotoxic, reducing cell viability to 50.9; 38.53; 30.82%, respectively. In addition, it was also inducer of apoptosis by gel DNA fragmentation. In cells of fibroblasts - MRC5 at concentrations of 100 and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ by the fluorescence viability test did not present cytotoxicity. In human lymphocytes the compound was genotoxic, by increasing the index and frequency of damage in the concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and mutagenic in 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, by the increase of micronuclei, bridges and nuclear buds in the test of micronuclei with block of cytokinesis. More specifically, in relation to cell death, using flow cytometry with Annexin V and 7AAD labeling, the number of live sarcoma cells decreased significantly from 92% (negative control) to 19%, 8% and 3.5 % at concentrations of 100, 250 and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. In addition, by fluorescence microscopy, the lower concentration (100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) demonstrated a cytotoxic effect on sarcoma 180 cells, when compared to the negative control. The study points out that the antitumor effects of alpha-terpineol can be explained by cytogenetic and molecular mechanisms indicative of aneugenicity / clastogenicity and apoptosis. Thus, in perspective, alpha-terpineol can be tested in antitumor pharmaceutical formulations.

Key-words: Essential oils. Monoterpenes Cytotoxicity Genotoxicity Antitumor activity.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais e a fitoterapia fazem parte da prática da medicina popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral (BRUNING et al., 2012). A partir de seu emprego pelas comunidades, pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre as plantas. Dessa forma, podemos planejar a pesquisa a partir de conhecimento empírico já existente, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, que deverá ser testado em bases científicas com o objetivo de avaliar a toxicologia desses produtos bem como analisar suas potencialidades farmacológicas (BRASILEIRO et al., 2008).

Os vegetais se apresentam como fonte de princípios ativos com ação farmacológica e, seu estudo têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários (FIRMO et al., 2012). Sendo assim, a descoberta de medicamentos à base de plantas medicinais resultou principalmente no desenvolvimento de agentes anti-infecciosos e antitumorais e continua a contribuir para a entrada de novos compostos na indústria farmacêutica (SILVA, 2015).

A descoberta de fármacos antineoplásicos (derivados de produtos naturais e especiarias) de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área de oncologia farmacológica, tornando-se importante a informação sobre os aspectos bioquímicos, químicos, biológicos e toxicogenéticos de produtos herbáceos com potencial para desestruturar a maquinaria das células cancerosas (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O câncer é uma doença causada por danos ou mutações no material genético das células devido a fatores ambientais ou hereditários (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). Ele é uma das principais causa de morte e a única barreira mais importante para aumentar a expectativa de vida em todos os países do mundo no século XXI. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, o câncer é a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em 91 dos 172 países, e ocupa o terceiro ou quarto lugar em outros 22 países (BRAY et al., 2018).

Há uma estimativa de 18,1 milhões de novos casos de câncer (17 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de mortes por câncer (9,5

milhões excluindo câncer de pele não melanoma) em 2018. Em ambos os sexos combinados, o câncer de pulmão é o câncer mais comumente diagnosticado (11,6% do total de casos) e a principal causa de morte por câncer (18,4% do total de óbitos por câncer), seguido de perto por câncer de mama feminino (11,6%), câncer de próstata (7,1%) e câncer colorretal (6,1%) câncer colorretal (9,2%) para incidência, câncer de estômago (8,2%) e câncer de fígado (8,2%) para mortalidade (GERSTEN; WILMOTH, 2006; MAULE; MERLETTI, 2012; BRAY et al., 2018).

Embora a cirurgia e a radioterapia sejam o tratamento primário usado para cânceres locais e não-metastáticos, as drogas anticâncer são a escolha atualmente usada em cânceres metastáticos. A quimioterapia baseia-se na inibição da divisão das células de rápido crescimento, característica das células cancerosas. Esses quimioterápicos bloqueiam vias de transdução biológica e/ou proteínas específicas de câncer para induzir a morte de células cancerígenas por meio de apoptose, bem como por efeitos pró-oxidantes antineoplásicos (FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015; MÖHLER; PFIRMAN). Porém, a destruição indiscriminada de células normais, a toxicidade dos fármacos quimioterapêuticos convencionais, bem como o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas, apoiam a necessidade de encontrar novos compostos com base nas alterações na biologia molecular das células tumorais (FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

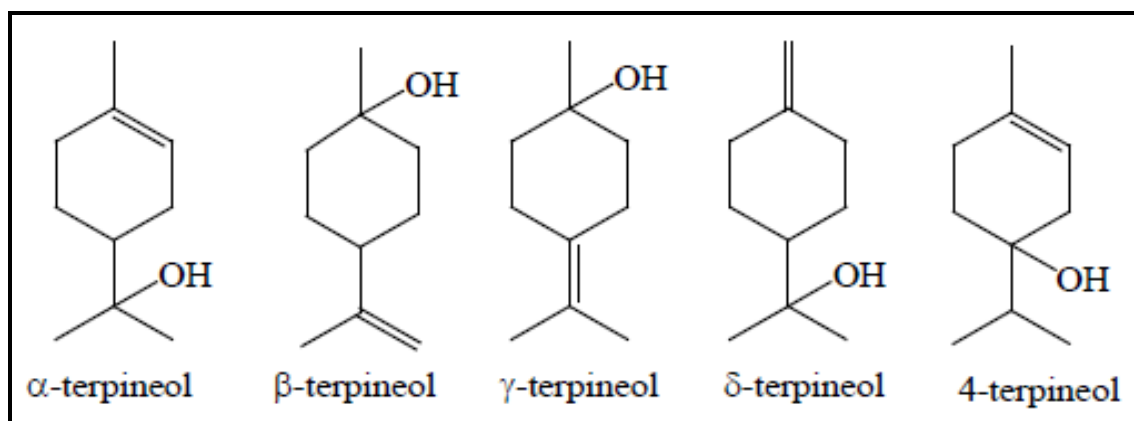
Mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer. Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores sólidos como os sarcomas ainda não dispõem de tratamento adequado. (COSTA-LOTUFO et al., 2010; BUTLER et al., 2008). Existe um potencial extraordinário para a descoberta de fármacos anticâncer de ocorrência natural em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação bem como de potencialidades toxicogenéticas já confirmadas na literatura científica para alguns compostos vegetais. Até o momento, calcula-se que menos de 2% das plantas superiores foram analisadas para detecção de constituintes com atividade antineoplásica e mesmo assim, buscando apenas a atividade citotóxica (ZHANG, 2002).

Explorar produtos vegetais naturais como uma opção para encontrar novas substâncias químicas como agentes anticancerígenos é uma das áreas de pesquisa que

mais crescem (FREI, 2014). Recentemente, na última década, os óleos essenciais vêm sendo estudados para seu uso na terapia do câncer. Sua composição é formada basicamente de monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos sendo oxigenados ou não, fenóis, álcoois simples, cetonas, ésteres, laquitonas e cumarinas (GAUTAM et al., 2014).

Dentre os constituintes de óleos essenciais, os terpenoides são uma rica fonte metabólica com estratégia de defesa das plantas contra insetos herbívoros. Eles são álcoois terciários monoterpênicos monocíclicos que estão naturalmente presentes em espécies de plantas. Existem cinco isômeros comuns de terpineol, alfa, beta, gama, delta e terpinen-4-ol, dos quais o alfa-terpineol e seu isômero terpinen-4-ol são os terpineois mais comuns encontrados na natureza (**Figura 1**). O alfa-terpineol desempenha um papel importante no campo industrial. Tem um odor agradável e é um ingrediente muito comum em perfumes, cosméticos e aromatizantes (AGLIASSA; MAFFEI, 2018; KHALEEL et al., 2018), o que torna, importante estudos que avaliem suas propriedades toxicológicas a nível celular já que o mesmo é utilizado pela população.

Figura 1 - Isômeros comuns de terpineol, alfa, beta, gama, delta e terpinen-4-ol.



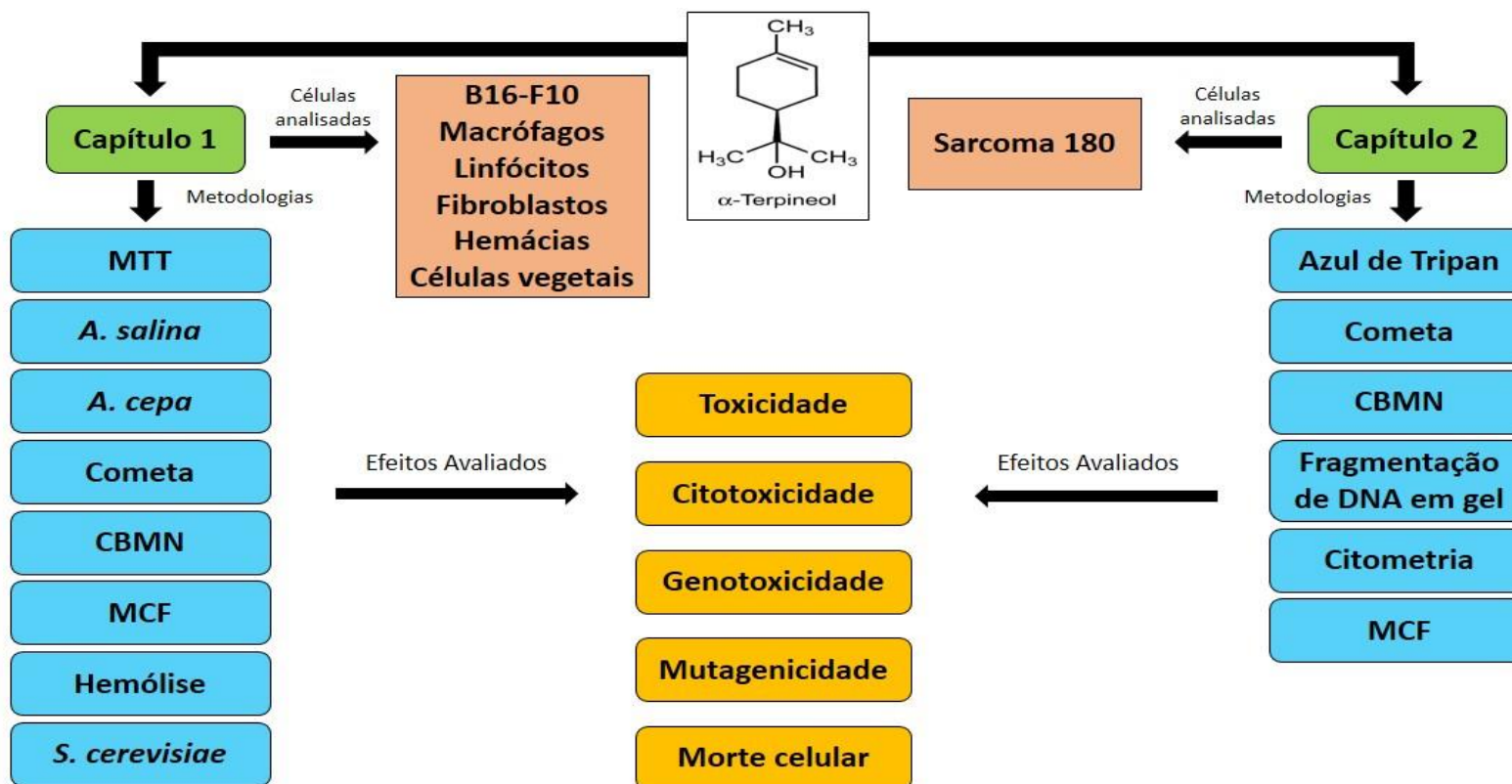
Fonte: (KHALEEL et al., 2018).

O alfa-terpineol já demonstrou em estudo prévio atividade antitumoral contra linhagens cancerígenas de carcinoma de pulmão de pequenas células (NCI-H69), mama (MCF-7), colorretal (HCT-8, SW620, HCT-116 e HT-29), leucemia mielóide crônica (K-562), além de suprimir a expressão de NF-kB que pode desempenhar um papel importante na inibição do crescimento de células tumorais. Além disso, sua atividade citotóxica efetiva mostra um efeito promissor para o tratamento de pacientes com

tumores resistentes a drogas ou tumores sólidos devido aos efeitos limitados de resistência representados por alfa-terpineol (HASSAN et al., 2010).

No capítulo I foram utilizados células tumorais murina (B16-F10), células normais de macrófagos murino, linfócitos e fibroblastos humanos, hemácias de cachorro e células vegetais de *Allium cepa* para avaliação citotóxica, genotóxica/mutagênica e apoptótica e oxidantes pelos testes de MTT, *A. salina*, *A. cepa*, Cometa, CBMN, Fragmentação de DNA em gel, Microscopia Confocal por Fluorescência (MCF), Hemólise e teste de disco central com *S. cerevisiae*. No capítulo II foi utilizado células de Sarcoma 180 empregadas nos testes de viabilidade por azul de tripan, Cometa, CBMN, Fragmentação de DNA em gel, Citometria de Fluxo e Microscopia Confocal por Fluorescência (MCF). Assim, tendo em vista a necessidade de compreender os possíveis efeitos tóxicos/genotóxicos e antitumoral do alfa-terpineol em estudos não clínicos (**Capítulo I**); assim como os efeitos antitumorais do monoterpene alfa-terpineol em modelo animal de sarcoma 180 (**Capítulos II**), como apresentado na **Figura 2**.

Figura 2. Divisão esquemática do corpo da dissertação.



2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar os efeitos toxicogênicos e antitumorais do alfa-terpineol com aplicação de biomarcadores citogenéticos e de morte celular em estudos não clínicos.

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos e citotóxicos do alfa-terpineol em *Artemia salina* e teste do MTT, bem como sua toxicidade/citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em meristemas de raízes de *Allium cepa*;
- Observar os efeitos oxidantes/antioxidantes do alfa-terpineol utilizando *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas oxidantes;
- Avaliar a atividade citotóxica e genotóxica do alfa-terpineol, pela viabilidade celular e danos ao DNA em linfócitos humanos e sarcoma 180.
- Avaliar a atividade mutagênica do alfa-terpineol em células de linfócitos humanos e de sarcoma 180 por mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade, alterações nucleares (brotos, pontes nucleoplasmáticas, micronúcleo), apoptose e necrose.
- Avaliar a viabilidade celular e determinação de apoptose e/ou necrose em linfócitos humanos e sarcoma 180, por citometria de fluxo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O uso de plantas medicinais e a investigação de suas atividades farmacológicas

O uso de plantas medicinais foi o primeiro recurso terapêutico utilizado para o cuidado da saúde dos seres humanos e de sua família, sendo, portanto, um conhecimento milenar que faz parte da história humana, pois antes mesmo do aparecimento da escrita as pessoas já faziam o uso de plantas como medicamento (BARRETO et al., 2015).

Nos séculos de colonização, a utilização de plantas medicinais para tratamento das patologias era feita somente por tribos indígenas e os seus pajés (ELDIN; DUNFORD, 2001). A população em geral utilizava medicamentos provenientes de importações, especialmente da Europa. Não existia, ademais, um conhecimento em relação ao correto armazenamento das plantas, a fim de preservar suas propriedades medicinais, ou seja, seus princípios ativos (MARTINS et al., 2000).

Entretanto, a história da utilização de plantas, no Brasil, em relação ao tratamento de doenças, apresenta influências marcantes das culturas africana, indígena e europeia. A contribuição dos escravos africanos para a tradição do uso de plantas medicinais se deu por meio das plantas que trouxeram consigo, as mesmas eram utilizadas em rituais religiosos, e por suas propriedades farmacológicas, empiricamente descobertas (DA CRUZ MONTEIRO et al., 2017). Já os milhares de índios que aqui viviam utilizavam uma imensa quantidade de plantas medicinais que existem na biodiversidade brasileira. Os pajés transmitiam o conhecimento acerca das ervas locais, e seus usos foram aprimorados a cada geração. Já os primeiros europeus que chegaram ao Brasil se depararam com esses conhecimentos, que foram absorvidos por aqueles que passaram a habitar o país e a sentir a necessidade de viver do que a natureza lhes tinha a oferecer, e também pelo contato com os índios (DA CRUZ MONTEIRO et al., 2017).

Dessa forma, uma gama de conhecimentos ligados à prática da saúde, acumulada por séculos começou a ser passada para as gerações e por fim, difundida até nossos dias. Porém, apesar da grande diversidade ainda presente na flora medicinal, o que vem ocorrendo é uma diminuição de incentivos e iniciativas para a continuidade do cultivo e a utilização de plantas como tratamento (BRUNING et al., 2012).

Assim, como estratégia de incentivo na investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto a usuários

da flora medicinal (comunidades e especialistas tradicionais), com estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY, 2003). Por conseguinte, a etnofarmacologia pode ser uma ferramenta importante na recuperação do conhecimento milenar e secular e, até mesmo, recursos terapêuticos naturais contemporâneos, o que permite combinar o conhecimento empírico e os conhecimentos científicos, facilitando a descoberta de novos agentes biologicamente ativos, através da redução do tempo e custo de triagem farmacológica e toxicológica (LEITÃO e DE OLIVEIRA, 2014).

Atualmente a Terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas é chamada de fitoterapia sendo ainda bastante utilizada de forma eficaz em atendimento primário a saúde, com finalidade preventiva ou curativa de patologias (BETTEGA et al., 2011; SOUSA et al., 2011; BRUNING et al., 2012). A fitoterapia, como ciência, é a área do conhecimento que busca o tratamento das doenças através das plantas medicinais, sendo amplamente difundida através de raizeiros, curandeiros e/ou nativos de uma determinada região. Neste contexto, as plantas medicinais são utilizadas sob diversas formas, desde chás, infusões, banhos até preparações mais elaboradas como extratos, tinturas, soluções, xaropes, cremes, pomadas, comprimidos, cápsulas, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

Além disso, essas diversas formas de preparo, uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (ARNOUS et al., 2005). Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em costume a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (DA COSTA; DA SILVA, 2014). Por isso, de maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a flora mundial (MACIEL et al., 2002). Assim, podemos planejar a pesquisa a partir do conhecimento empírico, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, que deverá ser testado em bases científicas por meio da experiência, da observação e da investigação (BRASILEIRO et al., 2008).

A intensa investigação científica sobre atividade biológica de plantas medicinais tem sido o alvo de vários estudos, proporcionando uma importante fonte de novos compostos farmacologicamente ativos (DE SOUZA ELLER et al., 2015). Tais plantas constituem uma

imensa fonte de compostos de ampla atividade biológica e sua utilização, principalmente no tratamento de diversas doenças, representando uma grande contribuição para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Entretanto, muitas são as espécies vegetais que ainda carecem de estudos (PORFIRIO et al., 2009).

Dentre essa considerável quantidade de espécies ainda não estudadas, estudos farmacológicos de produtos naturais permitem caracterizar e comprovar a eficácia e a toxicidade de plantas de uso popular. Além disso, certifica os efeitos colaterais, relacionando esses efeitos às doses e a um possível mecanismo de ação em várias espécies de animais de laboratório (BALBINO; DIAS, 2010; CORREA et al., 2010). Esses estudos em plantas medicinais na forma de extratos vegetais brutos, frações ou princípios ativos puros proporcionam resultados preliminares que norteiam a pesquisa (SIXEL; PECINALLI, 2013). Também, estudos farmacológicos, pré-clínicos e clínicos, têm gerado um grande número de dados sobre a eficácia e segurança de plantas de emprego tradicional, conduzindo a uma revisão de seu uso (GASPARETTO et al., 2010).

Na investigação farmacológica, a busca por metabólitos secundários produzidos por plantas, melhor conceituados como metabólitos especiais, têm um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos fabricados por síntese (VIEGAS et al., 2009).

Um bom exemplo de algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes advindos de fontes naturais, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças são a morfina, quinina, cânfora e cocaína (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Uma vez conhecendo o potencial das plantas medicinais, muitos compostos bioativos constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína, cloroquina e tropicamida. Depois da descoberta destes medicamentos de origem vegetal, é possível entender a corrida entre algumas indústrias transnacionais pela busca de substâncias bioativas novas (PINTO et al., 2002).

Além disso, em uma abordagem mais específica aos medicamentos, os antineoplásicos também estão intimamente relacionados aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância sua origem relacionada a uma fonte natural (**Tabela 1**). Porém, a grande heterogeneidade das células tumorais dificulta o tratamento e

facilita a manifestação de resistência, fatores que estimulam a pesquisa por novos quimioterápicos (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Tabela 1: Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.

Fármaco	Fonte	Alvo Molecular	Indicações terapêuticas
Vimblastina vincristina vindesina vinorelbina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Paclitaxel Docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina Etoposídeo Teniposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda;
Camptotecina Topotecano Irinotecano	<i>Camptotheca Accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon

Fonte: COSTA-LOTUFO et al., 2010.

A descoberta de novos antineoplásicos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. A busca por medicamentos anticancerígenos tem aumentado com vistas a se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (ALTMANN; GERTSCH, 2007).

Essa variedade de mecanismos contido nos compostos bioativos faz com que as plantas sejam consideradas fonte nobre de moléculas para o tratamento de várias formas de câncer e, mesmo que a molécula isolada do vegetal não possa ser usada diretamente como medicamento, pode servir de modelo para síntese ou para gerar um pró-fármaco para o desenvolvimento de novos agentes (BRANDÃO et al., 2010). Portanto, há necessidade de agilizar detalhes etnobotânicos, estudos farmacológicos, toxicológicos e clínicos sobre as plantas medicinais inexploradas, o que poderia levar ao desenvolvimento de drogas seguras e novas, com ênfases para atividades antitumorais (TARIQ et al., 2018).

3.2 Câncer e atividade antitumoral

O câncer é uma doença na qual as células acumulam alterações genéticas que, acredita-se, conferir uma vantagem clonal sobre as células do tecido circundante (VERMEULEN et al., 2013). Essas células podem invadir e se espalhar para locais distantes do corpo, as quais podem promover consequências graves para a saúde (LOURO, 2000). Seu acometimento, na maioria dos casos, ocorre por fatores hereditários e ambientais. Também, um estudo recente destacou o papel proeminente no câncer de mutações replicativas que surgem de uma terceira fonte: erros inevitáveis associados à replicação do DNA (TOMASETTI et al., 2017).

Em 2015, houve 17,5 milhões de casos de câncer em todo o mundo e 8,7 milhões de mortes. Entre 2005 e 2015, 16% dos casos de câncer aumentaram com o envelhecimento da população contribuindo com, o crescimento populacional em 13% e as mudanças nas taxas específicas por faixa etária contribuindo com 4%, perfazendo um total de 33%. Embora esses números impressionantes sejam o testemunho de que a “guerra contra o câncer” não foi vencida, os esforços na medicina e novas abordagens de tratamento têm surgido para tentar diminuir esses números (FITZMAURICE et al., 2017).

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico e a quimioterapia. Na década de setenta estas formas clássicas de abordagem sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamento adjuvante. O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos, incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Entre todos esses métodos, a quimioterapia é o método mais comumente usado para tratar o câncer metastático (JI et al., 2010).

A quimioterapia constitui uma das modalidades de maior escolha para produzir cura e palição. A quimioterapia envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por via sistêmica e pode ser classificada de acordo com a sua finalidade como: quimioterapia neoadjuvante, quimioterapia primária, quimioterapia paliativa, monoquimioterapia e poliquimioterapia (SPENCE; JOHNSTON, 2003). Nos últimos anos, a quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas e alguns tipos de

tumores sólidos, em especial os derivados de células germinais (COSTA-LOTUFO et al., 2010). É importante ressaltar que muitos desses agentes anticancerígenos são constituintes ativos isolados de ervas medicinais. Por isso, o conhecimento etnofarmacológico é útil para liderar a pesquisa de plantas com potencial atividade antitumoral, a fim de buscar novos produtos naturais (RUFFA et al., 2002).

O estudo de produtos naturais como fonte de novos agentes anticâncer com a capacidade de causar apoptose, parada do ciclo celular e dano oxidativo ao DNA, torna-se de grande importância, pois mesmo devido à grande quantidade de drogas já existente para o tratamento de neoplasias, ainda não se chegou a um composto ideal que tenha maior seletividade, menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência (LIMA, 2015). Entre as abordagens tradicionais alternativas, vários produtos vegetais classificados como alcaloides, saponinas, monoterpenos, triterpenos, glicosídeos e polifenóis mostraram propriedades anticancerígenas muito promissoras tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PRAKASH et al., 2013; GAUTAM et al., 2014).

Assim, os produtos herbáceos têm sido utilizados na forma de extratos, aleloquímicos puros ou óleos essenciais na pesquisa contra o câncer, com objetivo de ampliar ainda mais a busca por novos antineoplásicos, pois os mesmos são economicamente viáveis, biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade contra os mamíferos, além de possuir alta seletividade e baixa fitotoxicidade (CORRÊA SALGADO, 2011; GOMES et al., 2012).

3.3 Óleos essenciais

Explorar produtos vegetais naturais como uma opção para encontrar novos agentes antitumorais é uma das áreas de pesquisa que mais crescem. Recentemente, na última década, os óleos essenciais vêm sendo estudados para indicar seus constituintes como agentes anticancerígenos (GAUTAM et al., 2014). Eles são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules das plantas através de processos adequados de extração (MORAIS et al., 2006).

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e microondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação que se divide

em duas técnicas – arraste a vapor (CRAVEIRO et al., 1981) e coação (SANTOS et al., 1998).

Os óleos essenciais extraídos de diferentes órgãos de muitos espécimes são constituídos principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos (por exemplo, α -pineno, mirceno, limoneno, α -terpineno, p-cimeno), monoterpenoides oxigenados (por exemplo, α -terpineol, 1,8-cineole, linalol, terpinen-4-ol, borneol, cânfora), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (por exemplo, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, α -cubebeno), sesquiterpenóides oxigenados (por exemplo, espatulenol, (E)-nerolidol, óxido de cariofileno, α -cadinol, epi- α -bisabolol) e fenilpropanoides (por exemplo, safrol, dillapiole, miristicina, elemicina, (Z)-asarona, eugenol), todos com atividades e mecanismos relacionados as diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal (NASCIMENTO et al., 2012; PAZ et al., 2017).

Vários mecanismos como aumento da função imunológica e da vigilância, indução enzimática e aumento da desintoxicação, modulação da resistência a múltiplos fármacos e mecanismo sinérgico de constituintes voláteis são responsáveis por suas propriedades quimiopreventivas. Os mecanismos mais estudados envolvidos no tratamento do câncer são: antioxidante, antimutagênico, antiproliferativo, ativação de enzimas de desintoxicação, modulação da sinalização de reparo de DNA, antimetástase e antiangiogênese. Múltiplas vias estão envolvidas na atividade antiproliferativa demonstrada pelos óleos essenciais nas células cancerígenas e são até efetivos na redução de tumores em modelos animais. (BHALLA et al., 2013; GAUTAM et al., 2014).

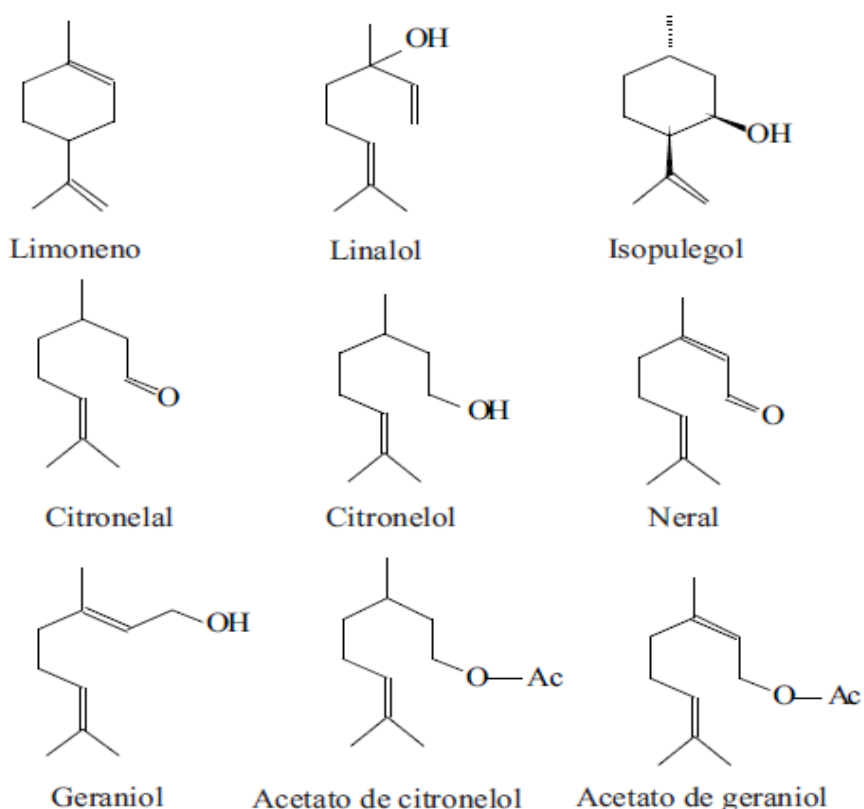
Considerando que os monoterpenos são comuns em muitas espécies de plantas e são usados em preparações cosméticas e farmacêuticas, bem como na indústria de alimentos, é importante estudar o potencial toxicológico e farmacológico dos monoterpenos com atividade anticancerígena (SOBRAL et al., 2014).

