

# MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE EXTRATOS, OBTENÇÃO DE FRAÇÕES, ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE VEGETAIS

METHOD OF PREPARATION EXTRACTS, FRACTIONS OBTAINED, ISOLATION AND VEGETABLES ANTICANCER ACTIVITY

MARCOS BISPO PINHEIRO CAMARA<sup>1\*</sup>, FERNANDO JOSÉ COSTA CARNEIRO<sup>2</sup>, ANTONIO JOSÉ CANTANHEDE FILHO<sup>3</sup>, MARIANO OSCAR ANÍBAL IBÁÑEZ ROJAS<sup>4</sup>

1. Aluno de Mestrado – IFMA, Campus Monte Castelo; 2. Professor Doutor do Curso de Graduação em Química – IFMA, Campus Monte Castelo, MA; 3. Professor Doutor do Curso de Graduação em Química – IFMA, Campus Monte Castelo, MA; 4. Professor Doutor do Curso de Graduação em Química – IFMA, Campus Codó, MA.

Av. Getúlio Vargas, 4, Monte Castelo, São Luís, Maranhão, Brasil. CEP: 65030-005. [quimarcosbispo@hotmail.com](mailto:quimarcosbispo@hotmail.com)

Recebido em 28/07/2016. Aceito para publicação em 16/10/2016

## RESUMO

Atualmente o câncer se apresenta como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse cada vez nas pesquisas para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. A descoberta de medicamentos para o câncer está relacionada principalmente à pesquisas de produtos naturais. O tratamento de enfermidade com determinados fármacos muitas vezes pode demonstrar toxicidade relevante com diversos efeitos colaterais. As pesquisas com produtos naturais se mostram uma interessante alternativa de novos fármacos. O uso de plantas na medicina popular é amplamente expandido no Brasil, tendo sua base na tradição familiar durante muito tempo. Várias plantas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. São cada vez mais frequentes estudos envolvendo espécies vegetais. A busca de novas alternativas para o tratamento que envolve o câncer através das plantas é altamente significativa. Portanto a busca por esses saberes repassados através das gerações são uma importante ferramenta para desenvolvimentos de estudo científicos. Uma vez que as plantas medicinais apresentam propriedades biológicas e ou farmacológicas de grande utilidade na sociedade. Portanto na pesquisa foi observada que grande parte dos extratos, frações e ou compostos isolados das plantas estudadas mostraram potentes ações em atividade anticâncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitoquímica, frações, anticâncer.

## ABSTRACT

Currently the cancer presents itself as a global public health problem, arousing increasing interest in research for the development of drugs with antitumor activity. The discovery of drugs for cancer research is mainly related to the natural products. Treatment of disease with certain drugs can often show significant toxicity at several side effects. Research on natural products to show an interesting alternative to new drugs. The use of plants in folk medicine is widely expanded in Brazil, with

its basis in family tradition for a long time. Various plants are consumed with little or no evidence of their pharmacological properties. They are increasingly frequent studies of plant species. The search for new alternatives for treating cancer involves using plants is highly significant. Therefore, the search for this knowledge passed down through the generations are an important tool for scientific study developments. Since medicinal plants and exhibit biological or pharmacological properties of use in society. So the research was observed that most of the extracts, fractions and isolated compounds or plants studied showed potent anticancer activity actions.

**KEYWORDS:** Phytochemistry, fractions, anticancer

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais pelo homem para os mais diversos propósitos parece ser uma atividade atávica. Observa-se que, em todas as fases de desenvolvimento das diversas civilizações, prevaleceu uma estreita relação entre o homem e as plantas. Através de tentativas e erros, o homem primitivo adquiriu conhecimento (biológico), que foram usados para determinar plantas valiosas para alimentos, medicamento e quais poderia apresentar risco à saúde<sup>1</sup>.

Durante muito tempo a terapia vegetal esteve sobre domínio do povo comum, especialmente do homem do campo, cujas mãos indoutas o conhecimento empírico do valor medicinal das plantas que tem prestado um valor inestimável<sup>2</sup>.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60 a 80% da população mundial não tem acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças<sup>3</sup>.

No Brasil existem muitas espécies utilizadas para fins medicinais, são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas

(VEIGA *et al.*, 2005)<sup>4</sup>. Há intensa forma alternativa ou complementar com uso de medicamentos alopatícos<sup>5,6,7</sup>.

A procedência de célula cancerosa surge através de efeito das alterações genéticas produzidas por diferentes mecanismos como a inativação de genes supressores de tumores e mutações por agentes químicos, físicos e biológicos, chamados de carcinógenos<sup>8</sup>. A célula cancerígena caracteriza-se por perda da função em consequência da falta de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes, metástase e determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas<sup>9</sup> (INCA, 2012).

### Objetivo Geral

- Realizar uma busca na literatura sobre avaliação farmacológica de extratos e frações de plantas medicinais com ação no combate ao câncer.

### Objetivos Específicos

- Avaliar as diversas formas de preparação de extratos em diferentes partes das plantas;
- Avaliar a obtenção de frações em diferentes sistemas proporcionais bem como as diversas formas de fracionamento;
- Reconhecer os constituintes de os produtos naturais que mais atuam no combate em diferentes tipos de câncer;

Revelar as perspectivas no tratamento do câncer com uso de produtos naturais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo versa uma revisão bibliográfica em ação farmacológica de compostos vegetais no combate ao Câncer, cujo objetivo foi proporcionar uma revisão sobre o uso de produtos naturais com propriedades anticancerígenas.

A coleta de material para elaboração foi feita por meio de pesquisa bibliográfica em artigos científicos da área. Neste caso, foi realizada busca de dados na literatura nacional e internacional através das bases de dados Scielo, Lilacs, Science Direct, Bireme e Medline/Pubmed, a partir de palavras-chave com relação ao assunto, tais como: plantas medicinais, anticâncer, atividade anticâncer e atividade citotóxica.

## 3. DESENVOLVIMENTO

A avaliação de extratos brutos e frações em células cancerígenas humanas foram avaliados por Vieiga *et al.* (2008)<sup>9</sup> e Almeida *et al.* (2016)<sup>10</sup>, verificou os efeitos do extrato de babaçu sobre a viabilidade, morfologia e metabolismo de linhagem de células leucêmicas em cultura e de outras células tumorais, não-tumorais em linhagens celulares imortalizadas e isolado linfócitos fresco de

humanos<sup>10</sup>, observou, a partir do extrato bruto e fração semi-purificadas da *Cecropia catarinensis*, a ação inibitória *in vitro* de células tumorais humanas como: adenocarcinoma de mama (MCF-7), células não pequenas de cancro de pulmão (NCI-H460) e melanomas (A375-C5).

Macedo *et al.* (2016)<sup>11</sup>; Lima *et al.* (2006)<sup>12</sup>; Monteiro (2015)<sup>13</sup> avaliaram a atividade citotóxica de *Erythroxylum suberosum* através de extratos vegetais combinados com radioterapia em linhagem de células humanas de carcinomas orais e hipofaringe e o efeito citotóxico supra - aditivo em linhagem de celulares de carcinoma da cabeça e pescoço por *Erythroxylum suberosum* seguido por irradiação com uma dose única de 2 Gy. A determinação celular frente ao efeito biológico do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. em culturas de células tumorais de laringe (Hep-2) e em células de hepatoma humano (HepG2), segundo Garcia *et al.*, 2012<sup>14</sup>, Magalhaes *et al.*, 2010<sup>15</sup> do extrato de *Caesalpinia var. peltophoroides*, verificou-se o potencial antitumoral, assim como dos seus constituintes isolados e dos compostos modificados<sup>16,17,18,19</sup>.

Momesso *et al.*, (2009)<sup>20</sup>; Ozi *et al.*, (2011)<sup>21</sup>; Lucena *et al.* (2011)<sup>22</sup> avaliaram os efeitos antitumoral do *Ageratum conyzoides* (frações clorofórmica e metanólica do extrato bruto) utilizando-se como modelo experimental o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos.

A determinação da avaliação da atividade antineoplásica por Pereira *et al.* (2015)<sup>23</sup>, Gomes (2008)<sup>24</sup>, foi através do flavonoide morina e o extrato de folhas de oliveira contra à linhagem de câncer de pulmão do tipo não pequenas células (H460) *in vitro*.

Jorge *et al.* (2013)<sup>25</sup>, Andradre (2011)<sup>26</sup> avaliou a influência do processo de fermentação enzimática de folhas de *A. chica Verlot* sobre a atividade farmacológica, empregando-se modelos de atividade anticâncer *in vitro* sobre células tumorais humanas. A avaliação das propriedades citotóxicas de extratos bruto de *P. parbatus* frente às células NCI-H292 e Hep-2 e as ações citotóxicas de extratos brutos de *L. alba* frente a duas linhagens celulares, células Hep-2) e células NCI-H292 (derivadas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano)<sup>27,28,29,30,31,32,33</sup>.

A determinação, segundo Garcia *et al.* (2012)<sup>34</sup>, Pretto, *et al.* (2005)<sup>35</sup>, foi a viabilidade celular frente ao efeito biológico do extrato de sálvia em culturas de células tumorais de laringe (Hep-2) e em células de hepatoma humano (HepG2). Segundo, Rattarom *et al.* (2010)<sup>36,37</sup>, investigou atividade citotóxica contra linhagem de células pulmonares humanas com células de carcinoma, COR- L23, pulmão humano, linhagem de adenocarcinoma de células epiteliais, A549 e miofibroblastos pulmonares humanos normais, células MRC- 5. Experimento feito também por método *in vitro* para analisar a atividade anticâncer de uma variedade de concentrações de extrato etanólico de flores de *Cassia auricu-*

*lata.*

### Coleta e métodos de obtenção de extratos e frações

A obtenção de extrato e frações das folhas secas e moídas (1000g), foi por extração exaustiva com metanol a frio e as frações, através de partição do extrato bruto com diclorometano e depois com acetato de etila<sup>10</sup>.

A utilização de extratos, aquoso, etanólico e hexânico a partir das folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St. -Hil, seguiu através de coleta e secagem das folhas à temperatura ambiente e o processo por pulverização. A extração foi por maceração passiva, usando hexano seguido de etanol. As soluções de extração obtidas foram concentradas até à secura sob pressão reduzida, a 40 °C em rota evaporador. O extrato aquoso foi obtido por infusão das folhas secas e pulverizadas em água destilada (3,0 L) a 70 °C, arrefeceu-se para aproximadamente 40 °C e submetido a filtração. A solução de extração resultante foi mantida a -20 °C e submetido a processo de liofilização<sup>11,38,14,16</sup>.

Folhas do vegetal foram previamente secas em estufa de ar circulante e então pulverizadas. Em seguida os pós foram ressuspensos em acetato de etila e particionados com uma solução metanol-água (9:1), sendo obtidas as frações AcOEt-E e AcOEt-NE, as quais foram concentradas. As frações hidroalcoólicas foram particionadas com clorofórmio, sendo obtidas as frações MeOH-E, MeOH-NE, CL-E e CL-NE. Todas as frações foram suspensas em 0,2 mL de água destilada estéril, com auxílio de um aparelho de ultra-som e banho-maria e filtradas em algodão com a finalidade de se obter doses de 50 e 100 mg/kg de peso<sup>20</sup>.

A coletas das folhas de Oliveira (*Olea europaea* L.) foram submetidas à secagem em estufa de ventilação, sob temperatura de 40°C até estabilização do peso para obter a matéria seca para os materiais supracitados. O material vegetal foi triturado e com 1000g submeteu-se a extração por maceração em álcool etílico absoluto (PA) diluído em água destilada 1:1, conforme metodologia descrita por Woisky (1996)<sup>39</sup>. Ao final, foi verificado o rendimento do extrato de aproximadamente 200 gramas (20%) e os mesmos foram armazenados em recipiente plástico opaco, em presença de agente dessecante<sup>23</sup>.

Oliveira *et al.*, (2010)<sup>18</sup>, da parte área, folhas da planta foram secas em estufa a 40 °C, pulverizadas e maceradas em álcool etílico 95%. O material resultante foi filtrado e rota evaporado a pressão reduzida, a 40 °C. O extrato foi levado à estufa a 40 °C por cerca de 10 h. O extrato do fruto foi preparado seguindo o mesmo procedimento para a preparação do extrato da folha, exceto que o fruto foi triturado antes da extração com o álcool etílico 95%.