3.4 Monoterpenos e alfa-terpineol

Os monoterpenos são componentes dietéticos não nutritivos encontrados nos óleos essenciais de frutas cítricas e outros vegetais. Funcionam fisiologicamente como quimiotáticos ou quimiorrepelentes e são amplamente responsáveis pela fragrância distinta de muitas plantas (CROWELL, 1999).

Os monoterpenos pertencem à classe dos terpenoides de produtos naturais e são biossintetizados através da via do ácido mevalônico. Seu pequeno peso molecular acoplado à alta natureza não polar os torna os componentes mais abundantes de óleos essenciais e são construídos a partir de unidades repetitivas de blocos básicos de 5 carbonos chamados isoprenos. Eles existem como hidrocarbonetos ou como partes oxigenadas com funcionalidades de aldeído, álcool, cetona, éster e éter. Além disso, eles podem ter estrutura acíclicas, monocíclicas, bicíclicas ou tricíclicas (DEWICK, 2002; THOLL, 2015; HABTEMARIAM, 2017) (**Figura 3**).

Figura 3: Estrutura química de alguns constituintes monoterpênicos presentes em óleos essenciais.



Fonte: GUILHON DE CASTRO et al., 2010.

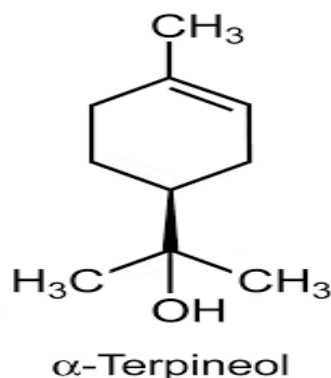
O isolamento dos monoterpenos primeiramente se dar por procedimentos de extração e destilação. Monoterpenos individuais são geralmente identificados nestes óleos essenciais pelas técnicas tradicionais como ponto de ebulição, ponto de fusão, índice de refração, atividade óptica, densidade, análise elementar, solubilidade, testes de reação química e dados espectrais através de espectroscopia de massa, absorção de infravermelho e espectroscopia de

ressonância magnética nuclear (RMN) do composto isolado. Hoje, a maioria dos óleos essenciais extraídos de plantas é analisada por cromatografia gasosa combinada a espectrometria de massa (GC-MS) e, por vezes, por cromatografia gasosa em espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IR) (GERON et al., 2000).

Entre os tipos de monoterpenos, os oxigenados possuem várias atividades farmacológicas tais como: antioxidante (GONZALES; GOMEZ, 2012), anti-inflamatória (DE CÁSSIA et al., 2013), antinociceptiva (GUIMARÃES et al., 2013), hipotensora (SANTOS et al., 2011), antiprurítica (KAMATOU et al., 2013), antimicrobiana (ESPINA et al., 2011), inseticida (SFARA et al., 2009). Também, alguns outros monoterpenos como acetato de linalil, α -terpineol e cânfora em sinergismo, possuem uma característica de agente quimiopreventivo ideal, a saber, a atividade antitumoral. Dessa forma, os monoterpenos demonstram um alto potencial farmacológico, bem como outras vantagens, sendo a disponibilidade comercial, baixo custo, biodisponibilidade oral e baixa toxicidade, tornando viável começar a considerá-los para testes de quimioprevenção de câncer humano (SOBRAL et al., 2014).

Dentre vários monoterpenos, tem-se α -terpineol (**Figura 4**) é um álcool monoterpeno oxigenado cíclico, volátil, de odor agradável, o qual possui uma hidroxila ligada a um carbono terciário e é encontrado em uma grande variedade de óleos essenciais, representando uma nova classe de agentes químicos com elevado potencial terapêutico (Figura 2). Seu peso e fórmula molecular é equivalente a 154,25 g/mol e $C_{10}H_{18}O$, respectivamente. Quanto a algumas características físico-químicas: ponto de fusão de 10-30 °C, Log K_{ow} (Coeficiente de Partição) de 3.33 e solubilidade em água de 371.7 mg / l a 25 °C (BATIA et al., 2008; CHOI et al., 2013).

Figura 4: Estrutura química do α -terpineol.

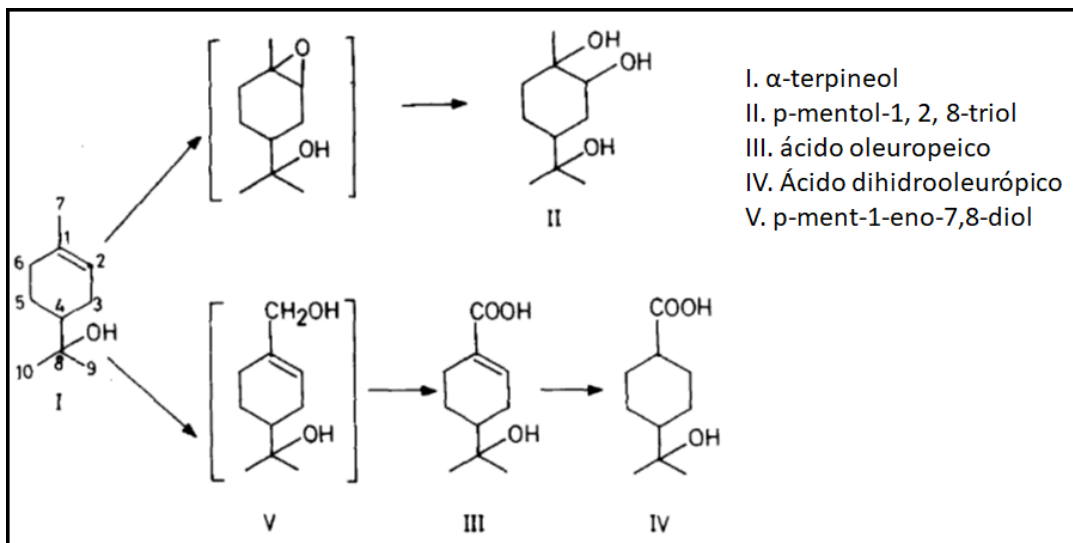


Fonte: DIEMER, 2016.

Esse monoterpeneo é encontrado em espécies de plantas tais como, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia officinalis* e *Carthamus tinctorius* (CHOI et al., 2013). São relatadas ações diversas deste composto na literatura, dentre elas, efeitos antineoplásicos, atividades antimicrobianas, antioxidantes, agonistas de canais de TRP, antinociceptivas e antiespasmolíticas. Ademais, estudos têm apresentado ações cardiovasculares com atividades vasorelaxante e hipotensora (RIBEIRO, 2012). Também possui ampla aplicação industrial, sendo utilizado em indústrias farmacêuticas como antifúngico e antisséptico, bem como na fabricação de perfumes, cosméticos e sabonetes (BAPTISTELLA et al., 2009).

Quanto a biotransformação do alfa-terpineol (**Figura 5**) em ratos, os esforços de Horning e colaboradores (1976) mostrou que o alfa-terpineol, quando administrado em humanos, é hidroxilado em p-mentol-1, 2, 8-triol. Um outro estudo coordenado por Madyastha e Srivatsan (1988) com o objetivo de determinar o destino metabólico do alfa-terpineol e seus efeitos no sistema microsomal do citocromo P-450 hepático após administração oral em ratos, mostrou que a oxidação do metil alílico e a redução da ligação dupla 1,2 na porção cíclica são as principais vias para o metabolismo do alfa-terpineol. A oxidação do metil alílico no alfa-terpineol formará o álcool p-ment-1-eno-7,8-diol, o qual provavelmente não se acumula, sendo prontamente oxidado ainda mais ao ácido oleuropeico. Já a redução da dupla ligação endocíclica é o que forma o ácido dihidrooleurópico a partir do ácido oleuropeico.

Figura 5: Biotransformação do alfa-terpineol em ratos.



Fonte: HORNING et al., 1976.

O potencial do alfa-terpineol como candidato anticancerígeno, tem sido relatado através da citotoxicidade significativa contra várias linhagens tumorais como Hep G2, HeLa, MOLT-4, K-562, CTVR-1, HCT-116, NCI-H69 e MCF-7 (HAYES et al., 1997; ITANI et al., 2008; HASSAN et al., 2010; CANDRASARI et al., 2016). Segundo estudos de Bicas e colaboradores (2011), o α -terpineol mostrou-se citostático especialmente contra o adenocarcinoma da mama (MCF-7) e leucemia mielóide crônica (K-562). Os mecanismos que podem justificar a atividade antitumoral são: inibição da isoprenilação pós-traducional de proteínas da regulação do crescimento celular, indução da parada do ciclo celular e a apoptose através da liberação de citocromo C, ativação de caspases e clivagem de PARP, inibição e indução das expressões de Bcl-2 e Bax, respectivamente, bem como é capaz de suprimir a via de sinalização do NF-kB (WAGNER; ELMADFA, 2003; ITANI et al., 2008; HASSAN et al., 2010; CANDRASARI et al., 2016).

Embora várias biomoléculas tenham potencial atividade anticâncer, é necessário o desenvolvimento de estudos toxicológicos, visando a segurança de preparações populares e suas aplicações terapêuticas, a fim de evitar efeitos colaterais, já que os mesmos são agentes xenobióticos, passivos de metabolismo ativador, cujos efeitos podem não se manifestar de forma imediata, o que intensifica as ações tóxicas mediante uso crônico (SILVEIRA et al., 2008; ARAUJO et al., 2015).

3.5 Toxicologia de compostos naturais

Os produtos fitoterápicos por serem utilizados para autoconsumo ou para venda, devem ser tomadas todas as medidas de controle. Eles geralmente têm uma alta aceitação pelos consumidores que, na maioria das vezes, consideram que “natural” é igual a “seguro”. Esta é, no entanto, uma simplificação excessiva, pois numerosos compostos botânicos foram encontrados contendo substâncias tóxicas (KRISTANC; KREFT, 2016).

A avaliação da segurança de agentes farmacológicos pode ser realizada através de ensaios toxicológicos (ERNST, 2005). Os estudos toxicológicos desempenham um papel significativo na compreensão das ações nocivas dos agentes ativos ou fitoquímicos nos tecidos. Fitoquimicamente, as espécies vegetais possuem compostos valiosos, incluindo triterpenos, alcaloides e flavonoides, que podem contribuir para sua atividade biológica (MONGALO et al., 2016). A partir deles é possível ter uma visão das ações químicas, reações, interações, mudanças consequentes de estrutura em tecidos biológicos e uma gama

de concentrações para o uso seguro de plantas para curar uma doença particular (OLEJNICZAK et al., 2001) e para determinar a faixa de doses, responsável por produzir o efeito máximo (REDDY; KAMBLE, 2014). Também, dados observacionais são coletados e usados para prever os resultados da exposição a animais e também a humanos. Esses resultados mostram que a dose mais baixa não é tóxica, enquanto doses altas são letais. Além disso, algumas doses podem ter efeitos benéficos, mas o aumento da exposição irá, em algum momento, causar um efeito prejudicial (SHARWAN et al., 2015).

A avaliação da toxicidade causada pelas plantas, especialmente quando fazem parte do tratamento de longo prazo é de fundamental importância para minimizar os possíveis riscos para as pessoas (RODEIRO et al., 2006). Assim, entende-se que a exposição crônica dos produtos herbáceos, produz um desenvolvimento de problemas mais insidiosos e que nem todas espécies não estão envolvidas na toxicidade aguda (KRISTANC; KREFT, 2016). Por isso, o uso racional de ervas medicinais se faz importante e implica na obtenção do melhor efeito, com a utilização pelo menor período de tempo possível, o que minimiza os danos nocivos aos órgãos e tecidos (RATES, 2001).

As substâncias tóxicas das plantas podem afetar todo o espectro de órgãos humanos vitais, inclusive os principais sistemas do corpo funcional, como o sistema nervoso central (SNC), interferindo assim na coordenação das funções nervosas do corpo. As toxinas mais dominantes são as neurotoxinas que afetam o cérebro e o SNC, seguidas por citotoxinas e toxinas metabólicas que afetam órgãos como os rins, o fígado, o coração e os pulmões. Também, a gravidade de um efeito tóxico pode depender da via de administração, do estágio de crescimento ou parte da planta, da quantidade consumida, da espécie e da suscetibilidade da vítima (BOTHA; PENRITH, 2008).

Os impactos tóxicos mais comuns produzidos por ervas e medicamentos fitoterápicos são efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos (KRISTANC; KRAFT, 2016) e nefrotóxicos (ASIF, 2012). Segundo Kristanc e Kreft (2016), a hepatotoxicidade crônica induzida por plantas é principalmente idiossincrática, no entanto, a ativação metabólica é frequentemente implicada. A neurotoxicidade crônica induzida por ervas medicinais podem resultar da depleção de tiamina, hipotireose ou ruptura do metabolismo neuronal. Já a nefrotoxicidade é causada por espécies vegetais que causam o comprometimento funcional, distúrbios estruturais, além de outros distúrbios específicos, tais como cálculos, inflamação, atrofia e fraqueza renal (ARDALAN et al., 2007).

Além disso, sabe-se que as plantas com atividades medicinais contêm numerosos compostos biologicamente ativos e, embora tenham propriedades farmacológicas comprovadas, podem causar danos, inclusive danos ao DNA (SPONCHIADO et al., 2016). Deste modo, uma outra avaliação pré-clínica concernente ao biomonitoramento dos danos oxidativos, nucleares e genotóxicos de produtos naturais e/ou sintéticos, manipulados e ingeridos pelo homem, se faz necessária para a liberação de substâncias para o uso terapêutico. Neste contexto, ensaios não-clínicos com organismos inferiores como *Artemia salina*, *Allium cepa* e o uso de linhagens de células proporcionam um meio alternativo para o teste de drogas e produtos químicos (DOKE; DHAWALE, 2015).

Os testes de toxicidade genética são realizados rotineiramente para identificar potenciais agentes cancerígenos, genotóxicos e mutagênicos de células germinativas. Essa avaliação inclui pelo menos dois ou três procedimentos de teste, tais como teste de mutação reversa em microrganismos, teste de danos cromossômicos e ensaio de mutação em células de mamíferos (KIM et al., 2013).

Desse modo, a investigação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias isoladas ou de novos compostos naturais possui uma importância crítica na avaliação de danos ao DNA, visto que o desenvolvimento do câncer pode decorrer de agentes genotóxicos e mutagênicos que podem causar deficiências no reparo do DNA, e que, também, exerce influência na condução dos efeitos bloqueadores do checkpoint do ciclo celular. Cabe enfatizar que a deficiência de reparo de danos ao DNA, que leva a instabilidade genética é comum em tumores. Assim, o uso de ferramentas biomarcadoras para avaliar a instabilidade genética assume importância clínica nas terapias oncológicas (KASSIE et al., 2001; WU et al., 2016; ASATRYAN; KOMAROVA, 2016; MOUW et al., 2017).

3.6 Bioensaios para avaliação toxicogenética *in vitro* e *in vivo*

Ensaio toxicogenéticos são normalmente usados para identificar substâncias que têm a capacidade de interagir com ácidos nucleicos em baixas concentrações. Quando um agente tóxico interage com o DNA, pode levar a aberrações cromossômicas e / ou alterações na estrutura de DNA que pode afetar a fidelidade da mensagem e levar a mudanças irreversíveis na célula (VARANDA al., 2002; SPONCHIADO et al., 2016).

Nos últimos 30 anos, diferentes metodologias, estratégias e abordagens foram desenvolvidas para avaliar substâncias químicas que poderiam demonstrar efeitos genotóxicos

e / ou carcinogênicos. O estabelecimento desses protocolos tem sido baseado em estudos que demonstram a correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade, e a correlação de ambos os parâmetros com genotoxicidade (WATERSETAL, 1999). Desde então, procedimentos estabelecidos têm sido utilizados para a avaliação do risco genotóxico associado ao uso de drogas, aditivos alimentares, pesticidas, produtos químicos industriais e ambientais e também produtos naturais, incluindo plantas medicinais e seus óleos (VILAR et al., 2008; SPONCHIADO et al., 2016).

3.6.1 Ensaio para estudos de viabilidade celular

Os métodos de exclusão de corante são tradicionalmente usados para avaliar a viabilidade celular, sendo o azul de tripan um dos mais comuns. O azul de tripan é uma coloração vital que deixa as células não viáveis com uma cor azulada quando observadas ao microscópio, enquanto as células viáveis aparecem sem coloração. As células viáveis possuem membranas celulares intactas e, portanto, não absorvem o corante do meio circundante. Por outro lado, as células não viáveis não têm uma membrana intacta e funcional e, portanto, absorvem o corante de seus arredores. Isto resulta na capacidade de distinguir facilmente entre células viáveis e não viáveis, uma vez que as primeiras são não coradas, pequenas e redondas, enquanto as últimas são coradas e inchadas. Entretanto, é importante salientar que o método não diferencia entre células apoptóticas e necróticas (LOUIS; SIEGEL, 2011).

Esse ensaio requer que as células estejam numa única suspensão celular, sendo que estas são então visualizadas e contadas ao microscópio usando um hemocitômetro de um volume definido, como por exemplo a câmara de Neubauer ou utilizando dispositivos de contagem automáticos que se tornaram recentemente disponíveis. A partir dessas contagens, é relativamente simples calcular o número total de células e a porcentagem de células viáveis dentro de uma população (STODDART, 2011).

Além disso, a comparação detalhada das estimativas de células vivas versus células mortas usando a exclusão do azul de tripan avaliada manualmente e avaliada eletronicamente por citometria de fluxo, indica que as duas técnicas fornecem resultados muito semelhantes, embora haja entre si uma larga diferença de robustez. Porém, considerando que a técnica de exclusão do corante descrita é mais provável a erro devido à subjetividade do operador, a abordagem da citometria de fluxo é menos adequada para a avaliação da viabilidade celular

durante o desempenho de técnicas complexas e demoradas de purificação celular (STROBER, 2015).

Com o tempo, os testes de viabilidade tornaram-se mais complexos. Cada vez mais, corantes que dependem da atividade metabólica das células estão ganhando vantagem, pois podem ser realizados em células aderentes e, portanto, prestam-se a análises de alto rendimento (STODDART, 2011).

Senso assim, o ensaio com MTT é um dos testes mais populares para avaliar a atividade de potenciais compostos antitumorais potenciais, e ele também é o ensaio mais popular para examinar interações entre compostos. O teste em questão foi criado e descrito por Mosmann em 1983 (ŚLIWKA et al., 2016). O ensaio é significativamente influenciado por compostos que modificam o metabolismo de células individuais que possuem a capacidade metabólica de converter o brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio (MTT) do sal de tetrazólio de cor amarela em seu metabólito roxo chamado formazano que é insolúvel em água. Essa reação ocorre aumentando o nível de NADPH ou a atividade de LDH (*lactato desidrogenase*). O reagente MTT tetrazol é impermeável à membrana celular. Ele é absorvido pelas células através de endocitose e é reduzido a seus metabólitos de formazan insolúveis e puros por enzimas oxidoreduzases dependentes de NADPH, principalmente nos compartimentos citosólicos (WANG; HENNING; HEBER, 2010; MIRZAYANS et al., 2017 a; MIRZAYANS et al., 2017 b; MIRZAYANS et al., 2017 c).

Além disso, o ensaio de viabilidade MTT unicelular é uma ferramenta poderosa para distinguir entre células vivas e mortas. Ao contrário de outros sais de tetrazólio que são amplamente utilizados em ensaios colorimétricos, o reagente MTT não requer um passo de acoplamento de elétrons para facilitar sua captação pelas células, sendo que a carga positiva líquida no MTT é suficiente para sua absorção através do potencial da membrana plasmática (BERRIDGE et al., 2005).

O ensaio de MTT unicelular é simples porque envolve apenas a adição do reagente MTT ao meio de cultura, a incubação das células durante 1 a 2 horas, avaliação microscópica e a aquisição de imagens celulares. A avaliação de dados também é direta. Independentemente do nível da atividade metabólica de uma célula, se a mesma é capaz de converter o MTT em seu metabólito formazan para dar origem a grânulos de cristais escuros, então a célula não pode estar morta. Portanto, supondo que um tratamento genotóxico particular possa resultar em uma diminuição na atividade metabólica de um

subconjunto de células (por exemplo, refletindo mudanças nas enzimas oxidoredutases), essas células ainda serão capazes de metabolizar o MTT. Por outro lado, as células mortas não metabolizam o MTT e, portanto, permanecem livres de grânulos e cristais de tetrazólio. Dessa forma, MTT é particularmente muito útil para a avaliação da viabilidade de células individuais por microscopia de uma maneira simples, mas altamente informativa e reproduzível (MIRZAYAN et al., 2018).

3.6.2 Toxicidade em *Artemia salina*

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas, é um organismo regulador hipo / hiper-osmótico capaz de manter as concentrações de íons de hemolinfa, dentro de limites estreitos sobre uma gama de salinidade externa de NaCl a 0,26% em ambientes supersaturados (CARVALHO et al., 2009; ATES et al., 2013). O uso da *Artemia salina* tem relevância ecológica nos ecossistemas marinhos, pois estes organismos são uma representação da comunidade zooplancônica e vital na ecologia das praias. A *Artemia* spp é conhecida por sua capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, tornando-se um organismo de teste crucial na ecotoxicologia (REGUEIRAS et al., 2018).

Seus cistos se adaptaram ao estresse de várias maneiras. Eles são cercados por uma parede celular rígida impermeável à maioria dos compostos químicos e que funciona como um escudo contra a radiação ultravioleta. Os cistos de *Artemia salina* contêm grandes quantidades de trealose, um açúcar não redutor com função de preservar membranas e proteínas durante a dessecação (MACRAE et al., 2016).

O ensaio de letalidade de *Artemia salina* é um bioensaio padronizado em pesquisa marinha e aquática que tem sido sucessivamente empregado para fornecer dados iniciais de toxicidade que pode ser apoiada por bioensaios mais específicos e mais sofisticados, uma vez que os compostos ativos tenham sido isolados (REGUEIRAS et al., 2018; APU et al., 2010).

Vários estudos tem sido desenvolvido utilizando o teste de toxicidade em *Artemia salina*, o qual é empregado desde a extratos até substâncias isoladas com a finalidade de encontrar a LC₅₀, justificando assim seu uso como um dos primeiros testes a serem utilizados na investigação da concentração a ser utilizada (DO AMARANTE et al., 2011; ARCANJO et al., 2012; ULLAH et al., 2013), bem como correlacionar a toxicidade do bioensaio com outras atividades farmacológicas, tais como antifúngicos, antiviral e antimicrobiana (MACBAE et

al., 1988), antiparasitária (SAHPAZ et al., 1994), antitripanossoma (ZANI et al., 1995), antiplasmódica (DO AMARANTE et al., 2011) e antitumoral (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN; ROGERS, 1988; NUNES et al., 2009; ARCANJO et al., 2012).

É importante ressaltar que muitos fatores podem interferir no êxito do teste de toxicidade utilizando *Artemia salina*, como luz, temperatura, alimentação da *Artemia* sp., tempo de eclosão dos ovos, água utilizada no teste, contaminação das vidrarias e das substâncias (BUENO et al., 2015).

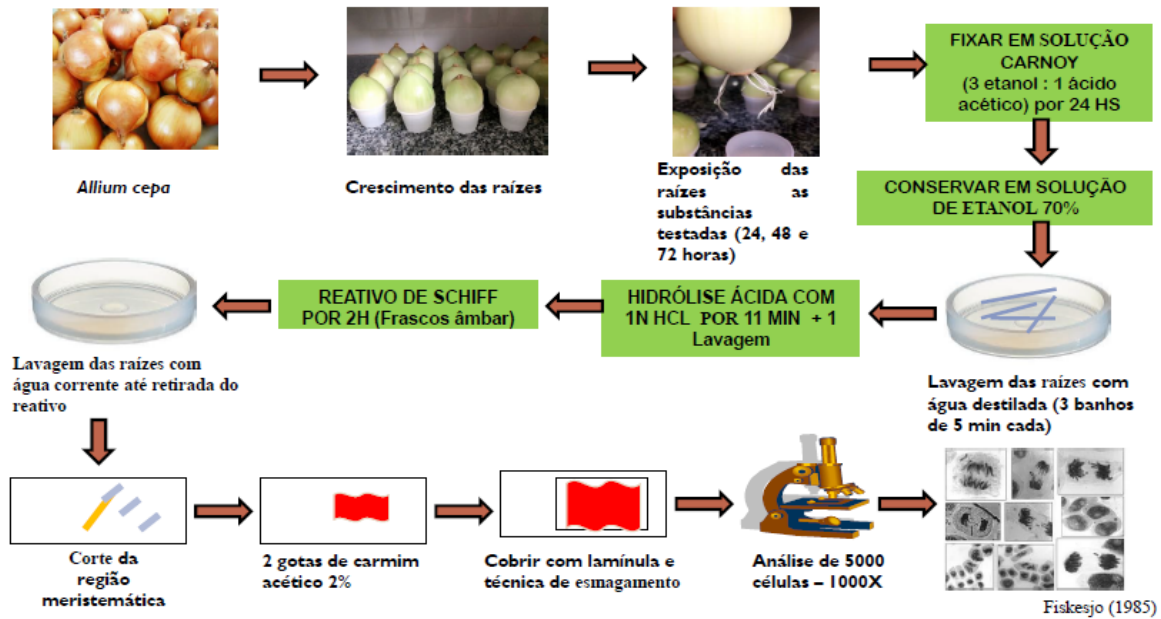
3.6.3 Teste de *Allium cepa*

O teste de *Allium cepa* (**Figura 6**) criado por Levan (1938) demonstrava inicialmente distúrbios no fuso mitótico devido ao uso de colchicina. Posteriormente, Fiskesjo em 1985 estabeleceu algumas modificações na técnica com o objetivo de torna-lo em uma ferramenta para monitoramento ambiental, entretanto, o teste permite uma avaliação mais ampla em produtos químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O sistema teste de *Allium cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica, para a observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular de *Allium cepa* (AMARAL et al., 2007; FACHINETTO; TEDESCO, 2009). Testes biológicos de mutagenicidade com plantas tem como objetivo verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico nas células do meristema radicular (MELLO et al., 2004). Este teste é de baixo custo, fácil de usar e produz resultados semelhantes aos ensaios em animais por causa da semelhança em suas composições genéticas, daí mesma resposta aos agentes mutagênicos. As células de *Allium cepa* possuem cromossomos metacêntricos permitindo uma melhor avaliação microscópica (AKINBORO et al., 2011).

As aberrações cromossômicas identificadas no ensaio são indicativas de genotoxicidade (RANK; NIELSEN, 1993), enquanto que a avaliação mutagênica é proposta via a contagem de micronúcleos, o qual é um indicador mais efetivo e mais simples de danos citológicos (MA et al., 1995). Assim, visto que tanto os fragmentos quanto cromossomos inteiros podem ser reincorporados no núcleo principal durante o ciclo celular (FENECH et al., 2002).

Figura 6: Método esquemático utilizado para análise das células meristemáticas do *Allium cepa*.



3.6.4 Teste do disco central em *S. cerevisiae*

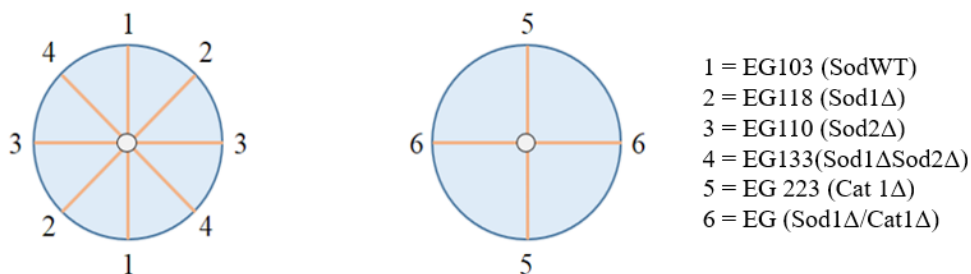
A *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos eucarióticos mais simples e tem sido amplamente estudado, possui um ciclo de vida que dura cerca de 90 min e requer procedimentos de crescimento e manutenção pouco dispendiosa. Foi o primeiro eucariota a ter seu genoma sequenciado em 1996, que agora está disponível em plataformas on-line públicas, onde seus genes já estão atribuídos às vias bioquímicas correspondentes. Devido à grande quantidade de conhecimento genômico, os recursos e as ferramentas de manipulação associadas a este fungo unicelular, *S. cerevisiae* é considerado um excelente sistema na investigação dos mecanismos de resistência aos fármacos e toxicidade a nível celular, sendo bastante utilizada na procura dos mecanismos moleculares de algumas doenças que acometem os seres humanos e também na investigação de drogas antitumorais (VALERIO et al., 2014).