Foram coletadas folhas mensalmente para realização de estudos da sazonalidade da espécie. A planta foi seca

durante 48 h em estufa, marca Fabbe®, a 40 °C, com ventilação forçada, e posteriormente moída em moinho de facas com peneira de 40 mesh<sup>25</sup>.

Extratos acetônico, etanólico, metanólico e aquoso de raiz, caule e folhas, foram preparados a partir de 35 g de planta seca (triturada) em 300 mL de solvente. As misturas foram filtrados e o volume total foi evaporado em evaporador rotativo. Extratos aquosos foram preparados por agitação por 4 h (200 rpm). Além dos extratos de *P. barbatus*, a ação citotóxica da vincristina sobre ambas as linhagens de células estudadas foi avaliada<sup>27</sup>.

A partir das raízes, caule e folhas foram preparou-se os extratos com 35 g de planta seca para 300 mL de solvente (hexano, clorofórmio, acetona, etanol, metanol e água). A extração dos princípios ativos foi feita por maceração em repouso (oito dias), exceto para extratos aquosos, que foram produzidos por maceração em agitação (4h a 200 rpm). Em ambos os casos, a temperatura de extração esteve entre 28-30 °C<sup>27</sup>.

Extratos de raiz, caule e folhas foram preparados utilizando-se 35 g de planta seca para 300 mL de solvente (hexano, clorofórmio, acetona, etanol, metanol e água)<sup>40</sup>. Syarifah *et al.*, (2012)<sup>28</sup>, através das folhas frescas *C. Odollam* (450g) foram sucessivamente extraído em metanol MeOH (3,5 L) por extrator de Soxhlet durante 18 horas. As folhas e raízes de *P. prunifolia* foram secas, moídas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. O extrato bruto etanólico da folha (EBEfPp) e o extrato bruto etanólico da raiz (EBEcPp) (35g) foram preparados e fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química (UFG)<sup>32</sup>.

Segundo Garcia *et al.*, 2012<sup>34</sup>, para a obtenção do extrato de *Salvia officinalis* L. foi submetido à maceração em solução hidroalcoólica 80% (v/v). Todos os compostos e extratos foram dissolvidos em DMSO, antes ensaio de atividade citotóxica<sup>36</sup>.

### Métodos e tipos e células utilizadas nos testes biológicos

Os testes com células mantidas em meio RPMI - 1640 (RPMI -1640), suplementado com 5% de FBS inativado, a 37 °C, humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com células em crescimento exponencial e que apresenta mais do que 90% de viabilidade. Os efeitos do extrato bruto e das frações semi-purificadas foram avaliados sobre o crescimento celular de linhagens de células tumorais de acordo com os procedimentos adotados pelo Instituto Nacional do Câncer<sup>10</sup>.

Linhagem de células de carcinoma epidermóide de boca (SCC -9), carcinoma de células escamosas da hipofaringe (FaDu) e dos queratinócitos humanos (HaCaT). Todas as linhas celulares são descritas em ATCC (American Type Culture Collection). As células foram armazenadas numa incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. suple-

mentado com soro fetal bovino a 10% e 1 % de penicilina e estreptomicina. Para a cultura de SCC- 9 foi utilizada relação DMEM/F12 (1:1) suplementado com os suplementos acima e hidrocortisona. Para tripsinização das células foi utilizada tripsina a 0,25 % com 0,03 % de EDTA. SCC- 9, FaDu, linhas de células HaCaT foram plaqueadas a uma concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços e após 24 h tratados com os extractos a uma concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , como descrito num estudo anterior. A cisplatina (Citoplax, 1  $\text{mg}/\text{mL}$ ; Bergamo, Taboão da Serra, SP, Brasil) na 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi utilizado como um controlo positivo. Para controlo negativo, as células foram tratadas apenas com o solvente que diluiu os extratos (água MilliQ para o extrato aquoso e DMSO/etanol (2:3) para os extratos etanólicos e hexânicos). Após 24 h de tratamento da cultura com o extrato foi aspirado e as células foram mantidas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato) para irradiação<sup>11</sup>.

A linhagem de células erythroleukaemic K562 e sua multidrugresistant (MDR) contraparte, K562-Lucena 1 e linfócitos. As células foram cultivadas a 37 °C 25  $\text{cm}^2$  em frascos de cultura contendo Dulbecco modificados meio de Eagle (D-MEM) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS-Gibco, Invitrogen, EUA), 1% PSA (10000 IU/mL de penicilina G de sódio, 10,00  $\text{g}/\text{mL}$  sulfato de estreptomicina e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B, conforme Fungizoner). meio D-MEM foi previamente suplementado com 3  $\text{g}/\text{L}$  de N- (2-hidroxiethyl)-piperazina-N' (2-etanossulfônico) (HEPES), 0,3  $\text{g}/\text{L}$  de L-glutamina e 0,2  $\text{g}/\text{L}$  de  $\text{NaHCO}_3$  (pH 7,4). A K562-Lucena 1 células foram mantidas na presença de 60 nM de vincristina. O meio utilizado para cultivo de MCF-7 também suplementado com 5  $\mu\text{g}$  de insulina/mL. As coletas das células foram a partir de sangue fresco heparinizado de voluntários de saúde (18-30 anos de idade), tratadas por centrifugação foram lavadas duas vezes por 50mL de phosphatebuffered solução salina. (RENNÓ *et al.*, 2008)

Segundo, Garcia *et al.* (2012)<sup>34</sup>, as Células tumorais Hep-2 e HepG2, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) em estufa a 37 °C. Na segunda etapa foram semeadas ( $5 \times 10^4$  células/mL) em placas de 96 poços. Realizou-se o tratamento das células com extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L., controle negativo de etanol 80% (v/v) e controles positivos de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), tert-butil hidroperóxido (t-BOOH), doxorubicina e cisplatina. A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Os camundongos utilizados foram da raça suíços, machos, de quatorze semanas, com 25 g em média. Durante a fase experimental os animais receberam ração

balanceada e água ad-libitum. Foi empregado o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). Foi implantada uma suspensão contendo 106 células neoplásicas, em 0,1 mL de solução salina apirogênica, por via intraperitoneal (IP). A determinação do número total de células neoplásicas foi realizada através da contagem das suspensões coradas por cristal violeta a 0,5% em Câmara de Neubauer. Grupos com dez animais cada foram tratados com frações CL-E, CL-NE, MeOH-E e MeOH-NE nas doses de 50 e 100  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso através de injeção i.p. O grupo-controle recebeu injeção de solução salina esterilizada<sup>20</sup>.

Pereira *et al.* (2015)<sup>23</sup>, a linhagem de célula H460 foi obtida do Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte Fluminense (Campos dos Goytacazes, RJ). As células foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL), conforme metodologia descrita por (Horn *et al.*, 2013). A linhagem de célula H460 foram plaqueadas em volume de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  ( $1 \times 10^6$  cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com o flavonoide morina e o extrato de oliveira nas concentrações finais de 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  e  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para os testes de viabilidade celular com MTT-3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), conforme metodologia descrita por Horn *et al.* (2013). Parte do sobrenadante das culturas foi utilizada para a dosagem da lactato desidrogenase (LDH). A determinação da enzima LDH é proporcional ao número de células mortas por necrose in vitro. Para quantificação da LDH foi utilizado o KIT DOLES.

Foram utilizados camundongos Swiss com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pela Indústria Química do estado de Goiás. Os animais foram agrupados ao acaso em caixas de polipropileno, em sala climatizada sob temperatura constante de  $26 \pm 2$  °C, com ciclo claroescuro de 12 h. O TAE foi mantido em camundongos Swiss por meio de passagens sucessivas intraperitoneais. A suspensão de células tumorais foi preparada com uma solução salina balanceada com pH 7,4, até a obtenção final de uma concentração de  $2 \times 10^6$  células viáveis/mL. Camundongos foram inoculados por via intraperitoneal no dia 0 com  $6 \times 10^8$  células tumorais/mL, em um volume de 0,2 mL. A viabilidade das células foi determinada pelo método de exclusão por azul de tripano. As culturas de células derivadas do TAE foram coletadas por lavagem peritoneal em camundongos, 8 a 10 dias após o transplante tumoral<sup>18</sup>.

As células K -562 e TAE foram semeadas ( $2 \times 10^6$  cels/mL; 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), em triplicata, em microplaca de 96 poços (Corning, USA), em meio de cultura RPMI 1640, suplementadas com 10% de soro bovino fetal e expostas a diferentes concentrações (0,062 a 2  $\text{mg}/\text{mL}$ ) do extrato de *P. granatum* da folha e do fruto, por 24 h. Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de 5  $\text{mg}/\text{mL}$  do corante MTT em cada poço. Após exposição por 4 h, o

meio de cultura foi removido e 80 µL de dimetilsulfóxido que foram adicionados a cada poço para solubilização dos cristais de formazam. As placas foram agitadas cuidadosamente por 10 min e em seguida a absorbância foi medida no aparelho de ELISA a 570 nm. Foi avaliada quanto ao seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Os extratos dos frutos e das folhas *P. granatum*, foram diluídos em salina com 5 % de Tween 80 e usados imediatamente<sup>18</sup>.

Para os ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro*, foram utilizadas 9 linhagens de células tumorais humanas: MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-03 (ovário), 786-0 (rim) e K562 (leucemia). Estas linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI/EUA), cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C e ambiente úmido. A avaliação dos extratos brutos de *A. chicha* (com e sem fermentação) foi realizada em fibroblastos de camundongos, linhagem 3T3, seguindo-se o protocolo descrito por JORGE et al, 2013<sup>25</sup>.

As células foram mantidas em DMEM – Minimum Essential Medium Eagle - modificado Dulbecco (Sigma), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (GIBCO), 1 % de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/ml + estreptomicina 250 mg/ml) e 1 % de L-glutamina 200 mM. Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o corante vital Azul Tripano 0,4% (p/v), em PBS. A contagem das células foi realizada em microscópio invertido LEITZ, com a utilização de um hemocítmetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizada. A determinação da citotoxicidade foi feita pelo método colorimétrico do MTT 10. A suspensão celular (105 células/mL)<sup>27</sup>. As células foram mantidas em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1 % de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM.

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o corante vital Azul Tripán (Merck) 0,4% (p/v), em PBS 11, e a contagem das células foram realizadas em microscópio invertido LEITZ, com a utilização de um hemocítmetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizada. A citotoxicidade foi determinada através do método colorimétrico do MTT 12. Uma suspensão celular (105 células/mL), preparada em meio adaptado para cada linhagem celular, foi distribuída em placas de cultura com 96 poços (225 µL em cada poço), as quais foram incubadas por 24 h a 37 °C, com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub><sup>40</sup>. Os EBEPp e EBECp foram diluídos em meio de cultura celular RPMI-1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB – Gibco, Grand Island, NY, EUA) e

colocados em aparelho de ultrassom por um período de 50 min. O EBEPp e o EBECp foram testados nas concentrações de 0,001 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> e 1 mg.mL<sup>-1</sup>

As células foram cultivadas em meio de cultura celular RPMI-1640 (pH 7,2-7,4), suplementado com 10 % de SFB (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 0,1 % de penicilina (10.000 UI/mL)/estreptomicina (10 mg.mL<sup>-1</sup>). As células de fibroblasto humano (HFF-1) foram rotineiramente subcultivadas usando 2,5 g.L<sup>-1</sup> de solução de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pois são células aderentes à garrafa de cultivo celular. As células foram tratadas com 3 mL de tripsina e incubadas em estufa contendo 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C por 5 min. (PIRES et al, 2011). As células tumorais Hep-2 e HepG2 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e suplementadas com 10 % soro fetal bovino inativado e 1 % de antibiótico (Penicilina/ Estreptomicina). As células foram mantidas em garrafas para cultura de tecido em estufa a 37 °C e atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub><sup>34</sup>.