As células de *S. cerevisiae* são modelos celulares extremamente eficazes no estudo de vários produtos químicos, incluindo compostos antioxidantes e a utilização de linhagens celulares com defeitos nas defesas antioxidantes é extensamente empregada na pesquisa científica. As células de levedura são intensamente utilizadas por serem capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) através dos mesmos mecanismos que as células de mamíferos, e expressar muitos dos mesmos fatores antioxidantes podendo, portanto,

proporcionar um sistema adequado para a detecção rápida de vários compostos antioxidantes (OPREA et al., 2014).

As linhagens são cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária. As células em suspensão são semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo, para ambos os lados da placa contendo no centro um disco de papel filtro estéril, no qual é adicionado a substância teste (**Figura 7**). Após 48hs de incubação em estufa a 30°C é mensurado o halo de inibição do crescimento, sendo estes resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico. Esse ensaio é realizado como descrito por De Oliveira e seus colaboradores (2014).

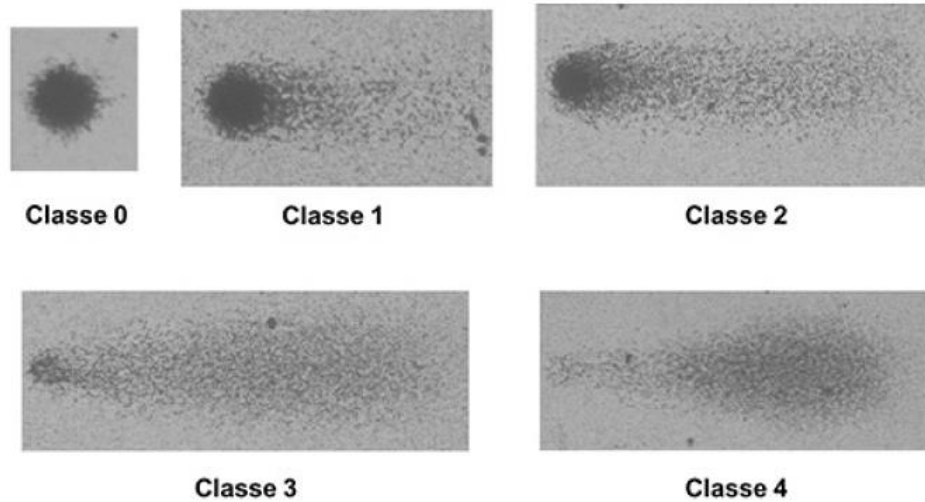
Figura 7: Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae*.



3.6.5 Ensaio cometa versão alcalina

O teste cometa, conhecido como eletroforese em gel de célula única, (SCGE – *Single Cell Gel Eletrophoresis Assay*) (HEUSER et al., 2008; TAKASAWA et al., 2015; ZAPATA et al., 2016) vem sendo reconhecido, internacionalmente, assim como o de micronúcleos *in vivo*, para avaliação do potencial genotóxico de químicos carcinógenos pela indução dos danos ao DNA e eficácia de reparo (KANG et al., 2013). Na sua versão alcalina (pH alcalino) apresenta mais sensibilidade para identificação de agentes genotóxicos (NESSLANY et al., 2007; DHAWAN et al., 2009; VALVERDE; ROJAS, 2009; CORREDOR et al., 2016), por detectar diversos danos tais como: quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* (VILLELA et al., 2003; HEUSER et al., 2007; VALVERDE; ROJAS, 2009; SOLONESKI; NIKOLOFF; LARRAMENDY, 2016; ZHOU et al., 2016) e danos oxidativos (LU et al., 2017). Os danos genéticos, são classificados e contabilizados pelas classes de 0 a 4, que medem a capacidade genotóxica da substância teste (**Figura 8**).

Figura 8: Classificação de danos do DNA. Imagem visualizada em microscópio óptico por coloração com prata.



Fonte: VALENTE et al., 2017.

Entretanto, não tem efeitos na detecção de mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos, que são eventos associados a carcinogenicidade e mecanismos epigenéticos (COLLINS, 2004), com sensibilidade na identificação de lesões pré-mutagênicas, de reparo, utilizando qualquer tipo de células nucleadas e não exigindo que as mesmas se encontrem em divisão (LEAL et al., 2009). O teste cometa pode ser aplicado em estudos de monitoramento clínico, entendimento da patogênese do câncer e de doenças degenerativas, predição de tumores, radiações e quimioterapias e estudos de infertilidades, assim como avaliação de riscos ocupacionais e ambientais (STANG, 2010; TICE, 2015; GUNASEKARANA; GLADWIN; CHAND, 2015), além de monitoramento de exposição a antineoplásicos (GOMES JÚNIOR et al., 2015). Diversas células podem ser usadas em estudos de biomonitoramento clínico, tais como: células mononucleares do sangue periférico, células do epitélio bucal, nasal, epitelial, espermatozoides, bem como, biópsias de tecidos (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009).

3.6.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

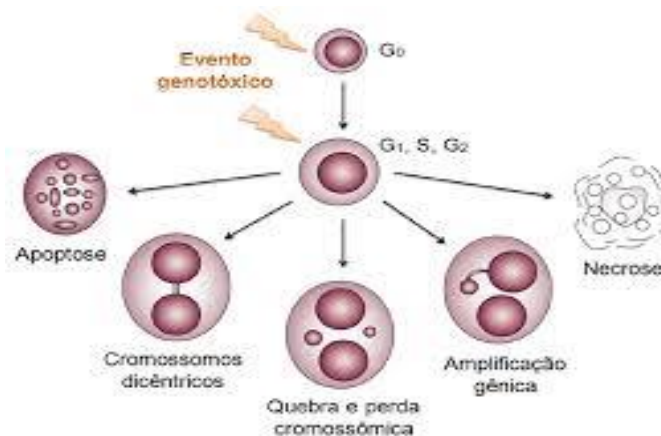
Para avaliação de genotoxicidade de químicos *in vitro*, o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese é recomendado (CBMN) (NERSESYAN et al., 2014; EL-ZEIN;

VRAL; ETZEL, 2011). No que se refere à metodologia do CBMN, a mesma é desenvolvida com o uso da citocalasina B para identificar células que se dividem em cultura. A citocalasina B é um inibidor de polimerização de actina, a qual é requerida para a formação do anel que divide o citoplasma durante a citocinese. Desse modo, as células podem ser identificadas por suas aparências binucleadas (NERSESYAN, 2007).

Os danos induzidos por agentes químicos e/ou físicos podem, dependendo do agente, causar a formação de micronúcleos, brotos nucleares e/ou pontes nucleoplasmáticas, além de poder induzir ou inibir necroses e ou apoptose (**Figura 9**). A indução de necrose pode resultar na liberação de enzimas degradativas, que podem causar a digestão parcial de DNA. Nesta perspectiva, o ensaio de micronúcleo é, amplamente, usado como um ensaio *in vivo* bastante viável para avaliar a ocorrência de alterações cromossômicas, que é um dos principais pontos finais da mutagenicidade. O teste é utilizado não só para identificação de mutações, mas para a avaliação de riscos a qual o organismo esteja susceptível (HAYASHI, 2016).

Como visto, é de grande importância a verificação da toxicidade genética e cromossômica causada por novas biomoléculas, de forma a assegurar a saúde humana e animal. Assim, alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversos agentes químicos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas (MALUF; ERDITIMANN, 2003)

Figura 9: Vários parâmetros que podem ser analisados através do ensaio de CBMN.



Fonte: Fenech, 2007.

3.6.7 Ensaio de avaliação da viabilidade celular e determinação de apoptose/necrose em linhagens celulares.

Para que uma célula seja considerada viável é necessária ter características que incluam a presença e o funcionamento de uma gama de propriedades estruturais, metabólicas, fisiológicas e genéticas. Dentre essas, um outro ponto que mostra a viabilidade de uma célula é a ausência de apoptose. A apoptose é um processo bem regulado de morte celular e tem um papel importante no desenvolvimento e manutenção de homeostase celular. Este processo é caracterizado por alterações morfológicas, incluindo encolhimento celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. No entanto, essas definições tradicionais exigem que uma única célula “viável” cresça e, subsequentemente, gere outras células que podem ser quantificadas por métodos adequados (DONG et al., 2009; MULLER; NEBE-VON-CARON, 2010).

O método DNA laddering ou teste de fragmentação de DNA em gel é utilizado para verificar a fragmentação internucleosômica do DNA das células tumorais, para confirmar a apoptose induzida pelos compostos. A fragmentação do DNA tem sido o principal critério bioquímico usado para distinguir os motivos da morte celular. São formados oligonucleossomos de aproximadamente 180 pares de bases, bem como fragmentos de DNA de alto peso molecular (aproximadamente 300 Kb) que constituem um padrão em forma de arraste no gel de eletroforese. O DNA característico de uma fragmentação induzida por apoptose apresenta ambas as quebras de fita simples e dupla (SINGH, 2000; BORGES, 2008; NERSESYAN et al., 2008).

Essa técnica consiste basicamente em extrair DNA da célula apoptótica em meio de cultura. O material genético é precipitado com polietilenoglicol (PEG) ou agarose ou poliácridamida. O DNA fragmentado permanece no sobrenadante e pode ser facilmente submetido a eletroforese em gel ou quantificação usando corantes fluorescentes. (ARCHANA et al., 2013).

Outra emergente técnica para avaliação da morte celular é a citometria de fluxo, que utiliza combinação de dispersão de luz e fluorescência emitida para detectar células tendo vários estados estruturais, fisiológicos e genéticos (CRONIN; WILKINSON, 2010). Diferentes técnicas de citometria de fluxo têm sido desenvolvidas para caracterização e quantificação de vários eventos celulares durante a apoptose, sendo o protocolo de apoptose Anexina-V / 7-AAD um dos mais utilizados (DONG et al., 2009; NIGJEN, et al., 2018). A anexina-V liga-se com elevada afinidade a fosfatidilserina, presente na membrana celular,

para formar um conjugado. Uma vez a Anexina-V marcada com fluorocromos, é possível detectar a apoptose por análises de citometria de fluxo (TAIT et al., 1989; ANDREE et al., 1990). Utilizando anexina-V conjugada em combinação com um corante de DNA impermeável a membrana tal como iodeto de propídeo ou 7-aminoactinomicina D (7-AAD), pode-se discriminar entre células viáveis, apoptóticas e necróticas (VERMES et al., 1995; MARTIN et al., 1995; RINOM et al., 1997; VAN ENGELAND et al., 1998; SCHMID et al., 2007; HASPER et al. 2000).

Esta técnica têm sido usada para estudar eventos apoptóticos e seu curso temporal em diferentes tipos de células em resposta a vários fatores desencadeantes (HOMBURG et al., 1995; GORCZYCA et al., 1993). Os parâmetros estudados incluem mudanças na distribuição dos fosfolípidios através da membrana celular (HOMBURG et al., 1995; TROIANO et al., 2007), alterações morfológicas e condensação da cromatina (ORMEROD et al., 1995), aumento da permeabilidade da membrana (SCHMID et al., 2007), dissipação do potencial transmembrana mitocondrial (TROIANO et al., 2007; BELLOC et al., 2000), ativação das caspases (BELLOC et al., 2000; DONG et al., 2008) e Fragmentação de DNA (GORCZYCA et al., 1993; DONG et al., 2008).

Dentre as técnicas de quantificação de células apoptóticas e necróticas, o método de coloração dupla por laranja de acridina e iodeto de propídeo é uma técnica econômica e, também muito utilizada, sendo conveniente para detectar apoptose em células tumorais e para testar a quimiossensibilidade do tumor em comparação com a citometria de fluxo. De acordo com as alterações das membranas celulares associadas à apoptose durante o processo de morte celular, é feita uma clara distinção entre células normais, células apoptóticas precoces e tardias e células necróticas (LIU et al., 2015; KAPLUM et al., 2018).

Essa técnica dispõe de microscopia por fluorescência que pode visualizar células viáveis contendo um núcleo verde com estrutura intacta, células em apoptose inicial que aparecem como um núcleo verde claro com condensação de cromatina, células em apoptose tardia que aparecem como densas áreas em laranja com condensação de cromatina, e necrose secundária aparece como um núcleo laranja-avermelhado (NG et al., 2013; HAJREZAIE et al., 2015).

3.6.8 Linhagem de células cancerígenas de Sarcoma 180

O sarcoma de camundongos (Sarcoma 180) foi um dos primeiros tumores experimentais a serem transplantados em animais. Inicialmente, este tumor, descoberto em 1914 como uma massa sólida na axila direita de um camundongo albino, foi denominado como Tumor de *Crocker*. Esse tumor foi, primariamente, classificado como carcinoma mamário, mas após várias transplantações subcutâneas, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180 (QI; XU, 2006).

Os sarcomas se apresentam diferentes, não obstante, existem algumas condições que favorecem o uso de experimentos com tumores transplantáveis na forma ascítica, tais como a facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral, quando for o objetivo do estudo; possibilidade de realizar um estudo comparativo, utilizando dos mesmos métodos de pesquisa, na corrente sanguínea e nos fluidos corporais (NERY, 2004). O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (RIZZO, 2000; MATSUZAKI et al., 2003; BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO, 2004).

A identificação da progressão tumoral está possibilitando o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas tendo como alvo células presentes no microambiente tumoral, enfatizando a importância da elaboração de novas estratégias com o restabelecimento do controle do ciclo celular por meio de agentes, que atuem nos pontos de checagem, disponibilizando de estratégias viáveis na terapia anticâncer. Neste sentido, o modelo Sarcoma 180 pode ser utilizado para avaliar a ação de componentes físicos, biológicos e químicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, cinética e terapia de células tumorais (ATKINS, 2006; FISCHER et al., 2007).

Os modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer. Eles são distinguidos por aberrações moleculares tais como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012). O Sarcoma 180 (S180) é bastante utilizado em estudos experimentais (FACCHINI et al., 2014; JANA et al., 2015; YANG et al., 2018) com taxa de disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente tóxicas. O transplante de suas células é realizado, em animais, via inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, com crescimento em até 100% dos casos, no

qual pode ocorrer regressão natural em 8 a 10% (WAL et al., 2003). Quanto estar consolidado apresenta um rápido crescimento chegando uma média de 18x14x10 mm por volta de sete dias do transplante. Depois de quatro semanas de evolução, a metástase começa a surgir nos pulmões (SILVA, 2014).

O uso do Sarcoma 180 tem sido um excelente modelo de estudo, uma vez que apresenta eficiente e rápida fase de promoção quando comparados com outros modelos experimentais tumorigênicos (OLIVEIRA- JÚNIOR et al., 2005). Existem diversos estudos demonstrando a utilização das células S180 para a pesquisa de novos antitumorais, bem como para avaliar o efeito do tumor e de metástases no tecido em um modelo murinho (JUNG et al., 2002; SUNG et al., 2007; RUOKUN et al., 2017). As células de S180 são uma linhagem maligna, heterogênea de células de tumor, desenvolvido naturalmente em camundongo, de origem mesodérmica e seu crescimento é observado em uma ampla gama de metástases (LEE et al., 2003; BRITTO et al., 2012).

REFERÊNCIAS

AGLIASSA, Chiara; MAFFEI, Massimo. Origanum vulgare Terpenoids Induce Oxidative Stress and Reduce the Feeding Activity of Spodoptera littoralis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2805, 2018.

AKINBORO, A.; MOHAMMED, K.; RATHNASAMY, S.; MUNIANDY, V.R. Genotoxicity assessment of water samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, using the Allium cepa test. **Tropical life sciences research**, v. 22, n. 2, p. 23, 2011.

ALTMANN, Karl-Heinz; GERTSCH, Jürg. Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Natural product reports**, v. 24, n. 2, p. 327-357, 2007.

AMARAL, A.M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste Allium (Allium cepa). **Revista Brasileira de Toxicologia** 20, n.1 e 2, 2007.

ANDREE, H. A. et al. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 9, p. 4923-4928, 1990.

APU, A. S. et al. Antimicrobial activity and brine shrimp lethality bioassay of the leaves extract of Dillenia indica Linn. **Journal of young pharmacists: JYP**, v. 2, n. 1, p. 50, 2010.

ARÁUJO, Éverton José Ferreira de et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 3, p. 361, 2015.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ARCHANA, M. et al. Various methods available for detection of apoptotic cells-A review. **Indian journal of cancer**, v. 50, n. 3, p. 274, 2013.

ARDALAN, Mohammad R. et al. Doenças do rim na Pérsia medieval - o Hidayat de Al-Akawayni. **Nefrologia Diálise Transplante**, v. 22, n. 12, p. 3413-3421, 2007.

ARNOUS, Amir Hussein; SANTOS, Antonio Sousa; BEINNER, Rosana Passos Cambraia. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

ASATRYAN, A.D.; KOMAROVA, N.L. Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. **Journal of theoretical biology**. v.396, p. 1-12, mai, 2016.

ASIF, Mohammad. A brief study of toxic effects of some medicinal herbs on kidney. **Advanced biomedical research**, v. 1, 2012.

ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013.

ATKINS, Michael B. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 7, p. 2353s-2358s, 2006.

BALBINO, Evelin E.; DIAS, Murilo F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.

BAPTISTELLA, Lúcia Helena Brito et al. Preparação do (+)- \pm -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, 2009.

BARRETO, Benilson Beloti; VIEIRA, Rita de Cássia Padula Alves. Percepção dos profissionais de saúde sobre a inserção da fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de APS**, v. 18, n. 2, 2015.

BELLOC, F. et al. Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 40, n. 2, p. 151-160, 2000.

BERGAMI-SANTOS, Patrícia C.; MARIANO, Mário; BARBUTO, José Alexandre M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

- BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.
- BERRIDGE, Michael V.; TAN, An S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BETTEGA, P.V.C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v.7, n.1, p.89-97, 2011.
- BHALLA, Yashika; GUPTA, Vinay Kumar; JAITAK, Vikas. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.
- BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-terpineol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S280-S285, 2008.
- BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011.
- BORGES, F. V., Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de compostos de coordenação de ferro. Dissertação (Mestrado em Biociência e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.
- BOTHA, C. J.; PENRITH, M.-L. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 549-558, 2008.
- BRANDÃO, Hugo N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASILEIRO, Beatriz Gonçalves et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no " Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.
- BRASILEIRO, Beatriz Gonçalves et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no " Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2018.
- BRITTO, A.C.S; et al. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v.78, n.5, p.409-414, 2012.

- BRUNING, M.C.R. et al. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n.10, p.2675-85, 2012.
- BRUNING, M.C.R. et al. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n.10, p.2675-85, 2012.
- BUENO, Ariele Cardoso; PIOVEZAN, Marcel. Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. **Instituto Federal de Santa Catarina**, 2015.
- BUTLER, Mark S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural product reports**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.
- CANDRASARI, Damiana Sapta; MUBARIKA, Sofia; WAHYUNINGSIH, Mae Sri Hartati. The effect of α -terpineol on cell cycle, apoptosis and Bcl-2 family protein expression of breast cancer cell line MCF-7. **Journal of the Medical Sciences (Berkala ilmu Kedokteran)**, v. 47, n. 2, 2016.
- CARVALHO, Camilo et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers–Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, 2009.
- CHOI, You-Jin et al. α -Terpineol induces fatty liver in mice mediated by the AMP-activated kinase and sterol response element binding protein pathway. **Food and chemical toxicology**, v. 55, p. 129-136, 2013.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, 26(3), p.249, 2004.
- CORREA, A. J. C.; LIMA, C. E.; COSTA, M. C. C. D. *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm.(Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 113-119, 2010.
- CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Insecticidal activities of plants and applications: a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.
- CORREDOR, Z.; et al. Levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients undergoing standard hemodialysis vs on-line hemodiafiltration: A comet assay investigation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v.808, p.1-7, set, 2016.
- COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. The contribution of natural products as source of new anticancer drugs: studies carried out at the national experimental oncology laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- CRAVEIRO, Afrânio Aragão. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, 1981.

- CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. The potential of flow cytometry in the study of *Bacillus cereus*. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-16, 2010.
- CROWELL, Pamela L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 3, p. 775S-778S, 1999.
- DA COSTA, Gilmar; DA SILVA, Patrícia Sanches. Tratamento bioenergético: estudo etnofarmacológico de plantas medicinais da Pastoral da Saúde Alternativa de Cotriguaçu, MT. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, 2014.
- DA CRUZ MONTEIRO, Siomara; BRANDELLI, Clara LiCosta. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.
- DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, Rita et al. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1227-1254, 2013.
- DE SOUZA ELLER, Sarah Carobini Werner et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.
- DEV, Sukh; MISRA, Renuka. **Manual CRC de terpenóides - Diterpenóides**. CRC, 1986.
- DEWICK, Paul M. A biossíntese de compostos terpenóides C 5-C 25. **Relatórios de produtos naturais**, v. 19, n. 2, p. 181-222, 2002.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol.**; v.25, n.1, p.5-32, fev., 2009.
- DIEMER, Andréa Wolf. **Ação antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* e *Zingiber officinale* frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em carne mecanicamente separada de frango**. 2016. Dissertação de Mestrado.
- DO AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.
- DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.
- DONG, Hiep Phuc et al. Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7-AAD assay: clinical relevance and comparison with other apoptosis parameters. **American journal of clinical pathology**, v. 132, n. 5, p. 756-762, 2009.
- DONG, Hiep Phuc et al. Methods for simultaneous measurement of apoptosis and cell surface phenotype of epithelial cells in effusions by flow cytometry. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 955, 2008.
- ELDIN, Sue; DUNFORD, Andrew. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. Editora Manole Ltda, 2001.

- ELISABETSKY, Elaine. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, Set. 2003.
- EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, 26(1), p.101-106, 2011.
- ERNST, Edzard. The efficacy of herbal medicine—an overview. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 405-409, 2005.
- ESPINA, Laura et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.
- FACCHINI, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M.; SILVEIRA, M. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma180, **International Journal of Biological Macromolecules**. v.68, p.72-77, 2014.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.360-367, 2009.
- FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181, p. 411-416, 2002.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.2; n.5, p.1084-1104, maio, 2007.
- FINKLER, Aliza; ASHERY-PADAN, Ruth; FROMM, Hillel. CAMTAs: ativadores de transcrição de ligação de calmodulina de plantas para humanos. **Letras FEBS**, v. 581, n. 21, p. 3893-3898, 2007.
- FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, 2012.
- FITZMAURICE, Christina et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.
- GASPARETTO, João C. et al. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.
- GAUTAM, Nandini; MANTHA, Anil K .; MITTAL, Sunil. Óleos essenciais e seus constituintes como agentes anticancerígenos: uma visão mecanicista. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- GERON, Chris et al. A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 11, p. 1761-1781, 2000.

- GERSTEN, Omer; WILMOTH, John R. The cancer transition in Japan since 1951. **Demographic Research**, v. 7, p. 271-306, 2002.
- GOMES JÚNIOR, A.L., et al. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, p.1-11. 2015.
- GOMES, Geovany Amorim et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, 2012.
- GONZALEZ-BURGOS, E .; GOMEZ-SERRANILLOS, MP Compostos de terpeno na natureza: uma revisão de sua potencial atividade antioxidante. **Química medicinal atual** , v. 19, n. 31, p. 5319-5341, 2012.
- GORCZYCA, Wojciech; GONG, Jianping; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer research**, v. 53, n. 8, p. 1945-1951, 1993.
- GUILHON DE CASTRO, Henrique et al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, 2010.
- GUIMARÃES, Adriana G .; QUINTANS, Jullyana SS; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J. Monoterpenos com atividade analgésica - uma revisão sistemática. **Phytotherapy Research** , v. 27, n. 1, p. 1-15 de 2013.
- GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01, 2015.
- HABTEMARIAM, Solomon. Antidiabetic potential of monoterpenes: A case of small molecules punching above their weight. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 4, 2017.
- HAJREZAIE, Maryam et al. Apoptotic effect of novel schiff based CdCl₂ (C₁₄ H₂₁ N₃ O₂) complex is mediated via activation of the mitochondrial pathway in colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9097, 2015.
- HASPER, H. J. et al. A new four- color flow cytometric assay to detect apoptosis in lymphocyte subsets of cultured peripheral blood cells. **Cytometry**, v. 40, n. 2, p. 167-171, 2000.
- HASSAN, Saadia Bashir et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-κB signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.
- HASSAN, Saadia Bashir et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-κB signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.
- HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, 38(1), p.18, 2016.

HAYES, Amanda J. et al. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 5, p. 575-582, 1997.

HEUSER, V.D., et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**, v.32, n10, p.1223-1229, out, 2008.

HEUSER, V.D. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicology**, v.232, n.3, p.235-247, abr, 2007.

HOMBURG, C. H. et al. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. **Blood**, v. 85, n. 2, p. 532-540, 1995.

HORNING, M. G. et al. Metabolism of drugs by the epoxide-diol pathway. **Advances in mass spectroscopy in biochemistry and medicine**, v. 1, p. 91-108, 1976.

ITANI, Wafica S. et al. Anti colon cancer components from lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: mechanistic basis. **Cancer biology & therapy**, v. 7, n. 11, p. 1765-1773, 2008.

JANA, S.; PATRA, K.; MUKHERJEE, G.; BHATTACHARJEE, S.; MANDAL, D.P. Antitumor potential of anethole singly and in combination with cyclophosphamide in murine Sarcoma-180 transplantable tumor model. **RSC Advances**, 5(70), pp.56549-56559, 2015.

Jl, Shun-rong et al. Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1806, n. 1, p. 29-35, 2010.

JUNG, K.O.; et al. Effects of various kinds of salt on the tumor formation, NK cell activity and lipid peroxidation in Sarcoma-180 cell transplanted mice. **Journal of Korean Association of Cancer Prevention**, v.7, p. 134-142, jun, 2002.

KAMATOU, Guy PP et al. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15-25, 2013.

KANG, S.H.; KWON, J.Y.; LEE, J.K.; SEO, Y.R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of cancer prevention**, 18(4), p.277, 2013.

KAPLUM, Vanessa et al. Proanthocyanidin polymer-rich fraction of *Stryphnodendron adstringens* promotes in vitro and in vivo cancer cell death via oxidative stress. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 694, 2018.

KASSIE, F.; LAKY, B.; NOBIS, E.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, n. 1, p. 1-9, 2001.

KHALEEL, Christina; TABANCA, Nurhayat; BUCHBAUER, Gerhard. α -Terpineol, um monoterpeneo natural: uma revisão de suas propriedades biológicas. **Open Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 349-361, 2018.

KIM, H. R.; PARK, Y. J.; SHIN, D. Y.; OH, S. M.; CHUNG, K. H. Appropriate *in vitro* methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. **Health Toxicology**, v.28, n.1, p.1-18, 2013.

KRISTANC, Luka; KREFT, Samo. Plantas medicinais e comestíveis europeias associadas à toxicidade subaguda e crônica, parte II: Plantas com efeitos hepato-, neuro, nefro e imunotóxicos. **Food and Chemical Toxicology**, v. 92, p. 38-49, 2016.

LEAL, J.F.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, V.; MONEO, V.; DOMINGO, A.; BUEREN-CALABUIG, J.A.; NEGRI, A.; GAGO, F.; GUILLÉN-NAVARRO, M.J.; AVILÉS, P.; CUEVAS, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, L.F. Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis® in several human cancer cell lines. **Biochemical pharmacology**, 78(2), pp.162-170, 2009.

LEE, Y.L.; et al. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp Anim.**, v.52, p. 371–375, 2003.

LEITÃO, S. G.; OLIVEIRA, D. R. The modern pharmacognosy and the ethnopharmacological approach on natural products research. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 97–98, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEVAN, Albert. The effect of colchicine on root mitoses in Allium. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, 48(1), pp.46-53, 2009.

LIMA, Nerilson Marques. Bioprospecção em espécies de Inga (Fabaceae Mimosoideae). 2015.

LIU, Kuan et al. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. **Medical science monitor basic research**, v. 21, p. 15, 2015.

LOUIS, Kristine S.; SIEGEL, Andre C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: **Mammalian cell viability**. Humana Press, 2011. p. 7-12.

LOURO, I. D. Oncogenética. **Revista Brasileira de Cancereologia**, n.11, p.36-42, 2000.

LU, Y.; et al. Treatment of epithelial ovarian cancer with folate receptor (α/β) targeted chemotherapy is enhanced by CTLA-4 blockade: Learning from animal models. **Cancer Res.**, v.77, n.13, p.1-5, jul, 2017.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

- MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.
- MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACRAE, Thomas H. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 1, p. 9-18, 2016.
- MADYASTHA, K. Madhava; SRIVATSAN, V. Biotransformations of α -terpineol in the rat: its effects on the liver microsomal cytochrome P-450 system. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 41, n. 1, p. 17-25, 1988.
- MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. **Biomonitoração do dano genético em humanos**. Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, organizadores. Genética toxicológica. 1a ed. Porto Alegre (RS): Alcance, 2003.
- MARTIN, Seamus J et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1545-1556, 1995.
- MARTINS, E.R; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D.C; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2000.
- MATSUZAKI, Patrícia et al. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life sciences**, v. 74, n. 5, p. 573-579, 2003.
- MAULE, Milena; MERLETTI, Franco. Cancer transition and priorities for cancer control. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 745-746, 2012.
- MCGARVEY, Douglas J.; CROTEAU, Rodney. Metabolismo terpenoide. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015, 1995.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.
- MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? **Pharmaceutical Research**, v.27, n.1, p.950-61, 2010.
- MELLO, M.L.S.; JUNQUEIRA, A.C.; MARIA, C.C.J.; RIBEIRO, D.M.; FERREIRA, R.C.; VERÍSSIMO, R.V.; SCHILDKNECHT, P.H.P.A.; MONTEIRO, G.; COLTRI, P.P.; OGUSUCU, R.; FARIA, V.G.; SANTOS, A.B.; BORGES, I.G.; SILVA, E.A. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermóneges Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso de Meio Ambiente Paulínia e Região Metropolitana de Campinas, 2004, Paulínia. Anais - CD-Rom. Campinas: UNICAMP, p. 1-8. 2004.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

- MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; MURRAY, D. Viability Assessment Following Anticancer Treatment Requires Single-Cell Visualization. **Cancers**, v. 10, n. 8, 2018.
- MIRZAYANS, Razmik et al. Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain viability and replicate their genome. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 360, (2017a)
- MIRZAYANS, Razmik; ANDRAIS, Bonnie; MURRAY, David. Do multiwell plate high throughput assays measure loss of cell viability following exposure to genotoxic agents?. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, p. 1679, (2017c)
- MIRZAYANS, Razmik; ANDRAIS, Bonnie; MURRAY, David. Impact of premature senescence on radiosensitivity measured by high throughput cell-based assays. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1460, (2017b)
- MÖHLER, H.; PFIRMAN, R. W.; FREI, K. Redox-directed cancer therapeutics: Taurolidine and Piperlongumine as broadly effective antineoplastic agents (Review). **International Journal of Oncology**, v. 45, p. 1329-1336, 2014.
- MONGALO, NI et al. Etnobotânica, fitoquímica, toxicologia e propriedades farmacológicas da Terminalia sericea Burch. ex DC (Combretaceae) - Uma revisão. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 789-802, 2016.
- MORAIS, Selene Maia de et al. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MOUW, K. W.; GOLDBERG, M. S.; KONSTANTINOPOULOS, P. A.; D'ANDREA, A. D. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. **Cancer discovery**, 2017.
- MÜLLER, Susann; NEBE-VON-CARON, Gerhard. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 4, p. 554-587, 2010.
- NAITO, T.; BABA, T.; TAKEDA, K.; SASAKI, S.; NAKAMOTO, Y.; MUKAIDA, N. High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. **Cancer Letters**, v. 366, p. 93-99, 2015.
- NASCIMENTO, Jeferson C. do et al. Ocorrência, atividades biológicas e dados de 13C RMN das amidas de Piper (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2288-2311, 2012.
- NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MISIK, M.; WULTSCH, G.; HARTMANN, M.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 762, pp.37-51, 2014.
- NERY, L. H. R. **Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de ehrlich transplantado em camundongos balb/c**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.
- NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-MEINTIÈRES, S.; TALAHARI, I.; NKILIMBOUI, E.N.; MARZIN, D. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish

genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**;630:28-41, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NG, Kuan-Beng et al. Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin a isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 41, 2013.

NIGJEH, Siyamak Ebrahimi et al. Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 56, 2018.

NUNES, L. C. C., GALINDO, A. B., DEUS, A. D. S. O. D., RUFINO, D. A., RANDAU, K. P., XAVIER, H. S., CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OLEJNICZAK, Klaus; GÜNZEL, Peter; BAIXO, Rolf. Estratégias de teste pré-clínico. **Drug Information Journal** , v. 35, n. 2, p. 321-336, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, F. J. M.; CESTE, E. A. P. Morbimortalidade do câncer na cidade do Recife na década de 90. **Rev Bras Cancerol**, v. 51, n. 3, p. 201-08, 2005.

DE OLIVEIRA, George Laylson et al. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L.(Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.

OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; POAP, C. V.; NEAGOE, A. D.; *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 516-521, 2014.

ORMEROD, M. G. et al. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 21, n. 3, p. 300-304, 1995.

PAZ, Rafaela F.; GUIMARÃES, Elsie F.; RAMOS, Clécio S. The occurrence of phenylpropanoids in the saps of six *Piper* species (Piperaceae) from Brazil. **Gayana Botanica**, v. 74, n. 1, 2017.

PÉREZ-HERRERO, Edgar; FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.

PINTO, Angelo C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química nova*, p. 45-61, 2002.

PORFÍRIO, Zenaldo et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoesia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Rev bras farmacogn**, v. 19, p. 785-789, 2009.

- PRAKASH, OM; KUMAR, Amit; KUMAR, P. Potencial anticancerígeno de plantas e produtos naturais. **Am J Pharmacol Sci** , v. 1, p. 104-115, 2013.
- QI, L.; XU, Z., *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 16(16), pp.4243-4245, 2006.
- QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, 2012.
- RANK, J.; NIELSEN, Mette Hviid. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.
- REGUEIRAS, Ana et al. Differential Toxicity of Cyanobacteria Isolated from Marine Sponges towards Echinoderms and Crustaceans. **Toxins**, v. 10, n. 7, 2018.
- RIBEIRO, Thaís Pôrto et al. Mecanismos de sinalização endotelial envolvidos na atividade cardiovascular do α -terpineol. 2012.
- RIMON, Galia et al. O aumento da fosfatidilserina na superfície é um marcador precoce da apoptose neuronal. **Journal of Neuroscience Research** , v. 48, n. 6, p. 563-570, 1997.
- RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 2000.
- RODEIRO, I. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1707-1713, 2006.
- ROY, S. S.; CHAKRABORTY, P.; BHATTACHARYA, S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 195-209, 2014.
- RUFFA, M. J. et al. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 335-339, 2002.
- RUOKUN, Y.I.; et al. Anti-tumor activities of bamboo salt on sarcoma 180 tumor-bearing BALB/c mice. **Biomedical Research**. v.28, 2017.
- SAHPAZ, S.; BORIES, CH.; LOISEAU, PM.; CORTÈS, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, n. 06, p. 538-540, 1994.
- SANTOS, Alberdan S. et al. Sesquiterpenes of amazonian Piper species. **Acta Amazonica**, v. 28, n. 2, p. 127-127, 1998.
- SANTOS, Márcio RV et al. Efeitos cardiovasculares dos monoterpenos: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.
- SCHMID, Ingrid; UITTENBOGAART, Christel; JAMIESON, Beth D. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. **Nature protocols**, v. 2, n. 1, p. 187, 2007.

SFARA, V.; ZERBA, E. N.; ALZOGARAY, Raúl A. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 3, p. 511-515, 2009.

SHARWAN, Gotmi et al. Toxicity profile of traditional herbal medicine. **Journal of Ayurvedic and Herbal medicine**, v. 1, n. 3, p. 81-90, 2015.

SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos**. Teresina, 2015, p. 166. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí – UFPI.

SILVA, T. D. S.; Atividade antitumoral *in vitro e in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen). 2014. 82 f. **Dissertação** (Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVEIRA, PF da; BANDEIRA, Mary Anne Medeiros; ARRAIS, Paulo Sérgio Dourado. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMAN G, *et al.* Org. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed UFSC; UFRGS; 2007.

SINGH, Narendra P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 328-337, 2000.

SIXEL, Paulo José; PECINALLI, Ney Roner. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 13/14, p. 74-77, 2013.

ŚLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBLIN, C.; CIERPJAŁ, T.; ŁYŻWA, P.; KIELBASIŃSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIZ, A.; CHILMONCZYK, Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155772, 2016.

SOBRAL, Marianna Vieira et al. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; LARRAMENDY, M. L. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 797, p. 46-52, 2016.

SOUSA, F.C. et al. Uso de plantas medicinais (fitoterápicos) por mulheres da cidade de Icó-CE. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, v.5, n.1, p.161-70, 2011.

SPONCHIADO, Graziela et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

STANG, M.; BRENDAMOUR, M.; SCHUNCK, C.; WITTE, I. Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay. **Mutat Res.**; v. 698, p. 1-5, 2010.

STODDART, Martin J. Cell viability assays: introduction. In: **Mammalian Cell Viability**. Humana Press, 2011. p. 1-6.

- STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.
- SUNG, J.E; et al. Comparison of therapeutic responses to an anticancer drug in three stocks of ICR mice derived from three different sources. **Lab Anim Res.**, v.33, p. 187-194, 2007.
- TAIT, J. F.; GIBSON, Donald; FUJIKAWA, K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 14, p. 7944-7949, 1989.
- TAKASAWA, H.; TAKASHIMA, R.; NARUMI, K.; KAWASAKO, K.; HATTORI, A.; KAWABATA, M. et al. Results of the International Validation of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: Individual data for 1,2-dibromoethane, p-anisidine, and o-anthranilic acid in the 2nd step of the 4th phase Validation Study under the JaCVAM initiative. **Mutat Res.**, v.786–788, p. 144-150, 2015.
- TARIQ, A. et al. Etnofarmacologia e toxicologia de plantas medicinais paquistanesas utilizadas no tratamento de queixas ginecológicas e infecções sexualmente transmissíveis. **Jornal Sul Africano de Botânica** , v. 114, p. 132-149, 2018.
- THOLL, Dorothea. Biossíntese e funções biológicas dos terpenóides nas plantas. Em: **Biotecnologia de isoprenóides**. Springer, Cham, 2015. p. 63-106.
- TICE R. Editorial Preface. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 1, p. 786–788, 2015.
- TOMASETTI, Cristian; LI, Lu; VOGELSTEIN, Bert. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, 2017.
- TROIANO, Leonarda et al. Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 11, p. 2719, 2007.
- ULLAH, M. Obayed et al. Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.
- VALENTE, Daniel et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Rev Bras Saude Ocup**, v. 42, 2017.
- VALERIO, E.; VILARES, A.; CAMPOS, A.; PEREIRA, P.; VASCONCELOS, V. Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. **Toxicon**, v. 90, p. 191-198, 2014.
- VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutat Res.**;681:93-109, 2009.
- VAN ENGELAND, Manon et al. Annexin V- affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

- VARANDA, Eliana Aparecida et al. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 257-264, 2002.
- VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.
- VERMEULEN, Louis et al. Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 995-998, 2013.
- VIEGAS JR, Claudio et al. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 117-127, 2009.
- VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.
- VILLELA, I.V. ; LAU, A. ; SILVEIRA, J. ; PRA, D. ; ROLLA, H.C. ; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (Orgs.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. p.145-163, 2003.
- VOLTARELLI, Fabrício Azevedo; DE MELLO, Maria Alice Rostom; DUARTE, José Alberto Ramos. Apoptosis and physical exercise: effects on skeletal muscle. **Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance**, v. 10, n. 1, p. 100-105, 2008.
- WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Ann Nutr Metab**, v.47, p. 95–106, 2003.
- WAL, R.; SATO, D.; OLIVEIRA, C.C.; LOPES, L.; OLIVEIRA, S.M; DIBERNARDI, R.P; GEHRKE, S.; PALAURO, F.R.; BUCHI, D.F. Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. **Cell and Molecular Biology of Cancer**, p. 34, 2003.
- WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.
- WATERS, Michael D.; STACK, H. Frank; JACKSON, Marcus A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 437, n. 1, p. 21-49, 1999.
- WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, p. 43–47, 2016.
- YANG, Y.; LEI, Z.; HUANG, L.; YANG, F.; ZHANG, N.; YUAN, J.; LI, K.; CHEN, J.; ZHANG, J. Antitumor Ability of Berberine Accompanied by Modulation of Gut Microbiome in Sarcoma-180 Tumor-bearing Mice. **International Journal of Pharmacology**, 14(4), pp.460-470, 2018.
- ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 1995.

ZAPATA, L.M.; BOCK, B.C.; OROZCO, L.Y.; PALACIO, J.A. Application of the Micronucleus Test and Comet Assay in *Trachemys callirostris* Erythrocytes as a Model for in Situ Genotoxic Monitoring. **Ecotoxicol Environ Saf.**; 127:108-16, 2016.

ZHANG, J. T. New drugs derived from medicinal plants. **Therapie**, v. 57, n. 2, p. 137-150, 2002.

ZHOU, Y.; FU, X.; HE, D.; ZOU, X.; WU, C.; GUO, W, et al. Evaluation of urinary metal concentrations and sperm DNA damage in infertile men from an infertility clinic. **Environ Toxicol Pharmacol**; 45:68–73, 2016.

CAPÍTULO I

Perfil toxicogenético do composto alfa-terpineol por ensaios não-clínicos

O artigo será submetido na revista *IUBMB life* no seguinte link:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15216551/homepage/ForAuthors.html>.

Fator de impacto: 3.23; Qualis B1 para Farmácia e Biotecnologia.

Perfil toxicogenético do composto alfa-terpineol por ensaios não-clínicos

Helber Alves Negreiros¹, Sabryna Brena Cunha Fontele², Felipe Alves Batista³, Marlene Gomes de Farias⁴, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva¹, Maria Luisa Lima Barreto do Nascimento¹; Kariely Gonçalves de Moura⁴, Layde de Sousa Correa⁴, Ana Rafaela Silva Pereira⁴, Lhais Suelem Soares Leal⁴, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{3,5}; Anderson Nogueira Mendes³, Juan Carlos Ramos Gonçalves², Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante¹, João Marcelo de Castro e Sousa^{1,5}.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC; Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. Brasil.

² Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil.

³ Departamento de Biofísica e Fisiologia. Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil.

⁴ Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Picos-PI, Brasil.

⁵ Programas de Pós-graduações em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia - RENORBIO. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. Brasil.

Autor correspondente: João Marcelo de Castro e Sousa, Departamento de Ciências Biológicas, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil. E-mail: j.marcelo@ufpi.edu.br

RESUMO

O alfa-terpineol é um álcool monoterpeneo constituinte de óleos essenciais presentes em plantas medicinais, mas apresenta riscos citotóxicos e hepatotóxicos. Assim, o estudo avaliou o potencial tóxico/citotóxico, genotóxico/mutagênico, hemolítico e oxidativo /antioxidante em bioensaios não clínicos. Diferentes concentrações de alfa-terpineol foram aplicadas aos testes MTT (5, 50 e 500 µg/mL), *Artemia salina* (50, 100, 200 e 400 µg/mL), *Allium cepa* (10, 50 e 100 µg/mL), cometa (100, 200 e 500 µg/mL), micronúcleos com bloqueio de citocinese (100, 250 e 500 µg/mL), viabilidade celular por fluorescência (100 e 500 µg/mL), hemólise e o teste com *Saccharomyces cerevisiae* (10, 35 e 75 µg/mL). Em MTT o alfa-terpineol mostrou atividades citotóxica e antitumoral em células murinas B16-F10, mas não citotóxico em macrófagos normais. Em *A. salina* apresentou toxicidade com concentração letal de 68,29 e 76,36 µg/ml para os tempos de 24 e 48h, respectivamente. Em concentração (10, 50 e 100 µg/mL) bem abaixo das testadas em *A. salina* também foi citotóxico em meristemas de raízes de *A. cepa*, por inibição de divisão celular, como também mutagênico pela formação de ponte e anáfase com atrasos. Em linfócitos humanos foi genotóxico pelo aumento do índice e frequência de danos em 250 e 500 µg/mL, mas com efeitos mutagênicos em 500 µg/mL, pela formação de micronúcleos, pontes e brotos nucleares. Na viabilidade por fluorescência as concentrações de 100 e 500 µg/mL não causou morte celular em fibroblastos normais e nem hemólise *in vitro*. Os mecanismos citogenéticos podem estar envolvidos nas atividades tóxicas/citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, mas, possivelmente, não induz efeitos oxidativos, como não observados em *S. cerevisiae*. Os dados apontam que o alfa-terpineol tem potencial antitumoral por mecanismos citogenéticos e moleculares associados com a indução de apoptoses, com mais seletividade para células tumorais.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Monoterpenos. Toxicologia. Genotoxicidade. Morte celular

ABSTRACT

Alpha-terpineol is a monoterpene alcohol constituent of essential oils present in medicinal plants, but presents cytotoxic and hepatotoxic risks. Thus, the study evaluated the toxic / cytotoxic, genotoxic / mutagenic, hemolytic and oxidative / antioxidant potential in non-clinical bioassays. The concentrations of alpha-terpineol (50, 100, 200 and 400 µg / mL, *Allium cepa* (10, 50 and 100 µg / mL), ketone (5, 50 and 500 µg / mL) (100, 200 and 500 µg / mL), DNA fragmentation by agarose gel, micronuclei with blockade of cytokinesis (100, 250 and 500 µg / mL), fluorescence cell viability (100 and 500 µg / mL), hemolysis and (10, 35 and 75 µg / mL) in MTT, alpha-terpineol showed cytotoxic and antitumor activities in murine B16-F10 cells, but not cytotoxic in normal macrophages. (10, 50 and 100 µg / mL) well below those tested in *A. saline* was also cytotoxic in root meristems of *A.*, as well as mutagenic by the formation of bridging and anaphase with delays. In human lymphocytes was gene oxygens by increasing the rate and frequency of damage at 250 and 500 µg / mL, but with mutagenic effects at 500 µg / mL, by the formation of micronuclei, bridges and nuclear shoots. Still in human lymphocytes, by the DNA fragmentation test (genotoxic damages), the alpha-terpineol caused a strong drag in 250 and 500 µg / mL. But at 100 and 500 µg / mL did not cause cell death in normal fibroblasts nor hemolysis in vitro. Cytogenetic mechanisms may be involved in toxic / cytotoxic, genotoxic and mutagenic activities, but possibly does not induce oxidative effects, as not observed in *S. cerevisiae*. The data indicate that alpha-terpineol has antitumor potential by cytogenetic and molecular mechanisms associated with the induction of apoptosis, with more selectivity to tumor cells.

Keywords: Essential oils. Monoterpenes. Toxicology. Genotoxicity. Cell death

1 INTRODUÇÃO

Estudos de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo (KAUR et al., 2005). Grande parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (VARANDA, 2012). Dentre a composição química dessas plantas, destacam-se os terpenoides, que juntos com os fenilpropanoides compõem os extratos voláteis de plantas, comumente designados de óleos essenciais (GONÇALVES et al., 2012). Os óleos essenciais apresentam geralmente odor agradável, e são por causa dessa propriedade, amplamente utilizados em vários tipos de produtos industriais, como aromatizantes de ambiente, alimentos, medicamentos e cosméticos, possuindo uma enorme importância econômica (OLIVEIRA et al., 2016). Além dessas propriedades, vários compostos químicos presentes nos óleos essenciais, apresentam importantes atividades farmacológicas, tais como anti-hiperalgésica (OLIVEIRA et al., 2016), antimicrobianas

(MUKHERJI; PRABHUNE, 2015), antifúngicas (JING et al., 2015), antiparasitárias (CAMARGOS et al., 2015), e anticancerígeno (HASSAN et al., 2010; SU et al., 2012).

O alfa-terpineol é um álcool monoterpeneo oxigenado cíclico, o qual possui uma hidroxila ligada a um carbono terciário. O mesmo é conhecido por alguns outros sinônimos: 3-Ciclohexeno-1-metanol; 4-Trimetil; 1-p-Menten-8-ol; p-Ment-1-en-8-ol; 1-Metil-4-isopropil-1-ciclo-hexen-8-ol. O mesmo é um constituinte encontrado no óleo essencial de várias plantas como *Pinus sp.*, *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca leucadendron*, *Citrus aurantium*, dentre outros. Por ser amplamente utilizado em alimentos, cosméticos e produtos de higiene e limpeza (BICAS et al., 2011), torna-se importante conhecer os seus efeitos farmacológicos e principalmente seu potencial toxicológico, fato inclusive já sugerido por (CALCABRINI et al., 2004), o qual encontrou citotoxicidade do composto sobre células epiteliais e fibroblásticas. Em adição, os principais componentes de óleos essenciais como monoterpeneos, sesquiterpeneos e seus metabólitos secundários podem provocar hepatotoxicidade (MORAES et al., 2016), o que nos motivou a desenvolver um estudo toxicológico, já que o mesmo é escasso na literatura científica.

Os estudos de genotoxicidade com compostos químicos oriundos de plantas medicinais têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse de comprovação da eficácia dessas plantas nas mais diversas finalidades farmacológicas. Ademais, muitas das plantas utilizadas, apesar de possuírem propriedades farmacológicas, também podem causar efeitos tóxicos a diferentes órgãos bem como alterações estruturais no DNA humano (COULIDIATI et al., 2015). Portanto, conhecendo-se a necessidade constante de avaliação toxicológica de extratos de plantas medicinais e seus compostos químicos juntamente com a carência de estudos toxicogenéticos do alfa-terpineol, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos/citotóxicos, genotóxicos/mutagênicos e antitumorais, em estudos não clínicos com aplicação de marcadores citogenéticos em células tumorais e não tumorais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produtos químicos

A Doxorrubicina e Cisplatina foram obtidas da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil). O Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), Azul de tripan, RPMI 1640 e o monoterpeneo alfa-terpineol foram

adquiridos na Sigma-Aldrich/Brasil. O soro bovino fetal (SBF) e penicilina/estreptomicina foram adquiridos a Gibco-BRL (EUA). O alfa-terpineol foi diluído a 1% de DMSO em diferentes concentrações.

2.2 Animais

Os camundongos machos *Swiss* que foram utilizados neste estudo possuíam cerca de 4 semanas de idade (25 g), mantidos no biotério do Centro de Pesquisa de Plantas Medicinais (NPPM/UFPI) em temperatura controlada (24 ± 1 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso à água e comida. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEEA-PI:022/2015).

2.3 Cultura de células

As células do melanoma murino (B16-F10), linfócitos humanos (GM16028) e fibroblastos humanos (MRC-5) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina e colocados em ar umidificado a 37 ° C com atmosfera de 5% de CO₂ (COULIDIATI et al., 2015).

2.4 Ensaio de viabilidade celular MTT

Para avaliar os efeitos citotóxicos do alfa-terpineol, o ensaio MTT foi realizado conforme descrito anteriormente por (MOSMANN, 1983) com pequenos ajustes. Resumidamente, 5×10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com o alfa-terpineol em concentrações variando de 5 a 500 µg/mL, durante 24 h a 37 °C e 5% de atmosfera de CO₂. A doxorubicina (DOXO, 50 µg/mL) foi utilizada como referência de fármaco de conhecida citotoxicidade. Posteriormente, adicionou-se MTT (5 mg/mL) e incubou-se durante 4 h nas mesmas condições descritas acima. Os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO durante 30 minutos adicionais e a densidade óptica registrada em um espectrofotômetro de microplacas (BioTek, Winooski-VT, EUA) a 550 nm (GONÇALVES et al., 2016).

2.5 Determinação da citotoxicidade em macrófagos

Os macrófagos murinos foram coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e plaqueados em placas de cultura de 96 poços, em concentrações de 2×10^6 células/mL (DE MORAES ALVES et al., 2017) As células foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF inativado, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As placas de cultura foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 3 h para adesão celular. Após o período de adesão, os macrófagos foram incubados com alfa-terpineol, em concentrações variando de 5 a 500 µg/mL, durante 24 h. Após este período, a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio MTT como descrito nos métodos.

2.6 Bioensaio de letalidade em *Artemia salina*

Para a preparação da *A. salina*, os cistos do microcrustáceo foram adquiridos no mercado central de Teresina-PI, Brasil. Esta foi uma rápida modificação do método descrito por Meyer et al., (1982). Foram incubados cistos do microcrustáceo (*Artemia salina*) em becker contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada e ajustado para pH 8,5 utilizando Na₂CO₃, 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48 h a $27 \pm 3^\circ$ C. Após incubação, os náuplios ativos livres de conchas do microcrustáceo foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta de Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 4,5 mL da solução salina. O experimento foi realizado por diluições seriadas, onde a concentração inicial de alfa-terpineol foi de 400 µg/ml. Em cada experimento, adicionou-se 0,5 mL da amostra teste a 4,5 mL de solução de salina, mantendo a mesma temperatura de eclosão. Sob a luz, os náuplios sobreviventes foram contados. Foram utilizados três tubos para cada tratamento. A mortalidade de *A. salina* foi avaliada após 24h e 48h de exposição à substância testada. A definição da toxicidade do extrato foi baseado nas escalas de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), de acordo com a escala, os valores de concentração letal (CL)₅₀ > 1000 µg/ml considerou-se não tóxico; entre 500 a 1000 µg/ml considerou-se baixa toxicidade; moderada toxicidade para CL₅₀ entre 100 a 500 µg/ml e, finalmente, muito tóxico ou elevada toxicidade quando a CL₅₀ foi inferior 100 µg/ml.

2.7 Teste de *Allium cepa*

Para caracterizar a ação citotóxica e mutagênica do alfa-terpineol, o teste *A. cepa* foi conduzido, de acordo com (GUERRA; SOUZA, 2002). Inicialmente, os bulbos de uma única variedade (Baia Periforme) e de um mesmo lote foram germinados em água destilada, durante 48 horas, à temperatura ambiente, em laboratório. Após a germinação, as raízes medindo aproximadamente 1 cm foram colocadas nas soluções de tratamento (Controle negativo-CN, tratamento 1-T1, tratamento 2-T2, tratamento 3-T3 e Controle positivo-CP) e expostas a diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Após cada tempo de exposição, as raízes foram medidas com o auxílio de paquímetro digital sendo desprezadas aquelas muito curtas ou muito longas, e o tamanho das raízes foi utilizado como avaliação de toxicidade. Após a mensuração, as raízes foram recolhidas e fixadas em etanol-ácido acético (3:1), durante 24h. Depois de fixadas, as raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1M a 60 ° C, durante 10 minutos e coradas comorceína acética a 2 %. O potencial mutagênico foi avaliado por meio de análise de alterações cromossômicas (perdas e quebras cromossômicas, pontes nucleoplasmáticas, c-metáfases e de micronúcleos) nas células meristemáticas de *A. cepa*, observando 1000 células por bulbo. O potencial citotóxico foi determinado pelo índice mitótico (IM). O IM de cada bulbo foi definido como o número de células em divisão por 1000 células analisadas. As análises foram realizadas em microscópio óptico 400X. Repetições de cinco bulbos foram analisadas para cada tratamento experimental. O controle negativo e positivo (CP) usados para o teste de *Allium cepa* foram água destilada e sulfato de cobre 0,6 µg/mL, respectivamente.

2.8 Ensaio cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por (SPEIT; ROTHFUSS, 2012). Alíquotas de 10 µL de suspensão celular de linfócitos (GM16028) ($0,5 \times 10^6$ células/mL) foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos; e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as

lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH=7,5) e coradas com solução de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID), frequência de danos (FD) e % de apoptoses de 100 células em triplicata por tratamento. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$.

2.9 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O CBMN foi realizado de acordo com (FENECH, 2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA]) foram adicionados 20 µL de suspensão celular de linfócitos (GM16028) ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas as soluções teste e controles. As células foram incubadas por 44 h a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período, foram adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet celular foi levemente agitado, para nova centrifugação após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético, 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas, previamente codificadas, foram analisadas em teste cego, com auxílio de microscópio óptico (1000X), considerando os danos citogenéticos (micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas) presentes em 1000 células por lâmina em triplicata.