As culturas de celulares HepG2 (linhagem de células de câncer de fígado) foram adquiridos a partir de Centro Nacional de Ciências da pilha (NCCS). Soro Fetal de Bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/ml) e anfotericina B (5 µg/mL) numa atmosfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C até à confluência. As células foram dissociadas com uma solução de TPVG (0,2 % tripsina, 0,02 % de EDTA, 0,05 % de glucose em PBS). (RATTAROM et al, 2010).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, o extrato bruto metanólico (CME), inibiu o crescimento celular das três linhagens utilizadas nos ensaios biológicos. A fração menos polar (diclorometano) CME1 apresentou a maior atividade inibitória entre as três amostras, enquanto mais polar (acetato de etila) CME2 menos ativa contra as linhagens MCF-7 e NCI-H460 e foi inativa sobre as células A375-C5<sup>10</sup>.

O extrato *Erythroxylum suberosum* mostrou um possível efeito sensibilizador *in vitro* para o câncer de cabeça e pescoço. O efeito da citotoxicidade em linhagem celulares não foi seletivo e é muito semelhante ao efeito de quimioterapia padrão. O extrato aquoso de *Erythroxylum suberosum*, combinada com radioterapia foi o extrato mais citotóxica para carcinomas orais e hipofaringe. De acordo com resultado, houve aproximadamente 73 % de morte celular. Entre todos os tratamentos, a cisplatina foi menos tóxico sob 8 Gy de radiação com células viáveis, 27% (Figura 3). Todos os tratamentos foram agressivos para a linhagem celular de queratinócitos (HaCaT). Os resultados que mostraram o maior percentual de viabilidade celular foram os tratamentos ESH com cerca de 47%<sup>11</sup>.

O OSEME promoveu uma diminuição dependente da dose sobre a viabilidade de todas as células. Este efeito foi muito mais acentuado nas linhas de células tumorais do que em células não tumorais. Um fenômeno foi revelado pela dose de OSEME que promove a metade do efeito máximo (ID<sub>50</sub>). Os resultados são apresentados em tabelas e gráficos<sup>38</sup>. Atividade citotóxica para células tumorais Hep-2 IC<sub>50</sub> 0,38±0,02 mg/mL e para HepG2 IC<sub>50</sub> 0,54±0,03 mg/mL. A cisplatina apresentou IC<sub>50</sub> abaixo do extrato de sálvia, porém para a obtenção do seu IC<sub>50</sub> aumentou-se o tempo de exposição em seis horas<sup>34</sup>.

Foram isolados o ácido gálico, galato de propila e o biflavonoide (5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona), a partir de raízes da *Caesalpinia* var. *peltophodoires*. Como o potencial anticâncer do ácido gálico já é bem definido na literatura em diversas linhagens de células tumorais. Apenas o galato de propila e o biflavonoide foram submetidos aos testes antitumorais. Apresentou um IC<sub>50</sub> de 48 ± 1,60 µM sobre a linhagem de células de hepatocarcinoma (HTC), valor muito próximo da referência cisplatina. Os resultados indicam que Caesalpinioflavona tem uma potencial atividade antiproliferativa em células HTC. As linhagens celulares, (MCF-7) e (U251) apresentaram capacidade de resposta, valor de IC<sub>50</sub> = 236,4 ± 25.3 µM e IC<sub>50</sub> = 228,9 ± 27.37 µM respectivamente<sup>16</sup>.

Foi constatado que o tratamento com as frações metanólicas, nas doses de 50 mg/kg de peso foi eficaz, inibindo o crescimento tumoral. A porcentagem de inibição para a fração metanólica estabilizada foi de 69,84% e de 68,25% para a fração metanólica não estabilizada. (MOMESSO et al, 2009). Os dados indicaram que o flavonoide morina e o extrato de oliveira diminuíram a viabilidade celular para taxas percentuais de 7,22±1,54% e 62,37±2,85% nas concentrações de 800µM e µg/mL, respectivamente. O CE50da cisplatina (55,87 ±1,10µM) é 4 vezes menor que o CE<sub>50</sub> da morina (220,30 ±1,08µM), sendo portanto, mais ativa, Tabela 01<sup>23</sup>.

As maiores taxas percentuais de morte celular por apoptose foram 100% para morina na concentração de 800µM, figura 1 e 70,49 ± 5,91% para o extrato de Oliveira na concentração de 800 µg/mL. Estes resultados foram associados com a alteração do potencial de membrana mitocondrial, cujos valores são de 54,91% para morina na concentração de 400µM e 42,2% para o extrato de Oliveira na concentração de 800 µg/mL sugerindo envolvimento da via intrínseca da morte celular por apoptose. Portanto, morina e o extrato de oliveira afetaram a viabilidade celular da linhagem H460 induzindo morte celular por apoptose<sup>23</sup>.

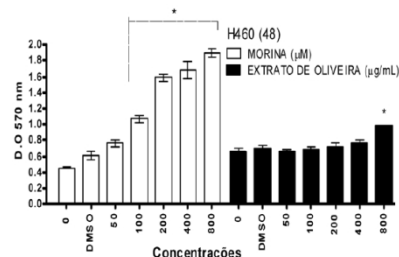
Os resultados dos estudos *in vitro* demonstraram uma redução na viabilidade das células K-562 e do TAE,

concentração-dependente, nos métodos investigados, Figura 2 e 3.

**Tabela 1.** CE50 (µM) da morina e do extrato de oliveira sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT.

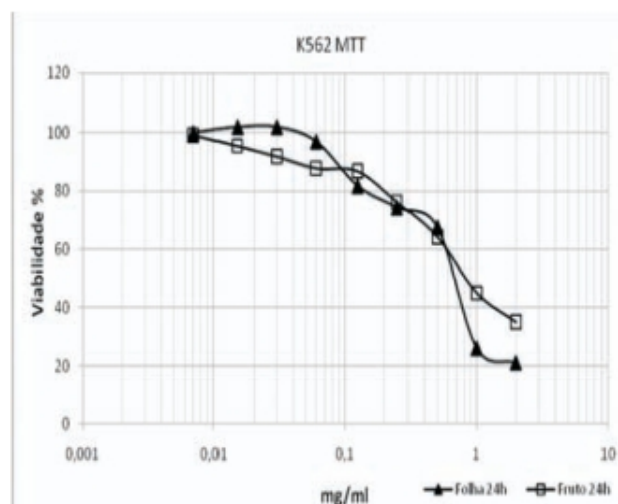
Drogas Testadas	CE50H460
Morina (µM)	220,30±1,08
Extrato de Oliveira (µg/mL)	>800
Cisplatina (µM)	55,87±1,10

**Fonte:** Pereira, 2015.



**Figura 1.** Avaliação da liberação da LDH (desidrogenase láctica). Células da linhagem H460 foram tratadas com diferentes concentrações do composto morina e extrato de oliveira durante 48 horas e avaliadas quanto à quantidade de LDH liberada (n=3). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultivo). A concentração de DMSO foi de 1%. \*P<0.05.