2.9.1 IDN e IDNC dos grupos testados no teste de CBMN

O índice de divisão nuclear (IDN) e o índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade (IDNC) auxiliam a compreensão da interferência da substância teste à mitose

celular de Sarcoma 180. Os seus cálculos para avaliação de citotoxicidade foram realizados pelas fórmulas:

$$\text{IDN} = \frac{\text{M1} + 2\text{X}(\text{M2}) + 3\text{X}(\text{M3}) + 4\text{X}(\text{M4})}{\text{Número total de células}}$$

$$\text{IDNC} = \frac{(\text{Apoptose} + \text{Necrose} + \text{M1} + 2\text{x}(\text{M2}) + 3\text{x}(\text{M3}) + 4\text{x}(\text{M4}))}{\text{Número total de células}}$$

Nota: “Apoptose” representa o número de células apoptóticas, “Necrose” o número de células necróticas, “M1” o número de células viáveis com 1 núcleo, “M2” o número de células viáveis com 2 núcleos, “M3” o número de células viáveis com 3 núcleos, “M4” o número de células viáveis com 4 núcleos, e “Número total de células” representa o número total de células analisadas em 1.000 células por lâmina.

2.10 Quantificação da apoptose usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) com dupla coloração por iodeto de propídio e laranja de acridina.

A caracterização morfológica foi realizada utilizando dupla coloração de iodeto de propídio (IP) e de laranja acridina (LA) e observada sob um microscópio de fluorescência. Resumidamente, as células de fibroblastos humanos (MRC-5) foram plaqueadas a uma densidade de 1×10^6 células/mL em microplacas com 35 mm de diâmetro e tratadas com a concentração de IC50 da substância teste. As células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 24 h e depois foram lavadas duas vezes utilizando PBS para remover o meio remanescente. Um volume igual de corante fluorescente (LA/IP) contendo LA (10 µg/mL) e IP (10 µg/mL) foram adicionados e as células recém-coradas foram observadas em um microscópio de fluorescência UV em 30 min antes da cor fluorescente começar a desaparecer. As porcentagens de células viáveis, apoptóticas precoces e apoptóticas tardias e necróticas foram determinadas em 200 células por lâmina. Os critérios de identificação foram os seguintes: (a) as células viáveis tem um núcleo verde ou não corado, com uma estrutura intacta; (b) células apoptóticas precoces exibem um núcleo verde-claro que mostra a condensação da cromatina no núcleo; (c) células apoptóticas tardias mostram áreas laranja densas de condensação de cromatina e formação de bolhas na membrana; (d) células

secundárias necróticas / mortas tem núcleo vermelho. Este ensaio fornece uma avaliação quantitativa útil e foi realizado em triplicata.

2.11 Hemólise

Para a avaliação da atividade hemolítica utilizou-se eritrócitos de cachorro coletado com anticoagulante (EDTA) (MENDES et al., 2017). Foram adicionados 50 μ L de eritrócitos diluídos em PBS na placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 150 μ l do composto químico, em diferentes concentrações (1500 a 162 μ g/mL). A placa de 96 poços foi incubada por 1 h a 37 °C. Após as placas foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da hemólise utilizando espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem.

2.12 Teste do disco central em *S. cerevisiae*

2.12.1 Linhagens de leveduras utilizadas

Seis linhagens de leveduras foram utilizadas para avaliar a atividade oxidante/antioxidante do α -terpineol. A linhagem selvagem utilizada não apresentava nenhuma mutação nas enzimas de defesa contra substâncias oxidativas, enquanto que as outras cinco linhagens selecionadas apresentavam defeitos em pelo menos uma enzima antioxidativa. A linhagem EG118 é mutada na enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD – produto do gene SOD1), a EG110 é mutada na SOD mitocondrial (MnSOD – produto do gene SOD2); a EG133 possui uma mutação em duas enzimas a SOD1 e SOD2; a EG223 mutada em CAT1 e EG mutada em SOD1 e CAT1 (Tabela 01).

Tabela 1: Descrição das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* a serem utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipos	Origem
EG103 (SodWT)	MAT α leu2 3, 112 his3 Δ 1, trp1 - 289 ura-3 52	Edith Gralla E, L Angeles
EG118 (Sod1 Δ)	EG103except sod1::URA3	Edith Gralla E, L Angeles
EG110 (Sod2 Δ)	EG103, exceto sod2:: TRP1	Edith Gralla E, L Angeles
EG133(Sod1 Δ Sod2 Δ)	EG103except sod1::URA3 sod2::TRP1	Edith Gralla E, L Angeles
EG 223 (Cat 1 Δ)	EG103except cat1::TRP1	Edith Gralla E, L Angeles
EG (Sod1 Δ /Cat1 Δ)	EG103except sod1::URA3cat1::TRP1	Edith Gralla E, L Angeles

Todos os experimentos foram realizados através do teste do disco central em *S. cerevisiae*, onde as culturas de leveduras foram distribuídas sobre a técnica de pré-tratamento (adição de alfa-terpineol 2 horas antes do tratamento com peróxido de hidrogênio H₂O₂), co-tratamento (adição de α -terpineol e H₂O₂ simultaneamente) e pós-tratamento (adição de α -terpineol 2 horas depois do tratamento com peróxido de hidrogênio H₂O₂). As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária (DE OLIVEIRA et al., 2014) De acordo com (DE OLIVEIRA et al., 2014) Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 μ L das três diferentes concentrações de α -terpineol utilizadas (10, 35 e 75 μ g/ml). Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados sendo 10 μ L de uma solução contendo H₂O₂ (10 mMol) utilizado como controle positivo e 10 μ L de solução salina (0,9%), como controle negativo. Após 48 h de incubação em estufa a 34 °C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular. Os valores tabelados e submetidos à análise estatística variaram de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os testes foram realizados em duplicata.

2.13 Análise estatística

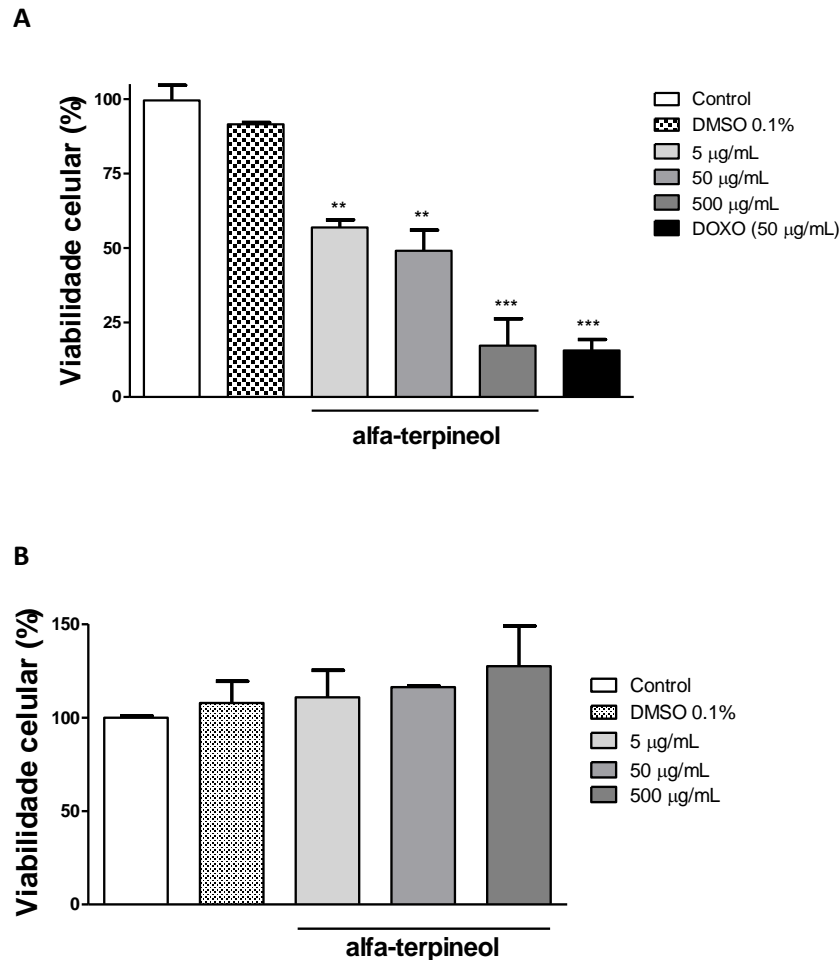
A diferença estatística para os testes realizados foram avaliados por ANOVA oneway seguida do teste de Dunnett para MTT e Tukey para as outras metodologias, considerando significativo os valores de $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Os valores de IC_{50} foram adquiridos ao traçar dados normalizados para a equação de Hill: $f = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + (IC_{50}/[\text{droga}]^n))$, onde, Max e Min representam os valores máximo e mínimo, respectivamente; IC_{50} a concentração efetiva do fármaco que mata 50% das células avaliadas e o “n” coeficiente Hill do fármaco. Para concentração letal de *Artemia salina*, os dados foram normalizados, transformados em logaritmo e submetido a uma regreção não linear, a fim de determinar a concentração letal (LC_{50}) que mata 50% dos microcrustáceos. O programa estatístico utilizado foi o Graphpad Prism, EUA, versão 7.0.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da citotoxicidade do alfa-terpineol em MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo método MTT para avaliar o potencial citotóxico de alfa-terpineol contra células tumorais murinas (B16-F10) e macrófagos murinos normais (Figura 1A-B). A partir dos dados obtidos, o efeito citotóxico induzido por alfa-terpineol em B16-F10, reduziu a viabilidade celular de 100% (controle) para $56,9 \pm 2,6$; $49,17 \pm 6,9$ e $17,3 \pm 9,0\%$ ($p < 0,05$), quando incubado em concentrações de 5, 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 1A). Ademais, o alfa-terpineol não foi capaz de induzir qualquer dano em células de macrófagos normais quando incubado nas mesmas condições já mencionadas (Figura 1B).

Figura 1. Efeitos cito do alfa-terpineol em células tumorais e normais de camundongos. A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio MTT após 48 h de incubação de alfa-terpineol (5, 50 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em células B16-F10 (A) e células de macrófagos murinos (B). Veículo (DMSO 0,1%) e Doxorrubicina (DOXO, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média \pm SEM, obtidos a partir de três experiências independentes (n = 3) em triplicado. ANOVA: teste de Dunnet, ** p <0,01; *** p <0,001 (em relação ao controle negativo).



3.2 Avaliação da toxicidade do alfa-terpineol em *Artemia salina*

O alfa-terpineol nas concentrações de 50 a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou as maiores letalidades, tendo valores estatisticamente significantes em relação ao CN e o veículo (p < 0,05) para os 02 tempos de exposição (TE) analisados. As maiores concentrações (200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram toxicidade estatisticamente maior do que o CP para os TE avaliados. As concentrações \leq 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram menores toxicidade (p < 0,05) do que o CP. Com as concentrações utilizadas na diluição seriada, os valores de CL50 foram determinados: 76,36

$\mu\text{g/mL}$ e $68,29 \mu\text{g/mL}$ para 24 e 48 h, respectivamente. Utilizando a classificação de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), o alfa-terpineol apresentou elevada toxicidade (abaixo de $100 \mu\text{g/mL}$). Não foi observada mortalidade significativa para o veículo utilizado quando comparado ao CN (**Tabela 02**).

Tabela 2: Atividade tóxica do α -Terpineol em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina*.

Concentrações	% de mortalidade de Náuplios	
	24 h	48 h
CN (solução salina)	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
DMSO 0,1%	$3,33 \pm 0,57$	$3,33 \pm 0,57$
CP ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 4,7 $\mu\text{g/mL}$)	$50,00 \pm 1,00^{\text{ab}}$	$56,66 \pm 0,57^{\text{ab}}$
400 $\mu\text{g/ml}$	$100,00 \pm 0,00^{\text{abc}}$	$100,00 \pm 0,00^{\text{abc}}$
200 $\mu\text{g/ml}$	$100,00 \pm 0,00^{\text{abc}}$	$100,00 \pm 0,00^{\text{abc}}$
100 $\mu\text{g/ml}$	$70,00 \pm 1,00^{\text{ab}}$	$76,00 \pm 0,57^{\text{ab}}$
50 $\mu\text{g/ml}$	$20,00 \pm 1,00^{\text{abc}}$	$23,33 \pm 0,57^{\text{abc}}$
25 $\mu\text{g/ml}$	$3,33 \pm 0,57^{\text{c}}$	$16,66 \pm 1,52^{\text{ac}}$
12,5 $\mu\text{g/ml}$	$0,00 \pm 0,00^{\text{c}}$	$3,33 \pm 0,57^{\text{c}}$
6,25 $\mu\text{g/ml}$	$0,00 \pm 0,00^{\text{c}}$	$6,66 \pm 0,57^{\text{c}}$
CL₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	76,36	68,29
IC	71,78 – 81,23	59,67 – 79,08
r ²	0,990	0,948

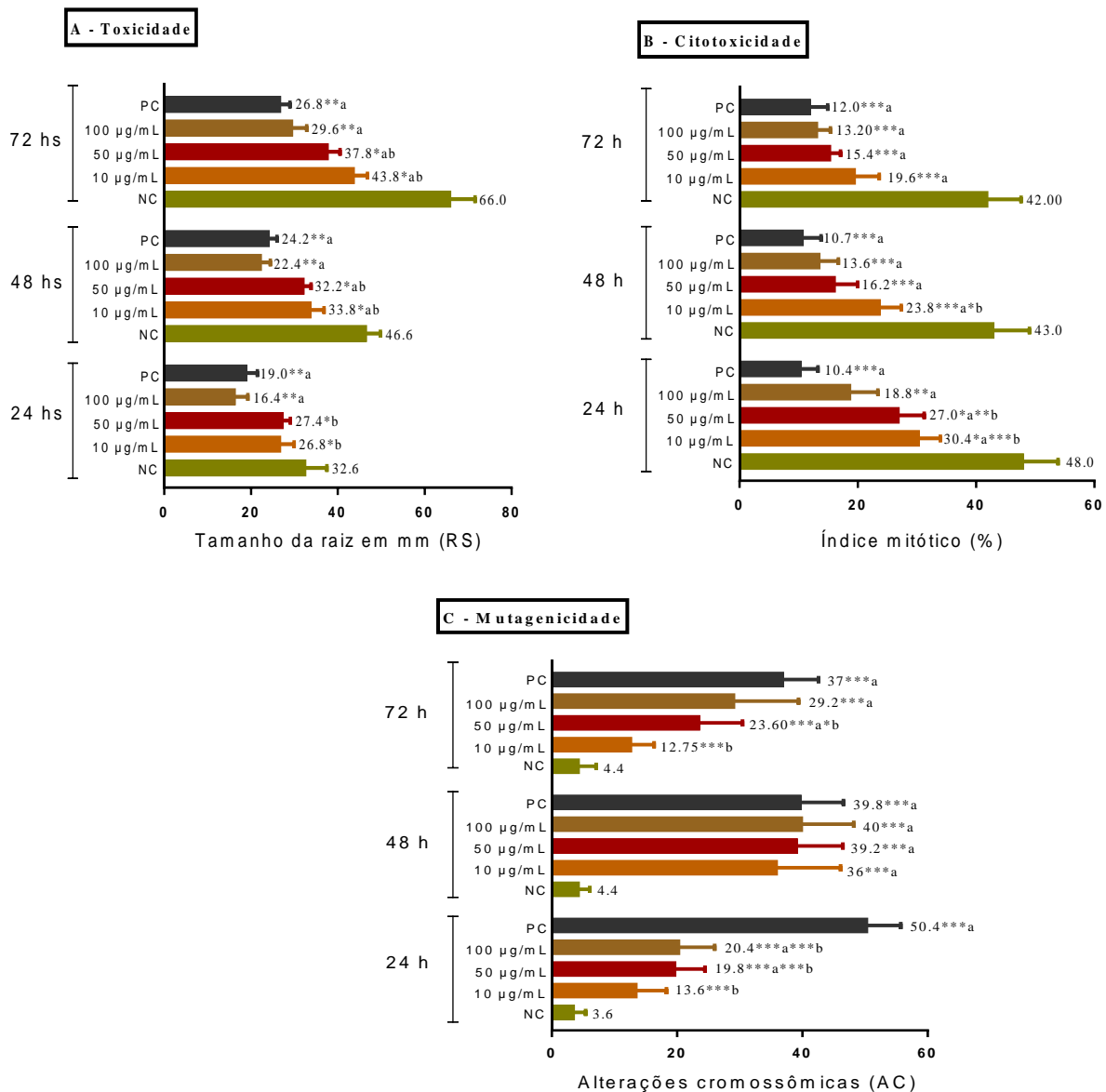
Valores são as médias e desvio padrão, ^a $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (CN), ^b $p < 0,05$ comparado com o DMSO 0,1%; ^c $p < 0,05$ comparado com o controle positivo (CP). Anova one-way, com pós teste de Tukey. Cada concentração foi executada com três tubos (10 náuplios vivos / tubo); CL₅₀: Concentração letal em $\mu\text{g/mL}$. IC: Intervalo de confiança; r²: Determinação de coeficiente.

3.3 Efeitos toxicogenéticos do alfa-terpineol em *A. cepa*

A caracterização toxicogenética do alfa-terpineol foi avaliada por parâmetros macroscópicos e citogenéticos: Tamanho das raízes (TR); Índice mitótico (IM), e Alterações cromossômicas (AC). Os resultados em relação à toxicidade (TR) e citotoxicidade medido pelo índice mitótico (IM) mostraram efeitos toxicológicos significantes para as três concentrações de alfa-terpineol comparados ao controle negativo (CN) nos tempos de exposição (TE) avaliados. Em alguns tempos de exposição, estatisticamente igual ao controle positivo (CP), o que comprova seu caráter tóxico para células nessas concentrações (**Figura**

2A e 2B). Nas concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram efeitos mutagênicos significantes ($p < 0.001^{***}$) comparados ao CN em todos os tempos avaliados. A menor concentração (10 µg/mL) apresentou efeito mutagênico apenas no TE 48hs. No TE 48hs, o efeito mutagênico do alfa-terpineol foi estatisticamente igual ao CP (**Figura 2C**).

Figura 2. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do alfa-terpineol sobre as raízes e células meristemáticas de *Allium cepa*. Em (A) avaliação da toxicidade, (B) avaliação da citotoxicidade e (C) avaliação da mutagenicidade.



ANOVA One-way e pós-teste de Tukey. Valores significantes (média) de $p < 0,05^*$, $p < 0,05^*$ e $p < 0,001^{***}$ para ^a comparado ao grupo controle negativo (CN), ^b ao grupo controle positivo (CP).

3.4 Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade do alfa-terpineol

A avaliação do índice de dano (ID) e frequência de danos (FD) mostraram um aumento significativo para as concentrações de 250 e 500 µg/mL bem como o CP quando comparado ao controle negativo. Quando comparadas com o CP, todas as concentrações testadas mostraram-se estatisticamente menores, exceto a concentração de 500 µg/mL na FD. Ademais para ID e FD, 250 e 500 µg/mL apresentaram maior genotoxicidade ($p < 0,05$) em relação a concentração de 100 µg/mL. Os valores percentuais de apoptose foram semelhantes aos resultados de ID e FD, somente as concentrações de 250 e 500 µg/mL demonstraram aumentados significantes em relação ao controle negativo. Entretanto, todas as concentrações testes não contemplam um aumento significativo em relação ao controle positivo (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos genotóxicos (índice de dano e frequência de dano) e avaliação de apoptose em células de linfócitos humanos através do bioensaio cometa versão alcalina.

	Concentração	Índice de dano (ID)	Frequência de dano (FD)	Apoptose (%)
Controle negativo	-	28,2 ± 3,8	23,3 ± 3,5	7,0 ± 2,2
Controle positivo	2 µg/mL	320,1 ± 12,6 ^a	92,1 ± 2,9 ^a	81,2 ± 3,6 ^a
	100 µg/mL	32,6 ± 5,5 ^b	26,6 ± 7,6 ^b	12,0 ± 5,0 ^b
Alfa-terpineol	250 µg/mL	62,0 ± 8,4 ^{abc}	48,3 ± 4,8 ^{abc}	36,6 ± 5,6 ^{abc}
	500 µg/mL	108,0 ± 10,6 ^{abc}	81,2 ± 3,5 ^{ac}	48,6 ± 3,5 ^{abc}

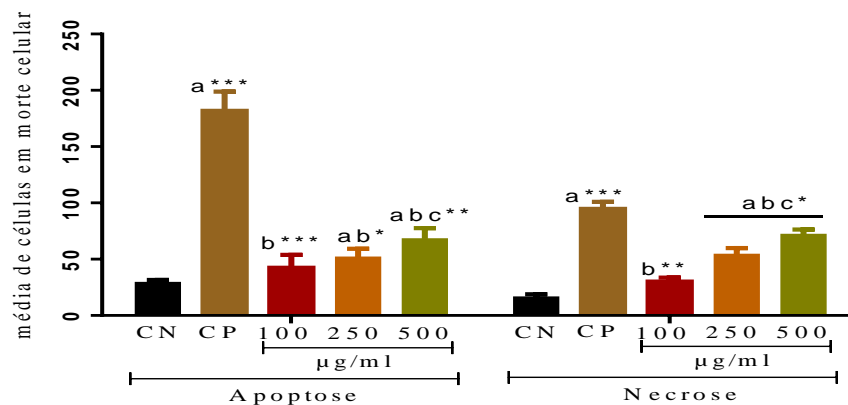
ANOVA one-way com pós teste de Tukey. (a) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN; (b) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a DOXO (CP); (c) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a menor concentração (100 µg/ml).

3.5 Avaliação da mutagenicidade do alfa-terpineol

O alfa-terpineol mostrou efeitos mutagênicos por indução de micronúcleos em linfócitos, como também apresentou aumento significativo no número de pontes e brotos nucleares apenas para a concentração de 500 µg/mL quando comparado com o controle negativo. Embora a maior concentração não tenha efeito mutagênico maior que o CP, a mesma causou maior efeito mutagênico para micronúcleos e brotos em relação a menor concentração (Tabela 4). Em relação a citotoxicidade representado pelos índices de divisão celular (IDN) e pelo índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade (IDNC),

novamente, apenas a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentou efeito estatisticamente significativo. Além disso, o composto em questão induziu significativamente o aumento de apoptoses e necroses para os tratamentos de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com o CN. O monoterpene estudado causou morte celular menor nos linfócitos normais em comparação ao CP (**Figura 3**).

Figura 3. Apoptose e necrose induzidas pelo alfa-terpineol em linfócitos humanos após 72h de exposição.



Valores representam a média \pm desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo CN (^a), comparado à Dox (^b) e comparado à menor concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) (^c).

Tabela 4. Mutagenicidade e citotoxicidade causados pelo alfa-terpineol em linfócitos após 72h de exposição avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).

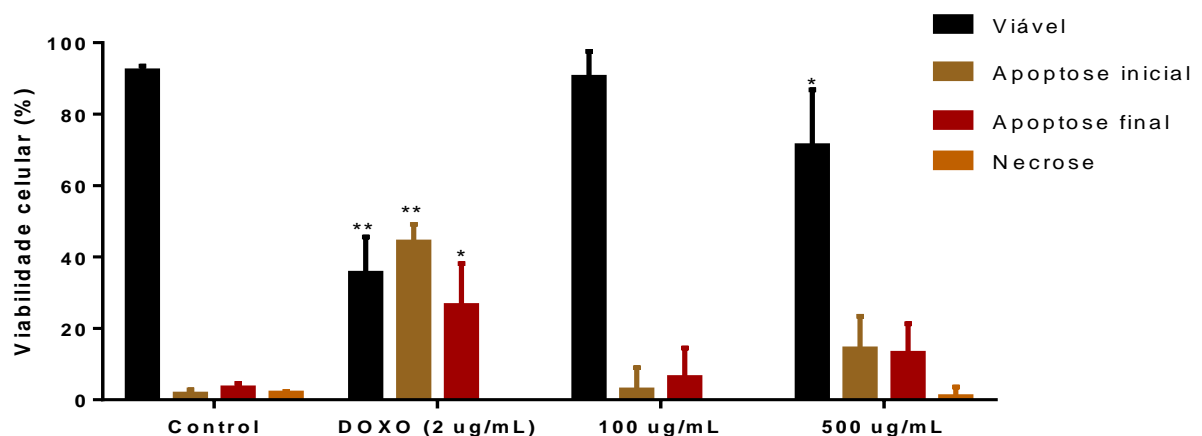
Tratamento	Mutagenicidade			Citotoxicidade	
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
Linfócitos humanos					
CN	3,0 \pm 1,12	3,0 \pm 1,31	2,50 \pm 0,89	1,72 \pm 0,1	1,77 \pm 0,12
DOX	32,0 \pm 3,94 ^a	41,0 \pm 2,11 ^a	34,0 \pm 2,91 ^a	1,11 \pm 0,12 ^a	1,23 \pm 0,1 ^a
100 $\mu\text{g/mL}$	4,9 \pm 2,5 ^b	5,5 \pm 0,7 ^b	6,8 \pm 1,9 ^b	1,7 \pm 0,18 ^b	1,72 \pm 0,19 ^b
250 $\mu\text{g/mL}$	5,8 \pm 2,5 ^b	7,5 \pm 2,7 ^b	7,5 \pm 2,2 ^b	1,69 \pm 0,23 ^b	1,70 \pm 0,33 ^b
500 $\mu\text{g/mL}$	12,5 \pm 3,5 ^{abc}	10,5 \pm 0,7 ^{ab}	16,5 \pm 2,1 ^{abc}	1,48 \pm 0,1 ^{ab}	1,50 \pm 0,11 ^{abc}

Valores representam a média \pm desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. IDN: índice de divisão nuclear. IDNC: índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN. ^b $p < 0,05$ comparado à Dox. ^c $p < 0,05$ comparado à menor concentração (100 $\mu\text{g/mL}$).

3.6 Quantificação da apoptose usando dupla coloração por iodeto de propídio e laranja de acridina.

O quimioterápico utilizado, em relação ao controle negativo, mostrou capacidade citotóxica esperada, com a diminuição estatística das células viáveis e a capacidade de indução de apoptoses. Para o monoterpeneo alfa-terpineol, a concentração de 100 µg/mL demonstrou ausência de apoptose e necrose nas células de fibroblastos, mostrando semelhança nos resultados quando comparado com controle negativo. Para a concentração de 500 µg/mL houve uma diminuição estatística da porcentagem de células viáveis em comparação com o controle negativo, entretanto, os resultados não apontam atividade apoptótica e necrótica significativa para esse tipo de células avaliadas (Figura 4).

Figura 4: Avaliação da capacidade citotóxica do alfa-terpineol em células MRC-5 (fibroblasto normal de humano) através da marcação fluorescente em microscópio confocal.

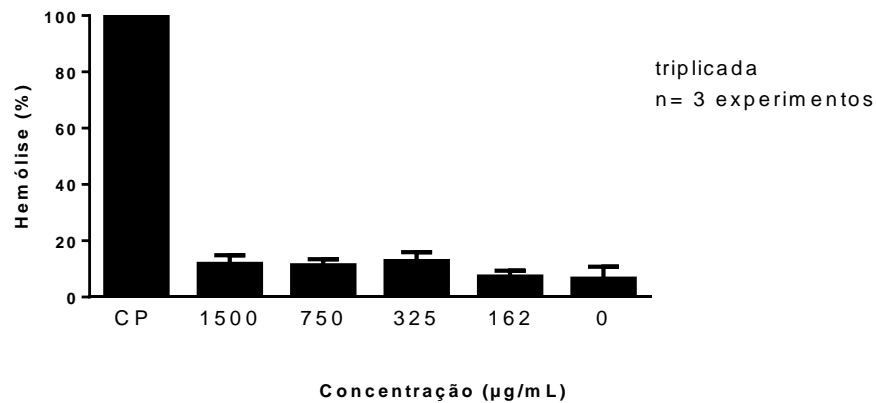


Valores representam a média \pm desvio padrão. ANOVA seguido de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao controle negativo.

3.7 Efeito hemolítico do alfa-terpineol

No presente estudo, o teste de hemólise *in vitro* em eritrócitos de cachorro foi empregado para a avaliação da atividade hemolítica do α -terpineol. As concentrações estudadas variaram entre 1500 – 162 µg/mL, as quais não foi observado efeito hemolítico (% de hemólise) (**Figura 5**), demonstrando que o monoterpeneo não possui atividade hemolítica, o qual não possa ser considerado um potente causador de danos à membrana.

Figura 5: Avaliação da atividade hemolítica do monoterpeneo alfa-Terpineol.