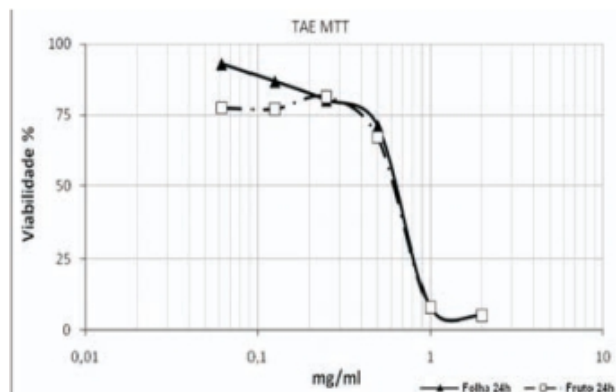
Os resultados *in vivo* demonstraram aumento da sobrevivência dos animais portadores do TAE tratados, de forma dose-dependente. Em paralelo, observou-se diminuição do número de células tumorais na cavidade peritoneal dos animais portadores e tratados. Dessa forma, os dados apresentados revelaram que o extrato de *P. granatum* possui atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em paralelo a redução da angiogênese peritoneal. Estes resultados estão representado em forma de imagem e gráficos<sup>18</sup>.



**Figura 2.** Viabilidade celular de células K-562 após 24 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha e do fruto de *P. granatum* (0,062 a 2 mg/mL) pelo método de redução do corante metiltetrazolium.



Este estudo contribuiu com dados relevantes para a padronização da matéria-prima vegetal, contribuindo para a compreensão dos parâmetros necessários ao produto para atender as necessidades de eficácia, segurança e reprodutibilidade imprescindíveis ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. O rendimento da extração final sem tratamento com enzima era mais elevada (4,28%) em comparação com o material tratado com enzima (19,03%), com uma razão de antocianina agliconas melhoradas, tal como determinado por HPLC-DAD e LC - MS com a infusão direta<sup>25</sup>.

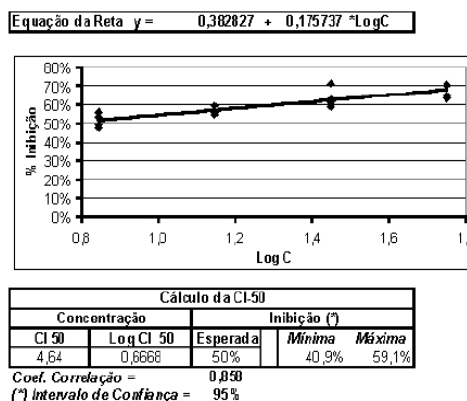


**Figura 3.** Viabilidade celular de células ascíticas do Tumor de Ehrlich após 24 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha e do fruto de *P. granatum* (0,062 a 2 mg/mL) pelo método de redução do corante metiltetrazolium.

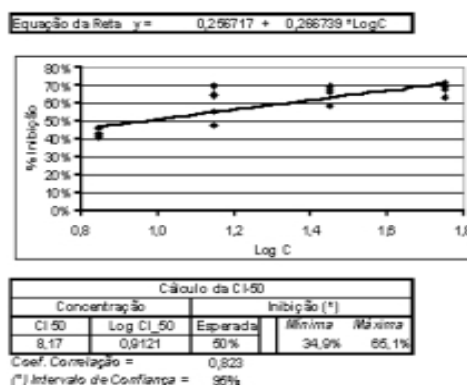
Os extratos de acetona e de metanol da raiz mostraram atividade significativa frente às células NCI-H292. Células HEp-2 não foram sensíveis aos extratos de *P. barbatus*. A IC<sub>50</sub> foi determinada a partir de uma regressão linear, relacionando-se o percentual de inibição celular em função do logaritmo das concentrações testadas ( $p < 0,01$ )<sup>40</sup>.

Extratos brutos de *L. alba* produzidos a partir de raiz, caule e folhas, mostraram atividades citotóxicas significativas frente às duas linhagens celulares. As células NCIH292, foram mais sensíveis ao extrato clorofórmico da raiz, enquanto as células HEp-2, foram mais sensíveis ao extrato etanólico das folhas (Figuras 4 e 5). O extrato etanólico da folha mostrou-se mais citotóxico frente às células HEp-2 com CI<sub>50</sub> igual 8,17 µg/mL, tabela 2. Para as células NCI-H292 observou-se que o extrato clorofórmico da raiz foi o mais citotóxico, com IC<sub>50</sub> igual 4,64 µg/mL. Os constituintes com maiores ações antineoplásica estão presentes, principalmente, na raiz e folhas da espécie<sup>40</sup>.

Seguindo bioensaio guiada isolamento, 17βH - neriifolin foi isolado como um potencial agente anti-câncer da folha *C. Odollam*. Ele mostrou potente atividade antitumoral com valores de IC<sub>50</sub> de 17, 21, 28, 32 e 24 nm contra MCF7, T47D, SKOV3, CaOV3 e linhagem de células Vero, respectivamente. (SYARIFAH et al, 2011).



**Figura 4.** Determinação da CI<sub>50</sub> para o extrato clorofórmico da raiz de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown frente a célula NCI-H292, a parti da regressão linear, relacionando o percentual de inibição do crescimento celular, em função do logaritmo das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ( $p < 0,01$ ).



**Figura 5.** Determinação da CI<sub>50</sub> para o extrato etanólico da folha de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown frente a célula HEp-2, a parti da regressão linear, relacionando o percentual de inibição do crescimento celular, em função do logaritmo das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ( $p < 0,01$ ).