3.8 Avaliação do poder oxidante/antioxidante do alfa-terpineol em *S. cerevisiae*

O alfa-terpineol em concentrações mais altas (100, 250 e 500 µg/ml) não provocou danos oxidativos para as linhagens analisadas quando comparados com o controle negativo (Dados não mostrados). Quando analisado em menores concentrações (10, 35 e 75 µg/ml) associado ao agente estressor (H₂O₂), seu efeito para o teste mostrou um comportamento antioxidante atuando na diminuição, principalmente na menor concentração, dos halos de inibição provocados pelo H₂O₂. Entretanto, essa diminuição não foi evidente nas concentrações de 35 µg/ml para as linhagens *CatΔ* e *Sod1CatΔ* e 75 µg/ml para *Sod1CatΔ*, ambas as concentrações relacionadas ao pós-tratamento (**Tabela 5**).

Tabela 5. Avaliação oxidante/antioxidante do alfa-Terpineol em diferentes tratamentos com H₂O₂ utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas em enzimas antioxidantes. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).

Tratamentos		Linhagens					
		<i>SODWT</i>	<i>Sod1Δ</i>	<i>Sod2Δ</i>	<i>Sod1Sod2Δ</i>	<i>CatΔ</i>	<i>Sod1CatΔ</i>
Salina		0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25
H ₂ O ₂		14,35 ± 0,25 ^a	14,73 ± 2,28 ^a	7,82 ± 0,45 ^a	11,35 ± 1,01 ^a	8,10 ± 0,70 ^a	8,37 ± 0,22 ^a
10 µg/ml	Pré-tratamento	12,98 ± 2,79 ^a	10,70 ± 1,79 ^{ab}	6,00 ± 0,75 ^a	9,25 ± 1,56 ^a	8,47 ± 4,32 ^a	7,27 ± 1,96 ^a
35 µg/ml		13,45 ± 1,65 ^a	9,75 ± 1,16 ^{ab}	4,12 ± 0,22 ^{ab}	8,67 ± 1,31 ^{ab}	8,22 ± 12,16 ^a	7,70 ± 1,04 ^a
75 µg/ml		12,23 ± 1,30 ^a	9,25 ± 2,47 ^{ab}	4,87 ± 1,27 ^{ab}	11,23 ± 2,82 ^a	8,25 ± 12,76 ^a	7,42 ± 1,88 ^a
Salina		0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25
H ₂ O ₂		14,35 ± 1,23 ^a	14,73 ± 2,28 ^a	7,82 ± 0,45 ^a	11,35 ± 1,01 ^a	8,10 ± 0,70 ^a	8,37 ± 0,22 ^a
10 µg/ml	Co-tratamento	8,32 ± 1,67 ^{ab}	8,00 ± 7,07 ^{ab}	5,77 ± 4,95 ^a	3,47 ± 2,87 ^{ab}	5,40 ± 2,57 ^a	4,20 ± 1,15 ^{ab}
35 µg/ml		13,03 ± 1,07 ^a	11,28 ± 3,27 ^a	7,57 ± 2,75 ^a	8,82 ± 1,01 ^a	8,30 ± 2,57 ^a	6,70 ± 0,99 ^a
75 µg/ml		10,18 ± 0,75 ^{ab}	9,57 ± 2,23 ^a	7,12 ± 0,85 ^a	7,15 ± 0,66 ^{ab}	9,52 ± 2,57 ^a	7,50 ± 0,86 ^a
Salina		0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25	0,12 ± 0,25
H ₂ O ₂		14,35 ± 1,23 ^a	14,73 ± 2,28 ^a	7,82 ± 0,45 ^a	11,35 ± 1,01 ^a	8,10 ± 0,90 ^a	8,37 ± 0,22 ^a
10 µg/ml	Pós-tratamento	10,70 ± 1,25 ^{ab}	9,25 ± 1,73 ^{ab}	5,22 ± 0,18 ^{ab}	10,10 ± 1,32 ^{ab}	6,62 ± 3,21 ^a	7,60 ± 2,01 ^a
35 µg/ml		13,60 ± 3,08 ^a	10,15 ± 1,38 ^{ab}	6,87 ± 3,42 ^a	10,95 ± 1,26 ^a	10,68 ± 1,50 ^a	9,92 ± 1,05 ^a
75 µg/ml		14,05 ± 1,11 ^a	12,98 ± 1,12 ^a	6,17 ± 3,47 ^a	8,02 ± 1,02 ^{ab}	7,92 ± 3,79 ^a	9,70 ± 3,46 ^a

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Tukey*. Valores de significância para ^a p<0.001 comparado à salina, ^b p<0.001 comparado à H₂O₂.

4. DISCUSSÃO

O alfa-terpineol tem vasta utilização em indústrias de processamento de minerais como agente de flotação, produtos cosméticos, produtos de limpeza e perfumaria (BAPTISTELLA et al., 2009), mas também apresenta um potencial farmacológico como antinociceptivo, anti-inflamatório (BAPTISTELLA et al., 2009, De OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto, o presente estudo aponta sua toxicidade em *Artemia salina*, nas concentrações testadas, corroborando com a toxicidade encontrada em estudos anteriores (MACLANGULIN, 1999), incluindo os relatados em *A. salina* (SATAYAL et al., 2013), no qual sua toxicidade ($CL_{50} = 11,8 \mu\text{g/mL}$) foi evidenciada em óleo essencial de *Pinus roxburghii*, e em *Litsea cubeba* (ABDUL; AHMAD, 1984). Sua atividade tóxica contra os náuplios de *A. salina* apresentou CL_{50} variando de 25,1 a 30,9 $\mu\text{g/mL}$. Em outros estudo, sua toxicidade de dose aguda em ratos Sprague-Dawley por via intraperitoneal, com DL_{50} de 0,847 g/kg (IC 95% de 0,70 e 1,01 g/kg) foi também demonstrada (RFIM, 1984).

Os efeitos toxicológicos do alfa-terpineol também foram observados pela inibição do crescimento das raízes, em meristemas de raízes de *Allium cepa*, com correlação positiva entre o atraso do crescimento radicular e celular e as aberrações cromossômicas (anáfase com pontes, anáfase com atraso e micronúcleo) em dose-dependente. Também foram observados efeitos citotóxicos pela diminuição do índice mitótico. Existem relatos de que a toxicidade (TR) e a citotoxicidade (IM) em teste dose-dependente estão relacionadas entre si (MASOOD; MALIK, 2013, ILDIZ et al, 2013). O alfa-terpineol apresentou efeito citostático contra seis linhagens celulares cancerosas humanas de cinco origens histológicas e embrionárias diferentes (mama, pulmão, próstata, ovário e leucemia) (BICAS et al., 2011). Além da atividade citotóxica do composto, os efeitos mutagênicos também foram observados e quantificados no estudo em *A. cepa*, pelo aumento de anáfase com pontes e anáfase com atraso. As pontes cromossômicas resultam de rupturas cromossômicas e cromátides, indicando o efeito clastogênico (BIANCHI et al., 2015), enquanto que cromossomo em atraso indica uma falha completa do aparelho do fuso mitótico ou a formação do cromossomo acêntrico, durante a troca ou terminação retardada (EL-SHAZLY et al, 2000). Um estudo com seis monoterpenos (GOMES – CARNEIRO et al., 1998) observou que o terpineol, um isômero do alfa-terpineol, demonstrou efeitos mutagênicos no teste de

Ames, causando um ligeiro aumento do número de colônias de cepa TA102 nas doses de 750 µg/placa e 1250 µg/placa.

O potencial genotóxico e mutagênico do alfa-terpineol em linfócitos humanos, observado nos testes cometa e CBMN foi evidente apenas na maior concentração. Esses resultados corroboram com os estudos de (FLETCHER et al., 2005), o qual constatou que a mutagenicidade do monoterpeneo 4-terpineol, utilizando o teste de AMES, ocorre somente em altas concentrações. Um outro estudo desenvolvido por (PEREIRA et al., 2014) sobre potencial genotóxico do óleo essencial volátil derivado da planta *Melaleuca alternifolia* em linfócitos humanos, demonstrou que o mesmo em nenhuma das concentrações testadas (95 µg/mL, 182 µg/mL e 365 µg/mL) causou um aumento significativo nas frequências observadas de micronúcleos, quando comparadas com as culturas não tratadas (controle negativo). Além disso, não foram observadas diferenças significativas em relação às frequências de aberrações cromossômicas entre as concentrações testadas e o controle negativo.

O alfa-terpineol induziu apoptoses em linfócitos humanos apenas nas duas maiores concentrações, como avaliado por fragmentação de DNA de linfócitos humanos em gel (Ensaio cometa). Entretanto, no teste de quantificação da apoptose em células de fibroblastos, nas concentrações testadas, não causou apoptose e necrose. Esses dados apontam não citotoxicidade em células normais (linfócitos, fibroblastos humanos, macrófagos murino). Entretanto, estudos indicaram citotoxicidade *in vitro* de óleos essenciais de folhas e flores de *Callistemon citrinus*, tendo o alfa-terpineol como um dos compostos majoritários (KUMAR et al, 2015, BICAS etl al, 2011), demonstrou efeitos antiproliferativos em células de carcinoma do pulmão humano (A549) e glioma de rato (C-6) por indução de apoptose, com aplicação do teste MTT, como observado em nossos estudos. Porém, o óleo da flor e folha protegeram células mononucleadas do sangue periférico humano (PBMCs) sem causar toxicidade.

O alfa-terpineol teve potencial antitumoral para linhagem tumoral murina B16-F10 em concentrações iguais ou abaixo de 100 µg/mL. Existem relatos indicando que o seu potencial antitumoral, como inibidor de crescimento e indutor de apoptose em células tumorais do por mecanismos de inibição da atividade de NF-kB e atividade inibitória nas quinases JNK1, JAK3, AKT e IKKbeta (HASSAN et al, 2010). Entretanto, estudos revelaram mecanismos associados a parada do ciclo celular (TSE et

al, 2008; BOEHM et al., 2008), com efeitos sinérgicos com a apoptose, observado em linhagens celulares do câncer de colo humano (HCT116 p53 $+/+$ e p53 $-/-$) (ITANI et al., 2008).

Também existem relatos em células HCT116 p53 $+/+$, que a apoptose pode ocorrer pela liberação do citocromo c do espaço intermembranar das mitocôndrias, devido à ativação do Bax e à inibição do Bcl-XL, como também devido a ativação da caspase-3 e clivagem da PARP. Já em células HCT116 p53 $-/-$, embora a liberação do citocromo c e clivagem PARP tenha sido evidente, onde a clivagem da procaspase-3 não ocorreu, e o potencial da membrana mitocondrial sofreu ruptura em menor extensão, indicando que a apoptose ocorre por inativação da PARP de maneira independente de caspases e de p53 (ITANI et al., 2008).

A atividade citotóxica e antitumoral de vários monoterpenos parece estar relacionado a diferentes mecanismos que promovem a inibição da isoprenilação pós-tradução de proteínas reguladoras do crescimento celular e indução de apoptose (VELLOSA et al., 2013; CROWELLI, 1999). Possivelmente esses mecanismos podem ser alcançados pelo alfa-terpineol através da inibição de JAK3, MAPK8 (JNK1), NFkB (via AKT e IKKbeta), ativação de caspases 3 e clivagem da PARP, como citados anteriormente no presente estudo. Outros mecanismos podem ser envolvidos em apoptoses. Estudos apontam que os compostos citotóxicos são oxidantes e/ou antioxidantes em observação á dose e/ou concentração (KASHIF et al., 2015; YANEZ et al., 2004).

No presente estudo o alfa-terpineol não evidenciou atividade oxidativa em *S. cerevisiae*, pela inibição de crescimento de linhagens proficientes e mutadas em defesas antioxidantes, como relatado por (ROSA et al., 2007). Entretanto, efeitos antioxidantes in vitro para o alfa-terpineol foram relatados frente ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e radical hidroxila, em que o composto em questão foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por dihidrocloridrato de 2, 2'- azobis 2 - metilpropinamida (AAPH), reduzindo a quantidade de TBARS formado (SILVA et al., 2012), bem como pela capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC) (BICAS et al., 2011). O estresse oxidativo é considerado como uma condição metabólica em que um desequilíbrio ocorre em sistemas pró-antioxidantes ou sistema de defesa corporal, em que essas condições podem mediar o dano celular através da oxidação de bio-macromoléculas,

como, lipídios, proteínas e DNA (YANEZ et al., 2004). Entretanto, a citotoxicidade e mutagenicidade do alfa-terpineol encontrada no presente estudo parece não ser explicada por mecanismos de estresse oxidativo.

Por outro aspecto, para o teste de hemólise, como triagem para citotoxicidade (WAGNER et al, 2003), não houve evidência de citotoxicidade nas concentrações estudadas. A insuficiência de hemólise corrobora com a ausência de citotoxicidade em macrófagos normais relatado no teste de viabilidade por MTT, reforçando a hipótese de citotoxicidade seletiva do alfa-terpineol. Porém, o estudo de (SHARMA; SHARMA, 2001) comparando a citotoxicidade em células de fibroblastos e o potencial hemolítico de sete monoterpenos, mostrou que o alfa-terpineol em concentrações mais altas do que a que estudamos, em 940 µg/mL, pode ter citotóxico e hemolítico.

Os terpenos têm a capacidade de aumentar a fluidez da membrana celular sem diferenças significativas entre os monoterpenos (MENDANHA et al., 2013). Eles podem efetivamente agir como espaçadores na membrana para fluidificar os lipídios e criar rupturas na rede de ligação de hidrogênio da interface polar (MAGNUSSON et al., 1997). Além disso, terpenos cíclicos como alfa-terpineol possuem efeito intensificador de penetração na barreira do estrato córneo (DOS ANJOS; ALONSON, 2008). O principal modo de ação desses intensificadores pode ser descrito pela teoria da partição de proteínas lipídicas (WILLIAMS & BARRY, 1991) Assim, parece que os mecanismos de citotoxicidade do alfa-terpineol é alterar a permeabilidade da membrana celular, aumentando sua fluidez e, uma vez no espaço intracelular pode ativar vias bioquímicas que interferem no ciclo celular e indução de apoptose. Além disso, os dados do estudo também apontam mecanismos citogenéticos e moleculares para a ação antitumoral do alfa-terpineol.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O alfa-terpineol apresentou toxicidade nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 µg/mL pelos testes de letalidade de *A. salina* e nas concentrações de 100, 50 e 10 µg/mL no bioensaio com células vegetais de *Allium cepa*. Ainda para este teste, foi observado o efeito citotóxico pela diminuição significativa do índice mitótico e efeito mutagênico pelos elevados números de alterações cromossômicas analisadas nas células vegetais. Também apresentou citotoxicidade em células tumorais murinas de B16-F10 e não citotoxicidade em células normais humanas (macrófagos, linfócitos e MRC5 –

fibroblastos) em 100 µg/mL. Em 250 e 500 µg/mL o alfa-terpineol induz efeitos toxicogénicos por mecanismos citogénicos compatíveis com a instabilidade genética e indução de apoptose.

REFERÊNCIAS

- ABDUL, Hammid S.; AHMAD, Fasihuddin. Chemotype of Litsea cubeba Essential Oil and Its Bioactivity. **Natural product communications**, v. 10, n. 7, p. 1301-1304, 2015.
- BAPTISTELLA, Lúcia Helena Brito et al. Preparação do (+)-±-terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, 2009.
- BARILE, Frank A. Introduction to *in vitro* Cytotoxicology. **Mechanisms and Methods**. CRC Press, 1994.
- BIANCHI, Jaqueline; MANTOVANI, Mario Sérgio; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the Allium cepa cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.
- BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011.
- BOEHM, Ingrid. Apoptosis in physiological and pathological skin: implications for therapy. **Current molecular medicine**, v. 6, n. 4, p. 375-394, 2006.
- CALCABRINI, Annarica et al. Terpinen-4-ol, the main component of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 349-360, 2004.
- CAMARGOS, Heverton Silva et al. Terpenes increase the lipid dynamics in the Leishmania plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104429, 2014.
- COULIDIATI, Tangbadia H. et al. Distinct effects of novel naphthoquinone-based triazoles in human leukaemic cell lines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 12, p. 1682-1695, 2015.
- CROWELL, Pamela L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 3, p. 775S-778S, 1999.
- DE MORAES ALVES, Michel Muálem et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania

major. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 9, p. 893-903, 2017.

DE MORAES, Germano Pinho et al. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 2, p. 18-28, 2016.

DE OLIVEIRA, Iuri Marques et al. Dicholesteroyl diselenide: Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 1-11, 2014.

DE OLIVEIRA, Makson GB et al. α -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120-125, 2012.

DOS ANJOS, Jorge Luiz Vieira; ALONSO, Antonio. Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. **International journal of pharmaceutics**, v. 350, n. 1-2, p. 103-112, 2008

EL-SHAZLY, Hanaa H.; EI-SHEIKH, Iman A. Arrest of mitotic cycle and induction of chromosomal aberrations by aflatoxin B2 in root cells of *Vicia faba* L. **Cytologia**, v. 65, n. 2, p. 113-122, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.2; n.5, p.1084-1104, maio, 2007.

FLETCHER, J. P. et al. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 2, p. 81-86, 2005.

GOMES-CARNEIRO, Maria Regina; FELZENSZWALB, Israel; PAUMGARTTEN, Francisco JR. Mutagenicity testing of (\pm)-camphor, 1, 8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 416, n. 1, p. 129-136, 1998.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos et al. Antitumoral activity of novel 1, 4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 3, p. 229-234, 2016.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos et al. Essential oil composition and antinociceptive activity of *Thymus capitatus*. **Pharmaceutical Biology** v. 55, n. 1, 2017

GUERRA, Marcelo; SOUZA, MJ de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, p. 201, 2002.

HASSAN, Saadia Bashir et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.

ITANI, Wafica S. et al. Anti colon cancer components from lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: mechanistic basis. **Cancer biology & therapy**, v. 7, n. 11, p. 1765-1773, 2008.

JING, Guo-xing et al. Influence of α -terpineol on the growth and morphogenesis of *Penicillium digitatum*. **Botanical studies**, v. 56, n. 1, p. 35, 2015.

KASHIF, Muhammad et al. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 5, p. 672-681, 2015.

KAUR, Swayamjot et al. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala—an Indian herbal drug. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 15-20, 2005.

KUMAR, Dharmesh et al. Chemical composition and in vitro cytotoxicity of essential oils from leaves and flowers of *Callistemon Citrinus* from western himalayas. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0133823, 2015.

MAGNUSSON, BEATRICE M.; RUNN, P.; KOSKINEN, L. O. D. Terpene-enhanced transdermal permeation of water and ethanol in human epidermis. **Acta dermatovenereologica-stockholm-**, v. 77, p. 264-267, 1997.

MASOOD, F., MALIK, A. Mutagenicity and genotoxicity assessment of industrial wastewaters. **Environment Science Pollution Research**. v. 20, p.7386–7397. 2013.

MCLAUGHLIN, Jerry L.; CHANG, Ching-Jer. Simple (bench-top) bioassays and the isolation of new chemically diverse antitumor and pesticidal agents from higher plants. In: **Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense**. Springer US, p. 89-132, 1999.

MENDANHA, Sebastião A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 323-329, 2013.

MENDES, Anderson Nogueira et al. Encapsulation of *Piper cabralanum* (Piperaceae) nonpolar extract in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 8363, 2017..

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

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

MUKHERJI, Ruchira; PRABHUNE, Asmita. A new class of bacterial quorum sensing antagonists: glycomonoterpenols synthesized using linalool and alpha terpineol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 841-849, 2015.

OLIVEIRA, Makson GB et al. α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-biological interactions**, v. 254, p. 54-62, 2016.

PEREIRA, Tais Susane et al. In vitro genotoxicity of Melaleuca alternifolia essential oil in human lymphocytes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 852-857, 2014.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials Inc.), 1984a. 14-Day single dose subacute toxicity study with alpha-Terpineol, 1 August, 1984.

ROSA, Renato Moreira et al. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 633, n. 1, p. 35-45, 2007.

SATYAL, Paudel, P., Raut, J., Deo, A., Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. Volatile constituents of Pinus roxburghii from Nepal. **Pharmacognosy research**, v. 5, n. 1, p. 43, 2013.

SHARMA, Poonam; SHARMA, Jayashri Devi. In vitro hemolysis of human erythrocytes—by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SILVA, O. A. et al. Potencial antioxidante in vitro do (-)- α -terpineol. **Biofar Rev Biol Farm**, v. 8, p. 140-152, 2012.

SMEE, Donald F. et al. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of virological methods**, v. 106, n. 1, p. 71-79, 2002.

SPEIT, Günter; ROTHFUSS, Andreas. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 79-90.

SU, Yu-Chang et al. Composition, anticancer, and antimicrobial activities in vitro of the heartwood essential oil of Cunninghamia lanceolata var. konishii from Taiwan. **Natural product communications**, v. 7, n. 9, p. 1245-1247, 2012.

TSE, Wai-Pui et al. Arsenic trioxide, arsenic pentoxide, and arsenic iodide inhibit human keratinocyte proliferation through the induction of apoptosis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 2, p. 388-394, 2008.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p.1-7, 2012.

VELLOSA, J. C. R. et al. Metabolic and inflammatory changes in oxidative stress conditions. **Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.** 37:4, 2013.

WAGNER, K.-H., ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. **Ann. Nutr. Metab.** 47, 95–106, 2003.

WILLIAMS, Adrian C.; BARRY, Brian W. Terpenes and the lipid–protein–partitioning theory of skin penetration enhancement. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 1, p. 17-24, 1991.

YÁÑEZ, Josefa et al. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. **Nutrition and cancer**, v. 49, n. 2, p. 191-199, 2004.

YILDIZ M, IBRAHIM H C, MUHSIN K, FATIH A F., HAKAN T. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere** v.75, p. 934–938. 2009.

CAPÍTULO II

Efeitos antitumorais do monoterpeno alfa-terpineol em modelo animal de sarcoma 180.

O artigo será submetido na revista Journal of Cellular Biochemistry no link abaixo:
<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10974644/homepage/forauthors.html>.

Fator de impacto: 2.9; Qualis A2 para Farmácia e Biotecnologia.

Efeitos antitumorais do alfa-terpineol em modelo animal de sarcoma 180.

Helber Alves Negreiros^{1,2}; Kariely Gonçalves de Moura²; Maria Luiza Lima Barreto do Nascimento¹; Débora Caroline do Nascimento Rodrigues³; Paulo Michel Pinheiro Ferreira⁴; Débora Cavalcante Brás¹; Marlene Gomes de Farias¹; Layde de Sousa Corrêa; Ana Rafaela Silva Pereira¹; Lubna Karine Beserra Santos¹; Juan Carlos Ramos Gonçalves⁵; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹; João Marcelo de Castro e Sousa^{1,2}.

¹ Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica (LAPGENIC). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí.

² Laboratório de Citogenética e Mutagenese (LCM). Campus Senador Helvídio Nunes de Barros-Picos-PI. Universidade Federal do Piauí.

³ Laboratório de Cancerologia Experimental - LabCancer. Universidade Federal do Piauí.

⁴ Laboratório de Cancerologia Experimental - LabCancer. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Programas de Pós-Graduações em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal do Piauí.

⁵ Departamento de Bioquímica e Farmacologia. Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI. 64049-550.

RESUMO

O alfa-terpineol é um monoterpeno com diversas atividades farmacológicas (antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, hipotensora e antiprurítica). O estudo avaliou o potencial antitumoral do alfa-terpineol em modelo animal para Sarcoma 180. Foram usados os bioensaios *de* viabilidade por azul de tripan, teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese, ensaio cometa, fragmentação do DNA em gel, citometria de fluxo e viabilidade celular por fluorescência. As células do líquido ascítico de sarcoma 180 foram obtidas de *Mus musculus*. O alfa-terpineol foi testado em 100, 250 e 500 µg/mL. A Doxorrubicina e a Cisplatina foram utilizados como controle positivo. Os resultados mostraram o efeito citotóxico do alfa-terpineol em células de S180, reduzindo a viabilidade celular para 50,9; 38,53; 30,82%, quando incubado em 100, 250 e 500 µg/mL, respectivamente. O alfa-terpineol induziu efeitos genotóxicos pelos elevados índices e frequências de danos e, clastogênicos pelo aumento de indução de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. A fragmentação de DNA e diminuição de viabilidade celular indicam que o alfa-terpineol pode causar apoptoses iniciais, tardias e necroses. Os dados apontam que o alfa-terpineol tem potencial antitumoral, por mecanismos citogenéticos e/ou perda de integridade de membranas que levam a morte celular.

Palavras – chave: Produtos naturais. Monoterpeno. Genotoxicidade. Câncer.

ABSTRACT

Alpha-terpineol is a monoterpene with several pharmacological activities (antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, hypotensive and antipruritic). The study evaluated the antitumor potential of alpha-terpineol in animal model for Sarcoma 180. In vitro bioassays were used: tripan blue viability, micronucleus test with cytokinesis block, comet assay, gel DNA fragmentation, flow cytometry and cell viability by fluorescence. Ascitic fluid cells from sarcoma 180 were obtained from *Mus musculus*. Alpha-terpineol was tested at 100, 250 and 500 µg / ml. Doxorubicin and Cisplatin were used as a positive control. The results showed the cytotoxic effect of alpha-terpineol on S180 cells, reducing cell viability from 100%, relative to the negative control, to 50.9; 38.53; 30.82%, when incubated at 100, 250 and 500 µg / mL, respectively. Alpha-terpineol induced genotoxic effects due to the high indexes and frequencies of damage and clastogenic by the increase of induction of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds. DNA fragmentation and decreased cell viability indicate that alpha-terpineol can cause early, late, and necrotic apoptosis. The data indicate that alpha-terpineol has antitumor potential, by cytogenetic mechanisms and / or loss of membrane integrity leading to cell death.

Keywords: Natural products. Monoterpene. Genotoxicity. Cancer.

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos antineoplásicos utilizados clinicamente são isolados de espécies de plantas ou são fundamentados em tais substâncias (KUŽMA et al., 2016). Estudos como os de (SUHAIL et al., 2011; MANJAMALAI; GRACE, 2012; GIROLA et al., 2015; FITSIOU et al., 2016) relatam sobre a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de vários óleos essenciais obtidos de plantas. Os óleos essenciais são produtos naturais com grande potencial farmacológico contra diversos tipos de tumores (SOBRAL et al., 2014). Essa atividade antitumoral desses óleos essenciais de diferentes espécies vegetais, tem sido associada à existência de monoterpenos em sua composição (MAGGI et al., 2013).

O alfa-terpineol é um álcool monoterpênico oxigenado volátil que possui fórmula $C_{10}H_{18}O$ e peso molecular 154.24. É amplamente utilizado na fabricação de perfumes, cosméticos, sabonetes e agentes antissépticos. É um componente monoterpeneo importante presente em óleos essenciais. Estudos sobre esse composto revelam excelente atividade neuroprotetora (PARVARDEH et al., 2016), antibacteriana

(LI et al., 2014), efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes (MOGHIMI et al., 2016) atividade antifúngica (HAMMER et al., 2003), antibacteriana (ZENGIN et al., 2014) e atividade nematicida (ECHEVERRIGARAY et al., 2010) e atividade antitumoral (HASSAN et al., 2010).

Diversos estudos com fitoquímicos apontam para atividades antitumorais de produtos naturais, por indução de apoptoses e inibição de proliferação celular (BEEVI et al., 2010; WU et al., 2010). A instabilidade cromossômica e os danos ao DNA estão bem associados a diversas doenças, especialmente o câncer. Portanto, as anormalidades citogenéticas são importantes para o entendimento dos mecanismos da tumorigênese. As alterações citogenéticas envolvem aneuploidia, deleções, inserções, quebras e perdas de cromossomos (GIAM; RANCATI, 2015).

Diversas metodologias toxicogenéticas são utilizadas para avaliação *in vitro* desses tipos de mutações bem como a avaliação da capacidade de induzir morte celular. Dentre os testes, o bioensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) pode determinar níveis de danos citogenéticos de vários agentes citotóxicos, com perspectivas para atividade antitumoral, em células binucleadas (FENECH, 2006; FENECH et al., 2011; NAKAMURA et al., 2015). Em outras abordagens, o ensaio cometa versão alcalina e a teste fragmentação de DNA podem detectar baixos níveis de danos ao DNA, a exemplo de quebras de fitas simples e duplas (KAWAGUCHI et al., 2010). Ademais, bioensaios mais refinados como citometria de fluxo e marcação por fluorescência são importantes testes biológicos para detecção de morte celular provocados pela substância teste avaliada (DAVISON, 2016).

Portanto, sabendo-se da importância da busca por novos compostos naturais com potencial terapêutico na quimioterapia, o estudo teve por objetivo a avaliação dos possíveis efeitos antitumorais do monoterpeneo alfa-terpineol, por mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em cultura primária de Sarcoma 180 (S-180), por meio da aplicação de bioensaios toxicogenéticos *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes químicos utilizados no estudo

O monoterpeneo alfa-terpineol foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura RPMI 1640, penicilina e estreptomicina foram obtidos da

GIBCO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A doxorubicina (Dox) foi obtida da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil). Alfa-terpineol foi solubilizado em três diferentes concentrações (100, 250 e 500 µg/ml), utilizando o solvente DMSO 1%. A Doxorubicina e Cisplatina foram utilizadas em uma única concentração (2 µg/mL e 50 µg/mL, solubilizada em dH₂O, respectivamente).

2.2 Cultura primária de Sarcoma 180

As células de S180 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos (UFPI, #167/16). Após 10 dias da inoculação, o líquido ascítico, contendo células tumorais, foi removido por punção na cavidade abdominal. Em seguida, as células de S180 foram contadas em câmara de Neubauer ($0,5 \times 10^6$ células/mL) e incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C para posteriormente serem realizados os testes.

2.3 Teste de viabilidade celular por azul de tripan em cultura primária de S180

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão por azul de Tripan, de acordo com Strober (2015). Após 24 horas de tratamento com alfa-terpineol e controles, 90 µL da suspensão de células ($0,5 \times 10^6$ células/mL) foram retirados das culturas e acrescidos de 10 µL do azul de Tripan. As células não viáveis foram contadas por sua coloração azulada, sendo consideradas como células mortas. Em contraste, as células viáveis não apresentam esta coloração devido às suas capacidades de expulsarem o azul de Tripan. As diferenciações celulares foram observadas em microscopia óptica com o aumento de 400X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

2.4 Teste de genotoxicidade de ensaio cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit & Rothfuss (2012). Alíquotas de 10 µL de suspensão celular de S180 ($0,5 \times 10^6$ células/mL) após o tratamento com alfa-terpineol (100, 250 e 500 µg/mL) por 24h, foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90

μL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos; e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID), frequência de danos (FD) e % de apoptoses de 100 células em triplicata. O ID foi calculado por meio da fórmula: $\text{ID} = \Sigma$ (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $\text{FD} = 100 - \text{n}^\circ$ de células classe 0.

2.5 Análise de Fragmentação de DNA Usando Eletroforese em Gel de Agarose

Para o teste, foram plaqueadas $0,5 \times 10^6$ μg de linhagem de sarcoma 180 em meio RPMI 1640 e tratadas com 100, 250 e 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de alfa-terpineol por 24 horas a 37 ° C e 5% de CO₂. Após a exposição, o DNA celular foi extraído pelo protocolo Salting Out (refX, ultima ref do artigo). A quantificação do DNA foi realizada com o sistema dsDNA Quantfluor (Promega, Madison, WI - USA). Para eletroforese, 200 ng de DNA foram adicionados e revelados em gel de agarose a 0,8%, utilizando 1: 10000 Diamond Dye para cada amostra. O gel foi examinado e fotografado por um sistema de documentação em gel ultravioleta. Para eletroforese foi executado em 80V e 50mA por 2 h. A escada de DNA 1 kb mais (invitrogen) e 10 μM de cisplatina foi usada como marcador e controle positivo, respectivamente.

2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina Sigma-Aldrich [St.

Louis, MO, EUA] foram adicionados 20 µL de suspensão celular de S180 ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas o alfa-terpineol de acordo com cada tratamento (100, 250 e 500 µg/mL) e controles. As células foram incubadas por 44 h a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período, foram adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado, para nova centrifugação após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético, 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas, previamente codificadas, foram analisadas em teste cego, com auxílio de microscópio óptico (1000X), considerando os danos citogenéticos (micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas) presentes em 1000 células por lâmina em triplicata.

2.6.1 Teste de citotoxicidade pelo IDN e IDNC dos grupos testados no teste de CBMN

O índice de divisão nuclear (IDN) e o índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade (IDNC) auxiliam a compreensão da interferência da substância teste à mitose celular de Sarcoma 180. Os seus cálculos para avaliação de citotoxicidade foram realizados pelas fórmulas:

$$\text{IDN} = \frac{\text{M1} + 2\text{X}(\text{M2}) + 3\text{X}(\text{M3}) + 4\text{X}(\text{M4})}{\text{Número total de células}}$$

$$\text{IDNC} = \frac{(\text{Apoptose} + \text{Necrose} + \text{M1} + 2\text{x}(\text{M2}) + 3\text{x}(\text{M3}) + 4\text{x}(\text{M4}))}{\text{Número total de células}}$$

Nota: “Apoptose” representa o número de células apoptóticas, “Necrose” o número de células necróticas, “M1” o número de células viáveis com 1 núcleo, “M2” o número de células viáveis com 2 núcleos, “M3” o número de células viáveis com 3 núcleos, “M4” o número de células viáveis com 4 núcleos, e “Número total de células” representa o número total de células analisadas, 1.000 por lâmina.

2.7 Quantificação da apoptose usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) com dupla coloração por iodeto de propídio e laranja de acridina

A caracterização morfológica foi realizada utilizando dupla coloração de iodeto de propídio (IP) e de laranja acridina (LA) e observada sob um microscópio de fluorescência. Resumidamente, as células foram plaqueadas a uma densidade de 1×10^6 células/mL em microplacas com 35 mm de diâmetro e tratadas com a concentração de IC_{50} do fármaco de teste. As células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a $37^\circ C$ durante 24 h e depois foram lavadas duas vezes utilizando PBS para remover o meio remanescente. Um volume igual de corante fluorescente (LA/IP) contendo LA (10 $\mu g/ml$) e IP (10 $\mu g/mL$) foram adicionados e as células recém-coradas foram observadas em um microscópio de fluorescência UV em 30 min antes da cor fluorescente começar a desaparecer. As porcentagens de células viáveis, necróticas, apoptóticas precoces e apoptóticas tardias foram determinadas em mais de 200 células por lâmina. Os critérios de identificação foram os seguintes: (a) as células viáveis tem um núcleo verde ou não corado, com uma estrutura intacta; (b) células apoptóticas precoces exibem um núcleo verde-claro que mostra a condensação da cromatina no núcleo; (c) células apoptóticas tardias mostram áreas laranja densas de condensação de cromatina e formação de bolhas na membrana; (d) células secundárias necróticas / mortas tem núcleo vermelho. Este ensaio fornece uma avaliação quantitativa útil e foi realizado em triplicada.

2.8 Teste da viabilidade celular por citometria de fluxo

Para determinar a porcentagem de células tumorais S180 vivas, em apoptose e em necrose após exposição ao alfa-terpineol por 24h, $0,5 \times 10^6$ células foram adicionadas a cada um dos cinco tubos, o tubo não marcado, tubo controle positivo e os 3 tubos com células expostas às concentrações 100, 250 e 500 $\mu g/mL$. Os tubos foram centrifugados para a retirada do meio e foram adicionados 100 μL de solução salina 0,9% e homogeneizados em vortex. Em seguida, 2 μL de Annexin V PE e 2 μL de 7-AAD do kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I *BD Pharmingen*® foram adicionados aos tubos e incubados em ambiente escuro por 30 minutos. Após esse período, 300 μL de solução salina foram adicionados e 30.000 eventos foram adquiridos e gravados em citômetro de fluxo FACSCanto II®.

2.9 Análise estatística

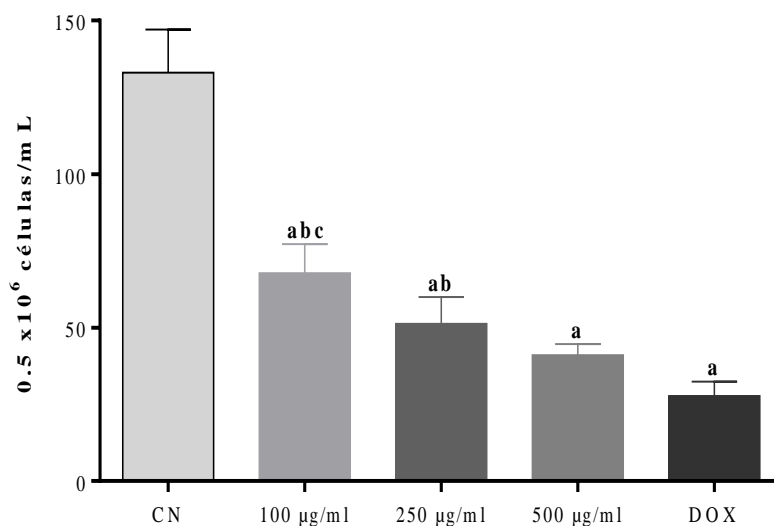
A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média \pm desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Tukey (considerando valores de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$ como significantes), por meio do programa *Graphpad prism 6* (software intuitivo para a Ciência, San Diego, CA). Todos os estudos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade pela viabilidade por azul de tripan em células de Sarcoma 180

O alfa-terpineol, nas concentrações testadas, interferiram, significativamente, na viabilidade celular da cultura primária de S180 (**Figura 1**), indicando efeitos citotóxicos. Observou-se diferenças estatísticas entre a menor e maior concentração do monoterpene em relação ao controle negativo, bem como em relação as duas menores concentrações em comparação à Dox.

Figura 1. Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao alfa-terpineol (100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$).



ANOVA-One-way e pós-teste de *Tukey*. Valores de significância de $p < 0,05$ para ^a comparado ao controle negativo (CN), ^b comparado a DOX, ^c comparado a 500 $\mu\text{g/mL}$.

3.2 Genotoxicidade e citotoxicidade do alfa-terpineol pelo teste cometa

A avaliação do índice de dano (ID) mostrou um aumento significativo para as concentrações testadas (100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bem como o CP quando comparado ao controle negativo. Entretanto, quando comparadas com o CP, as concentrações avaliadas mostraram-se estatisticamente menores. Ademais para ID, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causaram maiores ($p < 0,05$) danos em relação a menor concentração. Para a análise de frequência de dano, as concentrações testadas apresentaram um aumento significativo em relação ao controle negativo, porém sem diferenças estatísticas para o controle positivo. Ademais, o monoterpene nas 03 concentrações avaliadas provocou apoptose nas células tumorais murinas, porém, não foi tão eficiente em causar citotoxicidade comparado ao controle positivo (**Tabela 1**).

Tabela 1: Efeitos genotóxicos (índice de dano e frequência de dano) e avaliação de apoptose em células de sarcoma 180 através do bioensaio cometa versão alcalina.

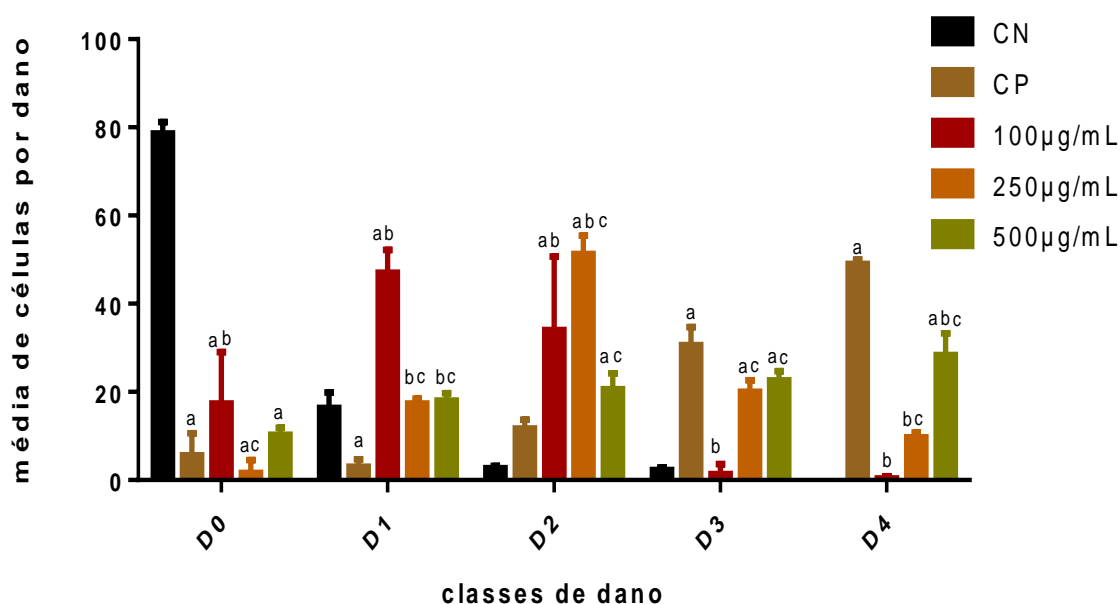
	<i>Concentração</i>	<i>Índice de dano</i>	<i>Frequência de dano</i>	<i>Apoptose (%)</i>
Controle negativo	-	27,6 \pm 2,5	21,3 \pm 2,5	6,0 \pm 2,0
Controle positivo	2 $\mu\text{g}/\text{MI}$	314,3 \pm 15,6 ^a	94,3 \pm 4,9	79,3 \pm 3,0 ^a
alfa-terpineol	100 $\mu\text{g}/\text{MI}$	122,6 \pm 30,0 ^{ab}	82,6 \pm 11,6 ^a	35,0 \pm 10,0 ^{ab}
	250 $\mu\text{g}/\text{MI}$	222,0 \pm 4,5 ^{abc}	98,3 \pm 2,8 ^a	44,6 \pm 15,6 ^{ab}
	500 $\mu\text{g}/\text{MI}$	238,0 \pm 2,6 ^{abc}	89,6 \pm 1,5 ^a	41,6 \pm 2,5 ^{ab}

ANOVA one-way com pós teste de Tukey. (a) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN (XXX); (b) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP (DOX); (c) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a menor concentração (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

O teste cometa também possibilitou a avaliação por classes de danos. Em D0, os tratamentos foram significativamente menores que o controle negativo que mostrou uma média de 78,6 \pm 2,5. No entanto, não houve diferença estatística em comparação com o controle positivo, exceto para a menor concentração. Para D1, apenas a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrou-se estatisticamente aumentado em relação ao controle negativo (16,3 \pm 3,5). Em comparação com controle positivo, todos os tratamentos apontaram um aumento significativo. Em D2 e D3, todos os tratamentos foram estatisticamente maiores que o controle negativo (2,6 \pm 0,5; 2,3 \pm 0,5, respectivamente), exceto para a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da classe de dano

D3. Para o controle positivo de D2, houve aumento estatístico apenas para os tratamentos de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Em D3, apenas o tratamento de 100 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se diminuído em relação ao controle positivo. No tipo D4, apenas a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ junto com o CP demonstraram aumento estatístico em relação ao controle negativo. Além disso, todos os tratamentos apresentaram valores estatisticamente menores em relação ao controle positivo em D4 (Figura 2).

Figura 2: Variação quantitativa dos tipos de dano (D0-D4) para o teste cometa em células de sarcoma 180 tratadas com alfa terpineol nas concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$.



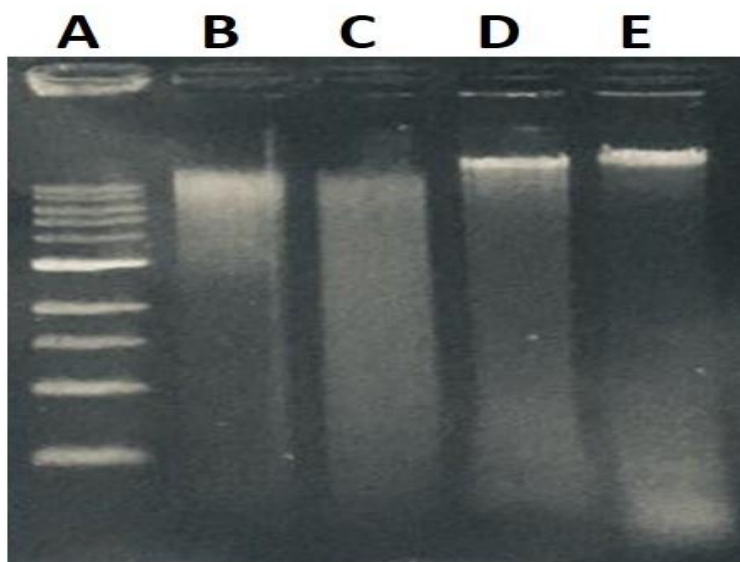
ANOVA one-way com pós teste de Tukey. (a) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN; (b) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP; (c) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a menor concentração (100 $\mu\text{g/mL}$).

3.3 Efeitos apoptóticos do alfa-terpineol por fragmentação de DNA em gel

Na fragmentação de DNA determinada por eletroforese em gel de agarose, foi observado um arraste (SMEAR) nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, o que indica que o alfa-terpineol possui capacidade de fragmentar o DNA, caracterizando a presença de apoptoses das células tumorais nessas concentrações. Ademais, na

concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o alfa-terpineol mostrou praticamente uma ausência de banda genômica de alto peso molecular e, por conseguinte, um padrão de arraste mais destacado, com mais fragmentação que o quimioterápico utilizado como controle de dano (**Figura 3**).

Figura 3: Fragmentação de DNA de S180 avaliado por eletroforese em gel de agarose tratados com alfa terpineol nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24h.



A - DNA ladder 1 kb plus; B - alfa-terpineol na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C - alfa-terpineol na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D - Cisplatina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E - Controle negativo.

3.4 Efeitos citogenéticos do alfa-terpineol em S180 avaliados por CBMN

O alfa-terpineol apresentou efeitos mutagênicos por indução de micronúcleos em S180, como também por aumento significativo no número de pontes e brotos nucleares, para as três concentrações testadas (100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), quando comparado ao CN. Também foi observado citotoxicidade pelos índices de divisão celular (IDN) e pelo índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) também pelas três concentrações avaliadas. Esses dados apontam que o alfa-terpineol causa danos fixos (mutações) ao DNA pela indução de micronúcleos e mostrou-se antitumoral por indução de citotoxicidade (IDN e IDNC estatisticamente significantes). Provavelmente, esse efeito está relacionado com as alterações citogenéticas observadas (**Tabela 2**) (**Figura 5**). Além disso, o composto em questão induziu significativamente o aumento

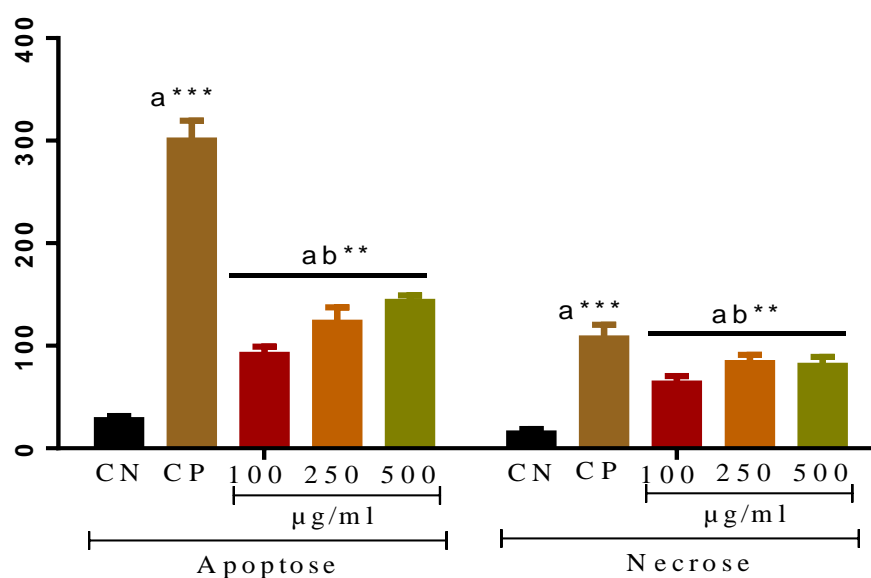
de apoptoses ($93 \pm 6,0$; $124,6 \pm 12,8$; $144 \pm 8,5$) e necroses ($65 \pm 5,5$; $85 \pm 6,2$; $82 \pm 6,4$) para as 03 concentrações avaliadas em comparação com o CN (**Figura 4**).

Tabela 2. Mutagenicidade e citotoxicidade causados pelo alfa-terpineol em Sarcoma 180 após 72h de exposição avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Tratamento	Mutagenicidade			Citotoxicidade	
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
Sarcoma 180					
CN	$2,20 \pm 1,0$	$2,50 \pm 0,81$	$5,20 \pm 1,29$	$1,74 \pm 0,08$	$1,74 \pm 0,09$
DOX	$37,00 \pm 2,1^a$	$39,00 \pm 1,1^a$	$39,10 \pm 1,31^a$	$1,21 \pm 0,01^a$	$1,19 \pm 0,11^a$
100 $\mu\text{g/mL}$	$21,0 \pm 3,6^{ab}$	$11,0 \pm 2,8^{ab}$	$21,5 \pm 0,7^{ab}$	$1,42 \pm 0,09^{ab}$	$1,59 \pm 0,1^{ab}$
250 $\mu\text{g/mL}$	$19,0 \pm 1,4^{ab}$	$13,5 \pm 0,7^{ab}$	$15,5 \pm 2,8^{ab}$	$1,34 \pm 0,09^{ab}$	$1,41 \pm 0,08^{ab}$
500 $\mu\text{g/mL}$	$22,5 \pm 2,3^{ab}$	$17,0 \pm 2,8^{ab}$	$23,0 \pm 1,8^{ab}$	$1,29 \pm 0,08^a$	$1,46 \pm 0,10^{ab}$

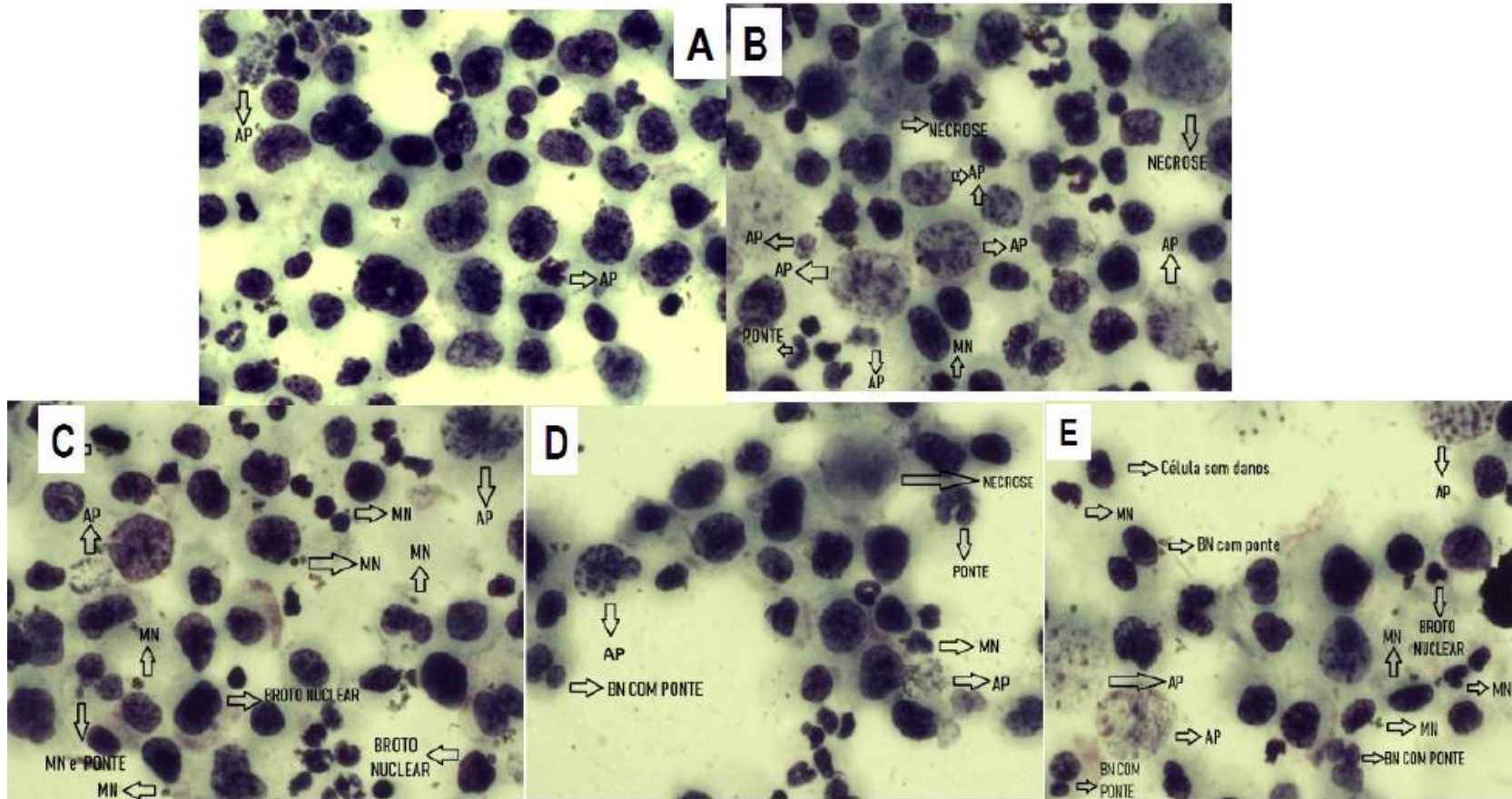
Valores representam a média \pm desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. IDN: índice de divisão nuclear. IDNC: índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN. ^b $p < 0,05$ comparado à Dox.

Figura 4. Apoptose e necrose induzidas pelo alfa-terpineol em cultura primária de S180, após 72h de exposição pelo teste de CBMN.



Valores representam a média \pm desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo CN (a) e CP (b).

Figura 5. Perfil fotomicrográfico da linhagem de Sarcoma 180 tratados com alfa-terpineol (100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) analisadas por meio do teste de CBMN. Coloração com Giemsa a 10% e aumento de 1000X ao microscópio óptico. BN: células binucleadas. MN: micronúcleos. AP: apoptose.

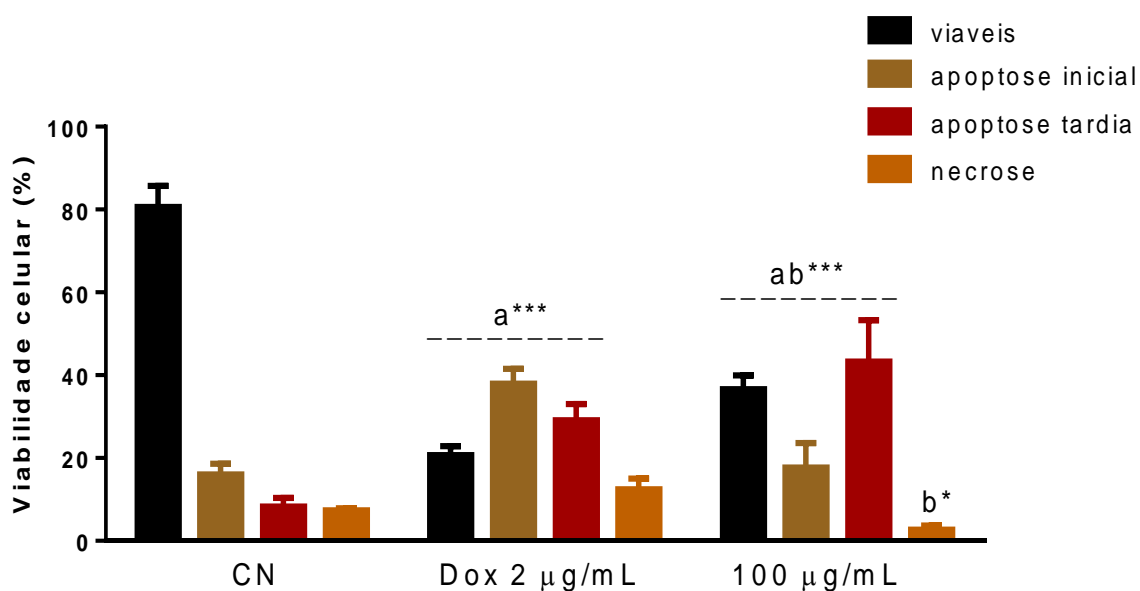


Em (A) células não tratadas – CN; (B) células tratadas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de Doxorubicina – CP; (C) células tratadas com alfa-terpineol a 100 $\mu\text{g/mL}$; (D) células tratadas com alfa-terpineol a 250 $\mu\text{g/mL}$; (E) células tratadas com alfa-terpineol a 500 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Efeitos apoptóticos e necróticos do alfa-terpineol usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF).