Os resultados sugerem que essa planta tem atividade citotóxica em células tumorais, embora esta atividade também tenha sido observada em células normais. Assim, torna-se necessário proceder a estudos mais detalhados, já que a planta se mostrou promissora no que diz respeito à atividade antitumoral<sup>32</sup>.

As análises foram pelo teste de Tukey no programa SPSS v.19. O extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. mostrou atividade citotóxica para células tumorais Hep-2 IC<sub>50</sub> 0,38±0,02 mg/mL e para HepG2 IC<sub>50</sub> 0,54±0,03 mg/mL em comparação ao controle negativo, ficando acima do IC<sub>50</sub> obtido para seus controles positivos. A cisplatina apresentou IC<sub>50</sub> abaixo do extrato de Sálvia, porém para a obtenção do seu IC<sub>50</sub> aumentou-se o tempo de exposição em seis horas<sup>14</sup>.

**Tabela 2.** Atividade citotóxica de extratos de *Lippia 163lba* (Mill.)

N.E. Brown e da vincristina frente as células Hep-2 e NCI-H292.[ \* Valores considerados significativos]

Extratos	Linhagens celulares CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	NCI-H292	Hep-2
Raiz hexano	>30	>30
Clorofórmio	11,51*	4,64*
Acetona	>30	16,30*
Etanol	>30	11,43*
Metanol	>30	>30
Água	>30	>30
Caule hexano	>30	>30
Clorofórmio	>30	19,74*
Acetona	>30	>30
Etanol	>30	>30
Metanol	>30	>30
Água	>30	>30
Folha hexano	>30	25,12*
Clorofórmio	>30	>30
Acetona	>30	>30
Etanol	8,17*	>30
Metanol	14,44*	>30
Água	>30	>30
Vincristina	0,00279	0,0438

Fonte: Costa, 2004.

Os compostos puros, plumbagina exibiram a maior atividade citotóxica contra COR- L23, A549 e MRC5 com valores de IC<sub>50</sub> de 0,36, 0,59 e 2.17µg /mL, respectivamente, e piperina gingerol exibiram atividades citotóxicas contra CORL23 mais do que A549<sup>36</sup>.

O extrato etanólico de flores de *Cassia auriculata* foi testado para a atividade anticâncer STI contra linhagem de células HePG2 de câncer de fígado por ensaio MTT. O valor CTC<sub>50</sub> da amostra foi 352.4 µg/ml contra linhagem celulares de cancro do fígado HePG2. Os resultados observados foram significativos, provando assim o uso da planta no sistema tradicional da medicina<sup>37</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

Em consideração as consultas nas bases de dados, foram possíveis observar um número significativo de espécies vegetais com ação anticâncer. Atualmente, os modelos experimentais *in vitro*, como a cultura de células, são amplamente desenvolvido para novas descobertas de tratamentos relacionadas para câncer. Os métodos de extração e obtenções de frações das espécies vegetais com diferentes tipos de solventes são muito semelhante com rendimentos muito diferentes. Sendo grande parte das ações com extratos brutos em concentrações mínimas das espécies investigadas.

## REFERÊNCIAS

[01] Silva, P. "Farmacologia". 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002; 1374.  
 [02] Chevallier, A. The Encyclopedia of Medicinal Plants. London: Dorling Kindersley, 1996. FIGUEREDO, C.A. Fitoterapia (texto didático). João Pessoa: Núcleo de Estudo e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas. 2011.

[03] Calixto JB. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. 1ª ed. Santa Catarina: Editora Universitária, capítulo. 2011; 7:298-312.  
 [04] Simões C O, Auler Mentz L, Schenkel Ep, Irgang Be, Stehmann JR. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade / UFRGS. 1989.  
 [05] Malafaia O, Campos Acl, Torres Ojm, Goldenberg S. Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização em cirurgia. Acta Cirúrgica Brasileira. 2006; 21: 1.  
 [06] Foro ACM. Plantas medicinais: um auxílio para a cicatrização. Acta Paulista de Enfermagem. 1988; 1(3):73-79.  
 [07] Sieber Om, Heinimann K, Tomlinson Ipm. GENOMIC instability – the engine of tumorigenesis. Nature Rev. 2003; 3:701-708.  
 [08] INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>.  
 [09] Veiga VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Química Nova. 2008; 28(3):519-528.  
 [10] Almeida AP, Quintela JC, Chaves DAS, Barbosa JF, Pinto M, Pedro M. Rev. Virtual Quím., Efeito Citotóxico de Extratos Obtidos de *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae). 2016; 8(1):27-34.  
 [11] Macedo TBC, Silvia T, Elias HM, Torres FPY-S, Dâmaris S, Pérola OM, Adriana L-P, Eliete N. Guerra MAGS. Brazilian Dental Journal. Efeito citotóxico de *Erythroxylum suberosum* combinado com radioterapia em câncer de cabeça e pescoço linhagem de Células. 2006; 7(1):108-112.  
 [12] Lima AP, Pereira FC, Vilanova-Costa CST, Ribeiro AS BB, Silveira-Lacerda EP. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Stolmatra brasiliensis*. Revista Eletrônica de Farmácia., Suplemento. 2006; 3(2):10-12.  
 [13] Monteiro LP. Determinação da Atividade Citotóxica do Extrato Vegetal de *Croton Urucurana* Baill em Linhagens de Células Tumorais. Viçosa, (MG). 2015.  
 [14] Garcia. CSC, Lambert APF, Henriques JA, Ely M. Roesch., Scientia Medica Avaliação *in vitro* do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais., (Porto Alegre). 2011; 22(3):131-137.  
 [15] Magalhães HIF, Ferreira PMP, Moura ES, Torres MR, Alves APNN, Pessoa ODL, Lotufo LC, Moraes MO, Pessoa C. Atividade Antiproliferativa *In vitro* e *In vivo* de Extratos Caule de *Calotropis Procera*. A. Acad. Bras. Ciênc. 2010; 82(2).  
 [16] Massoni M. Avaliação da atividade antitumoral do extrato da raiz de *Caesalpinia* var. *Peltophoroides*: isolamento, caracterização e modificação estrutural envolvendo a obtenção de complexos de rutênio, platina e vanádio / Murilo Massoni, Alfenas, MG. 2014.  
 [17] Madjarof C. Atividade Antitumoral dos Extratos e Frações Obtidos de *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). Campinas. Tese. 2014.  
 [18] Oliveira LP, Pinheiro RC, Vieira MS, Paula JR, Bara MTF, Valadares MC. Revista Brasileira de Farmacognosia. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. 2010; 20(2):201-207.



- [19] Veiga VFJ, Pinto AC, Maciel, MAM. Plantas medicinais: cura segura? Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Química Nova. 2008; 28(3):519-528.
- [20] Momesso. L. Da Silva, Moura R. M. Xavier De, Constantino D. H. Jardim. Brazilian Journal of Pharmacognosy., Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). 2009; 19(3):660-663.
- [21] Ozi J. M.; Suffredini I. B.; Paciência M.; Frana S. A.; Dib L. L. Efeitos Citotóxicos *In Vitro* de Planta Brasileira Extraí em carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral. Braz. res orais. vol.25 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2011.
- [22] Lucena RFP, Farias DC, Carvalho TKN, Lucena CM, Vasconcelos Neto CFA, Albuquerque UP. Conhecimento tradicional de *Myracrodruon Urundeuva* Allemão por comunidades tradicionais no Semiárido do Nordeste do Brasil. Sitientibus série Ciências Biológicas. 2011; 2:255-264.
- [23] Pereira WL, Oliveira TT, Kanashiro M, Costa MR, Rev. Bras. Pl. Med. Ação antiproliferativa flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460., Campinas. 2015; 17(4 supl. I):798-806.
- [24] Gomes J. P. M., Pesquisa de Atividade Antitumoral e Mutagênica *In Vitro* de Produtos Naturais. Araraquara (SP). Dissertação. 2008.
- [25] Jorge M. Pedroza, Sousa I. M. De Oliveira, Duarte M. C. Teixeira, Figueira G. M., Nubia De Queiroz C. Almeida, Rodrigues R. A. Ferreira, Carvalho J. E. De, Goes A. L. T. Ruiz, Foglio M. Ann., Quim. Nova., Atividade de Extratos de *Arrabidaea Chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot Obtidos por Processos Biotecnológicos Sobre a Proliferação de Fibroblastos e Células Tumorais Humanas. 2013; 36(3):431-436.
- [26] Andrade W. M., Investigação da Atividade Antitumoral *in vitro* e *in vivo* da *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). Goiana. 2011.
- [27] Costa M. Do Carmo C. D. Nascimento S. Carneiro., Acta Farm. Bonaerense., Atividade Citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). 2003; 22(2):155-8.
- [28] Syarifah M. M Siti, Nurhanan M.Y, J., Haffiz M., Ilham A. Mohd, Getha K, O Asiah, Norhayati I., H Lili Sahira, Suryani S. Anee., Journal of Tropical Forest Science., Potential anticancer compound from *Cerbera odoll*. 2011; 23(1):89-96.
- [29] BOGO. D., Avaliação da Atividade Antitumoral *In Vitro* E *In Vivo* de Compostos de Líquens. .Mato Grosso do Sul, Tese. 2012.
- [30] Martins. L. A., Avaliação do Potencial Anticâncer de Espécies Vegetais de Mato Grosso do Sul. CAMPO GRANDE, Dissertação. 2014.
- [31] Amarante C.B.Do, Müller A.H., Müller R.C.S., Oliveira D.De J., Lins A.L.F.De A., Prado A.F.Do, Dolabela M.F. Estudo farmacognóstico, fitoquímico e citotóxico do extrato etanólico e frações obtidos do caule de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). Rev. Bras. Farm. 2011; 92(2):60-65.
- [32] Pires W. Carvalho, Mello F. M. Dos Santos, Batista M. Pedrosa, Pereira F. De Castro Lima, A. Pereira, Vilanova-Costa C. A. Samtiago. Rev. Biol. Neotrop. Estudo da atividade citotóxica do extrato bruto etanólico de *Psychotria prunifolia* (Rubiaceae) em células tumorais e normais *in vitro*. 2011; 8(1):15-23.
- [33] Livia MA. Obtenção e Separação de Compostos Bioativos de *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI em Meio Supercrítico e Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Leucêmicas / Maayra Arauco Livia / orientador, Ariovaldo Bolzan – Florianópolis, SC. 2014.
- [34] Garcia C. S. Celi, Lambert A. P. Franco, Henriques J. A. Pêgas, Ely M. Roesch. Scientia Medica. Avaliação *in vitro* do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais. (Porto Alegre). 2012; 22(3):131-137.
- [35] Pretto JB. Potencial Antimicrobiano de Extratos, Frações e Compostos Puros Obtidos de Algumas Plantas da Flora Catarinense. Itajaí (SC), Dissertação. 2005.
- [36] Rattarom R, Sakpakdeejaroen I, Itharat A, Thai J. Pharmacol., Efeitos citotóxicos do extrato etanólico de fórmula Benjakul e sua compostos em células cancerígenas do pulmão humano. 2010; 32(1).
- [37] Rattarom R, Sakpakdeejaroen I, Itharat A, Thai J Pharmacol. Atividade anti cancer de cassia auriculata ( flores ) contra o cancro do fígado humano. 2010; 32(1).
- [38] Rennó MN, Barbosa Gleyce M, Zancan P, Veiga VF, Celuta S, Alviano PMS, Holandino C. Anais da Academia Brasileira de Ciências., Extrato bruto etanólico de babaçu (*Orbignya speciosa*): citotoxicidade sobre linhas de células tumorais e não tumorais. 2008; 80(3):467-476.
- [39] Woisky RGR. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 1996; 74 f.
- [40] Costa M. Do C. Caldas Dias, Aguiar J. Dos Santos, Nascimento S. Carneiro do., Acta Farm. Bonaerense. Atividade Citotóxica de Extratos Brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). 2004; 23(3):349-52.
- [41] Souza, CMPI, Brandão DO, Silva MSP, Palmeira AC, Simões MOS, Medeiros ACD. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande – Paraíba. Rev. bras. plantas med. vol.15 no.2, Botucatu 2013.