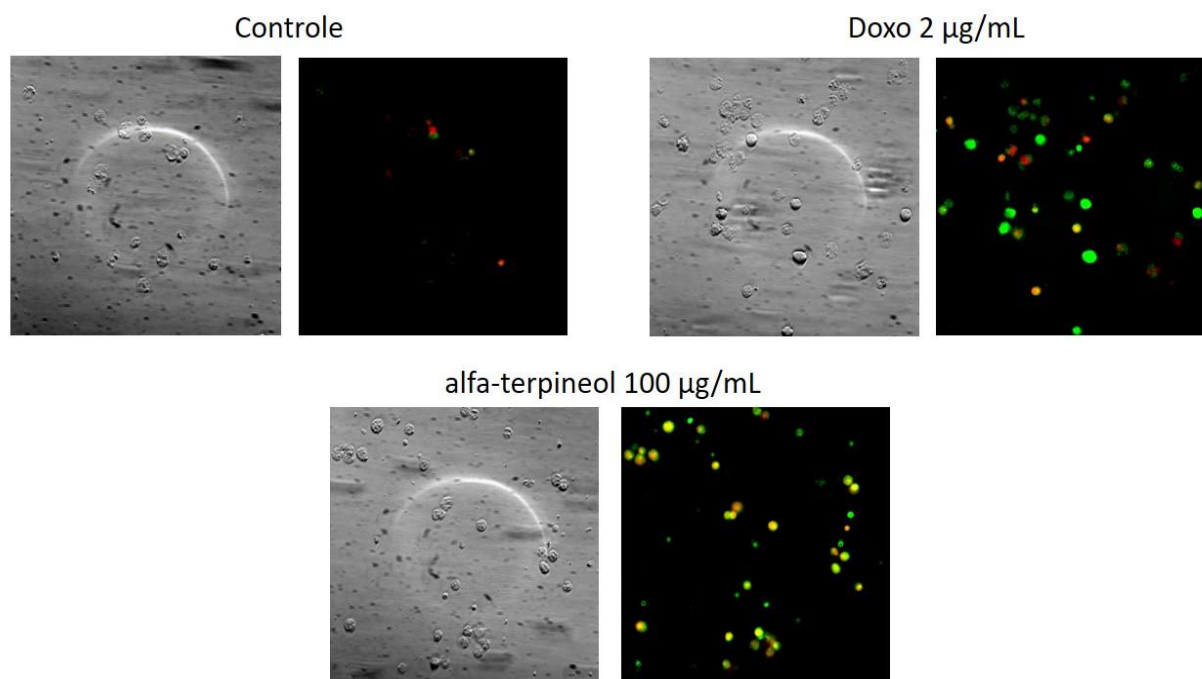
A capacidade citotóxica na avaliação de morte celular no tempo de exposição de 24h mostrou efeitos esperados do quimioterápico de forma estatisticamente significativa quando comparado com o controle negativo. O tratamento com alfa-terpineol na concentração de 100 µg/mL também apresentou efeito citotóxico (aumento de apoptoses iniciais – 17,7% e tardias – 43,3%) nas células de S180 quando comparado ao controle negativo de forma estatisticamente significativa. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa para necrose entre o alfa-terpineol e o controle negativo. Em comparação com a Doxorrubicina, o alfa-terpineol apresentou maior porcentagem de células viáveis (36,6%) e em apoptose tardia (43,3%) ($p < 0,05$). Em contrapartida, apresentou menores porcentagens de células em apoptose inicial (17,7%) e necrose (2,7%) ($p < 0,05$) (**Figura 6 e 7**).

Figura 6: Avaliação da citotóxica do alfa-terpineol em células de S180 através da marcação fluorescente em microscópio confocal de fluorescência (MCF).



Valores representam a média \pm desvio padrão. ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.
 * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo CN (a) e Doxorrubicina (b).

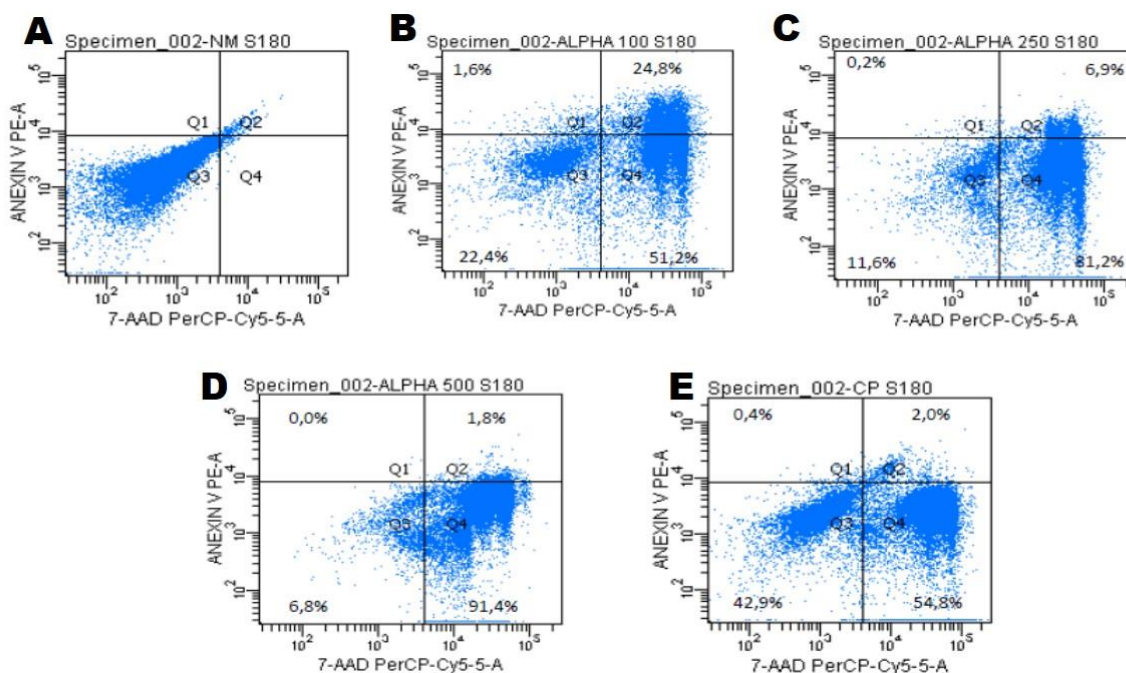
Figura 7. Citotoxicidade do alfa-terpineol (100 µg/mL) em linhagem de Sarcoma 180 analisadas por meio de Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) dupla coloração por iodeto de propídeo e laranja de acridina.



3.6 Efeitos citotóxicos do alfa-terpineol pela viabilidade celular por citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo demonstrou que o alfa-terpineol induz apoptose tardia/necrose em 76%, 88,1% e 93,2% das células do sarcoma 180 (Figura 8) após 24h de exposição nas concentrações de 100, 250 e 500, respectivamente. Para apoptose inicial os valores em S180 foram 1,6%; 0,2% e 0,0% nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL respectivamente. Com relação as células vivas, foi observado uma redução da porcentagem com o aumento da concentração, sendo estes os valores de 22,4%; 11,6%; 6,8% nas concentrações testadas. Esses dados mostram a confirmação qualitativa da capacidade citotóxica do alfa-terpineol em matar células S180.

Figura 8: Determinação da citotoxicidade do alfa-terpineol, em diferentes concentrações, em células de sarcoma 180 através de citometria de fluxo por marcação de Anexina V PE e 7-AAD.



Viabilidade de células S180 tratadas com alfa-terpineol nas concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Em todos os gráficos o quadrante (Q1) representa células em apoptose inicial (AV+/7AAD-), (Q2) são células em apoptose final/necrose (AV+/7AAD+), (Q4) necrose (AV-/7AAD+) e (Q3) células vivas (AV-/7AAD-). Em (A) tubo com células não marcadas com Anexin V PE e 7-AAD, (B) células S180 tratadas com alfa-terpineol 100 $\mu\text{g/mL}$, (C) células S180 tratadas com alfa-terpineol 250 $\mu\text{g/mL}$, (D) células S180 tratadas com alfa-terpineol 500 $\mu\text{g/mL}$, (E) Controle positivo com Doxorrubicina 2 $\mu\text{g/mL}$.

4. DISCUSSÃO

O alfa-terpineol nas concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ mostrou efeito citotóxico sobre células de Sarcoma 180 pela capacidade de excluir o azul de tripan (PITA et al., 2012). Os mecanismos citogenéticos podem estar envolvidos na atividade antitumoral do alfa-terpineol tais como os danos ao DNA e/ou alterações nucleares indicativas de apoptoses com base no padrão de fragmentação do DNA (BEDNAREK et al., 2006). Os efeitos genotóxicos e mutagênicos podem intensificar os efeitos citotóxicos resultando em parada do ciclo celular e, eventualmente, apoptose através da

ativação de genes pró-apoptóticos e supressão de genes antiapoptóticos (PERES; CUNHA, 2013).

O alfa-terpineol nas três concentrações testadas mostrou-se citotóxico de forma dose dependente para a avaliação do IDN, provavelmente associados a formação de micronúcleos, pontes e brotos nucleares. Existem relatos de que o carvacrol, um monoterpeno estruturalmente semelhante ao alfa-terpineol, através do ensaio cometa modificado por FPG (DNA formamidopirimidina glicosilase) em células de carcinoma de cólon humano (Caco-2), mostrou que na concentração de 69 µg/mL causou quebras nas fitas de DNA indicando danos às bases purinas (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2014).

Cabe enfatizar que a produção de bases oxidadas, como a 8-oxoguanina (8-oxoGua) que possui potencial mutagênico pela sua capacidade de emparelhar com adenina, além da formação de um indicador de estresse oxidativo, a 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) podem induzir alterações no material genético (mutações), tais como, rearranjos cromossômicos, inserções, deleções e ampliações gênicas (KOCAMAN et al., 2011; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2014; ERDOGAN; OZKAN, 2013). Vários métodos mais sensíveis de detecção da apoptose foram desenvolvidos para apontar alterações na morfologia celular, bem como interagir com marcadores de superfície associados à apoptose (LIU et al., 2015).

Estudos realizados por Taherkhani (2016) apontam que o óleo essencial de *Artemisia ciniformis*, constituído de alfa-terpineol e alguns de seus isômeros apresentou citotoxicidade, pelo teste de MTT, em células do câncer cervical (HeLa), nas concentrações de 19,64 µg/mL e 28 µg/mL. Efeitos citotóxicos também foram observadas em células de câncer de mama humano (T-47D), hepatocarcinoma humano (HepG2) e carcinoma de pulmão humano (A549) a sofrerem apoptose e desencadear a morte celular (CHANG; SHEN, 2014). O linalol um análogo do alfa-terpineol, o mesmo em condições ácidas de metabolização pode se transformar em alfa-terpineol, assim, entende-se que ambos possuam perfis toxicogênicos semelhantes (WU et al., 2010).

O alfa-terpineol induziu fragmentação de DNA em células de S180 nas concentrações de 100 e 500 µg/mL, em um tempo de exposição de 24 h de forma dose dependente. Existem relatos de que o gama-terpineol, um isômero do alfa-terpineol na

concentração de 320 µg/mL induziu a fragmentação do DNA de células de hepatoma BEL-7402, confirmando a apoptose em múltiplos de 180-200 pb após 12, 24, 36, 48 h (YIN et al., 2014). A integridade do DNA desempenha um papel fundamental na proliferação celular, logo a fragmentação do mesmo inviabiliza o desenvolvimento da célula, bem como é uma das características típicas da apoptose (WONG, 2011; ARCHANA et al., 2013). É importante enfatizar que caspase 3 está associada a indução da translocação da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana celular no processo de apoptose. Esse novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação (MANDAL et al., 2005; PAROLIN; REASON, 2001).

A indução de apoptoses pelo alfa-terpineol também foi observada por citometria de fluxo em células S180 de forma dose dependente para os eventos de apoptose tardia e necrose presente nos quadrantes Q2 e Q4, respectivamente. Além disso, a baixa porcentagem de células em apoptose inicial presente no quadrante Q1 é semelhante aos resultados adquiridos no teste MCF. A exposição da fosfatidilserina é transitória na apoptose inicial (KENIS et al., 2010). Em Q2, o número de células em apoptose tardia (duplo positivo) foi maior apenas na menor concentração (100 µg/mL). A marcação das células tumorais com Anexina-V e com intercalador de DNA impermeável à membrana, o 7-aminoactinomicina D (7-AAD) permite discriminar entre células viáveis, apoptóticas e necróticas secundárias (DONG et al., 2009).

A fragmentação do núcleo é geralmente considerada como um sinal de morte celular apoptótica, mas também pode ocorrer em menor extensão na necrose como observados pelos resultados do teste de citometria (LORENT et al., 2014). Existem relatos de que o isômero do alfa-terpineol, o terpinen-4-ol (0,04%), mostrou atividade antiproliferativa em células cancerígenas de pulmão de rato (AE17) através da morte celular por necrose na medida que aumentava o tempo de exposição (GREAY et al., 2010).

Por outros aspectos, as células podem, também, ser classificadas como duplamente positivas, pelo fato da membrana estar danificada a ponto de permitir a passagem de 7-AAD para o interior da célula, bem como permitir a ligação da Anexina-V em fosfatidilserina do lado interno da membrana. Porém, não é possível distinguir entre apoptose tardia e células necróticas nesta população dupla positiva (Q2) usando

citometria de fluxo clássica (PIETKIEWICZ et al., 2015). Essas informações sugerem que o alfa-terpineol pode matar células tumorais por apoptose e necrose, principalmente por necrose (Q4) quando as concentrações forem superiores a 100 µg/mL, segundo o teste analisado. Esses achados colaboram com os resultados significantes de necroses encontrados no teste de CBMN no presente estudo.

As células de S180 tratadas com alfa-terpineol (100 µg/mL) foram induzidas à apoptose. Ademais, o estágio de apoptose que o monoterpeno mais induziu foi o de apoptose tardia. O alfa-terpineol, na menor concentração, parece ter melhor efeito na indução da apoptose. O carvacrol e timol, moléculas estruturalmente semelhantes ao alfa-terpineol, podem penetrar na bicamada fosfolipídica, aumentando a permeabilidade da membrana celular, a dissipação da força protomotriz e o vazamento de íons inorgânicos, resultando em lise e morte celular (SOUZA et al., 2013; LAMBERT et al., 2001).

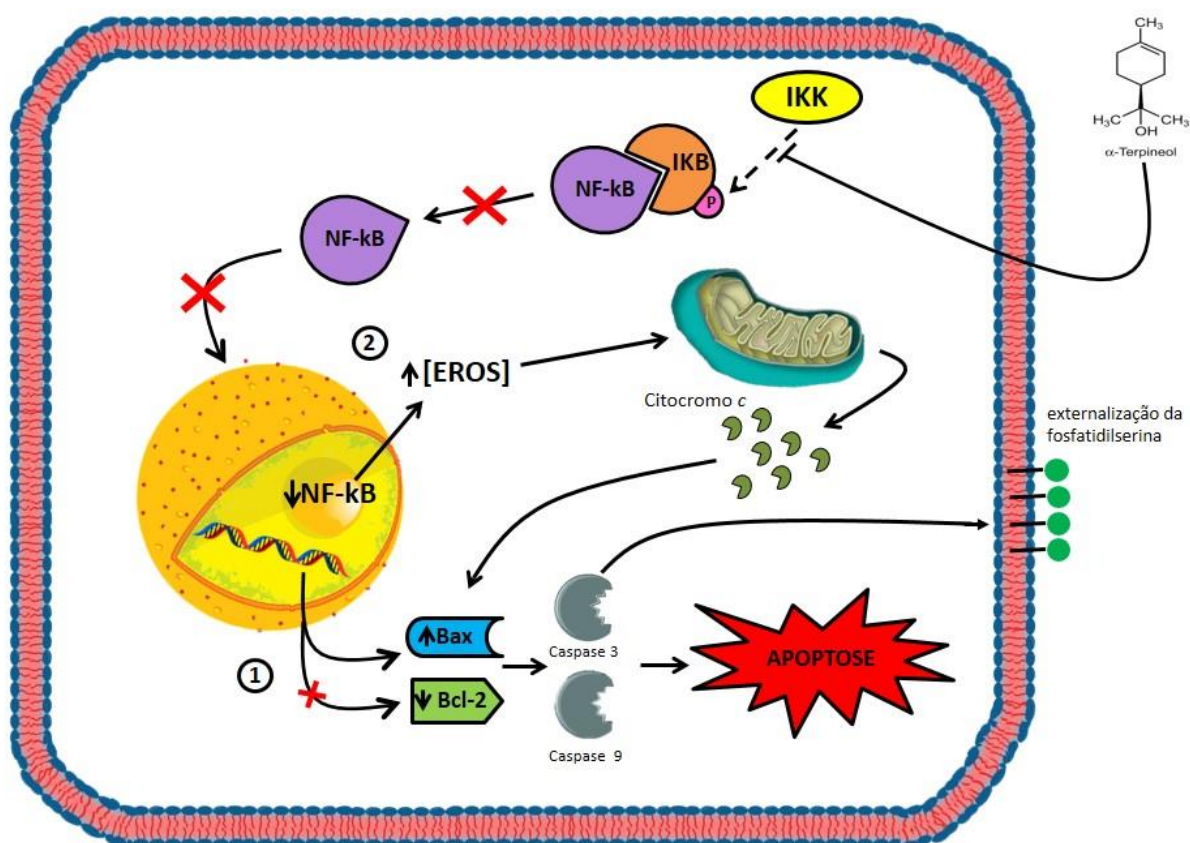
Porém, em concentrações elevadas, pode matar as células por necrose como mostrado no teste de citometria de fluxo. Cabe a dupla marcação por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) visualizada sob um microscópio fluorescente, identificar alterações de membranas celulares associadas à apoptose durante o processo de morte celular e distinguir com precisão células em diferentes estágios de apoptose (GHERGHI et al., 2003; LIU et al., 2015). O LA é um corante permeável que marca em verde o núcleo, enquanto o IP é absorvido pelas células cujas membranas celulares estão danificadas e a integridade da membrana é perdida (PAVITHRA et al., 2018). Um estudo de indução da apoptose com óleo essencial de *Pamburus missis*, nas concentrações entre 50 e 100 µg/mL em linhagem de câncer de pele não melanoma (A431), utilizando o teste de dupla marcação LA/IP, demonstrou que tais células apresentaram condensação da cromatina, formação de esferas e formação de bolhas na membrana, caracterizando apoptose (PAVITHRA et al., 2018).

Diversos mecanismos podem ser propostos, dentre eles, a ação de AKT, JNK1, JNK2, como também na quinase do inibidor kappa B (IKK), o que, por consequência, irá impedir ou reduzir a translocação do NF-κB para o núcleo (**Figura 9**). A regulação negativa da transcrição de NF-κB, em outras palavras, irá proporcionar o aumento da sensibilidade à ação de agentes antitumorais ou interromper a proliferação causada por células tumorais (HASSAN et al., 2010; BLOWMAN et al., 2018; KHALEEL et al.,

2018). A inibição de NF- κ B aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, causando despolarização mitocondrial, abertura do poro de permeabilidade, liberação do fator apoptótico citocromo *c* e liberação de caspases 9 e 3 (SILVA; FERRARI, 2011; GRIVICICH et al., 2007).

Além de coordenar respostas imunológicas, o NF- κ B está relacionado a mecanismos de sobrevivência celular. Uma vez sendo inibido, produzirá na maioria dos casos, a redução da expressão de genes alvos que pertencem à maquinaria antiapoptótica da célula, isto é, membros da família Bcl-2 e IAP (NOGUEIRA et al., 2011; CANDRASARI et al., 2016) confirma tais mecanismos, mostrando que o alfa-terpineol tem potencial atividade anticancerígena contra a linhagem de células cancerígenas MCF-7 por meio da estimulação da apoptose através da diminuição da expressão de Bcl-2, como o aumento das expressões de Bax (Figura 9).

Figura 9: Mecanismo de ação do alfa-terpineol através do impedimento ou redução da translocação do NF- κ B para o núcleo.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O alfa-terpineol induziu citotoxicidade em células de Sarcoma 180, pelos elevados e significantes índices de morte celular tanto por apoptose como necrose nos diferentes bioensaios avaliados. Também, mostrou mecanismos citogenéticos de danos ao DNA de forma dose-dependente pelo índice e frequência de dano, bem como por efeitos mutagênicos pelas alterações citogenéticas como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. Nas menores concentrações, o alfa-terpineol induziu apoptoses e necroses nas maiores concentrações. O estudo propõe que associado aos mecanismos citogenéticos, a perda da integridade da membrana plasmática pela exposição e perda da fosfatidilserina, podem explicar os efeitos antitumorais do alfa-terpineol. O alfa-terpineol é um monoterpeneo candidato a formulações farmacêuticas antitumorais.

6 REFERÊNCIAS

- ARCHANA, D.; DUTTA, Joydeep; DUTTA, P. K. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 193-203, 2013.
- BEATRIZ, PAROLIN Mônica; REASON, Iara J. Messias. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.
- BEDNAREK, I. et al. Single-cell gel electrophoresis (comet assay) as a tool for apoptosis determination in tumor cell lines HL-60 and Jurkat cultures treated with anisomycin. **Ann. Acad. Med**, v. 60, p. 278-284, 2006.
- BEEVI, Syed Sultan et al. Hexane extract of Raphanus sativus L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. **Plant foods for human nutrition**, v. 65, n. 3, p. 200-209, 2010.
- BERGHE, Tom Vanden et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 2, p. 135, 2014.
- BLOWMAN, K. et al. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
- CANDRASARI, Damiana Sapta; MUBARIKA, Sofia; WAHYUNINGSIH, Mae Sri Hartati. The effect of a-terpineol on cell cycle, apoptosis and Bcl-2 family protein

- expression of breast cancer cell line MCF-7. **Journal of the Medical Sciences (Berkala ilmu Kedokteran)**, v. 47, n. 2, 2016.
- CHANG, Mei-Yin; SHEN, Yi-Ling. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6694-6706, 2014.
- DAVISON, Steffi A.; DEN HAAN, Riaan; VAN ZYL, Willem Heber. Heterologous expression of cellulase genes in natural *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 18, p. 8241-8254, 2016.
- DONG, Hiep Phuc et al. Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7-AAD assay: clinical relevance and comparison with other apoptosis parameters. **American journal of clinical pathology**, v. 132, n. 5, p. 756-762, 2009.
- ECHEVERRIGARAY, Sergio; ZACARIA, Jucimar; BELTRÃO, Ricardo. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, v. 100, n. 2, p. 199-203, 2010.
- ERDOGAN, Ayse; OZKAN, Aysun. A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA damaging effects of *Origanum majorana*'s essential oil and its oxygenated monoterpene component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. **Biologia**, v. 68, n. 4, p. 754-761, 2013.
- FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1, p. 58-66, 2006.
- FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007..
- FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.
- FITSIOU, Eleni et al. Antioxidant and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their Major Constituents. **Anticancer research**, v. 36, n. 11, p. 5757-5763, 2016.
- GAUTAM, Nandini; MANTHA, Anil K.; MITTAL, Sunil. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- GHERGHI, I. Ch et al. Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). **Talanta**, v. 61, n. 2, p. 103-112, 2003.
- GIAM, Maybelline; RANCATI, Giulia. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. **Cell division**, v. 10, n. 1, p. 3, 2015.
- GIROLA, Natalia et al. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 467, n. 4, p. 928-934, 2015.

- GREAY, S. J. et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 877-888, 2010.
- GRIVICICH, Ivana et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- HAMMER, KA 1; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853-860, 2003.
- HASSAN, Saadia Bashir et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.
- KAWAGUCHI, Satomi et al. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, 2010.
- KENIS, Heidi et al. Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging. **Journal of nuclear medicine**, v. 51, n. 2, p. 259, 2010.
- KHALEEL, Christina; TABANCA, Nurhayat; BUCHBAUER, Gerhard. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. **Open Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 349-361, 2018.
- KOCAMAN, A.Y et al. Os efeitos do 4-thujanol sobre as aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e micronúcleos em linfócitos humanos de sangue periférico. **Cytotechnology**, v.63, n.5, p.493, 2011.
- KUMAR, Dharmesh et al. Chemical composition and in vitro cytotoxicity of essential oils from leaves and flowers of *Callistemon citrinus* from western Himalayas. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0133823, 2015.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LLANA-RUIZ-CABELLO, Maria et al. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III-and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. **Food and chemical toxicology**, v. 72, p. 122-128, 2014.
- LORENT, Joseph et al. Domain formation and permeabilization induced by the saponin α -hederin and its aglycone hederagenin in a cholesterol-containing bilayer. **Langmuir**, v. 30, n. 16, p. 4556-4569, 2014.
- MAGGI, Filippo et al. Chemical composition and in vitro biological activities of the essential oil of *Vepris macrophylla* (Baker) I. Verd. endemic to Madagascar. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 356-366, 2013.
- MANDAL, Debabrata et al. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 47, p. 39460-39467, 2005.

- MANJAMALAI, A.; GRACE, V. M. Antioxidant activity of essential oils from *Wedelia chinensis* (Osbeck) in vitro and in vivo lung cancer bearing C57BL/6 mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 7, p. 3065-3071, 2012.
- MOGHIMI, Mahsa et al. Protective effect of α -terpineol against impairment of hippocampal synaptic plasticity and spatial memory following transient cerebral ischemia in rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 19, n. 9, p. 960, 2016.
- NAKAMURA, Hideaki et al. DNA repair defect in AT cells and their hypersensitivity to low-dose-rate radiation. **Radiation research**, v. 165, n. 3, p. 277-282, 2006.
- NOGUEIRA, Lorena et al. The NF κ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 2, n. 8, p. 646, 2011.
- PARVARDEH, Siavash et al. α -Terpineol attenuates morphine-induced physical dependence and tolerance in mice: role of nitric oxide. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 19, n. 2, p. 201, 2016.
- PAVITHRA, P. S.; MEHTA, Alka; VERMA, Rama S. Induction of apoptosis by essential oil from *P. missionis* in skin epidermoid cancer cells. **Phytomedicine**, v. 50, p. 184-195, 2018.
- PERES, Luis Alberto Batista; CUNHA JÚNIOR, Ademar Dantas da. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 4, p. 332-340, 2013.
- PIETKIEWICZ, Sabine; SCHMIDT, Jörn H.; LAVRIK, Inna N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. **Journal of immunological methods**, v. 423, p. 99-103, 2015.
- PITA, J.C.L.R. et al. Efeito antitumoral in vitro e in vivo do trachylobane-360, um diterpeno da *Xylopiya langsdorffiana*. **Moléculas**, v.17, v. 8, p.9573-9589, 2012.
- SILVA, Wallison Junio Martins da; FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p. 441-451, 2011.
- SOBRAL, Marianna Vieira et al. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- SOUZA, E. L. et al. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 29-36, 2013.
- SPEIT, Günter; ROTHFUSS, Andreas. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 79-90.
- STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.
- SUHAIL, Mahmoud M. et al. *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 129, 2011.

SWARTZ, Melody A.; LUND, Amanda W. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 3, p. 210, 2012.

TAHERKHANI, Mahboubeh. Chemical Constituents, Antimicrobial, Cytotoxicity, Mutagenic and Antimutagenic Effects of *Artemisia ciniformis*. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 15, n. 3, p. 471, 2016.

WANG, Z. e SUN, Y. Alvejando p53 para a terapia anticancerosa nova. **Oncologia translacional**, v.3, n.1, p.1-12, 2010.

WONG, R.S. Apoptose no câncer: da patogênese ao tratamento. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.30 n.1 p.87, 2011.

WU, Shengde et al. A framework for using structural, reactivity, metabolic and physicochemical similarity to evaluate the suitability of analogs for SAR-based toxicological assessments. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 67-81, 2010.

YIN, Zhong-Qiong et al. γ -terpineol inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer BEL-7402 cells in vitro. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 10, p. 6524, 2014.

ZENGIN, Arife Candaş Adigüzel et al. Eco-friendly soaking process using tannic acid as an alternative bactericide. **Archives of Environmental Protection**, v. 40, n. 1, p. 3-12, 2014.

ANEXO A – Carta de aceite para manutenção do Sarcoma 180



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação toxicogenética e antitumoral do α -terpineol em estudos in vitro e pré-clínico*”, registrada nº 416/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JOÃO MARCELO DE CASTRO E SOUSA do Departamento de Biologia do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, 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 **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/06/2018**.

Finalidade	() Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Outubro/2018 à Dezembro/2019
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/swiss
Nº de Animais	50
Peso/ Idade	30g/ 12 semanas
Sexo	25 Machos e 25 Fêmeas
Origem	Biotério Centra da UFPI.

Teresina, 15 de Junho de 2018.


 Prof^a. Iyete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora