



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

SARA ALBUQUERQUE DOS SANTOS

**EVIDÊNCIA DE INTERAÇÃO ENTRE A CAMOMILA
(*Matricaria recutita*) E O 5-FLUOROURACIL FRENTE À
ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA EM CAMUNDONGOS COM
SARCOMA 180**

**SÃO CRISTÓVÃO
2018**

SARA ALBUQUERQUE DOS SANTOS

**EVIDÊNCIA DE INTERAÇÃO ENTRE A CAMOMILA
(*Matricaria recutita*) E O 5-FLUOROURACIL FRENTE À
ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA EM CAMUNDONGOS
COM SARCOMA 180**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana A. Carvalho

**SÃO CRISTÓVÃO – SE
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237e Santos, Sara Albuquerque dos
Evidência de interação entre a Camomila (*Matricaria recutita*) e o 5-Fluorouracil frente à atividade antineoplásica em camundongos com sarcoma 180 / Sara Albuquerque dos Santos ; orientadora Adriana Andrade Carvalho. – São Cristóvão, 2018.
120 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Câncer. 2. Medicamentos – Interações. 3. Plantas medicinais. 4. Agentes antineoplásicos. 5. Camomila. I. Carvalho, Adriana Andrade, orient. II. Título.

CDU 616-006.6-085

Folha de aprovação

SARA ALBUQUERQUE DOS SANTOS

**EVIDÊNCIA DE INTERAÇÃO ENTRE A CAMOMILA
(*Matricaria recutita*) E O 5-FLUOROURACIL FRENTE À
ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA EM CAMUNDONGOS COM
SARCOMA 180**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Andrade Carvalho

1º Examinador: Profa. Dra. Luciana Nalone Andrade

2º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Dedico esta dissertação a Deus, a Ele toda honra e toda glória. Aos meus pais, Cileide e Reginaldo, por sempre acreditarem em mim, a meu irmão Diego, aos meus avós Lenildo e Maria, e à minha tia Cilene, por todo apoio. Vocês são muito importantes.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, como sempre na minha vida, agradeço a Deus, onipresente, onisciente e onipotente, que sempre me dá a força necessária para ultrapassar tantas barreiras.

Aos meus pais, Cileide e Reginaldo, que sempre me ensinaram valores fundamentais para a vida, por todo zelo e cuidado.

A minha tia Cilene, que sempre acreditou em mim e me apoiou em tantas coisas.

Aos meus avós Lenildo e Maria, por todo carinho e atenção. A eles minha eterna admiração. Ao meu irmão Diego Ricardo que sempre me socorreu em problemas.

A minha orientadora Profa. Dra. Adriana Andrade Carvalho por ter aceitado me orientar e ter me proporcionado participar do Laboratório de Oncologia Clínica e Experimental (LAPOCE), sempre serena e paciente, que apesar de tantos afazeres por ser diretora da Universidade Federal de Sergipe – Lagarto, sempre esteve acessível para tirar dúvidas dos seus orientandos, sempre humilde. Obrigada!

A Ricardo Amaral pelo grande auxílio em tudo, por tirar tantas dúvidas, por me ensinar tantas técnicas, por ser essa pessoa tão calma e disposta a ajudar, por ser parceiro nos meus experimentos, por ser muitas vezes psicólogo, por transmitir tanta segurança, braço direito da profa. Adriana no LAPOCE. Muito obrigada!

A Robério, minha dupla do LAPOCE, amigo, sempre tranquilo e disposto a ajudar, sempre me perguntando “o que é que você quer Sara??? Nossa convivência sempre foi motivo de muitas risadas. Obrigada.

A Ariel, sempre prestativo, sempre dizendo que tudo tinha “viés”, por sua contribuição nos meus experimentos.

A Cecília, que enquanto aluna de iniciação científica e membro do LAPOCE, me ensinou várias técnicas. Uma pessoa sempre acessível. Obrigada.

A Silvana Floresta e a Luciana Nalone por todo apoio que recebi em determinadas etapas do meu trabalho, por serem sempre tão prestativas e por todo auxílio recebido no Instituto de tecnologia e Pesquisa ITP, da Universidade Tiradentes - Unit. Obrigada.

Ao Prof. Dr. Ricardo Albuquerque, pesquisador do Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE/ITP), por ter me permitido realizar uma parte dos meus experimentos em seu laboratório, por todo auxílio, colaboração e disponibilidade. Obrigada!

A Profa. Dra. Patrícia Severino, do Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, Universidade Tiradentes, por ceder o Laboratório de Nanotecnologia para realização de alguns procedimentos.

A Nely, técnica do LMPE/ITP, por todas as técnicas ensinadas, por tanta paciência sempre, por tantas risadas dentro do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica da Unit: Andréia, Camila, Amanda, Luís e Rafael, que sempre me ajudavam de alguma forma quando eu precisava.

A Carla, sempre prestativa em tudo no Laboratório de Tecnologia e alimentos – LTA - UFS.

A equipe do Laboratório de Bioquímica de Produtos Naturais (LQPNB), coordenado pelo Prof. Dr. Charles Estevam, que sempre me acolheu muito bem.

A prof. Dra Josi, por ceder o seu laboratório de Neurociências – LAPENE para a realização dos experimentos.

Ao prof. Enilton, por ser sempre tão calmo e educado, um exemplo de profissional. Obrigada por ter me aceitado no estágio de docência, por ceder o espaço do Laboratório do processo inflamatório – LAFAPI.

A prof. Dra Cláudia Pessoa e o doutorando Guilherme Graziany, da Universidade Federal do Ceará (UFC), do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), departamento de medicina, pela colaboração em algumas análises.

Ao prof. Dr. Narendra e sua equipe por permitir realizar umas análises em seu laboratório (Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas – LAF/UFS).

A todos os amigos externos à universidade e aos amigos que fiz no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PROCFIS, por tantas risadas, tantas conversas, tantas construções de conhecimentos e discussões críticas, confraternizações e união. Robério, Sabrina, Niviane, Ariel, Thiago, Roas, Jéssica, Silvio, Mirian, Cácia, Kelly, Marcos, Clarissa, Edson (s), Thássia e todos os outros com quem direta ou indiretamente convivi pelos laboratórios, corredores e aulas.

Ao Programa PROCFIS e ao seu quadro de professores, grandes profissionais e exemplos da academia.

A Renivan, o melhor secretário de todos os tempos, por tanta paciência, honestidade, consideração e “avisos”.

A Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de participar do seu corpo discente como pós-graduanda.

A CAPES/FAPITEC pelo apoio financeiro a pesquisa.

Evidência de interação entre a Camomila (*Matricaria recutita*) e o 5-Fluorouracil frente à atividade antineoplásica em camundongos com sarcoma 180. Sara Albuquerque dos Santos, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2018.

RESUMO

O câncer é a causa de adoecimento que mais se expande no planeta. É entendido como um conjunto de mais de 100 doenças celulares, causado por mutações e alterações nos mecanismos de regulação epigenética. O conhecimento popular fornece base para o uso de diversas plantas com potencial antitumoral e muitos pacientes associam seu uso aos tratamentos padrões para o câncer, desconhecendo, entretanto, a existência de possíveis interações medicamentosas ou potencializações de efeitos adversos. Particularmente infusos da *Matricaria recutita* tem sido popularmente utilizados em associação com quimioterápicos. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da associação entre a *Matricaria recutita* e o fármaco antineoplásico 5-fluorouracil no tratamento em camundongos transplantados com o sarcoma 180. Para isso, o extrato aquoso da *Matricaria recutita* (EAMR) foi preparado a partir das inflorescências, cujo registro cromatográfico detectou a presença de flavonóides como luteonina, quecertina, rutina e compostos fenólicos como ácido caféico. A citotoxicidade *in vitro* do EAMR foi avaliada frente a 5 linhagens de células tumorais humanas: próstata (PC-3), cólon (HCT-116), adenocarcinoma de mama (MCF-7), leucemia promielocítica aguda (HL-60) e glioblastoma (SNB-19), e não maligna fibroblasto (L929) através do ensaio do MTT. O EAMR não apresentou atividade citotóxica em nenhuma das linhagens de células testadas, com $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$. Para o experimento *in vivo* foram utilizados camundongos swiss divididos em grupos experimentais: tratados com solução veículo (CTRL -), 5-FU 25 mg/kg/dia (CTRL +), EAMR 100, EAMR 200, EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU (mg/kg/dia), $n = 07$ por grupo. O EAMR foi administrado v.o. e o 5-FU i.p durante 7 dias de tratamento. Foram analisados a Inibição Tumoral (IT) e parâmetros toxicológicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. O tratamento dos grupos associados EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU reduziu ($p < 0,05$) o crescimento do tumor, com percentuais de inibição de 66,1% e 87,7%, respectivamente, por provável sinergismo entre seus compostos. Em relação aos parâmetros toxicológicos, houve redução da massa corpórea a partir do 3º dia de tratamento nos grupos associados ($-1,2 \pm 0,3$ e $-1,3 \pm 0,3$ g, respectivamente) ($p < 0,05$), demonstrando a potencialização do 5-FU quanto à perda de massa corpórea, além da presença de diarreia, principalmente para a maior dose. Houve alteração da massa do coração nos grupos associados 100 e 200 ($0,50 \pm 0,01$ e $0,51 \pm 0,02$ g, respectivamente) ($p < 0,05$); atrofia esplênica nos grupos 5-FU, EAMR100 + 5-FU e EAMR200 + 5-FU ($0,23 \pm 0,02$, $0,31 \pm 0,03$ e $0,21 \pm 0,02$ g, respectivamente) ($p < 0,05$), sem potencialização do efeito; e redução da massa hepática no grupo EAMR200 + 5-FU, porém sem elevação das enzimas hepáticas. Não houve potencialização da mielossupressão (leucopenia e plaquetopenia) nos grupos associados. As análises histopatológicas dos tumores mostraram redução de mitoses e presença de áreas apoptóticas nos grupos associados, como também redução da extensão da poupa branca no baço. Os resultados desse estudo sugerem que a associação entre a *Matricaria recutita* e o 5-FU potencializa a atividade antitumoral de forma sinérgica, intensificando alguns efeitos adversos.

Palavras-chaves: Câncer; Antitumoral; Toxicidade; Interações Medicamentosas; Plantas Medicinais; *Matricaria recutita*.

Evidence of interaction between Chamomile (*Matricaria recutita*) and 5-Fluorouracil against antineoplastic activity in mice with sarcoma 180. Sara Albuquerque dos Santos, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2018.

ABSTRACT

Cancer is the most widespread cause of illness on the planet. It is understood as a set of more than 100 cellular diseases, caused by mutations and changes in mechanisms of epigenetic regulation. Popular knowledge provides a basis for the use of several plants with antitumor potential and many patients associate their use with the standard treatments for cancer, however, ignoring the existence of possible drug interactions or potentiation of adverse effects. Particularly infused *Matricaria recutita* has been popularly used in association with chemotherapy. This study aimed to evaluate the effect of the association between *Matricaria recutita* and the antineoplastic drug 5-fluorouracil in the treatment of mice transplanted with sarcoma 180. For this purpose, the aqueous extract of *Matricaria recutita* (EAMR) was prepared from the inflorescences, whose chromatographic record detected the presence of flavonoids such as luteonin, quecetin, rutin, and phenolic compounds such as caffeic acid. In vitro cytotoxicity of EAMR was evaluated against 5 human tumor cell lines: prostate (PC-3), colon (HCT-116), breast adenocarcinoma (MCF-7), acute promyelocytic leukemia (HL-60) and glioblastoma (SNB-19), and non-malignant fibroblast (L929) through the MTT assay. EAMR showed no cytotoxic activity in any of the cell lines tested, with IC₅₀ > 50 µg / mL. For the in vivo experiment, swiss mice divided into experimental groups were treated with vehicle solution (CTRL-), 5-FU 25 mg / kg / day (CTRL +), EAMR 100, EAMR 200, EAMR 100 + 5-FU and EAMR 200 + 5-FU (mg / kg / day), n = 07 per group. The EAMR was administered v.o. and 5-FU i.p for 7 days of treatment. Tumor Inhibition (IT) and toxicological, biochemical, hematological and histopathological parameters were analyzed. Treatment of the associated groups EAMR 100 + 5-FU and EAMR 200 + 5-FU reduced tumor growth, with inhibition percentages of 66.1% and 87.7%, respectively, by probable (p <0.05) synergism between its compounds. In relation to the toxicological parameters, there was a reduction in body mass from the 3rd day of treatment in the associated groups (-1.2 ± 0.3 and -1.3 ± 0.3 g, respectively) (p <0.05), demonstrating the potentiation of 5-FU in the loss of body mass, in addition to the presence of diarrhea, mainly for the higher dose. There was alteration of the heart mass in the associated groups 100 and 200 (0.50 ± 0.01 and 0.51 ± 0.02g, respectively) (p <0.05); (0.23 ± 0.02, 0.31 ± 0.03, and 0.21 ± 0.02 g, respectively) (p <0.05) without potentiating the effect; and reduction of hepatic mass in the EAMR200 + 5-FU group, but without elevation of hepatic enzymes. There was no potentiation of myelosuppression (leucopenia and thrombocytopenia) in the associated groups. Histopathological analyzes of the tumors showed reduction of mitoses and presence of apoptotic areas in the associated groups, as well as reduction of the extent of the white pouch in the spleen. The results of this study suggest that the association between *Matricaria recutita* and 5-FU potentiates the antitumor activity in a synergistic way, intensifying some adverse effects.

Key-words: Cancer; Antitumoral; Toxicity; Drug Interactions; Medicinal Plants; *Matricaria Recutita*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos bioativos encontrados na <i>Matricaria recutita</i>	21
Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais para os diferentes tratamentos.	39
Tabela 3. Compostos químicos identificados no extrato das flores da <i>Matricaria recutita</i> analisados por UFLC - DAD.	47
Tabela 4. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do EAMR.....	49
Tabela 5. Efeito do EAMR isolado e associado ao 5FU sobre a variação de consumo de ração e água em animais transplantados com S180.	53
Tabela 6. Efeito do EAMR associado ao 5-FU sobre a massa dos órgãos (baço, fígado, rins, estômago, cérebro, intestino, pulmão e coração) em animais transplantados com S180.....	54
Tabela 7. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros bioquímicos (ALT, AST, Ureia, Creatinina, BD, BT e FA) em animais transplantados com tumor S180.	55
Tabela 8. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos (HB, HEM, HT, VCM, HCM, CHCM e PLT) em animais transplantados com tumor S180..	56
Tabela 9. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos (contagem total de leucócitos e contagem diferencial relativa de leucócitos) em animais transplantados com S180.....	58
Tabela 10. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos (contagem absoluta de leucócitos) em animais transplantados com S180.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estatística sobre as principais causas de câncer.....	5
Figura 2. Processo de carcinogênese.....	6
Figura 3. Etapas da Intérfase celular- Ciclo celular.	7
Figura 4. Ciclo celular: pontos de checagem.....	8
Figura 5. Representação esquemática das alterações morfológicas características dos diferentes tipos de morte celular.....	11
Figura 6. Planta triturada (A). Fervura da água a 100°C (B). Infusão (C). Substância filtrada em papel filtro (D). Tubos falcons com tampa vedante e identificados (E).....	31
Figura 7. Liofilizador com as amostras (A). Painel do liofilizador com indicação digital (B). Extratos liofilizados (C e D).....	32
Figura 8. Cromatógrafo Líquido UFLC Ultra Rápido Prominence.	34
Figura 9. A. Fluxograma do Protocolo Experimental da manutenção do tumor S180. B. Células viáveis do S180 (incolores) na câmara de Neubauer. C. Fluxograma dos dias de tratamento.	41
Figura 10. Processamento dos cortes dos órgãos e dos tumores no aparelho PT09TS Tissue Processor (LUPETEC®).	45
Figura 11. Registro cromatográfico do extrato das flores da camomila (<i>Matricaria Recutita</i>).	47
Figura 12. Perfil cromatográfico do extrato das flores da <i>Matricaria Recutita</i> (Absorbância x Tempo de retenção).	47
Figura 13. Teste de DPPH do EAMR. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 minutos de reação no aparelho ELISA de microplaca com incubação a 27°C e na frequência de luz a 517 nm.....	48
Figura 14. A mudança de cor de púrpura para amarelo translúcido indicou atividade antioxidante do EAMR para as diferentes concentrações.	48
Figura 15. Efeito do EAMR (100 e 200 mg/kg/dia) associada ao 5-FU (25 mg/kg/dia), após administração por via oral e i.p. respectivamente, sobre o crescimento e inibição tumoral em animais transplantados com tumor S180.....	50
Figura 16. A. Efeito do EAMR (100 e 200 mg/kg/dia) via oral sobre a variação de massa corpórea em animais transplantados com tumor S180..	52

Figura 17. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores.....	60
Figura 18. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores.....	61
Figura 19. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores.....	62
Figura 20. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores.....	63
Figura 21. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores.....	64
Figura 22. Análise quantitativa do número médio de mitoses/campo histológico (x400) nos diferentes grupos experimentais.	65
Figura 23. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de baço de roedores com S180..	66

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

< - Menor que

® - Referência

µg - Microgramas

µm - Micrômetros

°C - Graus Celsius

5-FU - 5 fluorouracil

AH- Atividade antioxidante

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

CAM - Complementary and Alternative Medicine

Caspases – Proteases aspartato específicas contendo cisteína

CDK - Proteínas quinases dependentes de ciclina

CI₅₀ - Concentração Inibitória Média

CKI - Inibidores das proteínas-quinase dependentes de ciclina

COX-2- Ciclooxygenase

DCs- Células dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilenodiaminotetraacético

ERO- Espécies reativas de oxigênio

FPM - Fator promotor de mitose

g - gramas

G₀ - Gap 0

G₁ - Gap 1

G₂ - Gap 2

HCT-116 - Linhagem de células tumorais de carcinoma de cólon

H/E- Hematoxilina e eosina

HL-60- Leucemia promielocítica aguda humano

IFN- γ - Interferon- γ
IL-2 - interleucina-2
INC- Instituto Nacional do Câncer
INCA - Instituto Nacional do Câncer
LPS- lipopolissacarídeo
IT - Inibição do crescimento tumoral
ITP- Instituto de Tecnologia e Pesquisa
kg - Quilogramas
L - Litros
M - Mitose
MIT - Microambiente inflamatório tumoral
m-Metros
MAC- Medicina Alternativa Complementar
MCF-7- Adenocarcinoma de mama humano
mg - Miligramas
mL - Mililitros
mm - Milímetros
MMP - Membrana mitocôndrial externa
MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
OMS - Organização Mundial de Saúde
PC-3- Carcinoma de próstata - humano
Rb – Retinoblastoma
RNA- Ácido ribonucleico
ROS- Espécies reativas de oxigênio
SNB-19- Glioblastoma humano
TBS-101- Suplemento Botânico Tradicional-101
TGF- β - fator de transformação do crescimento beta
TP- Timidina fosforilase
UFLC - Cromatógrafo Líquido UFLC Ultra Rápido Prominence
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. CÂNCER.....	3
2.2. CÉLULA: CICLO E MORTE.....	7
2.3. TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER	13
2.4. 5-FLUOROURACIL.....	15
2.5. PLANTAS MEDICINAIS E O CÂNCER	17
2.6. CAMOMILA (<i>Matricaria recutita</i>) E SUAS PROPRIEDADES.....	19
2.7. INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E ANTINEOPLÁSICOS.....	23
2.8. SARCOMA 180	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL.....	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. MATERIAIS	28
4.1.1. EQUIPAMENTOS	28
4.1.2. FÁRMACOS E REAGENTES	28
4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	29
4.2.1. OBTENÇÃO DA CAMOMILA (<i>Matricaria Recutita</i>).....	29
4.2.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	30
4.2.3. PREPARAÇÃO EAMR	30
4.2.4. LIOFILIZAÇÃO DO EAMR	31
4.2.5. ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DO EAMR.....	33
4.2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS	34
4.2.7. TESTE DA CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	35
4.2.8. ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	37
4.2.8.1. MANUTENÇÃO DO TUMOR SARCOMA 180.....	37
4.2.8.2. ANIMAIS	38
4.2.8.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A <i>Matricaria recutita</i> E O ANTINEOPLÁSICO 5-FU EM CAMUNDONGOS TRANSPLANTADOS COM S180	39
4.2.9. PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS.....	42
4.2.9.1 MASSA CORPÓREA, CONSUMO DE RAÇÃO E INGESTÃO HÍDRICA..	42
4.2.9.2. ANÁLISE DAS MASSAS DOS ÓRGÃOS.....	43
4.2.9.3. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	43
4.2.9.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	44
4.2.10. ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA E HISTOMORFOLÓGICA	44
5.1. ANÁLISE DO EAMR.....	47
5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EAMR.....	48
5.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>in vitro</i>	49

5.4. ESTUDO DOS EFEITOS DAS ASSOCIAÇÕES <i>in vivo</i>	50
5.4.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO EAMR COM O 5-FU EM CAMUNDONGOS TRANSPLANTADOS COM S180	50
5.4.1.1. MASSA TUMORAL E INIBIÇÃO TUMORAL	50
5.4.2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	51
5.4.2.1. MASSA CORPORAL E CONSUMO DE ALIMENTOS E ÁGUA	51
5.4.1.2. ANÁLISE DA MASSA DOS ÓRGÃOS	53
5.4.1.3. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	55
5.4.1.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	56
5.4.1.5. ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA E HISTOMORFOLÓGICA	59
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO.....	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO A.....	101
ANEXO B.....	103

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia crônica multifatorial, clínica e socialmente impactante, cujo tratamento, além de oneroso, implica em efeitos colaterais com consideráveis prejuízos a qualidade de vida dos pacientes. Espera-se que o impacto da doença, nos próximos anos, corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos esperados para o ano de 2025 (INCA, 2015), sendo que, o quantitativo de mortes provavelmente subirá de 8,2 para 13 milhões por ano (OMS, 2014). Popularmente muitos tratamentos caseiros são descritos em diferentes regiões do país e no mundo. Em Sergipe, há vários relatos do uso de chá de camomila em associação com tratamentos quimioterápicos padrões, associação esta que pode culminar em interações variadas.

As principais formas de tratamento contra o câncer são a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia, as quais podem ser indicadas em conjunto, dependendo da suscetibilidade dos tumores a essas modalidades terapêuticas (INCA, 2011). O antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU) é bastante usado em protocolos de quimioterapia com outros tipos de antineoplásicos, aumentando o índice de sobrevivência e melhorando a resposta ao tratamento em neoplasias malignas de mama, cabeça e pescoço e colorretal (JOHNSTON; KAYE, 2001). No entanto, apesar dos tratamentos padrões curativos para o câncer, grande parte dos pacientes estão empregando a medicina alternativa complementar (Complementary and Alternative Medicine - CAM) que envolve uso de práticas não convencionais (HIETALA et al., 2011; NCCAM, 2009S; PARREBOOM et. al., 2004), a exemplo das plantas medicinais.

O uso das plantas medicinais é um tratamento alternativo usado desde a antiguidade para controlar distintas doenças em humanos, englobando o câncer (CORDELL; BEECHER; PEZZUT, 1991; POPOCA et al., 1998). Segundo Newman et al. (2003), medicamentos resultantes de plantas podem ser terapêuticos para 87% das doenças humanas classificadas. Espécie como a *Matricaria recutita* (Camomila), em especial, é citada na literatura como possuidora de propriedades antioxidantes (FAJEMIROYE et al., 2016; WEISS, 1988), anticancerígenas (WAY et al., 2004) e antiproliferativas de tumores (CHEZ; JONAS, 1997).

Apesar da existência da crença da população acerca de que os produtos naturais são em sua maioria confiáveis e vantajosos (WANG et al., 2013), a interação com fármacos pode ocasionar elevação ou diminuição de eventos terapêuticos e adversos ou causar uma terceira resposta não esperada (GAUI, 2010). Inúmeros compostos da medicina alternativa complementar são capazes de interagir com fármacos e, no casos dos antineoplásicos, considerando a estreita janela terapêutica dessas drogas, isto é, a dose terapêutica está

próxima a dose letal, isso pode trazer ao paciente oncológico consequências dramáticas, além de culminar em toxicidades em alguns casos (TASCILAR et al., 2006; YU et al., 2015).

Estudos citam que existe interação medicamentosa relevante entre algumas plantas e os fármacos antineoplásicos irinotecano, imatinibe e docetaxel (MEIJERMAN et al., 2006). Nicoletti et al. (2010) cita que a planta Ananás (*Ananas comosus* [L.] Merr.) pode intensificar a ação de drogas como o 5-fluorouracil e a vincristina, e o Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) aplicado sobre a pele com o 5-fluorouracil aumenta absorção da droga. Outro estudo *in vitro* evidenciou que a administração simultânea entre ervas e o quimioterápico 5-fluorouracil induz a uma redução da proliferação celular e aumento da apoptose de forma sinérgica (YU et al., 2015). Isso demonstra a influência existente das plantas em relação a fármacos de relevância clínica na oncologia.

Pesquisas envolvendo, especificamente, interações decorrentes da associação entre a camomila (*Matricaria recutita*) e antineoplásicos como o 5-FU são limitadas. Estudos envolvendo compostos bioativos isolados dessa planta, como a luteonina e quercetina, em associação com antineoplásicos como a cisplatina, mostraram desencadeamento do aumento da eficácia do fármaco e inibição da proliferação celular em células tumorais (INDAP et al.; 2006; WU et al.; 2008). Com base nisso, uma vez que as associações podem aumentar a eficácia dos antineoplásicos, conseqüentemente poderá também incidir sobre os efeitos colaterais deste, que no caso do 5-FU são frequentes e envolve o surgimento de leucopenia, diarreia, anorexia, estomatite, mielossupressão, perda de peso e cardiotoxicidade (EL-SAYYAD et al., 2009; SORRENTINO et al., 2012).

Diante do exposto, torna-se importante mais estudos sobre os efeitos das associações entre ervas e fármacos, uma vez que ambos possuem agentes farmacologicamente ativos e podem ser responsáveis por interações medicamentosas (JEMAL et al., 2011; KAMBLE et al., 2015). Dessa forma, partindo da confirmação de que a maioria dos pacientes oncológicos do estado de Sergipe tratados nas clínicas particulares Centro de Oncologia Dr. José Geraldo Dantas Bezerra: Núcleo de Oncologia de Sergipe (NOS), Clínica Vitta e Onco Hematos, utiliza chás de plantas medicinais, em especial o de camomila (*Matricaria recutita*), associado a quimioterápicos (CAETANO, 2016), o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da associação da *Matricaria recutita* usada como chá, com o fármaco antineoplásico 5-fluorouracila, e fornecer maior subsídio para confirmação da hipótese da existência de prováveis efeitos sinérgicos entre seus compostos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER

O registro da presença do câncer em seres humanos e em animais vem sendo documentado ao longo de milhares de anos. A definição mais antiga dessa doença, apesar da palavra câncer não ter sido utilizada, data de aproximadamente 3000 a.C. A existência de tumores ósseos fossilizados em múmias no Egito antigo, indicam evidências primárias da doença, além do registro dessas informações em manuscritos arcaicos. O osteossarcoma, crescimento sugestivo do câncer de osso, já foi constatado em múmias, além de já ter sido encontrado múmias com crânio destruído, característica do câncer de cabeça e pescoço (ACS, 2017).

O câncer é uma neoplasia maligna cuja palavra neoplasia significa “novo crescimento”. A terminologia “tumor” foi, a princípio, dado ao edema ocasionado pela inflamação, porém o uso não neoplásico do termo tumor, em sua essência, desapareceu, ficando esse termo atualmente igualado ao termo neoplasma (INCA, 2011; KUMAR et al., 2010).

A palavra câncer é originada do latim que deriva do termo grego *carcinus*, que significa caranguejo, devido à capacidade infiltrativa da massa tumoral que emite ramificações para os tecidos adjacentes semelhantes às patas do carangueijo. A oncologia (*oncos* significa tumor) é o estudo dos tumores ou neoplasmas (KUMAR et al., 2010). Desde que as células neoplásicas não se tornem invasivas, o tumor é considerado benigno (ALBERTS et al, 2010).

O câncer também pode ser entendido como um conjunto de mais de 100 doenças celulares, causado pela ruptura dos mecanismos de regulação epigenética que favorece desvios nos mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação celular (KUMAR et al., 2010; YOU; JONES, 2012).

Ambas as neoplasias, benignas ou malignas, têm como característica a proliferação desregulada, porém as últimas se destacam pela desdiferenciação, capacidade de invadir tecidos e principalmente capacidade de metastatizar. As duas possuem células neoplásicas clonais que formam o *parênquima* e o *estroma* reativo formado por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e quantidade oscilante de macrófagos e linfócitos. O primeiro determina as consequências patológicas, o crescimento e sua evolução, sendo completamente dependente

do estroma. O segundo precisa de um fluxo sanguíneo adequado para que as células tumorais vivam e se dividam (KUMAR et al., 2010).

A característica do câncer reflete padrões modificados de expressão genética das células, como consequência de mutações genéticas, sejam elas herdadas ou adquiridas. O termo *maligno*, quando se refere a uma neoplasia, expressa que a lesão pode invadir e devastar as estruturas próximas e se dispersar para sítios distantes, levando à morte (KUMAR et al., 2010; RANG et al., 2012).

Os genes que estimulam a progressão do ciclo celular positivamente são entendidos como proto-oncogenes. Esses genes, em caso de ocorrência de mutações, se transformarão em oncogenes. Já as proteínas relacionadas ao controle negativo do ciclo são entendidas como genes supressores tumorais, onde mutações nestes genes culminarão em ausência dos mecanismos reguladores do ciclo celular normal (WARD, 2000).

Os proto-oncogenes podem transformar-se em oncogenes por fenômenos carcinogênicos como infecção por vírus, radiações ou agentes químicos (RANG et al., 2012). Mutações nos genes de supressão tumoral podem acarretar o surgimento de muitos outros cânceres, sendo que, a disfunção desses genes culmina também na carcinogênese (YOU; JONES, 2012). Já foram reconhecidos em torno de 30 genes de supressão tumoral e 100 oncogenes dominantes (RANG et al., 2012).

Estima-se que no decorrer de toda a vida de uma pessoa ocorram em torno de 10^{16} divisões celulares e mesmo na ausência de agentes mutagênicos, ocorrem 10^{-6} mutações espontâneas para cada gene por divisão celular. Isso sugere que uma única mutação pode não ser suficiente para transformar uma célula normal em tumoral (ALBERTS et al, 2010). As mutações trazem consigo fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer, em especial, na população idosa, uma vez que foi exposta por mais tempo a esses fatores (INCA, 2017).

A célula cancerígena é também denominada assim quando obtém benefícios metabólicos e capacidades biológicas em relação às células normais, como imortalização da célula causada pela ativação da enzima telomerase; desaparecimento das características adesivas da membrana plasmática, importante para o reconhecimento célula-célula e inibição por contato do movimento e crescimento celular; perda de função e da capacidade de especialização, a capacidade de formar novos vasos sanguíneos (angiogênese) e evasão da morte celular programada (apoptose) (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LIOTTA ; KOHN, 2001).

Ao herdar uma única cópia defeituosa dos genes de supressão tumoral BRCA1 e BRCA2, por exemplo, as mulheres apresentam um grande risco para o desenvolvimento do câncer de mama, já a exposição a vírus ou a substâncias cancerígenas como, por exemplo, produtos que contêm tabaco ou amianto, pode propiciar o surgimento de outros tipos de cânceres. Porém, a carcinogênese é um evento complexo e possui várias fases, incluindo mais de uma alteração genética, além de outros fatores epigenéticos como os hormonais, cocarcinogênicos e efeitos de promoção tumoral, que, sozinhos, não levam a neoplasia maligna, entretanto aumentam as chances que as mutações culminem nessa patologia (RANG et al., 2012).

O risco de câncer na população depende das condições sociais, ambientais, políticas e econômicas onde está inserida, além das características biológicas. As relações de causa-efeito externas envolvem a alimentação, exposição a radiações ionizantes e radiação solar, tabagismo, poluição, substâncias químicas, fatores comportamentais, entre outros, que constituem fatores de risco ambientais e totalizam de 80% a 90% dos casos de câncer. As internas envolvem hormônios, condições imunológicas, além das mutações genéticas, fatores hereditários, familiares e étnicos (INCA, 2017) (**Figura 1**).

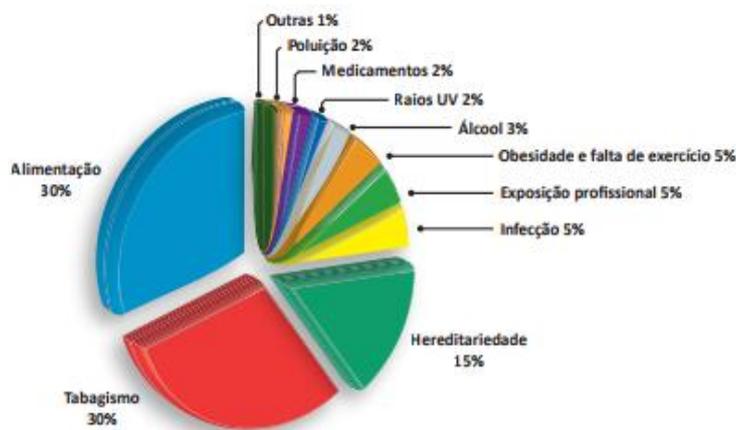


Figura 1. Estatística sobre as principais causas de câncer.
Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

O processo de geração do câncer é microevolutivo. Apesar da produção de metástases, sua origem precede um simples tumor primário existente em um órgão específico (ALBERTS et al., 2010). A carcinogênese, processo de formação do câncer, ocorre de forma lenta, sendo capaz de levar anos para que seja detectado algum tumor, cujas etapas para formação são: iniciação, promoção e progressão (SPANDIDOS, 2007).

Na primeira etapa da carcinogênese ocorre a mutação em alguns dos genes. Na etapa de promoção as células iniciadas são introduzidas no ciclo celular sob estímulo do agente cancerígeno promotor. Caso cesse o contato com o agente cancerígeno, paraliza-se o processo nessa etapa. Por fim, tem-se a etapa da progressão, onde a célula promovida consegue suplantar os mecanismos de combate aos clones malignos, identificada pela multiplicação descontrolada das células, que gera uma massa celular/tissular disfuncional, onde a doença já está instalada (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2017; YOU; JONES, 2012) (**Figura 2**).

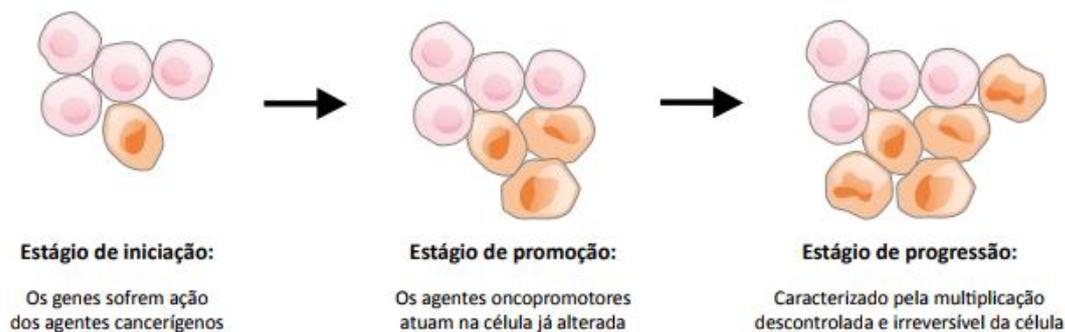


Figura 2. Processo de carcinogênese.
Fonte: INCA, 2011.

As células não alteradas controlam a geração e a liberação de sinais que propiciam o crescimento, a progressão do ciclo e a divisão celular, o que assegura uma homeostase da quantidade de células e a manutenção da função e da organização tecidual. Em contrapartida, as células mutadas desregulam tais sinais, tornando-se guias de seus próprios destinos, sinais esses transmitidos, em sua maioria, por fatores de crescimento que se acoplam a receptores de superfície celular contendo domínios intracelulares da tirosina quinase. Estes últimos emitem sinais intracelulares, através das células, por vias de sinalização que gerenciam a progressão através do ciclo celular e crescimento celular, além de intervir em outras propriedades biológicas como sobrevivência e metabolismo energético celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Ainda, relacionado ao favorecimento da progressão tumoral, atualmente tem-se como pauta para discussão o microambiente inflamatório tumoral (MIT), formado por células tumorais, células do estroma e um infiltrado de leucócitos (linfócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), eosinófilos, mastócitos e células supressoras de derivados mielóides) que estimulam o desenvolvimento do tumor mantendo sua atividade imunossupressora, através da liberação de citocinas e enzimas específicas que atuam no contato célula-célula (HANAHAN;

WEINBERG, 2011; YU et al. 2006). Isso porque, a progressão da neoplasia maligna, além de depender da alteração do ciclo celular, proliferação celular e da capacidade de invadir tecidos, precisa da habilidade em driblar mecanismos imunes e os tumores malignos apresentam vários mecanismos que o tornam resistentes, possibilitando evadir-se das respostas imunológicas do organismo (KERKAR; RESTIFO, 2012).

2.2. CÉLULA: CICLO E MORTE

- Ciclo Celular

A função primordial do ciclo celular é duplicar de forma exata a quantidade de DNA nos cromossomos, e a partir daí, segregar minuciosamente as cópias em duas cópias filhas iguais geneticamente. Esse processo caracteriza as duas principais fases do ciclo celular: a fase de crescimento, interfase, e a fase de divisão, chamada de mitose (ALBERTS et al., 2010).

A interfase é dividida em 3 momentos, G_1 , S e G_2 . Na fase G_1 , ocorre a preparação para a divisão da célula e a produção de componentes celulares fundamentais para a célula filha, além disso, ocorre a preparação do DNA para a síntese, que ocorrerá na fase S. Nas fases G_1 e S existem mecanismos regulatórios da divisão. Ocorrerá na fase G_2 , a síntese de constituintes para a mitose e logo após ocorrerá a divisão celular. Ao fim do ciclo as células voltam a entrar em G_0 , nesta etapa, a célula permanece num estado de quiescência, em repouso, cumprindo sua atividade normal (ALMEIDA et al, 2005) (**Figura 3**).

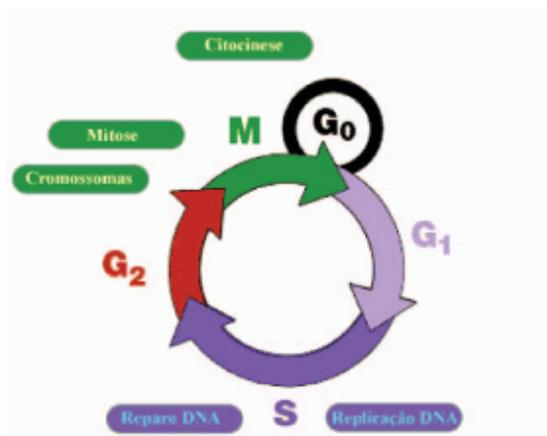


Figura 3. Etapas da Intérfase celular- Ciclo celular.

Fonte: ALMEIDA et al., 2005.

Entre um estágio e outro, há pontos de verificação (restrição ou crítico), como se fossem dificuldades a serem rompidas, localizados entre G_1 e S (G_1/S), onde a célula se compromete à entrada no ciclo celular e à duplicação dos cromossomos; entre G_2 e M (G_2/M), onde o sistema de controle desencadeia eventos mitóticos iniciais que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico, além de ter a missão de assegurar a propriedade preservativa celular; e o terceiro é a transição entre metáfase e anáfase, cujo sistema o regulatório induz a separação das cromátides irmãs, culminando na finalização da mitose e da citocinese. Caso o sistema de controle perceba ameaça fora ou dentro da célula, a progressão nesses pontos de checagem é interrompida (ALBERTS et al., 2010; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2007) (**Figura 4**).

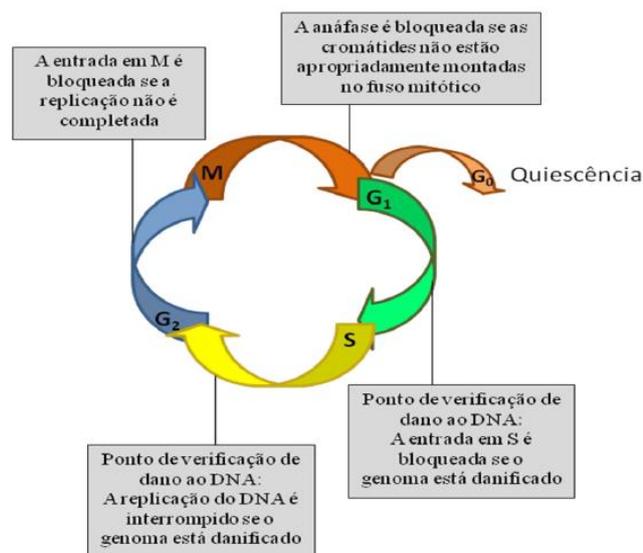


Figura 4. Ciclo celular: pontos de checagem.
Fonte: VERMEULEN et al., 2005.

Caso as células progridam para a fase adiante sem passar pela checagem e estejam alteradas, a alteração no DNA e/ou organelas e estruturas disfuncionais podem ativar a parada do ciclo e sofrerem apoptose (FOSTER, 2008). Nas células cancerosas, os pontos de verificação são ignorados o que induz a instabilidade genética e aumento da proliferação das células alteradas (FISCHER et al., 2004).

Para que o crescimento celular inicie, é necessária uma estimulação e liberação de fatores de crescimento, esses se interligam às membranas celulares através de receptores culminando na ativação de uma cascata de proteínas transdutoras de sinais. Quando o fator de crescimento acopla a um receptor específico, ocorre a ativação deste através da proteína transmembrana que aciona proteínas transdutoras de sinais do citoplasma, por exemplo. As

proteínas transdutoras de sinais transferem os sinais até o núcleo de onde dá-se a ativação das proteínas regulatórias nucleares, efetivando o início do processo de progressão do ciclo celular (KEITH et al., 2005).

O ciclo celular é regulado por vários fatores, em que, tanto sua produção como sua destruição ocorre em momentos estabelecidos. Os principais são: as ciclinas (subunidades reguladoras) A, B, D e E, que se ligam a CDKs (catalíticas) específicas, enzimas quinases dependentes de ciclinas (CDK4 e 6 se liga a ciclina D, CDK2 as ciclinas A e E, e CDK1 as ciclinas A e B) em fases específicas do ciclo celular; fosfatases: cdc-25 A, B e C, proteínas inibidoras de CDKs: p21, p27, p57, p16, p18, e fatores de transcrição: c-myc, E2F, Rb e p53 (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

O gene supressor de tumor p53 tem a função de proteger o genoma contra mutações. Ele atua através da identificação de danos ao DNA, paralisando e restaurando a célula em G₁. O DNA danificado culmina em morte por apoptose, prisão ou rearranjo do DNA celular. A p53 eleva a transcrição de inibidor de CDKs e da proteína p21 que se acopla a CDK, impossibilitando a interação ciclina-CDK, impedindo a fosforilação de Rb e a progressão do ciclo (FOSTER, 2008).

As cinases dependentes de ciclinas (Cdk, cyclin-dependent kinases), são os constituintes centrais do sistema de controle do ciclo celular. As atuações dessas cinases ora se elevam ora diminuem à proporção que a célula avança no ciclo, levando a alterações cíclicas na fosforilação de proteínas dentro da célula que regulam eventos cruciais do ciclo celular. Os reguladores mais importantes das Cdk são proteínas as ciclinas (ALBERTS et al., 2010).

Os complexos que formam a CDK/ciclina/inibidor de CDK são inativos, sendo que a sua ativação precisa da eliminação do inibidor de CDK ligado a ele por degradação (por exemplo: p21, p27), isso acontece nas transições de fases. A CKI, composta pelas proteínas específicas p21, 27 e 57, podem inibir as CDK1, 2 e 6; e composta pelas proteínas p16, 15, 18 e 19 podem inibir a CDK4 (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

Quando ocorre a ativação de CDK-4/ ciclina D, CDK-4/ciclina-6, CDK-2/ ciclina A, CDK-2/ciclina E eleva-se a ação da quinase dessas enzimas, promovendo a fosforilação gradativa da proteína retinoblastoma (RB). Esse evento promove a desagregação do complexo E2F/RB, o que favorece que E2F comece a transcrição de genes da fase S. Após, a ativação do complexo CDK-1/ciclina B induz a fosforilação de algumas proteínas nucleares, a condensação dos cromossomas, a formação do fuso e o início da mitose. Depois da

degradação da ciclina B, a atividade enzimática do complexo é interrompida e finaliza-se o ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

A proteína Rb coordena a expressão de genes que afetam as ciclinas presentes nos pontos de verificação na fase G para S. Inicialmente na fase G ela apresenta-se hipofosforilada, inibindo a progressão do ciclo celular e impedindo a ação do fator de transcrição E2F. Perto do ponto de restrição, os complexos ciclina D-CDK4 e 6 e o complexo ciclina E-CDK2 hiperfosforila a proteína Rb, desprendendo E2F e induzindo a entrada na fase S). Caso aconteça uma mutação no gene da proteína Rb, ocorre alteração no ciclo, ainda que a célula esteja despreparada para adentrar a fase S. Como o gene da proteína Rb é entendido como um supressor de tumor que pode bloquear o ciclo, ele é muito importante para a detecção dos erros que surgem no ciclo celular e as mutações de Rb são geralmente encontradas em tumores (ALMEIDA et al., 2005; MADDIKA et al., 2007).

A ausência de atividade da p53 e Rb reflete o surgimento de possíveis mutações, deleção do gene ou associação com proteína diferente, alterações essas que podem fazer com que os supressores de tumor impeçam a inibição da progressão do ciclo celular, favorecendo uma proliferação celular anormal. Na maioria dos cânceres, os supressores tumorais Rb e p53 aparecem alterados, apesar da presença de outros supressores de tumor em diferentes locais da célula os quais podem desencadear o câncer, a exemplo da superfície celular (fator de transformação do crescimento beta [TGF- β]), na região interna da membrana plasmática (NF1), no citoesqueleto (NF2), no citosol (APC/ β -catenina, PTEN, SMAD2 e SMAD4) e no núcleo (WT1, p16/INK4a, BRCA1 e BRCA2) (KUMAR *et al.*, 2010).

- Morte Celular

O controle da quantidade de células no organismo se dá pelo equilíbrio entre a proliferação e morte celular e as peculiaridades de cada tipo de morte celular estão associadas às cascatas de eventos bioquímicos e fisiológicos que desencadeiam alterações na síntese de macromoléculas, na homeostase celular, no ajuste do volume celular e na perda da viabilidade celular (BRASILEIRO FILHO, 2006). Tipos de morte celular como a apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica e senescência, têm sido estudados para entender diversas patologias, principalmente a formação de tumores (KRYSKO et al., 2010) (**Figura 5**).

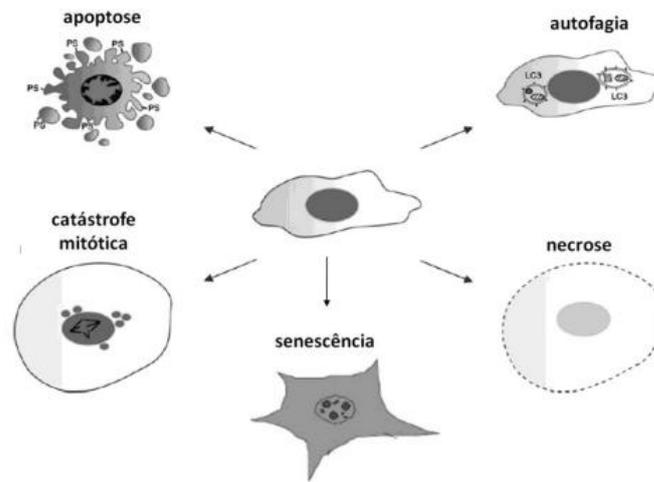


Figura 5. Representação esquemática das alterações morfológicas características dos diferentes tipos de morte celular.

Fonte: Modificado de Bruin e Medema (2008) e Gewirtz et al. (2008).

O mecanismo mais comum de morte celular é a apoptose, que mantém a homeostase das células e as protege da presença de agentes tóxicos. Do grego apo = de e ptose = cair, a apoptose é conhecida como morte celular programada. O desequilíbrio entre as moléculas pro-apoptóticas (Bax, Bid, Bak e BH3) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) caracteriza esse tipo de morte celular, pois promove modificações morfológicas e bioquímicas à exemplo da retração celular, condensação da cromatina, fracionamento nuclear e geração de corpos apoptóticos sem sofrer autólise, os quais serão fagocitados sem a ativação de cascatas inflamatórias (sem desencadear quimiotatismo) e sem danificar as células adjacentes (BRASILEIRO-FILHO, 2006; HUERTA et al., 2007; SU; MEI; SINHA, 2013).

As vias de indução de apoptose podem ser pela via extrínseca ou pela via intrínseca. A primeira é instituída por ativação de receptores de morte, e a segunda é iniciada pela elevação da permeabilidade da membrana mitocondrial externa (MMP) e liberação de citocromo c. As duas vias podem ser ativadas pela p53, sendo que a via extrínseca eleva a expressão de receptores de morte, ativando a caspase 8 e a caspase 3, já a via intrínseca amplia a expressão de proteínas pró-apoptóticas culminando no aumento da MMP, liberação de citocromo c (armazenado nas mitocôndrias) e ativação de caspases 8 e 9. As caspases são de uma família de cisteína proteases e são ativadoras de morte em diversas formas de morte celular, porém as que são atreladas a apoptose são as caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10 (FULDA; DEBATIN, 2006; SU; MEI; SINHA, 2013;).

O que promove a saída do citocromo c são os eventos elétricos e químicos como a diminuição do potencial de transição de permeabilidade iônica, abertura de megaporos e a violação pontual de uma região da membrana externa. Esses eventos são controlados pela interação das proteínas inibidoras de apoptose da família Bcl-2 e por proteínas indutoras de apoptose da família Bax, que podem atuar mutuamente com componentes estruturais externos das mitocôndrias, a exemplo dos poros de transição de permeabilidade (porinas) para várias moléculas como a H₂O e Ca²⁺. Esses domínios favorecem a homodimerização de compostos semelhantes e a geração de poros que medeiam a passagem do citocromo c da mitocôndria para o citosol. Em contrapartida, a geração de heterodímeros do tipo Bcl-2/Bax inibe a formação dessa estrutura e, por conseguinte, a morte celular (ADAMS; CORY, 2007).

Outro tipo de morte celular é a necrose, distinguida por apresentar redução energética, danos à membrana lipídica e ausência da função homeostática dos canais e bombas de íons, vacuolização do citoplasma, desagregação da membrana e elevação do volume celular. Esse tipo de morte é ocasionada também pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de proteases não apoptóticas (BRASILEIRO-FILHO, 2006; KRYSCO et al., 2008; RICCI; ZONG, 2006).

Tumores frequentemente apresentam necrose, seja ela associada a uma intervenção terapêutica ou inerente ao crescimento do tumor. Neste último ocorre um rompimento dos mecanismos homeostáticos, ocasionando um desequilíbrio entre proliferação e morte celular, tendo como resultado a elevação do tamanho tumoral. A porção de células no interior do tumor que estão em atividade proliferativa denomina-se “fração de crescimento”. Geralmente uma relevante parcela de células tumorais não está em replicação, além disso, a fração de crescimento não corresponde por si só ao crescimento tumoral, mas depende também de morte por necrose e apoptose, e perda por metástase ou disseminação local, representando um equilíbrio entre esses e a proliferação celular (TANNOCK, 2005).

Um terceiro tipo de morte celular é a autofagia, que é uma resposta ativa a ausência de nutrientes e diferenciação, que culmina na degradação seletiva de proteínas de longa duração, agregados de proteínas, organelas citoplasmáticas lesionadas e patógenos intracelulares, degradadas, em sua maioria por proteases lipossomais. Esse processo é adaptativo a resposta do estresse metabólico (RICCI; ZONG, 2006; SU; MEI; SINHA, 2013).

A catástrofe mitótica está mais para um sinal irreversível para morte celular do que um mecanismo de morte propriamente dito, pois está associada com os pontos de verificação do ciclo celular. O dano que leva a esse tipo de morte pode ser ocasionado por fármacos

antineoplásicos como, por exemplo, os agentes da hiperpolimerização dos microtúbulos (paclitaxel) e agentes despolimerizantes de microtúbulos (vimblastina e vincristina). Esse tipo de mecanismo apresenta defeitos mitóticos como condensação do núcleo inacabada, não alinhamento dos cromossomos e DNA danificado. Na senescência há elevação da granulosidade do citoplasma e as células apresentam-se esticadas e achatadas (BRUIN; MEDEMA, 2008; GEWIRTZ et al. 2008; RICCI; ZONG, 2006).

2.3. TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER

Os principais tipos de tratamento contra o câncer são cirurgia, radioterapia e terapia sistêmica (quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo e imunoterapia), os quais podem ser usados isoladamente ou combinados (JEMAL et al., 2014). Além destes, outra modalidade de tratamento é o transplante de medula óssea (INCA, 2017). O maior índice de cura da doença é atribuído à cirurgia (49%), seguido da radioterapia (40%) e quimioterapia (11%). Uma terapia ideal e um diagnóstico precoce cooperam para o declínio do número de morte por câncer em países mais desenvolvidos (JEMAL et al., 2014). Recentemente a fototerapia e a imunoterapia têm sido escolhidas como adjuvante no tratamento do câncer, sendo que todos esses tratamentos visam erradicar a doença (KATZUNG, 2010).

Em países de baixa e média renda, o alcance para um diagnóstico, tratamento de qualidade e custo acessível é limitado, colaborando para uma incidência de mortalidade em torno de 20% mais elevada que a dos países industrializados. O custo do tratamento do câncer aumentou principalmente devido ao avanço de técnicas de imagem, aparelhos de radioterapia e agentes anticâncer caros, abrangendo terapias alvo molecular. Ainda que cerca de 60% dos pacientes com a doença utilize a radioterapia em algum momento do tratamento, esta tecnologia não está disponível para 82% da população de países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2014).

O tratamento através da cirurgia é o mais antigo para tratar o câncer e cerca de 60% dos pacientes serão submetidos à cirurgia isoladamente ou associado com outras terapias. O Instituto Nacional do Câncer – INC (2017) distingue sete tipos de cirurgias:

- **Cirurgia preventiva** - Impede o câncer de acontecer, removendo massas pré-cancerosas antes de se tornarem malignas.
- **Cirurgia diagnóstica** - Conhecida como biópsia, retira-se fragmentos ou todo o tumor para determinar se o crescimento é canceroso.

- **Cirurgia curativa** - Remoção do tumor maligno localizado sem metástases.
- **Cirurgia suportiva** - Usada como suporte em outros tratamentos de câncer (a exemplo de alguns dispositivos de quimioterapia a serem inseridos debaixo da pele).
- **Cirurgia restauradora** – Reconstrói, ao máximo, a aparência e função normal após o tratamento de câncer.
- **Cirurgia paliativa** - Estabelecida apenas para aliviar a dor.

A radioterapia é um tratamento que destrói as células cancerosas através de feixes de radiações ionizantes. A dose a ser aplicada é pré-calculada, aplicada em determinado tempo, em um volume de tecido que envolve a massa tumoral, buscando erradicar as células tumorais (INCA, 2017). A radiação lesiona o DNA das células tumorais, promovendo a morte celular, no entanto, também pode causar dano em células saudáveis, limitando o tratamento (LOMAX et al., 2013).

O termo quimioterapia é utilizado, originalmente, para descrever o uso de drogas que são tóxicas para microrganismos agressores, mais que no organismo humano possuem efeitos mínimos. Engloba também medicamentos que têm como alvo tumores, sendo assim, atualmente, atrelado especialmente a esse ramo da farmacologia (RANG et al., 2012). A quimioterapia pode ser classificada como Curativa, que busca o controle total do tumor; Adjuvante, utilizada após a cirurgia curativa, objetivando eliminar a ação de células residuais locais ou circulantes, suprimindo a ocorrência de metástases; Neoadjuvante ou prévia, para se obter a diminuição parcial do tumor, permitindo uma complementação com a cirurgia e/ou radioterapia; e Paliativa, quando não tem finalidade curativa, mas somente melhoraria da qualidade de sobrevivência (BONASSA; GATO, 2012).

Os fármacos citotóxicos não são letais às células tumorais de forma seletiva. Estruturas como a medula óssea, pelos e mucosa do tubo digestivo, que se renovam continuamente, são muito atingidas pelos quimioterápicos. Uma vez que as células normais possuem um tempo de recuperação prevista, diferentemente das células doentes, a quimioterapia é aplicada repetidamente com base na recuperação das células normais, sendo assim aplicada comumente em ciclos periódicos (INCA, 2017).

A finalidade central da quimioterapia é eliminar as células neoplásicas sem agredir as células normais. Entretanto isso ainda não é possível, sendo que os benefícios dessas drogas são confrontados com a toxicidade, buscando-se um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2010). Os efeitos terapêuticos dos antineoplásicos dependem do tempo de

exposição e da concentração plasmática do fármaco, sendo a toxicidade variável nos diferentes tecidos, a depender do agente usado. O efeito tóxico sobre os tecidos não cancerosos ocorre, principalmente, naqueles de regeneração rápida, culminando em náuseas, vômitos, alopecia, maior susceptibilidade a infecções, artralgias, agitação, exantemas, flebites, mielossupressão, mucosites, imunossupressão, entre outros (INCA, 2017).

Os protocolos clínicos indicados para o tratamento oncológico têm o objetivo de padronizar as terapias para que se obtenha o máximo efeito com o menor prejuízo para o paciente (FERNANDÉZ et al., 2006). Os esquemas terapêuticos podem ser administrados por dia, semana, quinzena ou de 3/3 semanas a 6/6 semanas. A administração é em ciclos, ou seja, em intervalos regulares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). As quimioterapias de combinação com as fluoropirimidinas são comuns, como por exemplo, o 5-FU, Irinotecano ou Oxaliplatina, sendo considerada terapia padrão para o câncer colorretal (KYU-HYOUNG et al., 2010). Outros protocolos também envolvem o 5-FU como o IFL (Saltz) (Irinotecano, Leucovorin, 5-FU), FOLFOX4 (Oxaliplatina, 5-FU), FEC100 (Ciclofosfamida, Epirrubicina, 5FU) (JANUS et al. 2010).

2.4. 5-FLUOROURACIL

O fluoropirimidina 5-fluorouracil (5-FU), comumente 5-fluorouracil, é uma antimetabólico análogo do uracila (GREM, 1997). As Fluoropirimidinas foram criadas na década de 1950, quando foi observado, através de um experimento, que ratos com hepatomas utilizavam mais rapidamente uma das quatro bases nitrogenadas presentes no RNA, a pirimidina uracila, do que os tecidos normais. Esse processo acabou evidenciando que o metabolismo da uracila era um importante alvo para a quimioterapia antimetabólita (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Os pró-fármacos do 5-FU são largamente prescritos como agentes antineoplásicos para terapias contra os cânceres de mama, gastrointestinais e tumores de cabeça e pescoço (GREM, 1997). As drogas antimetabólicas agem inibindo processos biossintéticos cruciais ou são incorporadas à macromoléculas impedindo sua atividade normal, à exemplo do DNA e RNA. O 5-FU atua fazendo ambos os processos. Sendo assim, o mecanismo de citotoxicidade desse análogo do uracila está relacionado à incorporação de fluoronucleótidos no RNA e DNA, e à inibição da enzima timidilato sintase (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Os efeitos colaterais relacionados ao 5-FU são vários, como a leucopenia, estomatite, diarreia, náuseas e toxicidade cardíaca, esta última é a segunda causa mais frequente de cardiotoxicidade induzida por antineoplásico (GRESSETT; STANFORD; HARDWICKE, 2006; SORRENTINO et al., 2012). Alguns metabólitos do 5-FU estão relacionados à toxicidade, à exemplo da alfa-fluoro-betaalanina, associada a neuro e cardiotoxicidade (MUNEOKA et al., 2005). A enzima timidina fosforilase (TP) está associada na transformação do agente citotóxico capecitabina em 5-FU e do 5-FU em seus metabólitos ativos. Além disso, essa enzima também foi entendida como um fator angiogênico, onde há o surgimento de endotélio proveniente de plaquetas fator de crescimento celular (BRONCKAERS et al., 2009; ISHIKAWA et al., 1989).

A disponibilidade do 5-fluorouracil para a assimilação intracelular está relacionada especialmente ao catabolismo da droga no tecido. O 5-FU, logo depois da sua administração, é encaminhado para distintos destinos metabólicos onde cerca de 80% da dose administrada é inativada através de biotransformação no fígado, cerca de 15 a 20% são expelidos através da diurese e somente uma diminuta porção permanece disponível para encarregar-se da ação antitumoral (CASALE et al., 2004).

O 5-FU é muito usado combinado com outros tipos de antineoplásicos, aumentando o índice de sobrevivência e melhorando a resposta ao tratamento em neoplasias malignas de mama, cabeça e pescoço e colorretal. Apesar disso, as taxas de resposta para o tratamento quimioterápico com o 5-FU como primeira linha para o câncer colorretal são baixas, somente 10 a 15% (JOHNSTON; KAYE, 2001).

A associação do 5-FU com os antineoplásicos mais recentes à exemplo do irinotecan e oxaliplatin aumentam as taxas de resposta para esse tipo de câncer em cerca de 40 a 50% (DOUILLARD et al., 2000). Apesar dos avanços, outras alternativas terapêuticas devem ser encorajadas, a exemplo de compostos naturais obtidos de plantas, uma vez que os tumores tornam-se resistentes ao 5-FU. Esse fato torna importante o estudo do mecanismo dessa droga para superar sua resistência, como também estudar estratégias que melhorem ou influenciem na sua atividade. Nesse contexto, as pesquisas pré-clínicas podem impactar o uso clínico dessa droga (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

2.5. PLANTAS MEDICINAIS E O CÂNCER

A influência das plantas sobre a saúde humana tem sido relatada há milhares de anos e seu uso está relacionado tanto com a medicina tradicional como a não tradicional por cerca de 5000 anos (FAJEMIROYE et al., 2016; PHILIP, 2004). Essa popularidade das ervas serem escolhidas como medicamentos é fundamentada na habilidade delas agirem lentamente, gerando efeitos tóxicos mínimos, além de proporcionarem o alívio de uma vasta quantidade de doenças e de seus sinais e/ou sintomas (ASTIN et al., 2000; ATANASOV et al., 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) elucida que a planta medicinal é todo e qualquer vegetal que detém, em um ou mais órgãos, componentes que podem ser empregados para finalidade terapêutica ou ser precursores de drogas semi-sintéticas (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

As ervas são destacadas como um repositório de vários tipos de compostos bioativos contendo inúmeras propriedades terapêuticas. Os estudos científicos sobre as atividades biológicas das plantas começaram há cerca de dois séculos. A partir daí, várias atividades desencadeadas por constituintes à base de plantas foram elucidadas (ATANASOV et al., 2015; ORTIZ et al., 2017). As numerosas implicações terapêuticas associadas às plantas incluem atividade anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antimaláricas, analgésicas, entre outras (ATANASOV et al., 2015; JEMAL et al., 2011). A superpopulação, a oferta inadequada de drogas, o custo alto para os tratamentos, além da ocorrência de diversos efeitos colaterais de inúmeros medicamentos e a resistência, tem contribuído, crescentemente, para a procura de ervas como fontes de medicamentos (BADRIA; ZIDAN, 2004).

A medicina alternativa, incluindo as ervas, são inquestionáveis fontes de novos princípios ativos investigáveis para controlar diversas patologias, sendo que a variedade estrutural dos compostos químicos presentes nas ervas as transformam em ferramentas importantes na procura de agentes ativos com fenótipos sensíveis e resistentes (NEWMAN; CRAGG, 2007).

As plantas são compostas por um elevado número de diferentes compostos elementares do solo em resposta a gradientes de concentração. Estudos indicam que, devido à natureza não-biodegradáveis de alguns elementos, estes se acumulam no compartimento biológico e são transferidos através da cadeia alimentar, agindo nas funções normais do corpo (HUANG et al., 1996; ZIVKOVIC et al., 2012).

As plantas sintetizam compostos químicos como metabólitos primários e secundários que tem aplicações significativas na terapia moderna, além de possuir uma ação benéfica para a saúde a longo prazo, tratando doenças. São os metabólitos secundários, especialmente, que atuam terapeuticamente no organismo humano. Mais de 30% de uma espécie de uma planta inteira são utilizados para objetivos terapêuticos devido à quantidade e ao tipo de metabólito secundário que possui. Embora, atualmente, exista elevada influência e dependência da população em relação à medicina moderna e aos avanços dos agentes sintéticos, grande parte da população mundial recorre e utiliza medicamentos à base de plantas (AGBOR; NAIDOO, 2015; JOY et al., 2001).

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade de ervas do mundo, possuindo mais de 20% da quantidade total de espécies do planeta, contém uma flora com mais de 55 mil espécies descritas, o que reflete em 22% do total mundial. Essa imensa biodiversidade está associada a uma grande aceitação de uso de plantas medicinais além de vasta sabedoria popular. Cerca de 48% dos fármacos usados no tratamento de doenças advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, principalmente plantas (CARVALHO et al., 2007).

Estima-se que cerca de 60% dos fármacos anticâncer aprovados na América do Norte, entre 1983 a 1994, eram de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2007). Entretanto, a utilização de substâncias à base de ervas para o tratamento do câncer pode ser rastreada até a década de 1950, sendo os primeiros compostos anticâncer, derivados de plantas, identificados como alcaloides da vinca, vimblastina, vincristina e podofilotoxinas citotóxicas (BELAYACHI et al., 2013), englobando compostos originados de protótipos naturais como o paclitaxel, docetaxel, vindesina, irinotecan e camptotecina (MONÇÃO et al., 2015)

Os medicamentos à base de plantas possuem compostos químicos com propriedades antioxidantes que colaboram para o seu efeito anticâncer. As principais classes de compostos bioativos que possuem atividade antioxidante são as flavonas, isoflavonas, flavonóides, antocianinas, cumarinas, lignanas, catequinas, e isocatequinas (NEMA et al., 2013).

O elevado uso de medicamentos à base de ervas para terapias e prevenção anticâncer está relacionado a segurança, baixo custo e biodisponibilidade oral. Entretanto, componentes à base de ervas podem levar a efeitos colaterais, sendo que esses efeitos secundários podem ser superados por administração dose-dependente em inúmeros casos (ALONSO-CASTRO et al., 2011).

Os agentes quimioterápicos derivados de ervas contribuíram muito para o progresso da oncologia na sua prática clínica, uma vez que a necessidade da cura da doença aumentou a

busca e o rastreio por agentes bioativos naturais antineoplásicos (RAINA et al., 2014). De acordo com Belayachi e colaboradores (2013), apenas 16 fármacos anticancerígenos provenientes de plantas foram sujeitos a ensaios clínicos até o momento.

Segundo Raina et al. (2014), a descoberta de novos fármacos anticâncer à base de plantas tem sido alvo de interesse de muitos grupos de pesquisa, especialmente de metabólitos secundários, visando mais pesquisas e experimentação com esses compostos objetivando desenvolver opções terapêuticas naturais para essa patologia (RAINA et al., 2014). A *Matricaria recutita*, em especial, é citada como uma planta possuidora de diversos compostos bioativos, sendo alguns deles capazes de inibir tumores (CHEZ; JONAS, 1997).

2.6. CAMOMILA (*Matricaria recutita*) E SUAS PROPRIEDADES

A camomila é umas das plantas mais antigas e mais empregadas para objetivos terapêuticos, além de ser uma das mais bem documentadas e indicadas para vários tipos de doenças (ASTIN et al, 2000; FAJEMIROYE et al., 2016). Sua abrangência multiétnica, cosmética e de altos índices nutricionais foram fundamentadas a centenas de anos através de estudos tradicionais e científicos (SINGH et al., 2011).

As espécies *Matricaria chamomilla* L., *M. recutita* L. e *M. suaveolens* L., são descritas em vários livros e são conhecidas como a mesma espécie: *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. Na maior parte dos formulários e livros de referência, a espécie *Matricaria chamomilla* L. é citada como o nome da espécie verdadeiro. Entretanto, segundo as Regras Internacionais de Nomenclatura Botânica, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert é o nome legítimo escolhido para a espécie (FAJEMIROYE et al., 2016; VEIGA JUNIOR; MELLO, 2008; WHO, 1999;). Neste trabalho, a camomila será citada como *Matricaria recutita*, nomenclatura usada comercialmente e escolhida para o estudo.

A família *Asteraceae*, a qual pertence a camomila, é identificada como a maior família dentre as Angiospermas, incluindo cerca de 23 mil espécies, pertencentes a 1.535 gêneros (JUDD et al., 2009). Aproximadamente 40 espécies dessa família têm participação direta na nutrição humana e indireta na aquisição de produtos, a exemplo da *Matricaria recutita* L. Várias espécies têm utilidade tecnológica, ornamental, produção de metabólitos secundários para fins farmacêuticos e industriais (VITTO; PETENATTI, 2009).

O gênero *Matricaria* é constantemente utilizado como fonte de fitofármacos, além de ser muito usado como compostos de chás, tinturas e extratos. Como seu óleo essencial possui

elevado número de componentes, as flores dessa planta são muito valorizadas, embora deteriorem facilmente (DRAGLAND et al., 2003; ZAITER et al., 2007).

A espécie *Matricaria recutita* L. é uma planta herbácea, aromática, anual, apresentando-se com 10 a 30 cm de altura, caule ereto e subdividido, possuindo cones ocos e brilhantes nas flores, embalados com floretes tubulares anelados com, aproximadamente, 12 a 20 flores brancas com 1,5 cm de diâmetro. É originária da Europa, porém foi aclimatada em regiões da Ásia e países latinos. Foi inserida no Brasil pelos imigrantes europeus há mais de 100 anos. É conhecida também como camomila alemã, camomila Húngaro e camomila selvagem (GUPTA et al., 2010; HANSEN; CHRISTENSEN, 2009; MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Possui ação emenagoga e atividade antibacteriana (ASOLINI et al. 2006; LORENZI; MATOS, 2002; NOVÁKOVÁ et al. 2010; ROMERO et al., 2005). Os chás e os extratos dessa erva medicinal são preparados a partir das flores secas da *Matricaria recutita* L. (ASTIN et al, 2000), sendo muito utilizados para cura de problemas do tubo digestivo como diarreia, flatulência, espasmos, colite, gastrite e hemorróidas, além de ser empregada para problemas de ansiedade e insônia (ANDERSON; LIS-BALCHIN; KIRK-SMITH, 2000; CROTTEAU, 2006; FAJEMIROYE et al., 2016; FRAGOSO et al., 2008), além de reduzir o risco de infarto (CHEZ; JONAS, 1997).

Por esses e outros motivos essa planta é vista como antiespasmódico, ansiolítico, sedativo, anti-inflamatório e anti-séptico. É usada também para o tratamento de irritações superficiais, assaduras e catapora (GARDINER, 2007; NOVÁKOVÁ et al. 2010), anti-emético (SRIVASTAVA; SHANKARE GUPTA, 2010), antioxidante (WEISS, 1988), ferimentos, hematomas, queimaduras, úlceras, eczema, aftas, dores reumáticas, hemorróidas, mastite, banhos de assento (ROMBI, 1993) conjuntivite e inflamação nasal (MARTENS, 1995). A existência de reações alérgicas para camomila são incomuns e nenhum dos seus constituintes foi citado como potencialmente tóxico (FAJEMIROYE et al., 2016).

É também descrita na literatura como possuidora de potencial inibitório contra a proliferação de tumores (CHEZ; JONAS, 1997). Entretanto, estudos com ratos relatam efeito tóxico para níveis elevados (5 g/kg) (MOHAMMED et al., 2016).

As infusões e óleos essenciais feitos das flores desidratadas ou frescas dessa planta têm propriedades aromatizantes e coloridas, o que leva a serem escolhidas para fabricação de inúmeros produtos industrializados, a exemplo de sabões, detergentes, perfumes, loções,

ungentos, produtos de cabelos, bebidas alcoólicas e chás de ervas (GUPTA et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Os principais compostos ativos encontrados nos extratos brutos da camomila são os fenilpropanóides (ácido clorogênico, ácido cafeico), flavonas (apigenina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina, luteolina-7-O-glucósido), flavonoides (apigenina, luteolina, rutina, patuletin e quercetina), ácidos fixos fortes, bases quaternárias, quinonas, xantonas e triterpenos livres, cumarinas (herniarina e umbeliferona), terpenoides e mucilagem, enquanto os compostos majoritários encontrados nos óleos são: chamazuleno, alfa-bisabolol, oxido de bisaboleno e oxidos de α -bisabolol A e B, que são compostos medicamente importantes.

As flores possuem diversos constituintes fenólicos, em especial os flavonoides apigenina, quercetina, patuletin, luteolina e seus glicosídeos, existindo também coumarinas (BASER et al., 2006; CARNAT et al., 2004; GUPTA et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006; NOVÁKOVÁ et al. 2010; SILVA, 2010). Alguns compostos bioativos encontrados na *Matricaria recutita* estão expostos na **Tabela. 1**.

Tabela 1. Compostos bioativos encontrados na *Matricaria recutita*.

Composto	Subclasse	Preparação	Referência
Apigenina	Flavona	Chá	Atoui et al. (2005); kato et al. (2008)
Luteonina	Flavona	Chá	Atoui et al. (2005) kato et al. (2008)
Miricetina	Flavonol	Chá	Atoui et al. (2005)
Quercetina	Flavonol	Chá	Atoui et al. (2005) kato et al. (2008)
Patuletina	Flavonol	Chá	Atoui et al. (2005)
Umbeliferona	Cumarina	-	kato et al. (2008)
Herniarina	Cumarina	-	kato et al. (2008)
Escopoletina	Cumarina	-	kato et al. (2008)
Bisabolol	-	Óleo	kato et al. (2008)
Chamazuleno	-	Óleo	Mitoshi et al. (2012)
Ácido Palmítico	Fenilpropanóide	Óleo	Mitoshi et al. (2012)
Naringenina	flavanona	-	Gupta et al. (2010)
Patuletina	-	-	Gupta et al. (2010)
Apigenina-7-O-glucósido	Flavona	-	Gupta et al. (2010)
Luteolina-7-O-glucósido	Flavona	-	Gupta et al. (2010)

Os constituintes fenólicos encontrados nas ervas desempenham funções importantes como antioxidantes, anti-inflamatórios e inibidores da carcinogênese. Os antioxidantes fenólicos bioativos apresentam espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, podendo impedir danos oxidativos do DNA, proteínas e lipídios. Assim a carcinogênese pode ser inibida devido a diminuição do estresse oxidativo da célula, por ação das ervas. Apesar disso, a ação antioxidante esta relacionada também a concentração da substância e de uma fonte de radicais livres (JURANIĆ; ZIZAK, 2005).

O potencial antitumoral dos antioxidantes fenólicos está relacionado a regulação da divisão celular e do processo antiapoptótico, influência nos fatores de crescimento e transcrição, modulação de proteínas cinases e compostos de adesão celular, mediadores do processo infeccioso, influência na angiogênese, invasão celular e metástase de células malignas (MEHTA et al., 2010).

Essa erva contém de 0,24 a 1,9% de óleo volátil, cuja diversidade deste é separada através de destilação à vapor. O óleo fresco varia do azul brilhante para o verde intenso, amarelado depois do armazenado. Já foram identificados 120 metabólitos secundários nessa planta, sendo 28 terpenoides e 36 flavonoides (MCKAY; BLUMBERG, 2000). Além de vários fitoquímicos já citados, quimicamente a camomila ainda contém terpenos como terpineol, linolol, limoneno, pulegone, entre outros (ELOUADDARI et al., 2013).

Os flavonoides possuem propriedades anti-inflamatórias e antiflogísticas (CARNAT et al., 2004). A ação anti-inflamatória se dá através do bloqueio do lipopolissacarídeo (LPS), induzido por prostaglandinas E2 e pela diminuição da ciclooxigenase (COX-2) e atividade enzimática, sendo que a forma constitutiva COX-1 não é afetada (SRIVASTAVA; PANDEY; GUPTA, 2009). O α - bisabolol é o composto mais abundante do óleo dessa planta constituindo 50% deste, o que corresponde a 2% da erva toda, sendo responsável, principalmente, por seu papel ansiolítico (PIRZAD et al., 2006). É um componente volátil, sendo absorvido rapidamente por via oral (MOHAMMED et al., 2016).

Estudos com esse composto evidenciaram alta teratogenicidade, supressão da atividade da célula e aumento da quantidade de ROS em elevadas concentrações (1000mg de extrato de camomila contém 20 mg bisabolol) podendo levar a morte celular. Entretanto, é importante citar que as vias de sinalização induzidas por estímulos apoptogênicos podem acarretar a sobrevivência ou a destruição da célula alvo. A ação pro-apoptótica do α -Bisabolol sugere um efeito protetivo, apesar de poucos estudos sobre sua farmacocinética e dosagem efetiva (MOHAMMED et al., 2016; TODER et al., 2002).

Pesquisas que compreendem o estudo de atividades anticancerígenas e a camomila, são estudos também envolvendo o componente bioativo apigenina. Atividades com efeito inibitórios foram evidenciadas em pesquisas englobando o câncer de mama, de próstata, ovário e pele, onde foi detectada uma diminuição na viabilidade das células cancerosas, tendo uma ação inibitória mínima em células saudáveis, concluindo-se que a exposição à camomila favoreceu a ocorrência da apoptose em células doentes (SHUKLA et al., 2005; SRIVASTAVA; GUPTA, 2007). Outras pesquisas envolvendo a mistura da *Matricaria recutita* com outros seis extratos botânicos padronizados, chamado Suplemento Botânico Tradicional-101 (TBS-101), também revelaram alto potencial para atividade anticâncer, tanto *in vitro* como *in vivo* (EVANS et al., 2009).

No entanto, apesar das propriedades terapêuticas das plantas, em especial as da *Matricaria*, seu uso com outros fármacos pode resultar em interações que podem tanto elevar quanto diminuir a concentração plasmática destes resultando na ineficácia do tratamento ou no aumento dos efeitos adversos, além de ocorrer alterações na biodisponibilidade da droga de acordo com Oliveira e Costa (2004).

2.7. INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E ANTINEOPLÁSICOS

A tradição popular em relação o uso de ervas medicinais data de séculos e reforça a utilização indiscriminada, no que tange a automedicação, falta de orientação de um profissional qualificado e facilidade na obtenção da planta, o que propicia a procura de uma medicação com um custo mais barato pela maioria da população (NICOLETTI et al., 2007).

Muitas pessoas acreditam que drogas à base de plantas oferecem mais segurança e são eficazes em dirimir diversos efeitos colaterais relacionados aos fármacos usuais (WANG et al., 2013). Apesar disso, a eficácia da utilização de ervas medicinais associadas a diversas drogas, assim como a possibilidade da ocorrência de efeitos adversos devido a interações, deve ser investigada criteriosamente, principalmente porque uma quantidade crescente de pacientes tem procurado em produtos naturais, em especial em plantas, tratamentos complementares para tratar o câncer (CHIEN et al., 2010; CUI et al., 2004).

As plantas estão entre as formais mais usuais de Medicina Alternativa Complementar (MAC), usados por pacientes oncológicos. Apesar disso, os produtos de origem natural, não são tão inofensivos, uma vez que podem sintetizar substâncias que podem ser agudamente tóxicas. Somado a isso, as concentrações dos constituintes naturais com atividade

medicamentosa, de interesse clínico, podem oscilar bastante, dependendo de alterações no clima, estresse no ambiente ou flutuações fisiológicas causadas pelo seu desenvolvimento. Todos esses aspectos são relevantes no que diz respeito ao risco do consumo de concentrações menores ou maiores interligadas a sua ação terapêutica (SCHWARTSMANN, 2006; TEIXEIRA; FUCHS, 2006).

De acordo com Yu et al. (2015), uma vez que as janelas terapêuticas dos antineoplásicos existentes são bem curtas, interações sinérgicas (ou aditivas) podem propiciar um favorecimento dos resultados terapêuticos ou, até mesmo, reduzir a dosagens padrões dos antineoplásicos convencionais. Em interações farmacocinéticas, por exemplo, plantas associadas pode alterar a absorção, a distribuição, o processo metabólico e a excreção de fármacos habituais. Já nas interações farmacodinâmicas, as plantas associadas têm ação em alvos específicos como receptores, fatores transcripcionais ou citocinas, enzimas, entre outros. Isso pode culminar em processos sinérgicos, antagônicos ou antiterapêutico (KAMBLE et al., 2015).

Segundo Li et al (2008), alguns compostos medicinais derivados de plantas favorecem os desfechos clínicos do tratamento antineoplásico, apesar dos mecanismos ainda não serem totalmente claros. Livak e Schmittgen (2001) relataram a grande influência de componentes provenientes de ervas para sensibilizar células tumorais, alvos de fármacos antineoplásicos, e também compostos naturais que influenciam na restauração de células resistentes aos quimioterápicos.

A elevada utilização de produtos naturais, como as plantas, pelos pacientes com câncer vem do pressuposto de que a grande parte dos pacientes com a doença falece ainda que recebam o tratamento convencional. Isso reflete, para a população oncológica, que faz uso de ervas, que as terapias tradicionais não são necessariamente a melhores opções de terapia. À vista disso, é convincente testar “alternativas de tratamentos” ou usá-los em associação com as terapias convencionais, a fim de extrair todos os proveitos possíveis (CEYLAN et al., 2002).

Nesse sentido, McCune et al. (2004), em seus estudos, estipulou que, da população de pacientes em tratamento de câncer, que usam fármacos antineoplásicos e Medicamentos Complementares e Alternativos (MAC), em torno de 27% correram riscos de desencadear interações medicamentosas relevantes.

Os efeitos da Medicamentos Complementares e Alternativos ainda não estão bem esclarecidos, sabe-se que tem ação sobre enzimas metabolizadoras e transportadoras de

drogas. Estudos sugerem cuidado quanto à combinação de fármacos quimioterápicos e compostos naturais como vitamina E, quercetina, ginseng, alho, β -caroteno, entre outros, já que possuem uma certa capacidade para incitar enzimas metabolizadoras e pode favorecer a uma terapia ineficaz, além de toxicidade. Além disso, o que dificulta ainda mais o uso desses compostos naturais é a presença de vários constituintes ativos, além de composição não definida (SYNOLD; DUSSAULT; FORMAN, 2001).

Meijerman e colaboradores (2006) citam que algumas plantas associadas ao antineoplásicos irinotecano, imatinibe e docetaxel, por exemplo, podem estimular a indução de enzimas e alterar o transporte e o metabolismo das drogas, além de reduzir seus níveis plasmáticos. A planta Ananás (*Ananas comosus* [L.] Merr.) pode intensificar a ação de drogas como o 5-fluorouracil e vincristina; e o Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) e Hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), quando aplicados sobre a pele com loção contendo 5-fluoruracila, aumenta a absorção desta droga (NICOLETTI, et al., 2010). Outras pesquisas *in vitro* mostraram que a administração simultânea entre ervas e o quimioterápico 5-Flouroracila induz a uma redução da proliferação celular e aumento da apoptose de forma sinérgica (YU et al., 2015).

Em estudos envolvendo o tumor experimental Sarcoma 180, como o realizado por Amaral e colaboradores (2016), a investigação do efeito da combinação do antineoplásico 5-FU e a *Mentha x villosa*, mostrou que a associação do fármaco (10 mg / kg / dia) com o óleo essencial (50 e 100 mg / kg / dia) foi benéfico, diminuindo a leucopenia nos animais. O Sarcoma 180 (S180) é bastante usado em estudos pré-clínicos *in vivo*, motivo pelo qual foi escolhido para esse estudo.

2.8. SARCOMA 180

A palavra sarcoma esta relacionada a neoplasias malignas do tecido mesenquimal. O prefixo “sar” vem do grego e significa carnosos, uma vez que apresentam reduzido estroma de tecido conjuntivo (CONTRAN et al., 2000). O tumor S180 foi um dos primeiros tumores experimentais a ter suas células malignas transplantadas através da inoculação subcutânea em animais (ASSEF et al. 2002). Também é a linhagem de célula tumoral mais usada no que diz respeito à estudos com experimento *in vivo* (LEE et al. 2003).

Sua descoberta data de 1914 pelo então Dr. W. H. Woglom do Laboratório Crocker nos Estados Unidos. Devido a isso, outro nome dado ao tumor é tumor de Crocker. Esse tumor foi descoberto, à princípio, na região axilar do rato, sendo caracterizado como tumor

de procedência epitelial e/ou carcinoma de mama, hipótese posteriormente descartada (STEWART et al., 1959).

Após sucessivos implantes na região subcutânea, histologicamente falando, observou-se que o padrão do tumor tornou-se misto, com características epiteliais e mesenquimatosas, provenientes de tecido epitelial e tecido conjuntivo respectivamente (QI; XU, 2006). Como tais características morfológicas e comportamentais são típicas de um sarcoma, o tumor ganhou o nome de S180 em 1919, nomenclatura usual desde então (SUGIURA, 1994).

As células tumorais desse tipo de sarcoma são de grande valia para diversas pesquisas envolvendo análises químicas, físicas e biológicas, que culminam em estudos relacionados a proliferação, patogenicidade e tratamentos para o câncer (STEWART et al., 1959). Suas células são também facilmente transplantadas por meio de translocação subcutânea, intramuscular e intraperitoneal, tendo como característica importante a proliferação rápida em 90 a 100% dos animais submetidos a esse processo (ZUCKERBERG, 1973).

A vantagem de estudos com esse tipo de sarcoma é que se tem o conhecimento antecipado da quantidade de células tumorais inoculadas no início da doença, podendo-se avaliar melhor o desenvolvimento do tumor em comparação com os grupos tratados e não tratado, além estabelecer o tempo ideal de tratamento, uma vez que a doença diminui a sobrevivência do animal (STEWART et al., 1959).

As células ao serem inoculadas por via intramuscular e subcutânea originam um tumor sólido e quando inoculadas no peritônio forma um tumor ascítico (ASSEF et al. 2002). O S180 pode adentrar a musculatura esquelética, o tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos, sendo caracterizado por apresentar, no tumor, células pleomórficas (formas variadas) organizadas em ninhos ou cordões, cuja superfície da massa é circundada por estroma conjuntivo vascularizado, com necrose central recorrente. Embora seu desenvolvimento local seja agressivo, não desencadeia metástases (FACCHINI, 2011; KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da associação entre o extrato aquoso das flores da *Matricaria recutita* (EAMR) e o fármaco antineoplásico 5-fluorouracila no tratamento de camundongos transplantados com Sarcoma 180.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de compostos bioativos presentes no extrato aquoso das flores da *Matricaria recutita*
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* do EAMR em células tumorais e não tumorais;
- Avaliar o efeito do EAMR sobre o crescimento tumoral em animais transplantados com tumor Sarcoma 180;
- Avaliar o efeito da associação do EAMR com o fármaco antineoplásico 5-fluorouracila sobre o crescimento tumoral em animais transplantados com tumor Sarcoma 180;
- Avaliar o efeito do EAMR associado ao antineoplásico sobre os parâmetros toxicológicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos em animais transplantados com tumor Sarcoma 180;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. EQUIPAMENTOS

- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica de alta precisão (SHIMADZU AUW220D)
- Balança para pesar os animais
- Centrífuga
- Espectrômetro de RMN da marca MERCURY-VARIAN
- Micrótomo
- Microscópio óptico
- Câmara de Neubauer
- Estufa
- Placa quente
- Liquidificador
- Geladeira
- Liofilizador
- UFLC
- Aparelho ELISA
- Tissue Processor (LUPETEC®).
- Capela
- Monitor de atividades

4.1.2. FÁRMACOS E REAGENTES

- Azul de tripan
- Acetonitrila
- Ácido fórmico
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Sigma
- Doxorrubicina
- Dimetilsulfóxido (DMSO),

- Eosina
- Etanol
- Gentamicina
- Hematoxilina
- Isofurano
- Penicilina
- Ringer com lactato
- RPMI 1640
- Soro Fetal Bovino
- Tripsina
- 5-Fluorouracil
- Quecertina
- Rutina
- Luteonina
- Ácido caféico
- Ácido clorogênico
- DPPH
- Ácido gálico
- Extrato de camomila
- Formol a 10%
- Xilol
- Parafina

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.2.1. OBTENÇÃO DA CAMOMILA (*Matricaria Recutita*)

A amostra da camomila usada no presente estudo resultou do extrato aquoso das inflorescências (flores) dessa planta, processo resultante da fragmentação dessas partes vegetais, identificada como *Matricaria recutita*.

Os 2 quilos da amostra orgânica comercial da camomila (*Matricaria recutita*) foram obtidos na forma desidratada em outubro de 2016, com o número de Lote C01211, junto à empresa Namastê Orgânicos (razão social Daterra Agroindustria Eireli).

4.2.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Logo após a obtenção, os 2 kg da *Matricaria recutita* foram armazenados em temperatura ambiente em potes de vidro com tampa vedante, impedindo-se por completo luz e umidade conforme descrito por Jahanban-Esfahlan et al. (2015). A subtração da ação da luz, umidade, poeira e calor são fundamentais para a conservação por período variável (Costa, 2002). As partes das plantas a serem utilizadas foram posteriormente pulverizadas por 1 minuto usando um liquidificador para padronizar e homogeneizar o tamanho das partículas (KIRAITHE et al., 2015), sendo acondicionados em ambiente hermeticamente fechado até a preparação do extrato aquoso da *Matricaria recutita* (EAMR) e posterior liofilização.

4.2.3. PREPARAÇÃO EAMR

Após a trituração mecânica, os pedaços rasurados resultante das flores da *Matricaria recutita* foram submetidos à extração à quente por infusão, numa proporção de 3 g de inflorescência seca triturada para 150 mL de água destilada (total de 12 g de inflorescências para 600 mL de água) a aproximadamente 100°C, conforme o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (2011), deixando-se o becker coberto e em repouso (LORENZI; MATOS, 2002), com o objetivo de simular os chás usados como terapia pelos pacientes oncológicos.

A solução obtida foi mantida em repouso e resfriada em temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Logo depois, foi filtrada em papel filtro evitando-se resíduos de partículas e armazenada em um freezer a -20°C em tubos falcons identificados e com tampa vedante por no mínimo três dias para total congelamento e posterior utilização (**Figura 6**).

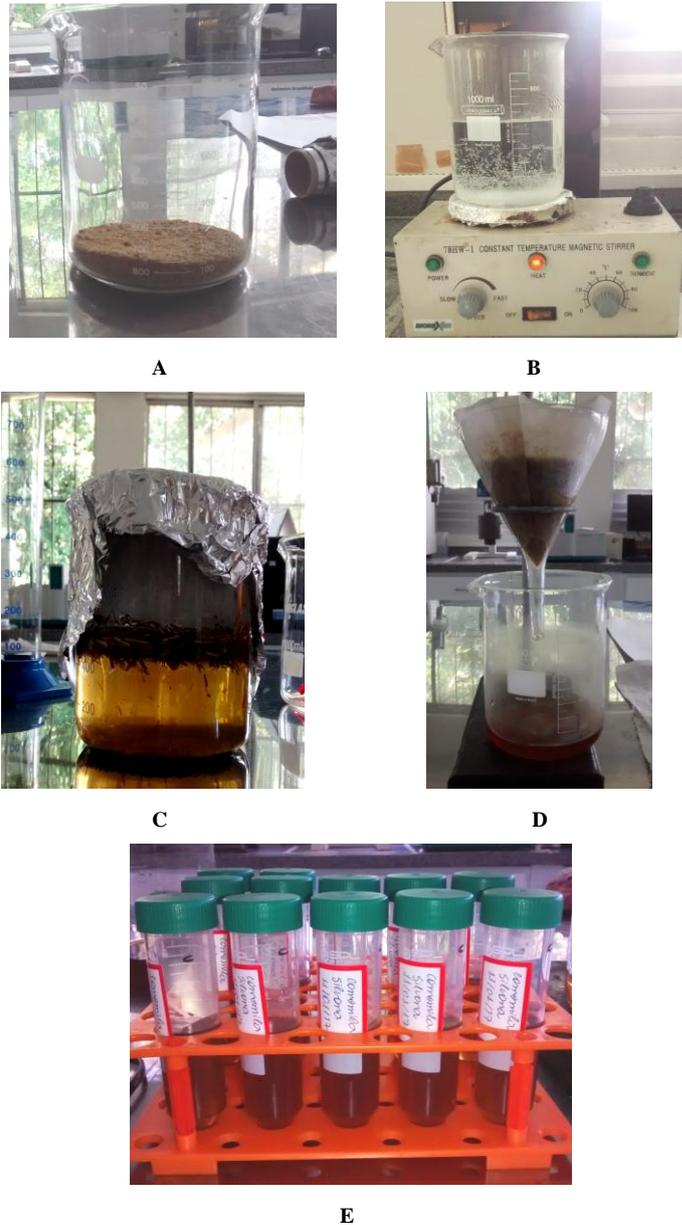


Figura 6. Planta triturada (A). Fervura da água a 100°C (B). Infusão (C). Substância filtrada em papel filtro (D). Tubos falcons com tampa vedante e identificados (E).

Fonte: Sara Albuquerque dos Santos.

4.2.4. LIOFILIZAÇÃO DO EAMR

O EAMR foi distribuído em tubos falcons, em seguida congelados por no mínimo 72 horas e colocados posteriormente no aparelho de Liofilizador Modelo L101da Liotop ® disponível no Laboratório de Nanotecnologia, no Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, Universidade Tiradentes.

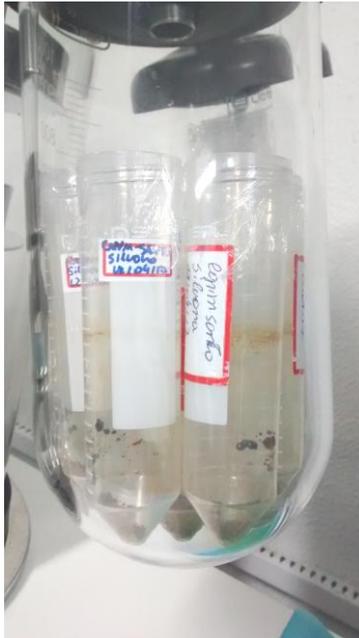
O liofilizador L101 utilizado realiza, preferencialmente, a desidratação por liofilização de amostras aquosas. É um aparelho composto por uma unidade condensadora, construída em aço inox, capacidade para até 3 L de gelo em 24 h e capacidade total de 5 L, com temperatura de até -55°C com refrigeração por compressor hermético com proteção térmica, dupla ventilação, com indicação digital de vácuo na escala de 15.000 a 1 μHg . Possui 08 adaptadores para encaixe de frascos e uma bomba de vácuo de duplo estágio com palhetas rotativas banhadas a óleo, velocidade de $10,2 \text{ m}^3/\text{h}$ (170 lpm ou 6 cfm).



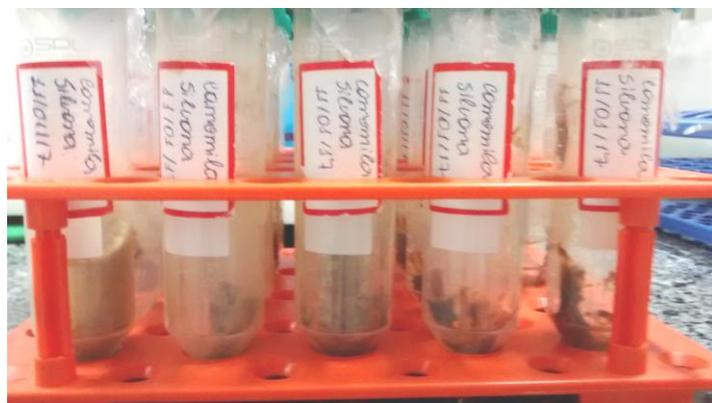
A



B



C



D

Figura 7. Liofilizador com as amostras (A). Painel do liofilizador com indicação digital (B). Extratos liofilizados (C e D).

Fonte: Sara Albuquerque dos Santos.

As amostras congeladas foram submetidas à secagem por liofilização, com temperatura do condensador de -52°C , voltagem de corrente alternada 360 Vca, a uma

pressão de vácuo de aproximadamente 115 μ Hg (**Figura 7**). A massa final do extrato liofilizado foi de 3,451 g e seu rendimento foi de 28,76%. Calculou-se o rendimento total do extrato da *Matricaria recutita* pela fórmula: $Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100$ (Re = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{folhas} = Peso das folhas frescas ou secas (g) (RODRIGUES et al., 2011).

4.2.5. ANÁLISE DOS CONSTITUENTES DO EAMR

A identificação dos compostos encontrados no EAMR foi realizada no Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas – LAF, da Universidade Federal de Sergipe. Foi utilizado um Cromatógrafo Líquido UFLC Ultra Rápido Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan), compostos por duas bombas LC-20D, desgaseificador (DGU-20 A3), auto injetor (SIL-20A HT), detector de arranjos de diodos (SPD-M20A) e controladora de dados (CBM-20A) (**Figura 8**).

Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC. A água utilizada para a fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil; Direct-Q® 3UV). Os solventes acetonitrilo e ácido fórmico utilizados eram de grau HPLC de 98% de pureza obtido da Sigma Aldrich e Fluka Analytica (St Louis, MO, EUA). Os padrões analíticos foram selecionados conforme suas descrições de ocorrência na referida planta, de acordo com a literatura (MCKAY; BLUMBERG, 2006; SCHNEIDER et al., 2015): Apigenina ($C_{15}H_{10}O_5$), ácido cafeico ($C_9H_8O_4$), ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$), luteolina ($C_{15}H_{10}O_6$), quercetina ($C_{21}H_{20}O_{12}$), ácido clorogênico ($C_{16}H_{18}O_9$) e rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Para esse teste, o extrato foi reconstituído em água com etanol (2 mg para 2ml de água com etanol a 70%), para posterior injeção no aparelho. Após isso, as amostras foram filtradas através de filtros de celulose de 0,2 μ m (Millipore, Bedford, MA, EUA) e injetados no sistema UFLC. Dez microlitros do EAMR foram injetados ao cromatográfico líquido acoplado a detector de arranjo de fotodiodos a 270 nm e coluna de fase reversa Sulpelco/Ascentis® Express F5 (15 cm x 2,1 mm), com tamanho de partícula de 2,7 μ m. A fase móvel usada foi água (Solvente A) e acetonitrila acidificado com 0,1% de ácido fórmico (Solvente B), cuja vazão constante foi de 0,1500 mL (min). O gradiente iniciou com 15% do solvente B, aumentando para 55% de B em 30 min, 75% de B em 35 min e 15% de B em 15 minutos.

Os padrões usados foram injetados no aparelho nas mesmas condições do EAMR. Ao final da corrida no UFLC, os gráficos com as curvas com os espectros de absorbância, índice (tempo) de retenção e dados Ultra Violeta visível (UV/Sis), foram comparados, usando-se os recursos do detector arranjo de fotodiodos. A coluna foi conservada a temperatura contínua de 40°C e os cromatogramas foram processados utilizando o Software Lab Solutions SHIMADZU.



Figura 8. Cromatógrafo Líquido UFLC Ultra Rápido Prominence.

Fonte: <http://www.shimadzu.com.br>

4.2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS

Para estudar a atividade antioxidante do EAMR utilizou-se o teste de atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Esse teste foi realizado em parceria, no Laboratório de Bioquímica de Produtos Naturais (LQPNB) e Laboratório de Biologia Experimental (LIBEX 3) na UFS. Esta técnica é baseada na transferência de elétrons que, por influência de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH muda de cor para o amarelo translúcido.

A molécula de DPPH é identificada como uma molécula de radical livre estável, já que apresenta deslocamento do elétron desemparelhado por toda a molécula. Em virtude dessa deslocamento, a molécula de DPPH apresenta-se com uma coloração violeta, identificada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. O teste de Atividade sequestradora do radical livre se baseia na capacidade antioxidante de dada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina (difenil-picril-hidrazina). Assim, quando uma dada substância que atua como doador de átomos de hidrogênio é inserida a uma solução de DPPH, a

hidrazina é obtida com alteração simultânea na coloração de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

A mudança na coloração soma-se a uma consequente supressão da absorção, conseguindo, a mesma, ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (NASCIMENTO, et al., 2011). O método de atividade antioxidante que foi utilizado nesse estudo baseou-se nas instruções de DUARTE-ALMEIDA et al. (2006), com algumas alterações. Uma solução metanólica de DPPH a 50 mg/ml foi preparada. Para chegar à absorbância, foram inseridos em cada poço da microplaca 250 µL da solução de DPPH, depois se inseriu 40 µL de água para o controle negativo, 40 µL de ácido gálico (controle positivo), e 40 µL de diferentes concentrações do extrato. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 minutos de reação no aparelho ELISA de microplaca com incubação a 27°C e na frequência de luz a 517 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e em seguida, os dados foram avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA), acompanhada do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), no programa *GraphPad Prism 7.0*.

A concentração eficiente, ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}) (SOUZA et al., 2007), foi determinada utilizando uma curva, obtida plotando-se no eixo da abscissa as concentrações da amostra do extrato (µg/mL) e controle positivo e no eixo da ordenada, os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min.

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) usado como o controle positivo no teste de DPPH é um flavonoide e polifenol encontrado em chás, uvas, entre outros produtos naturais. Estudos citam que este ácido possui forte atividade antioxidante, antimutagênica e antitumoral (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

4.2.7. TESTE DA CITOTOXICIDADE *in vitro*

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados em parceria com a Universidade Federal do Ceará (UFC), no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do departamento de medicina. Foi realizada a análise do potencial citotóxico do EAMR, em 5 linhagens de células tumorais humanas: PC-3 (próstata - humano), HCT-116 (côlon - humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda - humano) e SNB-19 (glioblastoma - humano); e em célula não tumoral, L929 (Fibroblasto de mama

murino), por meio do método do MTT, sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium, após 72 horas de incubação (BEZERRA et al., 2008a).

A amostra da planta foi dissolvida em dimetil-sulfóxido (DMSO) para 10 mg/mL. As linhagens células foram fornecidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 (exceto L929 que foi cultivada com DMEM), suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, conservadas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

O programa de *screening* do *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos utiliza comumente o método MTT (sob calorimetria) para analisar a atividade citotóxica, a viabilidade celular e o estado metabólico da célula, assim como também analisar a atividade redutiva mitocondrial das células (SKEHAN et al., 1990; BERRIDGE et al., 1996), sendo esse método considerado acessível, sensível e não demorado, descrito a princípio por Mosmann (1983) e modificado por Alley, entendido como um ensaio quantitativo *in vitro* para avaliar a proliferação e sobrevivência da célula.

Esse teste converte o sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium em azul de formazan púrpura (MOSMANN, 1983), a partir de enzimas mitocondriais presentes apenas nas células metabolicamente ativas e viáveis, como a succinato desidrogenase, enzima do Ciclo de Krebs. Apesar desse método ser usado para expor a citotoxicidade, não define o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

Para a análise do comportamento citotóxico, as linhagens tumorais testadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, numa concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL para as linhagens SNB-19, MCF-7, L929 e PC-3, $0,3 \times 10^6$ cél/mL para HL-60 e uma concentração de $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-116, depois foram colocadas em estufa, sob incubação por cerca de 24 horas (AMARAL et al., 2015; BEZERRA et al., 2008b) com 5% de CO₂ a 37°C. As substâncias testes antecipadamente foram dissolvidas em dimetil-sulfóxido (DMSO) para 10mg/mL. Foram recompostas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (1,56 - 50 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL / poço). Depois de um período de incubação de 72h, sob mesmas condições supracitadas conforme Dória et al. (2016), as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm / 15 minutos.

Aspirou-se o sobrenadante e foi colocado 150 µL de solução de MTT 10% em RPMI, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO₂ por 3h em mesmas condições da estufa já citada. Logo depois, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm / 10 minutos a 4°C,

tendo o sobrenadante aspirado e o precipitado ressuspensão em 150 μ L de DMSO e agitado por 10 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro da placa a um comprimento de onda de 550 nm, semelhante ao usado por Amaral et al. (2015), com o objetivo de realizar a quantificação do sal (formazan) diminuído nas células sobreviventes (MOSSMAN et al., 1983). Os resultados foram realizados em triplicata e avaliados segundo suas médias e respectivos erros-padrões. O cálculo das CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo e inibir 50% da viabilidade celular) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *Graph Prism Software* 6.01.

4.2.8. ATIVIDADE ANTITUMORAL

4.2.8.1. MANUTENÇÃO DO TUMOR SARCOMA 180

A fim de avaliar o efeito da associação existente entre o EAMR e o antineoplásico 5-FU frente ao tratamento antitumoral *in vivo*, foi utilizado o tumor experimental Sarcoma 180 (S180), obtido da Universidade Federal do Ceará, pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), cuja manutenção na forma ascítica em camundongos foi realizada a cada 10 dias no Laboratório de Neurociências – LAPENE, na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

O animal que albergava as células tumorais foi anestesiado ao inalar o isoflurano a 1,5%, e logo depois realizou-se a eutanásia deste por meio de deslocamento cervical. Em seguida, realizou-se a assepsia alcoólica do abdome e extraiu-se 0,5 mL de líquido ascítico da cavidade abdominal por meio de uma punção ascítica, a quantidade puncionada foi misturada com 5,0 mL de Ringer Lactato formando uma suspensão de células e logo depois foi realizada a contagem do número de células viáveis úteis ao experimento.

A viabilidade celular foi identificada por meio do método exclusão de azul de Tripán, o qual permite calcular distintamente as células tumorais vivas das mortas através desse composto, que é usado para a identificação de células viáveis. O azul de tripan faz com que as células mortas fiquem com a coloração azulada, já as vivas ficam brancas/translúcidas. Contam-se as células tumorais viáveis com o auxílio de uma câmara de Neubauer, através de um microscópio óptico. Nos animais saudáveis, que receberam as células tumorais, foram

inoculados 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal (BEZERRA et al., 2006; BEZERRA et al., 2008a; BEZERRA et al., 2008b; CHEN et al., 2010; ZHENG et al., 2010).

4.2.8.2. ANIMAIS

Foram usados camundongos machos Swiss, com massa corpórea de 30 ± 5 g, alojados em condições normais de temperatura e umidade, respectivamente $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $30 \pm 70\%$, em ciclos artificiais de claro-escuro de 12 h, conforme Ferreira *et al.* (2016). Os animais foram alimentados livremente com ração e água (GUIMARÃES et al., 2015).

Os camundongos utilizados foram adultos jovens e saudáveis, não usados em outros experimentos, obtidos do biotério setorial da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e mantidos no Laboratório de Neurociências (LAPENE). Os locais mantidos durante os experimentos foram caixas de polipropileno com forro de maravalha, cobertas de grades metálicas adequadas para acomodar um conjunto de, no máximo, 10 camundongos do mesmo sexo, respeitando-se o número mínimo de animais necessário para alcançar os objetivos científicos. Os camundongos foram diferenciados por grupos, identificados no exterior das caixas e mantidos em condições adequadas por nove dias de experimento.

Os experimentos foram executados conforme orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Resolução Normativa N^o - 12, 20/09/2013) e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa com Animais - CEPA com número 60/2016 (Anexo A). Os animais foram tratados conforme os princípios éticos do CEPA, Brasil. Foi reduzida a quantidade de animais para o experimento ao mínimo cientificamente sugerido.

Os animais foram separados em 06 grupos ($n = 7$ animais por grupo) somando-se 42 animais. A divisão de grupos foi: Grupo Controle Negativo (CTRL-) com tumor, tratados com veículo água destilada; Grupo Controle Positivo (CTRL+), tratados com fármaco padrão 5-fluorouracila e, quatro Grupos de Extratos Testes, sendo dois grupos com extrato em diferentes dosagens e dois grupos com o extrato associado ao antineoplásico (**Tabela 2**).

Foi realizado o cálculo apropriado para a quantidade do EAMR que foi administrado em cada animal, levando em consideração a dose por quilograma relacionada à média de massa corpórea do animal e as quantidades de aplicações realizadas. Para o antineoplásico 5-Fluorouracil foi utilizado o valor de 25 mg/kg/dia, intraperitoneal, segundo o protocolo prático do tumor S180 (AMARAL et al., 2016; FERREIRA et al., 2016). Os extratos aquosos

das flores da planta foram usados nas concentrações preestabelecidas de acordo com a literatura variando entre 100 e 200 mg/kg/ dia (CHANDRASHEKHAR et al., 2011; UCHIDA, et al., 2017).

Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais para os diferentes tratamentos.

Grupos	Inoculação das células tumorais	Administração Terapêutica
Controle negativo com tumor	Tumor S180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	Veículo água destilada
Controle positivo	Tumor S180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	5FU 25 mg/kg/dia
Planta Medicinal teste Extrato Teste - 100	Tumor S180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	EAMR (100 mg/kg/dia)
Associação - 100	Tumor S180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	EAMR (100 mg/kg/dia) e 5FU (25 mg/kg/dia)
Planta Medicinal teste Extrato Teste - 200	Tumor S180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	EAMR (200 mg/kg/dia)
Associação - 200	Tumor S180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	EAMR (200 mg/kg/dia) e 5FU (25 mg/kg/dia)

4.2.8.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A *Matricaria recutita* E O ANTINEOPLÁSICO 5-FU EM CAMUNDONGOS TRANSPLANTADOS COM S180

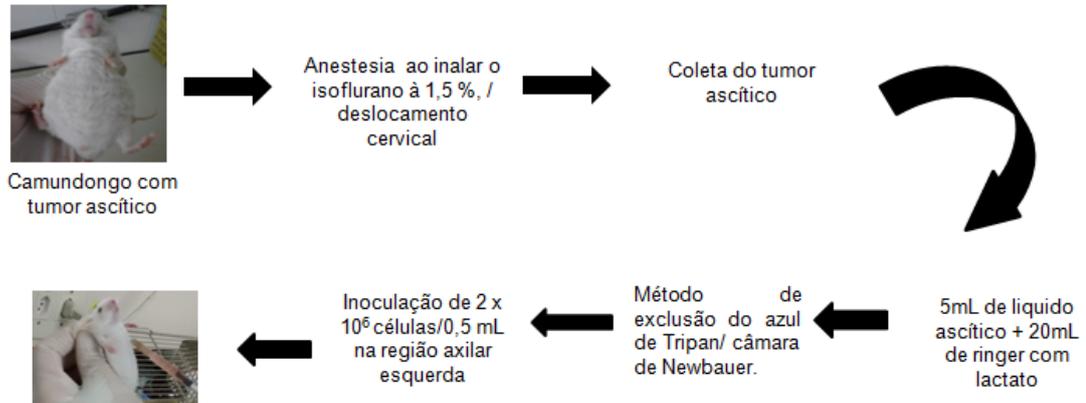
Com a intenção de avaliar os efeitos da associação entre o EAMR e o antineoplásico 5-FU, inoculou-se as células tumorais do S180 nos animais em experimento, os quais foram posteriormente analisados e comparados por grupo, quanto à redução do crescimento do tumor e quanto aos aspectos toxicológicos, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos e locomotores.

- Execução do procedimento experimental

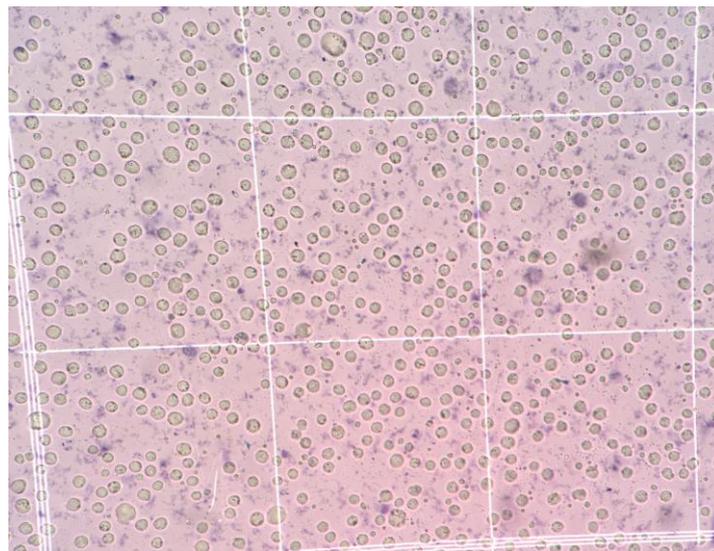
O animal que albergava as células tumorais com dez dias de vida foi primeiramente anestesiado e eutanasiado por deslocamento cervical. Foi feita a assepsia do abdome e retirado o líquido ascítico com uma seringa de 5 mL. Foi realizada uma suspensão de células

com 20 mL de Ringer lactato e 5 mL de células. Dessa mistura retirou-se uma alíquota de 50 μ L e foram colocados em 50 μ L de Azul de tripan, para posterior contagem de células viáveis (incolores) em câmara de Neubauer. As células não viáveis ficam azuis, pois não conseguem retirar o azul de tripan para o meio externo (**Figura 9.A. e 9.B.**).

A.



B.



C.

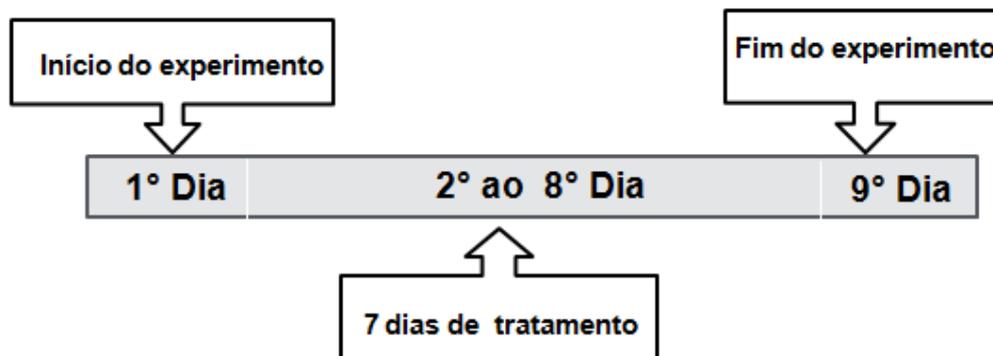


Figura 9.A. Fluxograma do Protocolo Experimental da manutenção do tumor S180. **B.** Células viáveis do S180 (incolores) na câmara de Neubauer. **C.** Fluxograma dos dias de tratamento.

Fonte: Sara Albuquerque dos Santos.

Após esse procedimento, foram transplantadas 2×10^6 células/0,5 mL na região subcutânea axilar esquerda dos camundongos saudáveis, retiradas da cavidade intraperitoneal dos camundongos com o tumor ascítico após dez dias de vida, de acordo com os experimentos de Bezerra et al., (2006), Bezerra et al., (2008a), Amaral et al., (2015) e Amaral et al., (2016).

As extratos aquosos testados foram administrados nos animais via gavagem após 24 horas da inoculação do tumor (FERREIRA et al., 2016), com o auxílio de uma cânula de gavagem para camundongos, uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos (AMARAL et al., 2016) (**Figura 9. C.**).

Durante todo o experimento foi utilizado um protocolo de acompanhamento de sinais e sintomas para animais em experimento, observando-se alterações comportamentais indicativas de sofrimento (movimentação, agitação, vocalização, agressividade, feridas/ulcerações, sinais evidentes de toxicidade, alimentação, ingestão hídrica e escores de dor), utilizado como preditor do bem estar. O quadro de acompanhamento individual de sinais e sintomas durante o período de execução do experimento encontra-se em Anexo B.

Logo depois de transcorrido um dia (24 horas) da última administração de drogas, foi realizada a anestesia inalatória dos camundongos com isoflurano (1,5%), com vaporizador associado a cilindro de oxigênio em ambiente com exaustão (capela) (AMARAL et al., 2016) e foi feita a coleta de sangue pelo plexo retroorbital (WAYNFORTH, 1980) através de tubos/filamentos estéreis e heparinizados, a fim de posteriormente avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Como a dor é um fator estressor, pode levar a um estresse e angústia significativa no animal, devendo esta ser aliviada por dessensibilização, sendo aconselhado o uso de anestésicos e analgésicos em animais em experimentos (JOSHI; OGUNNAIKE, 2005). Nesse contexto, antes de qualquer procedimento invasivo que causasse dor, ou antes, do deslocamento cervical, os animais foram submetidos a um anestésico inalatório como o halotano ou isoflurano.

Posteriormente, foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, sendo os tumores e os órgãos retirados e pesados. Segundo a “*Guide for the care and use of laboratory animals*” 2011, a escolha dos métodos e agentes peculiares para o procedimento de eutanásia, está sujeita à espécie de animal usada, bem como a idade e desfecho do protocolo, sendo que os barbitúricos e anestésicos inalantes são aconselhados para métodos físicos como decapitação e deslocamento cervical. É importante também que a morte do animal seja confirmada após a observação da cessação dos sinais vitais dos camundongos que estão sendo sacrificados.

Órgãos como o fígado, rim, estômago, baço, cérebro, intestino, pulmão e coração foram também analisados quanto ao tamanho, cores e ocorrência de hemorragias. Tumores e órgãos foram fixados em formol a 10% (FERREIRA et al., 2016). Com base na mensuração das massas dos tumores, avaliou-se o percentual de Inibição do crescimento Tumoral (IT) que foi calculado através da fórmula: $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$ (AMARAL et al., 2016; FERREIRA et al., 2016). A variável A é a média dos pesos do tumor no grupo controle e B é o peso do tumor nos animais que passarão pela terapia medicamentosa com os extratos aquosos. Após a eutanásia, os animais foram armazenados em freezer no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS, e depois foi coletado pelo serviço de lixo seletivo da mesma universidade.

4.2.9. PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

Foram avaliados os parâmetros toxicológicos de todos os grupos do experimento.

4.2.9.1 MASSA CORPÓREA, CONSUMO DE RAÇÃO E INGESTÃO HÍDRICA

Os camundongos, durante todo o experimento, foram pesados diariamente, assim como também foi mensurada a quantidade de ração e a água consumida. Os resultados foram avaliados a partir da média e do erro padrão da média (E.P.M.) nos diferentes grupos. Para a análise de diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) acompanhada do pós-teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$), no programa *GraphPad Prisma versão 7.0*.

4.2.9.2. ANÁLISE DAS MASSAS DOS ÓRGÃOS

Ao fim do tratamento com o extrato e a droga, 24 horas após, os órgãos e tumores foram aferidos em balança analítica, anotados e colocados em frascos com formol a 10% para conservação, para posterior avaliação histológica. As respectivas massas anotadas foram convertidas para 100 g de peso de cada animal, como uma forma de padronização. No preparo das seções histológicas, os órgãos foram cortados em fatias de 5 mm, corados com hematoxilina e eosina para posterior análise em microscopia de luz conforme Ferreira et al. (2016).

Os resultados foram avaliados a partir da média e do erro padrão da média (E.P.M.) nos diferentes grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) acompanhada do pós-teste de *Student Newman-Keuls* ($p < 0,05$), no programa *GraphPad Prisma versão 7.0*.

4.2.9.3. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para a análise hepática foram utilizados testes para avaliar as atividades das enzimas Alanina-aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST), além de bilirrubinas e fosfatase alcalina. A ALT é uma enzima de alta atividade no fígado, e na lesão desse órgão, sua atividade sérica está elevada (MINCIS, 2008; TENNANT, 1997).

Para a análise dos rins, foram feitas avaliações da ureia e creatinina. A ureia é um produto resultante da metabolização dos aminoácidos, sintetizada a partir da amônia no ciclo da ureia do fígado (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). Já a creatinina é um produto resultante da degradação da creatinina muscular. Ambas são filtradas através dos glomérulos, porém esta última não é reabsorvida pelos túbulos dos rins. A capacidade de filtração desse metabólito é um parâmetro singular para avaliação do desempenho do glomérulo (BRENNER; LEVINE, 2004).

O sangue coletado do plexo retrorbital com a ajuda de uma cânula heparinizada, um dia após o término da terapêutica dos animais (1 mL), foi útil para analisar os testes supracitados. O sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos com 3.500 rotação por minuto (rpm) sob 25°C objetivando separar o plasma. Para diagnósticos, foram usados kits padrões da Biotécnica IND (Varginha, MG, Brasil) conforme usado por Amaral et al. (2016), utilizando um espectrofotômetro.

Para análise dos dados foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) acompanhada do pós-teste de *Student Newman-Keuls* ($p < 0,05$), no programa *GraphPad Prisma* versão 7.0.

4.2.9.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para análise dos parâmetros hematológicos foram extraídas amostras sanguíneas através do plexo retrorbital do camundongo sob efeito anestésico inalatório, por capilares revestidos internamente com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), que impede a coagulação do sangue. Foi utilizada uma fração da alíquota do sangue e colocado em microtúbos com EDTA e outra fração colocada em microtúbulo sem EDTA (com gel separador). O primeiro foi usado para as análises hematológicas, hemoglobina (HB), hemácias (HEM), hematócritos (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT) e contagem total de leucócitos, e o segundo para a análise dos parâmetros bioquímicos como dosagens da Alanina-aminotransferase (ALT/TGP), Aspartato Aminotransferase (AST/TGO), Ureia, Creatinina, Bilirrubina direta (BD), Bilirrubina total (BT) e Fosfatase Alcalina (FA). Foi também realizada esfregaço em lâmina para contagem relativa e absoluta de leucócitos, para a análise de valores de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos.

Para análise dos dados foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) acompanhada do pós-teste de *Student Newman-Keuls* ($p < 0,05$), no programa *GraphPad Prisma* versão 7.0.

4.2.10. ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA E HISTOMORFOLÓGICA

Foram retirados todos os órgãos e tumores e foram analisadas suas formas e possíveis alterações incomuns. Foram feitos cortes histológicos para análise microscópica

dessas estruturas, especificamente do fígado, rim e baço, que são órgãos importantes para metabolismo e excreção das drogas (BRENNER; LEVINE, 2004, MINCIS, 2008) e tumor, alvo do tratamento antineoplásico. Foi utilizado o método de coloração por hematoxilina e eosina (H/E) para as análises histopatológicas, técnica esta que permite avaliar e distinguir algumas estruturas celulares. Por meio desta análise é possível estudar prováveis alterações surgidas devido a efeitos associativos ou tóxicos causados pelos compostos utilizados.

As vísceras que, após a eutanásia dos animais, foram armazenadas em formol a 10%, foram avaliadas através da análise macroscópica, em especial o fígado, baço, rim e tumor. Os órgãos e tumores foram fatiados e depois foram colocados novamente no formol à 10% por um dia, em cassetes identificados, depois passaram pelo processamento (desidratação) durante 10 horas no aparelho PT09TS Tissue Processor (LUPETEC®) (**Figura 10**), onde foram embebidos em soluções de álcool (70%), álcool (80%), álcool (90%), álcool (95%), álcool (100%), xilol 1, xilol 2, xilol 3, parafina 1 e parafina 2, para desidratação (**Figura 10**).



Figura 10. Processamento dos cortes dos órgãos e dos tumores no aparelho PT09TS Tissue Processor (LUPETEC®).

Fonte: Sara Albuquerque dos Santos.

Após isso, os cortes passaram pelo processo de inclusão, processo de parafinização. Com os blocos de parafinas já formados, foram fatiados em um micrótomo, suas fatias foram colocadas em lâminas, posteriormente aquecidas em uma estufa, e depois passaram pelo processo de coloração H/E. Para o processo de coloração, as lâminas foram embebidas em várias soluções como xilol 1, xilol 2, xilol 3, álcool absoluto 1 e 2, álcool (95%), álcool (80%), álcool (70%), água 1 e 2, hematoxilina, água 1 e 2, eosina, álcool (80%), álcool (90%), álcool absoluto 1 e 2, xilol 1, 2 e 3, cujos cortes sofreram processo de desparafinização.

Após a coloração, as lâminas foram montadas e fixadas, para posterior análise em microscopia óptica. As áreas histológicas específicas dos tecidos em estudo foram registradas através de fotografias e armazenadas para a análise histopatológica subsequente. Foi realizada

também a contagem do número médio de mitoses/campo histológico (x400) nos diferentes grupos experimentais. Para isso, o método utilizado foi a seleção de 5 secções histológicas/tumor; seleção de 5 campos histológicos (400x)/secção; desprezadas áreas de necrose; selecionados campos por casualização sistemática, onde para cada campo selecionado seguiam-se dois desprezados (esquerda para direita e de cima para baixo). Eram consideradas na contagem figuras mitóticas típicas e atípicas em qualquer fase do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DO EAMR

A massa final do extrato liofilizado foi de 3,451 g e seu rendimento foi de 28,76%. A **Figura 12** apresenta o perfil cromatográfico do EAMR em 270 nm. Quatro compostos químicos foram identificados com base na comparação do tempo de retenção dos picos do extrato com os padrões selecionados (**Tabela 3**), por meio do Software Shimadzu LC Solution.

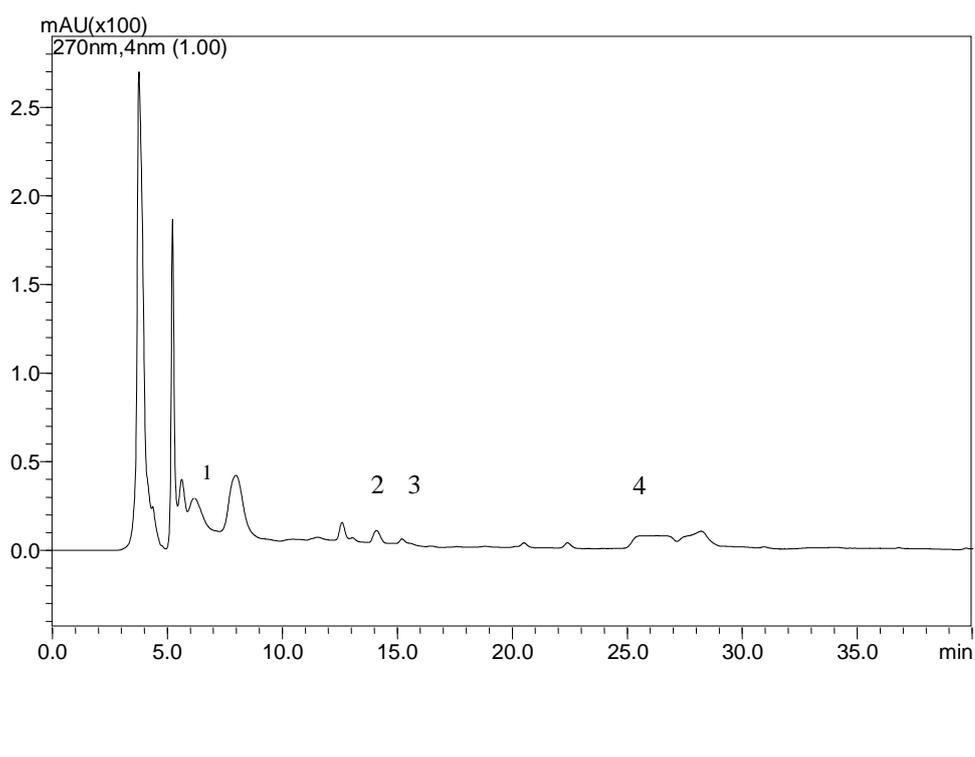


Figura 12. Perfil cromatográfico do extrato das flores da *Matricaria Recutita* (Absorbância x Tempo de retenção).

Tabela 3. Compostos químicos identificados no extrato das flores da *Matricaria recutita* analisados por UFLC - DAD.

Pico	Constituintes	Tempo de retenção do EAMR	Tempo de retenção dos Padrões
1	Rutina	6,18	6,68
2	Quercetina	14,08	14,78
3	Luteonina	15,20	15,42
4	Ácido Caféico	25,40	25,60

Os resultados foram expressos por meio do Cromatógrafo Líquido UFLC Ultra Rápido Prominence.

5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EAMR

O teste DPPH permitiu a identificação da capacidade antioxidante do EAMR (**Figura 13**). A mudança de cor de púrpura para amarelo translúcido indicou atividade antioxidante do EAMR para as diferentes concentrações, quanto maior a mudança da cor púrpura para o amarelado translúcido, mais antioxidante (**Figura 14**). O cálculo da CE_{50} (concentração efetiva de antioxidante requerida para sequestrar/gerar mudança de cor de 50% do radical livre DPPH) foi expresso em $\mu\text{g/mL}$. A curva foi feita a partir de diferentes concentrações do extrato cujo cálculo obtido foi $[y=(-0,52885 + 1,0591)/0,0008]$, cujo CE_{50} foi de 662,81 $\mu\text{g/mL}$.

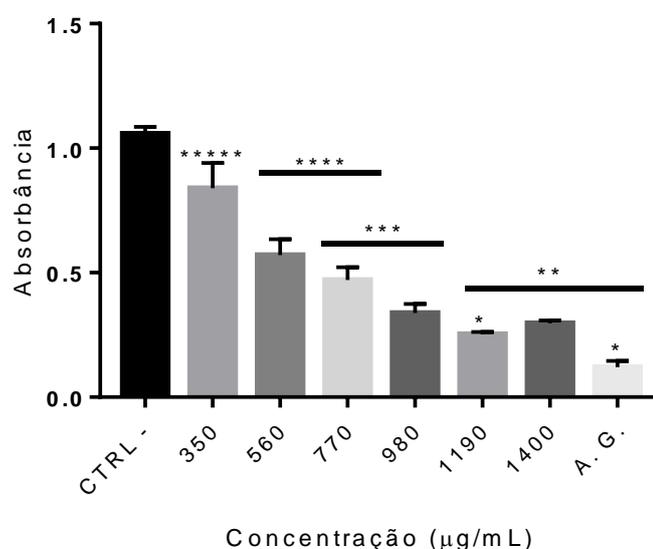


Figura 13. Teste de DPPH do EAMR. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 minutos de reação no aparelho ELISA de microplaca com incubação a 27°C e na frequência de luz a 517 nm. As análises foram realizadas em triplicatas e repetidas três vezes pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey's*. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo (água destilada).



Figura 14. A mudança de cor de púrpura para amarelo translúcido indicou atividade antioxidante do EAMR para as diferentes concentrações.

Fonte: Sara Albuquerque dos Santos.

5.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro*

Tabela 4. Atividade citotóxica *in vitro* do EAMR.

Células	Histotipo	Doxorrubicina (Literatura) CI ₅₀ (µg/mL)	EAMR (µg/mL)
PC-3	Carcinoma de próstata - humano	5	>50
HCT-116	Carcinoma de cólon humano	0,01 0,01 – 0,02	>50
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	0,2 0,1 – 0,5	>50
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humano	0,02 0,01 – 0,03	>50
SNB-19	Glioblastoma humano	0,24 0,17 – 0,36	>50
L929	Fibroblasto de mama murino (não tumoral)	-	>50

Os resultados foram obtidos através de experimento realizado em triplicata em 5 linhagens de células cancerígenas humanas e uma linhagem de célula não tumoral no programa *GraphPad Prisma 6.01*.

A atividade citotóxica do EAMR foi analisada em 5 linhagens de células tumorais humanas: PC-3 (próstata - humano), HCT-116 (cólon - humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama – humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda – humano) e SNB-19 (glioblastoma – humano); e uma linhagem de célula tumoral não maligna L929 (Fibroblastos de mama murino), por meio do método de MTT, cujo tempo de exposição foi de 72 e cujos resultados estão expressos na **Tabela 4**.

O EAMR não apresentou atividade citotóxica em nenhuma das 5 linhagens de células tumorais humanas avaliadas. A contrário da doxorrubicina que apresenta, de acordo com a literatura, atividade citotóxica frente a PC-3 (CI₅₀ de 5 µg/mL), HCT-116 (CI₅₀ de 0,01 – 0,02), MCF-7 (CI₅₀ de 0,1 – 0,5), HL-60 (CI₅₀ de 0,01 – 0,03) e SNB-19 (CI₅₀ de 0,17 – 0,36) (BUZADAR et al, 1981; KANTROWITZ et al., 1984; MOUSINHO, 2010; OSMAN et al., 2012; SILVA; OLORIS,2013; AMARAL et al., 2016). O EAMR não pôde ter seu valor de CI₅₀ calculado por estar acima da maior concentração testada em todas as linhagens (50 µg/mL).

5.4. ESTUDO DOS EFEITOS DAS ASSOCIAÇÕES *in vivo*

5.4.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO EAMR COM O 5-FU EM CAMUNDONGOS TRANSPLANTADOS COM S180

5.4.1.1. MASSA TUMORAL E INIBIÇÃO TUMORAL

A massa tumoral e a inibição tumoral foram utilizadas como parâmetros para avaliação do efeito da associação entre o EAMR e o 5-FU. Foi constatado que o tratamento dos grupos com O EAMR (100 e 200 mg/kg/dia) associados com o 5-FU (25 mg/kg/dia) reduziu significativamente ($p < 0,05$) o crescimento do tumor nesses grupos, quando confrontado com o grupo CTRL (-) (água destilada), com percentuais de inibição de crescimento tumoral de 66,1% e 87,7%, respectivamente. O fármaco 5-FU foi administrado como controle positivo e inibiu o crescimento do tumor significativamente em 68,4% ($p < 0,05$) na dose de 25 mg/kg/dia, quando comparado ao CTRL (-) (**Figura 15**).

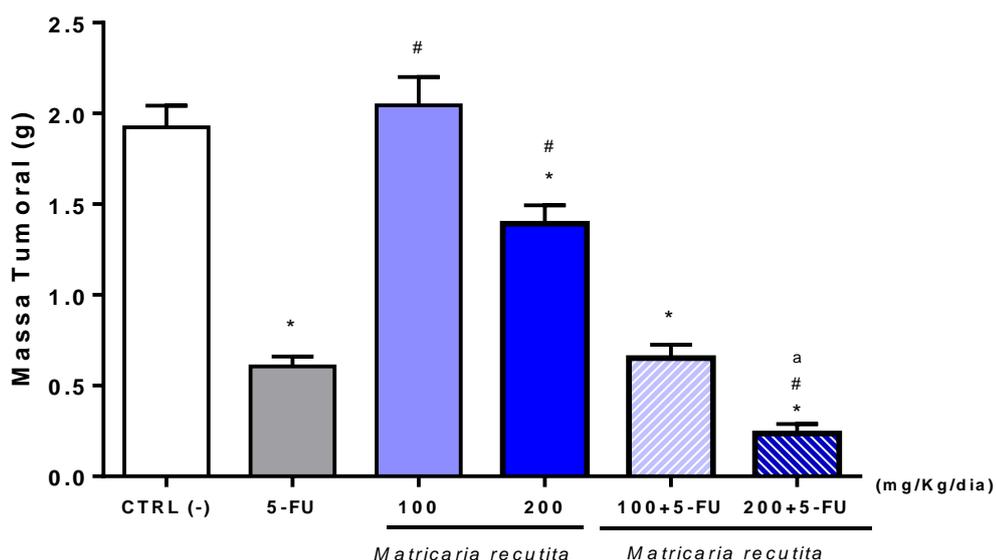


Figura 15. Efeito do EAMR (100 e 200 mg/kg/dia) associada ao 5-FU (25 mg/kg/dia), após administração por via oral e i.p. respectivamente, sobre o crescimento e inibição tumoral em animais transplantados com tumor S180. O grupo controle negativo foi tratado com o veículo (água destilada). O 5-FU (25 mg/kg/dia) foi aplicado como controle positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de 07 animais/grupo analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo 5-FU 25 mg/kg/dia. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU+ extrato 100 mg/kg/dia.

A associação do EAMR na dose de 100 mg/kg/dia com o 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia, dentre os grupos avaliados foi o que mais se aproximou da taxa de inibição tumoral do grupo controle positivo 5-FU 25 mg/kg/dia, cuja associação não demonstrou diferença estatística significativa em comparação com esse grupo. No entanto, a associação EAMR na dose de 200 mg/kg/dia com 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia apresentou mudança estatisticamente significativa quando confrontada ao controle positivo 5-FU 25 mg/kg/dia.

O grupo tratado com o EAMR na dose de 200 mg/kg/dia apresentou uma taxa de inibição tumoral estatisticamente significativa em relação ao grupo CTRL (-) (27,6%). O grupo do EAMR na dose de 100 mg/kg/dia associado ao 5-FU apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo EAMR na dose de 200 mg/kg/dia associado ao 5-FU, demonstrando que, entre as duas doses associadas, a maior dose intensificou a taxa de inibição tumoral em 21,6% de diferença.

As massas tumorais dos grupos CTRL (-), CTRL (+), EAMR (100 e 200 mg) e EAMR (100 e 200) associados ao 5-FU foram respectivamente $1,924 \pm 0,11$ g; $0,606 \pm 0,05$ g; $2,044 \pm 0,15$ g; $1,392 \pm 0,10$ g; $0,651 \pm 0,073$ g e $0,236 \pm 0,05$ g. Observou-se diminuição da massa tumoral nos três grupos com o 5-FU sozinho e associado, em relação ao CTRL (-) ($p < 0,05$), sendo que a massa tumoral do grupo EAMR 200 + 5-FU diferiu significativamente ($p < 0,05$) da massa tumoral do grupo EAMR 100 + 5-FU.

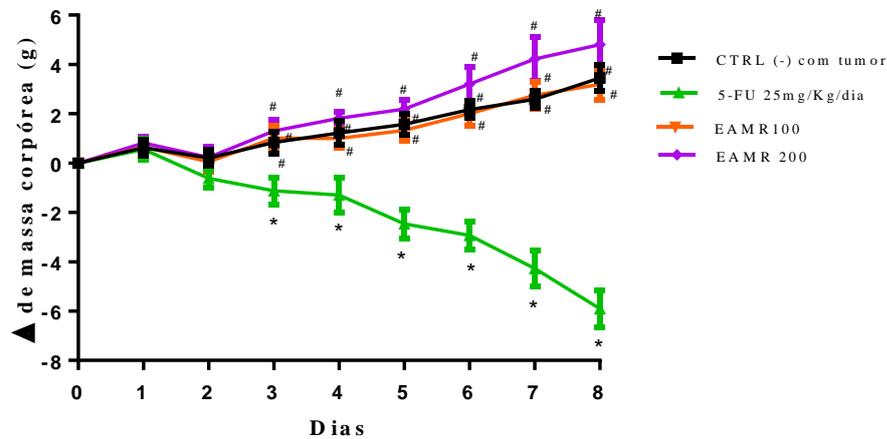
5.4.2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

5.4.2.1. MASSA CORPORAL E CONSUMO DE ALIMENTOS E ÁGUA

Na **Figura 17** estão expressas as variações de massa corpórea dos animais transplantados com tumor S180 por grupo de tratamento, analisados do início ao fim do experimento. Os resultados expressam uma variação estatisticamente não significativa ($p > 0,05$) na comparação entre o grupo CTRL (-) e os grupos tratados com o EAMR sozinhos e associados (100 e 200 mg/kg/dia respectivamente), porém apresentou-se estatisticamente significativo ($p < 0,05$) a partir do terceiro dia quando comparado o grupo CTRL (-) ($0,8 \pm 0,4$) com o grupo CTRL (+) ($-1,1 \pm 0,5$) e quando comparado o grupo CTRL (+) com os grupos tratados com os extratos nas duas doses de 100 e 200 mg ($1,0 \pm 0,5$ e $1,3 \pm 0,4$, respectivamente). No último dia a variação dos grupos tratados com os extratos de 100 e 200 mg foi de $3,1 \pm 0,6$ e $4,7 \pm 1,0$, respectivamente e do 5-FU de $-5,9 \pm 0,7$ (**Figura 16 A.**).

Os resultados apresentam uma variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a partir do terceiro dia de tratamento em relação à massa corpórea do grupo CTRL (-) ($0,8 \pm 0,4$) quando comparado aos grupos tratados com o EAMR na dose de 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia em associação com o 5-FU ($-1,2 \pm 0,3$ para ambos) e também em relação ao grupo 5-FU sozinho ($-1,1 \pm 0,5$). No último dia de tratamento observou-se grande diferença ($p < 0,05$) na variação no peso corporal dos grupos tratados com o EAMR na dose de 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia em associação com o 5-FU ($-4,1 \pm 1,0$ e $-7,0 \pm 0,5$, respectivamente) e grupo 5-FU sozinho ($-5,9 \pm 0,7$) observando-se que esses grupos perderam peso progressivamente, além da ocorrência de diarreia principalmente no grupo EAMR 200 + 5FU (Figura 16 B.).

A.



B.

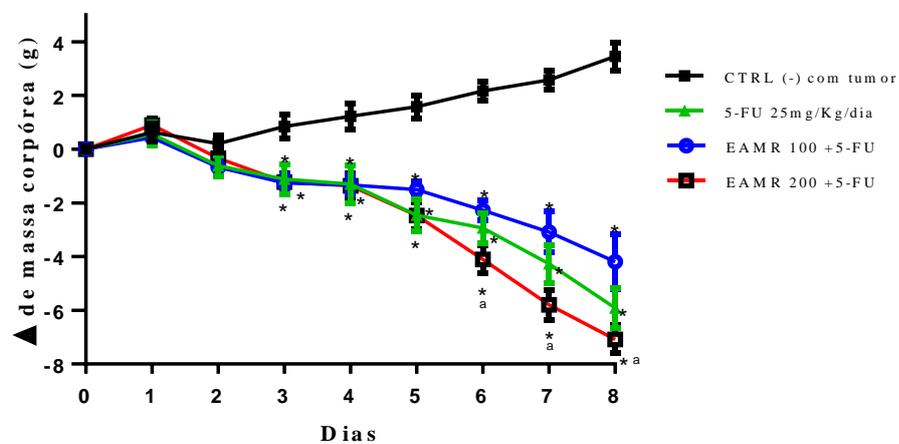


Figura 16. A. Efeito do EAMR (100 e 200 mg/kg/dia) via oral sobre a variação de massa corpórea em animais transplantados com tumor S180. B. Efeito do EAMR associado ao 5-FU (25 mg/kg/dia), via oral e via i.p., respectivamente, sobre a variação de massa corpórea em

animais transplantados com S180. O grupo veículo (-) com tumor foi tratado com água destilada. O 5-FU (25 mg/kg/dia) foi aplicado como controle positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de 07 animais/grupo analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo com tumor. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU + EAMR 100.

Entre os grupos associados EAMR 100 e EAMR 200 houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) a partir do sexto dia de tratamento ($-2,2 \pm 0,3$ e $-4,1 \pm 0,5$ respectivamente) até o oitavo ($-4,1 \pm 1,0$ e $-7,0 \pm 0,5$ respectivamente).

Na **Tabela 5** está expresso o consumo de ração e água dos animais submetidos a diferentes tratamentos, avaliados durante o período de início ao fim do experimento.

Tabela 5. Efeito do EAMR isolado e associado ao 5FU sobre a variação de consumo de ração e água em animais transplantados com S180.

	Consumo de ração	Consumo de água
CTRL (-)		
Veículo (água destilada)	6,21 \pm 1,07	5,52 \pm 0,87
5-FU	4,36 \pm 1,03	4,56 \pm 0,67
EAMR 100	6,05 \pm 1,11	5,19 \pm 0,79
EAMR 200	6,50 \pm 1,02	5,76 \pm 0,92
EAMR 100 + 5-FU	4,57 \pm 1,15	4,34 \pm 0,61
EAMR 200 + 5-FU	4,1 \pm 1,17	3,22 \pm 0,49

Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de 07 animais/grupo estudados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. Não houve alterações significativas ($p > 0,05$) no consumo de ração e água.

5.4.1.2. ANÁLISE DA MASSA DOS ÓRGÃOS

A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos no que diz respeito às massas dos órgãos (baço, fígado, rins, estômago, cérebro, intestino, pulmão e coração) por 100 g de massa corpórea, em animais que receberam diferentes tratamentos por via oral e i.p.

Os resultados demonstrados expressam que o EAMR nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia associada com 5-FU (25 mg/kg/dia) produziu alterações significativas ($p < 0,05$) na massa de alguns órgãos analisados (baço, fígado e coração), quando comparado ao grupo controle negativo com tumor e grupo controle positivo.

O tratamento dos animais com o 5-FU 25mg/kg/dia, EAMR 100 + 5-FU mg/kg/dia e EAMR 200 + 5-FU mg/kg/dia reduziu de forma significativa a massa do baço ($0,23 \pm 0,02$, $0,31 \pm 0,03$ e $0,21 \pm 0,02$ g, respectivamente) quando comparado ao grupo CTRL (-) ($0,69 \pm 0,02$ g).

Tabela 6. Efeito do EAMR associado ao 5-FU sobre a massa dos órgãos (baço, fígado, rins, estômago, cérebro, intestino, pulmão e coração) em animais transplantados com S180.

Orgãos / Droga	CTR (-) Com tumor	5-FU	EAMR 100	EAMR 200	EAMR 100 + 5-FU	EAMR 200 + 5-FU
Dose (mg/kg/dia)	-	25	100	200	25+100	25+200
Baço (g/100g massa corpórea)	0,69±0,02	0,23±0,02 [#]	0,93±0,06 ^{#a}	0,78±0,02 ^a	0,31±0,03 [#]	0,21±0,02 [#]
Fígado (g/100g massa corpórea)	4,99±0,15	3,57±0,04 [#]	6,24±0,28 ^{#a}	6,28±0,31 ^{#a}	5,00±0,16 ^a	3,40±0,24 [#]
Rins (g/100g massa corpórea)	1,27±0,03	1,14±0,01	1,61±0,14 ^{#a}	1,64±0,13 ^{#a}	1,50±0,07	1,18±0,07
Estômago (g/100g massa corpórea)	1,06±0,05	0,76±0,03	0,91±0,04	0,91±0,05	0,85±0,04	0,99±0,06
Cérebro (g/100g massa corpórea)	1,11±0,05	1,31±0,07	1,15±0,02	1,12±0,02	1,29±0,05	1,27±0,06
Intestino (g/100g massa corpórea)	10,13±0,49	11,71±0,57	10,14±0,81	11,02±0,41	10,52±0,29	9,99±0,69
Pulmão (g/100g massa corpórea)	0,60±0,03	0,60±0,04	0,82±0,10	0,65±0,05	0,64±0,01	0,59±0,01
Coração (g/100g massa corpórea)	0,45±0,00	0,40±0,01	0,41±0,02	0,42±0,02	0,50±0,01 ^a	0,51±0,02 ^{#a}

Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de 07 animais/grupo estudados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo com tumor (água destilada). ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo (5-FU 25mg/kg/dia).

A massa do fígado do grupo associado EAMR 200 + 5-FU diminuiu ($3,40 \pm 0,24$) em relação a massa do grupo CTRL (-) ($4,99 \pm 0,15$) ($p < 0,05$) e a massa dos grupos EAMR 100

e 200 aumentou ($6,24 \pm 0,28$ e $6,28 \pm 0,31$, respectivamente) ($p < 0,05$). Em relação ao coração, o tratamento associado com 100 e 200 aumentou de forma significativa a massa do coração ($0,50 \pm 0,01$ e $0,51 \pm 0,02g$, respectivamente) ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento com o grupo CTRL (-) ($0,45 \pm 0,00$) e CTRL (+) ($0,40 \pm 0,01$).

5.4.1.3. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Na **Tabela 7** estão expostos os resultados das avaliações dos parâmetros bioquímicos TGP (ALT), TGO (AST), Ureia, Creatinina, Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT) e Fosfatase Alcalina (FA) obtidos por meio do sangue coletado dos animais transplantados com S180, 24 horas posteriores ao último dia de tratamento. Os resultados expressam modificações ($p < 0,05$) no grupo EAMR 100 + 5-FU no parâmetro bioquímico ALT ($28,0 \pm 1,4$ U/L) em relação ao grupo CTRL (-) ($65,1 \pm 5,9$ U/L) e grupo controle positivo ($61,5 \pm 4,6$ U/L). O grupo controle positivo ($168,8 \pm 28,9$ U/L), EAMR 100 + 5-FU ($166,9 \pm 21,9$ U/L) e EAMR 200 + 5-FU ($155,4 \pm 17,6$ U/L) diferiram em relação ao controle negativo com tumor ($260,7 \pm 25,1$ U/L) ($p < 0,05$). A bilirrubina direta e indireta de todos os grupos não demonstrou alterações.

Tabela 7. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros bioquímicos (ALT, AST, Ureia, Creatinina, BD, BT e FA) em animais transplantados com tumor S180.

Droga	Dose (mg/kg/dia)	ALT/TGP (U/L)	AST/TGO (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	BD (mg/dL)	BT (mg/dL)	FA (U/L)
CTR (-)								
Com tumor								
Veículo (água destilada)	-	65,31±5,9	260,7±25,1	36,7±2,2	2,0±0,1	0,11±0,01	0,24±0,02	40,6±3,2
5-FU	25	61,5±4,6	168,8±28,9 [#]	35,0±4,6	2,1±0,1	0,11±0,01	0,28±0,02	30,2±1,3 [#]
EAMR 100	100	75,0±2,7	217,3±18,5	39,0±3,4	1,9±0,1	0,11±0,01	0,27±0,03	19,2±2,4 [#]
EAMR 200	200	48,5±4,6	224,4±19,4	33,4±3,2	1,9±0,07	0,12±0,01	0,31±0,07	22,6±4,3 [#]
EAMR 100 + 5-FU	100+25	28,0±1,4 ^{##a}	166,9±21,9 [#]	48,6±5,9	2,1±0,1	0,11±0,01	0,22±0,02	16,8±1,6 [#]
EAMR 200 + 5-FU	200+25	67,0±7,3	155,4±17,6 [#]	36,4±4,0	2,2±0,1	0,12±0,02	0,31±0,05	25,8±1,7 [#]
Valores de Referência*	-	17,0 – 77,0	54,0 – 298,0	42,0– 61,0	0,10– 0,90	-	-	-

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 07 animais estudados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo com tumor. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo (5-FU 25mg/kg/dia). *Valores obtidos do Banco de Dados do Biotério da Universidade Tiradentes.

Com base nos resultados expostos, notou-se que os grupos tratados em associação quando comparados com o grupo CTRL (-) apresentaram indícios de alterações (diminuição) nos níveis de AST, ALT, e FA, com exceção do grupo EAMR 200 + 5-FU que não apresentou variação significativa em relação ao ALT, porém todos os resultados estão dentro dos valores de referência. Os parâmetros bioquímicos ureia, creatinina e bilirrubinas não apresentaram modificações significativas em nenhum dos grupos em estudo.

5.4.1.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A **Tabela 8** apresenta os resultados das avaliações dos parâmetros hematológicos (HB, HEM, HT, VCM, HCM, CHCM e PLT), a partir do sangue coletado dos animais transplantados com S180, 24 horas posteriores ao último dia de tratamento.

Os grupos tratados com EAMR 100 e EAMR 100 + 5-FU mostraram modificação ($p < 0,05$) no parâmetro hematológico Hemoglobina ($8,7 \pm 0,7$ e $8,9 \pm 0,5$ g/dL respectivamente) comparado ao grupo CTRL (-) ($11,6 \pm 0,1$ g/dL) e grupo CTRL (+) ($12,3 \pm 0,3$ g/dL).

Os grupos associados EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU demonstraram alterações ($251,9 \pm 36,1$ e $266,4 \pm 30,4 \times 10^3$ dL respectivamente) ($p < 0,05$) comparados ao grupo CTRL (-) ($486,1 \pm 16,5 \times 10^3$ dL) em relação à contagem de plaquetas. Os outros parâmetros hematológicos não demonstraram alterações significativas entre os grupos.

Tabela 8. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos (HB, HEM, HT, VCM, HCM, CHCM e PLT) em animais transplantados com tumor S180.

Droga	Dose (mg/kg/dia)	HB g/dL	HEM 10^6 /UL	HT %	VCM fL	HCM pg	CHCM g/dL	PLT 10^3 dL
CTR (-) Com tumor								
Veículo destilada)	(água -	11,6±0,1	6,5±0,2	31,3±0,9	49,6±0,8	17,3±0,7	36,4±1,4	486,1±16,5
5-FU	25	12,3±0,3	6,7±0,3	32,4±1,5	48,3±0,6	16,6±0,8	38,4±2,0	221,0±23,6 [#]
EAMR 100	100	8,7±0,7 ^{#a}	6,1±0,2	32,1±1,2	50,5±1,1	18,3±1,4	36,1±1,1	571,1±21,9 ^{#a}
EAMR 200	200	12,0±0,2	5,7±0,3	29,9±1,9	49,8±0,9	19,1±1,2	37,3±1,8	446,7±30,1 ^a
EAMR 100 + 5-FU	100+25	8,9±0,5 ^{#a}	5,4±0,4	26,3±2,0	48,3±0,5	18,4±1,0	37,5±1,9	251,9±36,1 [#]
EAMR 200 + 5-FU	200+25	12,2±0,5	6,5±0,1	32,4±0,8	47,7±0,4	19,1±1,2	38,1±2,0	266,4±30,4 [#]
Valores de Referência*	-	10,2– 16,6	6,36– 9,82	39 – 49	-	-	-	-

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 07 animais estudados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo

controle negativo com tumor.^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo (5-FU 25mg/kg/dia). *Valores obtidos do Banco de Dados do Biotério da Universidade Tiradentes.

As **Tabelas 9 e 10** expõem os resultados analisados quanto aos parâmetros hematológicos: leucócitos totais, contagem diferencial relativa e absoluta de leucócitos (eosinófilo, linfócito, neutrófilo e monócito), através do sangue coletado dos animais transplantados com S180, 24 horas posteriores ao último dia de tratamento.

Os grupos tratados com o EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU apresentaram modificações significativas ($p < 0,05$) no número total de leucócitos ($0,9 \times 10^3 \pm 0,1$ e $0,7 \times 10^3 \pm 0,06$ células/ μL , respectivamente) quando comparados ao grupo CTRL (-) ($5,7 \times 10^3 \pm 0,2$ células/ μL).

Em relação à contagem diferencial relativa de leucócitos houve modificações significativas ($p < 0,05$) nos grupos tratados com EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU na porcentagem de neutrófilos ($19,6 \pm 2,5\%$ e $22,7 \pm 1,7\%$, respectivamente) e linfócitos ($77,6 \pm 3,2\%$ e $75,5 \pm 2,8\%$, respectivamente) em comparação ao grupo CTRL (-) ($36,1 \pm 3,5\%$ de neutrófilos e $56,0 \pm 3,8\%$ de linfócitos).

Em relação à contagem diferencial absoluta de leucócitos houve modificações ($p < 0,05$) nos grupos CTRL (+), EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU na porcentagem de neutrófilos ($0,082 \pm 0,0 \times 10^3 \mu\text{L}$ e $0,150 \pm 0,02 \times 10^3 \mu\text{L}$, respectivamente), Eosinófilos ($0,0 \pm 0,0 \times 10^3 \mu\text{L}$ e $0,0 \pm 0,0 \times 10^3 \mu\text{L}$, respectivamente), linfócitos ($0,488 \pm 0,08 \times 10^3 \mu\text{L}$ e $0,538 \pm 0,04 \times 10^3 \mu\text{L}$ respectivamente) e Monócitos ($0,0 \pm 0,0 \times 10^3 \mu\text{L}$ e $0,0 \pm 0,0 \times 10^3 \mu\text{L}$, respectivamente) em comparação ao grupo CTRL (-) ($2.487 \pm 158,3 \times 10^3 \mu$ de neutrófilos e $56,0 \pm 3,8\%$ de linfócitos, $113,2 \pm 23,7 \times 10^3 \mu\text{L}$ de eosinófilos, $2.790 \pm 0,2 \times 10^3 \mu\text{L}$ de linfócitos e $174,2 \pm 32,1 \times 10^3 \mu\text{L}$ de monócitos).

Esse resultado evidencia a redução na quantidade de leucócitos totais e uma modificação em relação à taxa de neutrófilos e linfócitos na contagem diferencial relativa para os dois grupos com tratamentos associados, quando comparados com o grupo controle negativo, além da modificação desses dois grupos em relação à taxa de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos na contagem diferencial absoluta, em relação ao grupo controle negativo.

Tabela 9. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos (contagem total de leucócitos e contagem diferencial relativa de leucócitos) em animais transplantados com S180.

Droga	Dose (mg/kg/dia)	Total de Leucócitos (10^3 cels/ μ L)	Contagem Diferencial Relativa de Leucócitos (%)			
			Neutrófilos Segmentados	Eosinófilos	Linfócitos	Monócitos
CTR (-) Com tumor						
Veículo (água destilada)	-	5,7 \pm 0,2	36,1 \pm 3,5	1,1 \pm 0,3	56,0 \pm 3,8	1,9 \pm 0,4
5-FU	25	0,9 \pm 0,07 [#]	24,6 \pm 2,0 [#]	0,6 \pm 0,2	81,2 \pm 2,7 [#]	1,9 \pm 0,7
EAMR 100	100	5,1 \pm 0,4 ^a	42,89 \pm 4,0 ^a	1,5 \pm 0,4	54,5 \pm 3,7	1,9 \pm 0,5
EAMR 200	200	2,8 \pm 0,3 ^{#a}	49,4 \pm 2,1 ^{#a}	0,6 \pm 0,2	50,9 \pm 2,9	1,3 \pm 0,4
EAMR 100 + 5-FU	100+25	0,9 \pm 0,1 [#]	19,6 \pm 2,5 [#]	0,5 \pm 0,3	77,6 \pm 3,2 [#]	1,9 \pm 0,9
EAMR 200 + 5-FU	200+25	0,7 \pm 0,06 [#]	22,7 \pm 1,7 [#]	0,3 \pm 0,2	75,5 \pm 2,8 [#]	2,5 \pm 0,5
Valores de	-	6 - 15	10 - 40	0 - 4	55 - 95	1 - 4
Referência*						

Os dados correspondem a média \pm E.P.M de animais estudados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo com tumor. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo (5-FU 25 mg/kg/dia). *Valores obtidos do Banco de Dados do Biotério da Universidade Tiradentes.

Tabela 10. Efeito do EAMR associado ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos (contagem absoluta de leucócitos) em animais transplantados com S180.

Droga	Dose (mg/kg/dia)	Contagem Absoluta de Leucócitos ($10^3\mu$ l)			
		Neutrófilos Segmentados	Eosinófilos	Linfócitos	Monócitos
CTR (-) Com tumor					
Veículo (água destilada)	-	2.487 \pm 158,3	113,2 \pm 23,7	2.790 \pm 0,2	174,2 \pm 32,1
5-FU	25	0,181 \pm 0,02 [#]	0,0 \pm 0,0 [#]	0,64 \pm 0,05 [#]	1,68 \pm 1,6 [#]
EAMR 100	100	2.753 \pm 101,5 ^{#a}	118,8 \pm 46,0 ^a	1.896 \pm 0,3 [#]	109,2 \pm 21,5 [#]
EAMR 200	200	1.443 \pm 121,9 ^{#a}	46,8 \pm 11,3	1.348 \pm 0,1 [#]	75,5 \pm 26,5 [#]
EAMR 100 + 5-FU	100+25	0,082 \pm 0,0 [#]	0,0 \pm 0,0 [#]	0,488 \pm 0,08 [#]	0,0 \pm 0,0 [#]
EAMR 200 + 5-FU	200+25	0,150 \pm 0,02 [#]	0,0 \pm 0,0 [#]	0,538 \pm 0,04 [#]	0,0 \pm 0,0 [#]

Os dados correspondem a média \pm E.P.M de animais estudados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo com tumor. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo (5-FU 25mg/kg/dia).

O grupo CTRL (+) 5-FU apresentou modificações significativas ($p < 0,05$) no número total de leucócitos ($0,9 \times 10^3 \pm 0,07$ células/ μ L) e na contagem diferencial relativa de leucócitos: taxa de neutrófilos ($24,6 \pm 2,0\%$) e linfócitos ($81,2 \pm 2,7\%$). Esse grupo

demonstrou intensa redução na quantidade de leucócitos totais (leucopenia grave) e modificação na taxa de neutrófilos e linfócitos, depois de confrontado com o grupo controle negativo. Além disso, o grupo controle positivo apresentou modificações significativas ($p < 0,05$) em relação à contagem absoluta para todos os quatro tipos de leucócitos, quando comparado ao grupo controle negativo. Em relação à contagem diferencial relativa, os eosinófilos e monócitos não demonstraram nenhuma mudança significativa entre os grupos em tratamento.

Os grupos EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU não apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) em nenhum dos parâmetros hematológicos quando comparados ao CTRL (+), ou seja, os grupos associados demonstraram uma diminuição no número de leucócitos totais tão severa quanto o CTRL (+).

5.4.1.5. ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA E HISTOMORFOLÓGICA

- Análise descritiva dos tumores excisionados

Macroscopicamente os tumores excisionados formavam massas sólidas irregulares e volumosas nos grupos CTRL (-), EAMR 100 e EAMR 200, mas apresentaram redução expressiva de sua massa nos grupos CTRL (+) (5-FU), EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU.

Os espécimes de S180 estavam representados por proliferação de células poliédricas, cuboides e ocasionalmente ovoides dispostas em lençóis compactos, com pouco estroma interveniente, sustentada por uma delicada rede vasculocapilar. Individualmente as células neoplásicas exibiam citoplasma eosinofílico amplo e de limites bem definidos, e núcleos volumosos, ora hipercromáticos ora exibindo cromatina finamente dispersa e um a dois nucléolos proeminentes. Algumas células gigantes tumorais de núcleos disformes bizarros e hipercromáticos podiam ser eventualmente observadas. As figuras mitóticas eram abundantes e exibiam morfologia predominantemente típica em todas as fases (prófase, metáfase, anáfase e telófase), embora figuras de mitose atípicas (e.g. fusos metafásicos tri e tetrapolares) pudessem ser eventualmente observadas, assim como alguns corpos apoptóticos **Figura 17**).

De permeio ao componente parenquimatoso tumoral era possível evidenciar extensas áreas de necrose coagulativa (necrose tipo comedo) estruturadas sob a forma de trabiques (por vezes conferindo ao componente proliferativo um arranjo pseudolobular) ou formando blocos irregulares no interior dos lençóis tumorais. As margens tumorais se mostraram irregulares e

mal definidas em alguns casos, conferindo aspecto mais infiltrativo ao tumor, porém bastante regulares e bem definidas em outros, emprestando uma aparência de crescimento tumoral por expansão. De forma geral, o estroma era bastante escasso e composto por tecido conjuntivo fibroso delicado. Discreto infiltrado inflamatório peri e intratumoral, rico em linfócitos, também foi observado. Êmbolos tumorais eram achados raros (**Figura 18**).

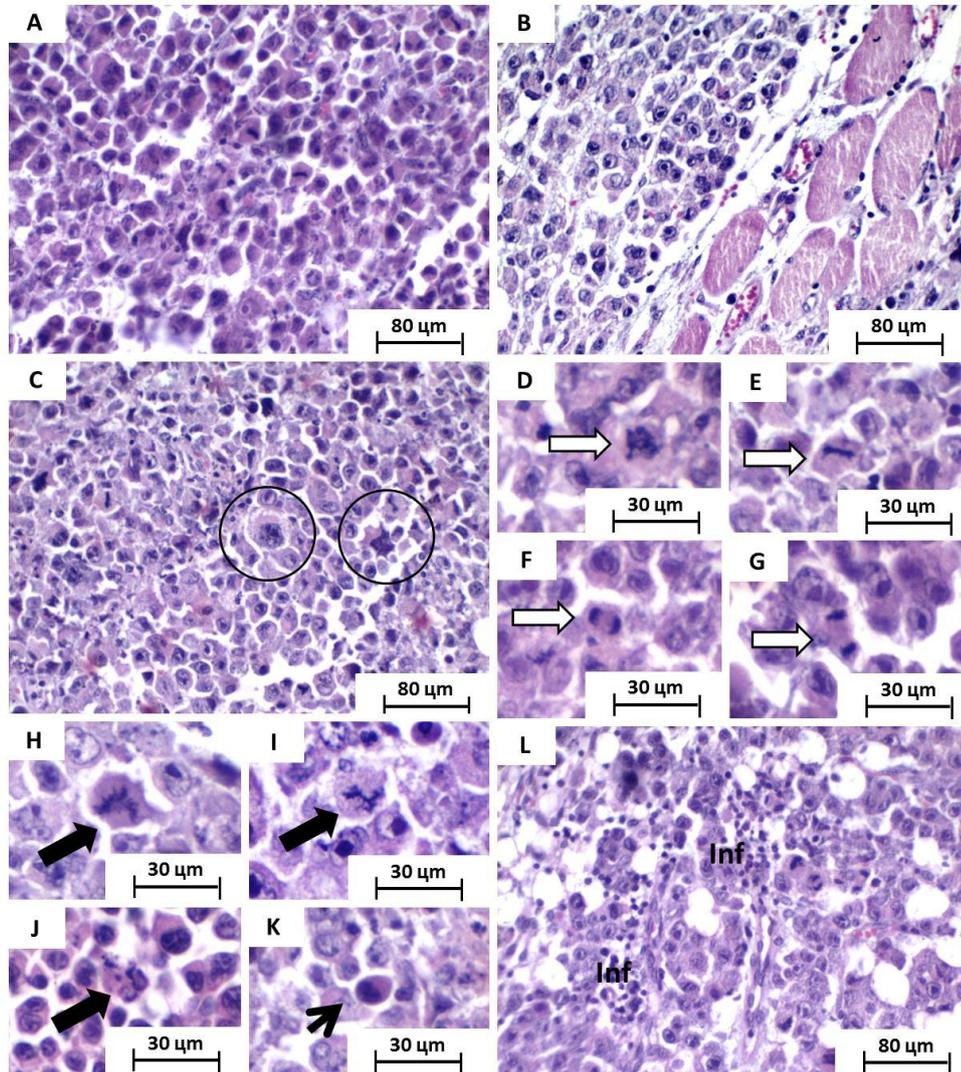


Figura 17. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores. (A) Células tumorais ora exibindo citoplasma amplo e eosinofílico e núcleos hiper cromáticos pleomórficos e (B) ora apresentando aspecto mais isomórfico, com núcleos claros e nucléolos proeminentes. (C) Células gigantes tumorais, com núcleos bizarros (círculos). Figuras mitóticas típicas (setas brancas) nas fases de (D) prófase, (E) metáfase, (F) anáfase e (G) telófase, bem como figuras atípicas (setas escuras) (H) como fusos tripolares e (I) tetrapolares, e (J) prófases atípicas eram comuns, (K) assim como corpos apoptóticos (seta delgada). (L) infiltrado inflamatório linfocítico (Inf) podia ser notado entre as células tumorais. (x400, x800).

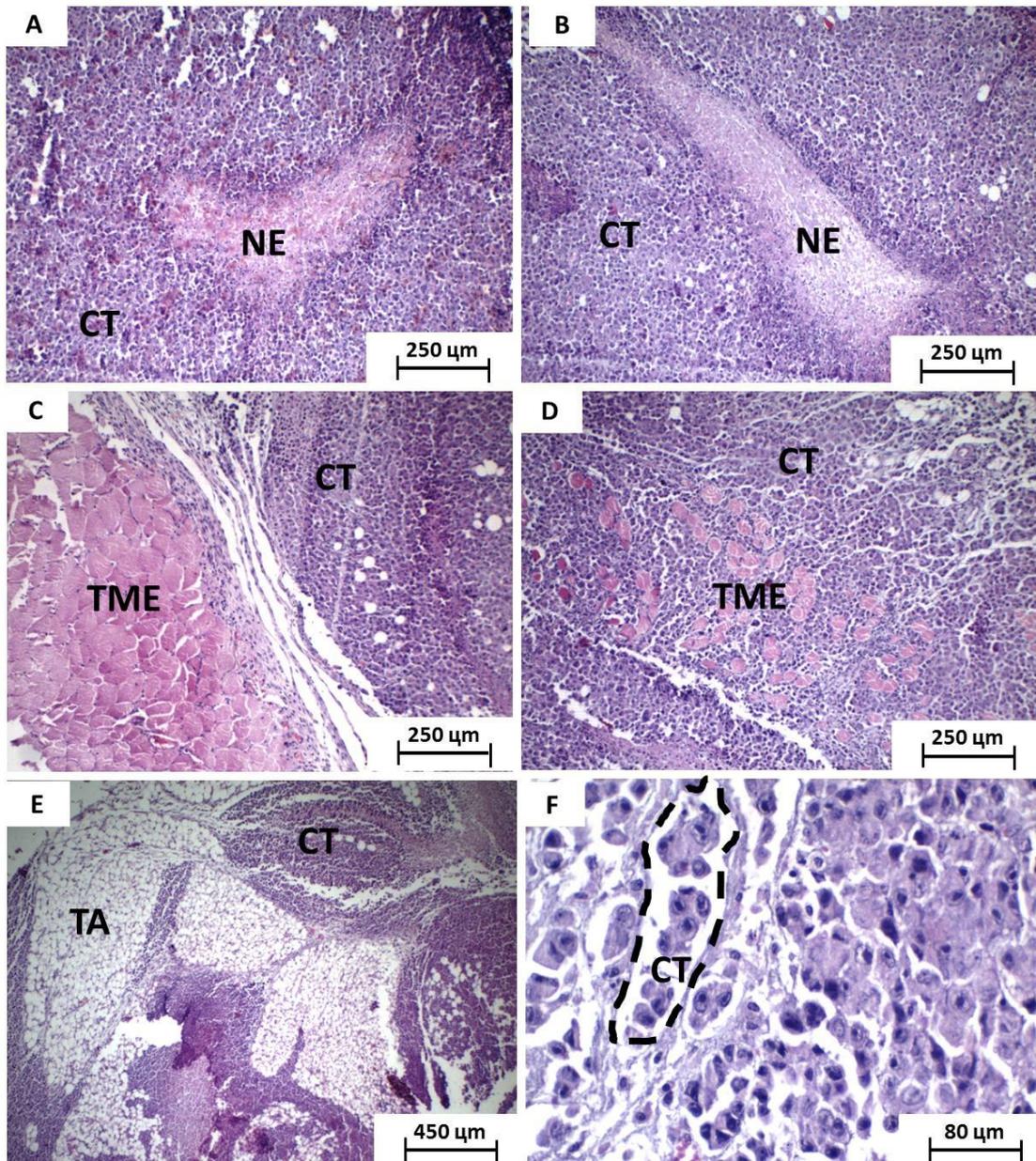


Figura 18. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores. (A e B) Presença de extensas áreas de necrose coagulativa tipo comedo em meio às células tumorais viáveis. (C) Células tumorais ora comprimindo o tecido muscular estriado esquelético periférico e (D) ora invadindo e dissociando este tecido, (E) Células tumorais permeando e desorganizando o tecido adiposo subcutâneo (x100). (F) Presença de êmbolos de células tumorais no interior de vasos sanguíneos (linha tracejada) (x400). Legenda: CT – células tumorais viáveis; NE – necrose coagulativa; TME – tecido muscular estriado esquelético; TA – tecido adiposo subcutâneo.

Ao serem analisados separadamente, foi possível observar algumas diferenças entre os grupos. O grupo tratado com solução salina exibiu atipia citológica intensa, maciça invasão, dissociação e destruição de feixes de fibras musculares estriadas esqueléticas e formação de extensas áreas de necrose formando blocos sólidos intraparenquimatosos. Os tumores

mostravam margens infiltrativas irregulares, permeando e invadindo o tecido subcutâneo fibroso e adiposo circunjacente (**Figura 19A e B**). O grupo tratado com 5-FU apresentou margens tumorais mais regulares, com menos infiltração periférica, e as áreas de necrose coagulativa eram delgadas e formavam trabiques intraparenquimatosos que conferiam ao tumor um aspecto pseudolobular (**Figura 19 C e D**).

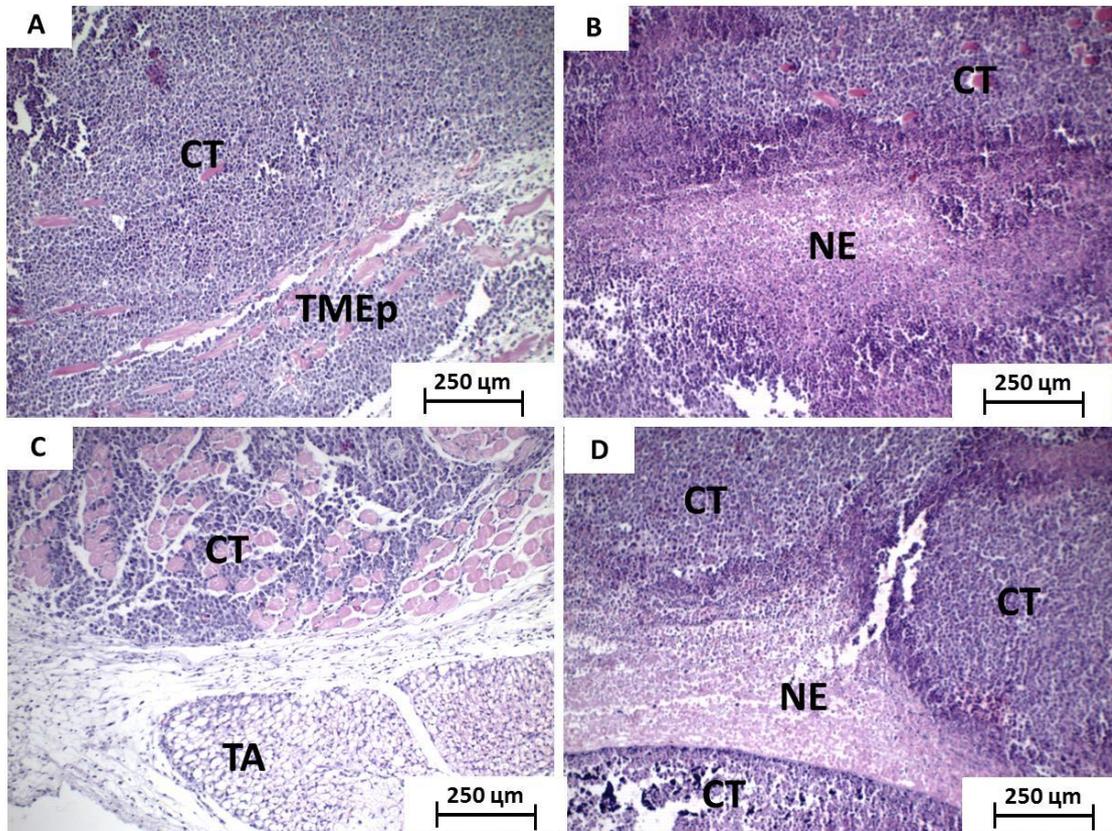


Figura 19. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores. (A) Grupo Salina exibindo tumor com margens infiltrativas e irregulares, invadindo e dissociando o tecido muscular periférico e (B) formando blocos sólidos intraparenquimatosos de necrose coagulativa. (C) Grupo 5-FU apresentando margens tumorais regulares, com padrão de crescimento mais expansivo e (D) faixas delgadas de necrose coagulativa formando um padrão trabecular. Legenda: CT – células tumorais viáveis; NE – necrose coagulativa; TME – tecido muscular estriado esquelético; TA – tecido adiposo subcutâneo.(x100).

O grupo tratado com 100 mg/kg do extrato exibiu características morfológicas bastante semelhantes às observadas no grupo salina, expressas por margens tumorais infiltrativas e irregulares e necrose coagulativa formando lençóis sólidos intratumorais (**Figura 20A e B**). Por outro lado, o grupo tratado com 200 mg/kg do extrato apresentou um aspecto marginal mais regular e menos infiltrativo e trabiques necróticas delgadas, à

semelhança dos achados evidenciados no grupo 5-FU (**Figura 20C e D**). Além disso, ambos os grupos tratados com a associação entre 5-FU e extrato, nas duas doses testadas (100 e 200 mg/kg) apresentaram características histopatológicas bastante próximas daquelas observadas no grupo 5-FU isoladamente (**Figura 21**).

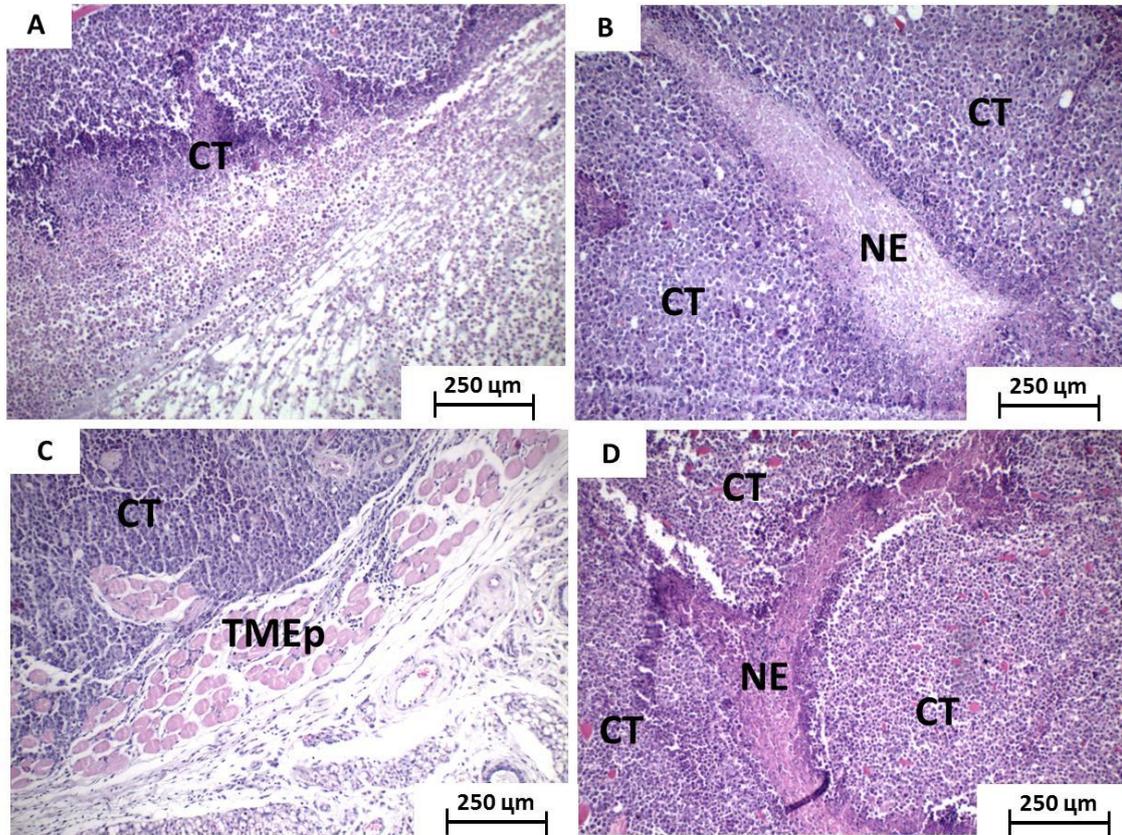


Figura 20. Fotomicrografias de seções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores. (A) Grupo tratado com 100 mg/kg do extrato exibindo margens tumorais bastante infiltrativas e (B) formando faixas espessas intraparenquimatosas de necrose coagulativa. (C) Grupo tratado com 200 mg/kg apresentando margens tumorais bem mais regulares e (D) trabiques de necrose coagulativa intratumoral. Legenda: CT – células tumorais viáveis; NE – necrose coagulativa; TME – tecido muscular estriado esquelético (x100).

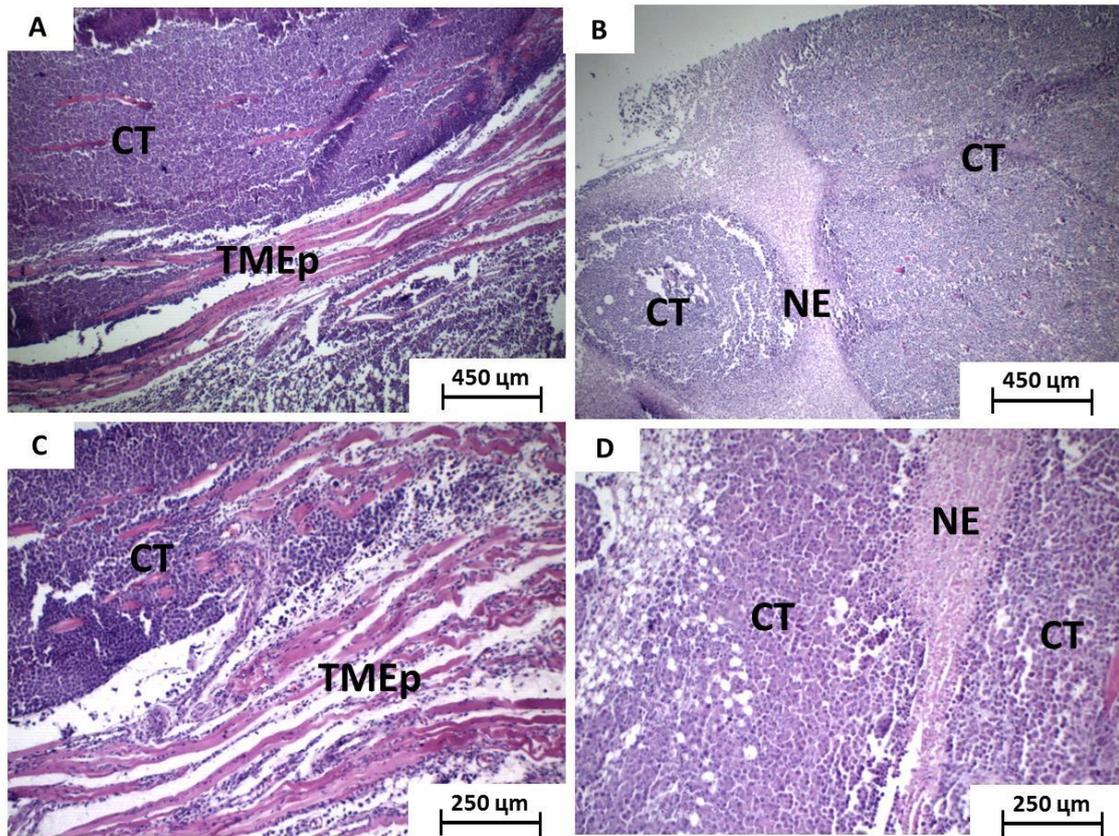


Figura 21. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de S180 implantado em roedores. (A e B) Grupo tratado com 5-FU associado a 100 mg/kg e (C e D) 200 mg/kg do extrato exibindo margens tumorais regulares comprimindo o tecido muscular estriado esquelético periférico e trabiques delgados de necrose coagulativa intratumoral. Legenda: CT – células tumorais viáveis; NE – necrose coagulativa; TME – tecido muscular estriado esquelético (x100).

- Análise semiquantitativa de parâmetros histopatológicos de agressividade tumoral

A **Figura 22** demonstra o número médio de mitoses/campo histológico analisado entre os grupos tratados. O grupo 5-FU e associados 100 e 200 mg/kg diferiram significativamente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). O grupo EAMC 100 mg/kg não diferiu significativamente em relação aos controles negativo e positivo, ao contrário do grupo EAMC 200 mg/kg que diferiu significativamente em relação ao controle negativo ($p < 0,01$) e também em relação ao grupo controle positivo (5-FU) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos associados entre si.

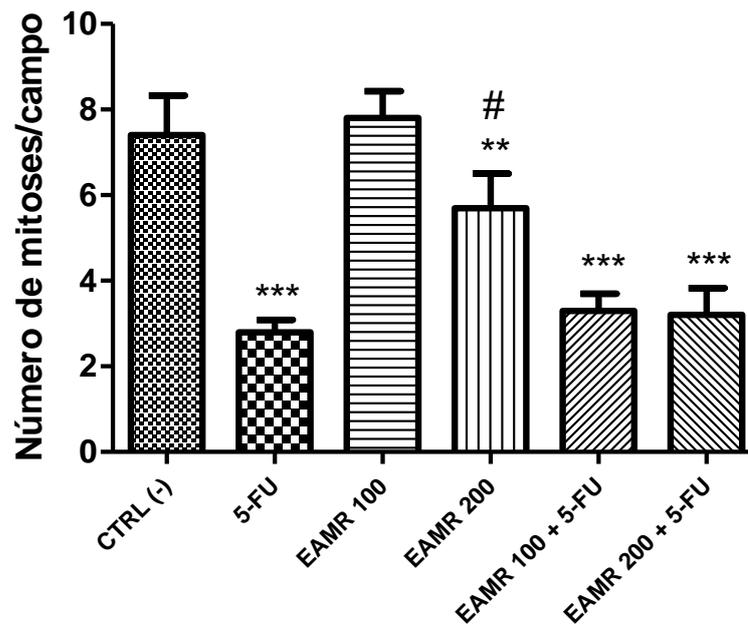


Figura 22. Análise quantitativa do número médio de mitoses/campo histológico (x400) nos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como média \pm E.P.M. Dados analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo 5-FU 25 mg/kg/dia.

- Análise descritiva dos órgãos excisionados

No exame macroscópico dos órgãos excisionados dos grupos tratados, não houve alterações no formato, cor e consistência, com exceção do baço que reduziu de tamanho e do coração que aumentou de tamanho nos grupos associados, respectivamente. Não foram evidenciadas hemorragias ou necroses a nível macroscópico.

Na análise anátomo-patológica e histomorfológica do baço (**Figura 23**) pôde-se observar nos grupos CTRL (-), EAMC100 e EAMC200, o tecido esplênico exibindo folículos linfóides extensos com diâmetro variável, caracterizados pela poupa branca, circundados pela poupa vermelha (**Figura 23 A, C e D**). Essa mesma região, apresentou-se reduzida nos grupos controle positivo e associados (5-FU+EAMC100 e 5-FU+EAMC200) (**23 B, E e F**),.

Como na análise toxicológica não houve alterações toxicológicas aparentes nos rins e fígado, estes não foram analisados histologicamente.

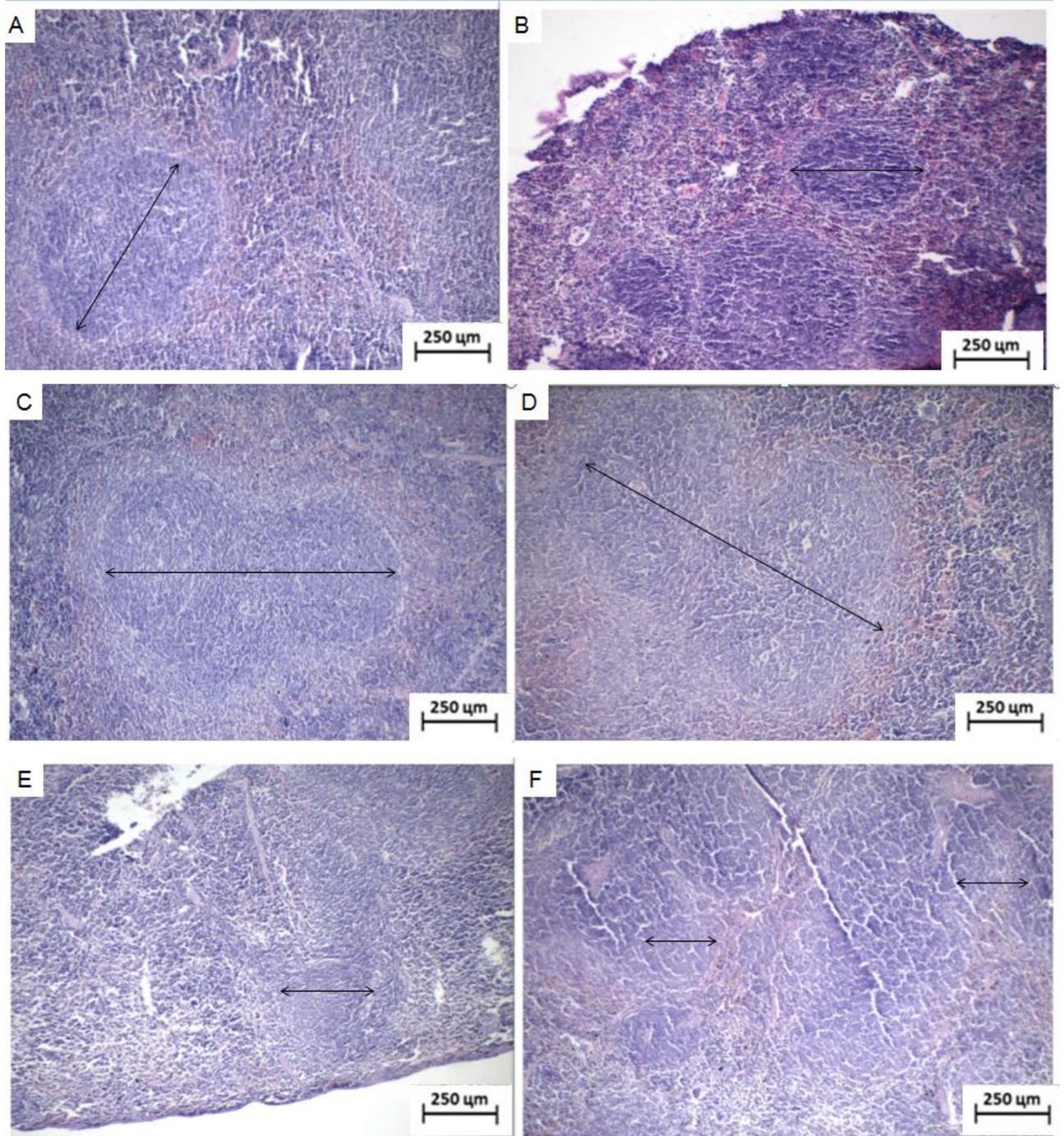


Figura 23. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes cirúrgicos de baço de roedores com S180. (A, C e D) Grupo controle negativo, Grupo EAMC 100 mg /kg / e Grupo EAMC 200 mg/kg, respectivamente, demonstrando região da poupa branca extensa. (B, E e F) Grupo tratado com 5-FU sozinho e associado a 100 mg/kg e 200 mg/kg de extrato, respectivamente, exibindo atrofia da poupa branca (x100).

6. DISCUSSÃO

A planta medicinal Camomila (*M. recutita*) tem sido largamente empregada para terapia de diversos distúrbios. Normalmente essa planta é consumida através de chás preparados com as cabeças das flores secas, numa frequência de mais de um milhão de copos por dia (BHASKARAN et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006; SPEISKY et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2009). Estudos com modelos animais apresentaram efeitos positivos em relação à vários extratos dessa planta ou de seus componentes isolados, especialmente atividades anti-inflamatórias, antimutagênicas e hipocolesterolêmicas (MATIĆ et al., 2013).

Apesar de produtos naturais provenientes de plantas terem se tornado comuns como terapias alternativas em todo do mundo, interações entre ervas, terapias combinadas validadas e potenciais desfechos clínicos dessas associações são temas de grandes discussões (WANG et al., 2013). As interações farmacodinâmicas podem elevar ou reduzir o efeito do medicamento, devido ao sinergismo ou antagonismo, já as interações farmacocinéticas podem influenciar na absorção e disposição do medicamento no organismo, resultando em modificações na concentração plasmática do mesmo (OLIVEIRA; COSTA, 2004).

Em relação ao uso de plantas medicinais por pacientes em tratamentos quimioterápicos em Sergipe, acolhidos na rede privada de saúde do estado, dos 331 indivíduos entrevistados maiores de 18 anos, 49,55% (164) declararam fazer uso dessa prática milenar (CAETANO, 2016). A *M. recutita* (camomila) foi umas das plantas medicinais mais citadas com 39,02% (64), sendo a justificativa do seu uso a “melhoria da qualidade de vida” (CAETANO, 2016). Desses pacientes, 21,95% obtêm a planta de farmácias e 48,17% obtêm via internet/correios e supermercados, ou seja, amostras comerciais, por esse motivo, optou-se, nesse trabalho, em adquirir esse tipo de amostra. Essa planta também foi uma das mais citadas por seu uso, pela população oncológica, no trabalho de Vieira (2008).

Através da observação e comparação do perfil cromatográfico do EAMR com os perfis dos padrões selecionados, foram identificados quatro picos/curvas para os compostos: Luteonina, Ácido cafeico, Rutina e Quercetina, os quais são citados na literatura como presentes na *M. recutita* (NOVAKOVA et al., 2010). A Luteonina, Rutina e Quercetina são flavonóides. Estes são os componentes fenólicos mais vastos na *M. recutita* (MLADENKA; ZATLOUKALOVÁ; FILIPSKY; HRDINA, 2010). A literatura relata que os glicosídeos de flavonoides constituem a elevada fração de constituintes solúveis em água na camomila. A fração fenólica da camomila pode apresentar também ácidos fenólicos como o ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siringídico e ácido anísico; cumarinas:

umbeliferona e herniarina; e flavonoides como agliconas e /ou glicosídeos de: isoorientina, luteolina, quercetina, apigenina e patuletina (NOVAKOVA et al., 2010).

O flavonoide isolado luteonina é citado como possuidor de atividades anticancerígenas (MCKAY; BLUMBERG, 2006; SRIVASTAVA; GUPTA, 2007). A quercetina também é citada como possuidora de efeitos anticâncer (INDAP et al, 2006) e a rutina como possuidora de propriedades antioxidantes e efeitos inibitórios de possíveis males oxidativos provocados pelo H₂O₂ no DNA de linfócitos humanos (NOROOZI et al., 1998).

A luteolina, além da atividade anticâncer, é também citada como um antioxidante natural, descrita na literatura por inúmeras atividades farmacológicas e possuidora de atividade contra neoplasias malignas de pulmão, próstata, mama e cólon. Sugere-se que esse composto leva a morte da célula ativando as vias de apoptose, extinguindo as vias de sobrevivência da célula, além de levar a uma prisão do ciclo celular e senescência em algumas células cancerosas (AMIN et al., 2009; JU et al., 2007; LEE et al., 2010; LIN et al., 2008;). Em outros estudos com modelos animais, a luteonina reduziu a proliferação do tumor em linhagens de células cancerosas de mama (MCF-7/6 e MDA-MB231-1833) e diminuiu, com significância, a ocorrência de neoplasia maligna de cólon, como também reduziu a quantidade de tumores por rato (ATTOUB et al., 2011; MANJU; NALINI, 2007).

Os achados na literatura sobre as propriedades antioxidantes dos flavonoides, em especial da luteonina e da rutina (AMIN et al., 2009; NOROOZI et al., 1998), podem explicar a atividade antioxidante apresentada pelo EAMR utilizado no nosso estudo, o qual apresentou uma CE₅₀ (concentração efetiva de antioxidante requerida para sequestrar/gerar mudança de cor de 50% do radical livre DPPH) de 662,81 µg/mL (**Figura 14**).

Em relação à citotoxicidade *in vitro*, os dados obtidos referentes ao extrato apresentados na **Tabela 4**, indicam que este não apresentou atividade citotóxica em nenhuma das 5 linhagens de células tumorais avaliadas, nem na linhagem não maligna. Apesar do nosso extrato não ter apresentado atividade citotóxica nas células tumorais em estudo, extratos aquosos e metanólicos de camomila, usados em outros trabalhos, apresentaram citotoxicidade para outras linhagens tumorais em concentrações maiores.

Nos estudos de Srivastava e Gupta (2007), foram avaliados os efeitos inibitórios da *M. recutita* sobre o crescimento em algumas células malignas do câncer de próstata, como o LNCaP (resposta ao androgênio; tipo selvagem p53), DU145 (refratário androgênico, mutante p53) e PC-3 (refratário a andrógenos; p53 nulo), que simbolizam as distintas etapas da doença em progressão. A exposição ao EAMR da camomila, nas doses elevadas de 4000 µg / mL, no

decorrer de 24 h, sucedeu em uma redução dose dependente da viabilidade celular, que oscilou entre 9,8 a 37,2% (LNCaP), 6,7 a 35,2% (DU145) e 8,6 para 33,4% (PC-3) em concentrações de 1000 - 4000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Os números de CI_{50} dessas células, depois de 72 h, variou de 2000 a 3000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Com o extrato metanólico de camomila houve uma redução da viabilidade das células de 25,4 a 61,9% (LNCaP), 14,7 para 47,5% (DU145) e 16,3 a 55,6% (PC-3) em concentrações de 100 a 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e os valores CI_{50} nessas células oscilaram de 100 a 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

De acordo com os autores, em outros tipos de células malignas como HeLa (adenocarcinoma cervical), HT1080 (fibrossarcoma), RKO (carcinoma do cólon) e T-47D (carcinoma de mama), foi percebida diminuição no crescimento celular. A CI_{50} , depois do tratamento de 72 h com o EAMR, oscilou entre 1650 a 4000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e com o metanólico oscilou entre 165 a 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$. A CI_{50} , em ordem decrescente, apresentou-se assim: T-47D > HT1080 > HeLa > RKO.

Esses resultados demonstram que a *M. recutita* pode provocar atividades inibitórias distintas em diferentes células cancerosas. Além disso, o tipo de extrato (aquoso, metanólico ou outro) também resulta em uma exposição diferenciada dos constituintes ativos dessa planta, além das distintas frações de ervas possuírem constituintes com química diferente podendo demonstrar diferentes formas de atividades, segundo Srivastava e Gupta (2007).

No que se refere ao estudo *in vivo*, com a intenção de avaliar os efeitos da associação entre o EAMR e o antineoplásico 5-FU, foi realizada a avaliação da atividade antitumoral nos animais sob diferentes tratamentos. No nosso estudo, a inibição tumoral provocada pelo CTLR (+) 5-FU foi de 68,4% (**Figura 16**). Esse resultado corrobora com os estudos de Bezerra et al. (2006), Amaral et al. (2015) e Amaral et al. (2016), onde o 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia demonstrou elevada atividade antitumoral após 7 dias de tratamento, com percentual de inibição de 76,7%, 69,4% e 63,7% respectivamente.

O 5-FU é um dos antineoplásicos mais usados contra o câncer (DIASIO; HARRIS, 1989), é um antimetabólito que age interferindo na duplicação e transcrição do DNA (WOODCOCK et al., 1980). É muito usado para tratar neoplasias malignas de tumores sólidos como as gastrointestinais, ginecológicas, cabeça e pescoço, principalmente de mama e colorretal (CASALE et al, 2004; GREM, 1997; WIGMORE et al., 2010). Trabalha impedindo a proliferação celular, em especial, inibindo a enzima timidilato sintetase (TS), inibição esta, que impede a síntese de timidina, crucial para a produção do DNA (WIGMORE et al., 2010).

Supõem-se que o fígado seja o maior sítio para a metabolização do 5-FU (HO, 1986). A enzima timidilato sintetase, por ser alvo do 5-FU esta associada à eficácia dessa droga. Altas expressões dessa enzima estão relacionadas à ocorrência de resistência a 5-FU além de resultados clínicos ruins (KURAMOCHI et al., 2008). A disponibilidade dessa droga para a assimilação dentro da célula está sujeita ao catabolismo da mesma nos tecidos corpóreos. Após a administração, há destinos metabólicos distintos para ele: em torno de 80% da dose sofre inativação através de uma biotransformação, especialmente no tecido hepático e cerca de 15 a 20% são expelidos na diurese, ficando somente uma diminuta fração que continua disponível para realizar ação antitumoral (CASALE et al., 2004). A ação do 5-FU nas células, descrita na literatura, justifica a redução tumoral do grupo CTRL (+) e também dos grupos associados nesse trabalho.

Apesar de vários fármacos citotóxicos, como o 5-FU, destruírem o tumor impedindo o avanço da doença, a grande parte deles é tóxica para as células saudáveis, causando também destruição em tecidos não afetados pela doença. Esse fato limita a eficácia e a utilização das terapias antineoplásicas e realça a necessidade de buscar novos agentes que provoquem um efeito mínimo nos órgãos saudáveis (FAN et al., 2012; SUSANTI et al., 2012; TRIPATHY; PRADHAN, 2013;). O 5-FU, por exemplo, pode provocar efeitos colaterais frequentes como leucopenia, diarreia, anorexia, estomatite e náuseas, mielossupressão, perda de peso, alopecia, fotossensibilidade, hiperpigmentação, além de toxicidade cardíaca que pode levar a morte, caracterizada como segunda causa de cardiotoxicidade provocada por quimioterapia (EL-SAYYAD et al., 2009; SORRENTINO et al., 2012;).

Nesse contexto, a utilização de princípios ativos de vegetais tem sido foco na luta contra o câncer e muitos metabolitos secundários provenientes de plantas têm sido estudados em relação à sua capacidade de tratar essa doença, sendo que, em torno de 250 000 espécies de plantas existentes, em mais de mil, foram descobertas propriedades anticancer significativas (ALJURAISSY et al., 2012; FAN et al., 2012; RAJKUMAR et al., 2009;). Além disso, extratos de vegetais usados como terapias alternativas contra essa doença têm comumente reduzida toxicidade e custo reduzido (ALSHATWI et al., 2011)

Diante disso, a população oncológica tem procurado alternativas contra o câncer, além do tratamento tradicional, ora para melhorar a qualidade de vida, segundo a pesquisa de Caetano (2016), ora para tratar enfermidades paralelas ao câncer, como problemas renais, resfriados, processos infecciosos, náuseas, problemas gastrointestinais e insônia, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014), ou ainda, uma pequena parcela, para a cura da doença

propriamente dita, conforme os estudos de Vieira (2008). Grande parte tem associado o uso de chás de ervas ao tratamento quimioterápico (CAETANO, 2016).

Baseado nessas informações, os tratamentos dos grupos experimentais associados EAMR 100 + 5-FU e EAMR 200 + 5-FU refletem o tratamento concomitante utilizado pela população oncológica, sendo que o extrato foi administrado por via oral, simulando a utilização dos chás e o 5-FU administrado via intraperitoneal, simulando o tratamento clínico do 5-FU, que é administrado por via parenteral (NOORDHUIS et al, 2004). A administração de medicamentos orais, como chás sob forma de extrato, usados no nosso experimento, não tem a mesma eficácia de outros tipos de vias de administração, como a intraperitoneal, principalmente devido aos efeitos da primeira passagem (UNDEVIA; GOMES-ABUIN; RATAIN, 2005).

A administração simultânea do 5-FU com o extrato da *M. recutita* nas duas doses (100 e 200 mg/kg/dia), demonstrou uma atividade eficaz para a diminuição do tumor experimental S180. Esse resultado revelou que, ao contrário da menor dose associada (EAMR 100 + 5-FU), que inibiu o crescimento tumoral da mesma forma ao controle positivo (66,1% e 68,4%, respectivamente), a dose EAMR 200 + 5-FU apresentou maior taxa de inibição tumoral em relação ao controle positivo (87,7% e 68,4%, respectivamente), mostrando maior taxa de inibição tumoral também em relação a dose do EAMR 100 + 5-FU (diferença de 21,6% entre as duas) sugerindo uma potencialização do efeito do fármaco.

Amaral et al. (2016) e Bezerra et al. (2008b) também tiveram resultados significativos com associações entre o 5-FU e o óleo da *Mentha x villosa*, e o 5-FU e a pirplatina, respectivamente, quando comparados ao controle positivo (5-FU 10 mg/kg/dia). Nos estudos dos autores, apesar das doses do antineoplásicos usados terem sido diferentes dos nossos estudos (10 mg/kg/dia de 5-FU), além de diferir quanto à associação com óleos naturais e alcaloide, respectivamente, isso mostra a importância das combinações entre as drogas administradas, como também a escolha das doses, para modular a eficácia do tratamento e se chegar a um efeito desejado.

As combinações de antineoplásicos, como o 5-FU, e outras terapias são muito recorrentes no tratamento contra o câncer para melhorar as respostas biológicas dos quimioterápicos. Entretanto a combinação adequada ainda é desconhecida, sendo o modelo padrão de tratamento ainda discutido. Assim, o uso de terapias complementares envolvendo plantas, tem sido utilizada em associação com tratamentos convencionais. Nesse contexto, devido às estreitas janelas terapêuticas dos antineoplásicos, interações sinérgicas ou aditivas

podem conseqüentemente aumentar os desfechos terapêuticos reduzindo as dosagens necessárias de quimioterápicos (AJANI, 2005; CUI et al., 2005). A utilização da quimioterapia combinada também tem uma grande capacidade de diminuir a toxicidade de drogas e influenciar na resistência aos fármacos (CHEN et al., 2015). Algumas fórmulas medicinais fundamentadas com plantas aprimoram os resultados clínicos da quimioterapia (LI et al., 2008).

Sugere-se nesse estudo, que a *M. recutita* na dose de 200 associada ao 5-FU pode ter melhorado a eficácia e/ou potencializado o efeito do 5-FU ou ter contribuído, juntamente com esse fármaco (ação sinérgica), para a redução do tumor, uma vez essa dose administrada sozinha teve uma taxa de inibição tumoral de 27,6% quando comparado ao grupo controle negativo. Esse fato pode ter ocorrido devido essa planta possuir várias classes de flavonóides e fenóis que são indicados como importantes agentes contra o câncer (DASHWOOD, 2007; SOOBATTE; BAHORUN; ARUOMA, 2006), além de componentes antioxidantes citados como possuidores de atividade quimiopreventiva, segundo Di Domenico e colaboradores (2012).

Estudo realizado por WU et al. (2008), a luteonina, um dos flavonoides da *M. recutita*, é descrito por sua atividade anticâncer. Este composto aumentou a eficácia do antineoplásico cisplatina no tratamento frente às células neoplásicas gástricas *in vitro*, pelo método MTT. O tratamento feito com a cisplatina sozinha e associada à luteonina, mostrou que a associação apresentou maior inibição da proliferação celular em relação à cisplatina sozinha. Os autores também sugerem a presença de sinergismo. Apesar desses achados, a luteolina, segundo os autores, não sensibilizou as células neoplásicas gástricas para outros antineoplásicos como 5-FU, doxorrubicina e paclitaxel, mas também não relatou a possível causa.

Esses dados, referentes a luteonina, reforçam a ideia do envolvimento desse composto na redução tumoral nos nossos estudos, em especial no grupo tratado apenas com o EAMR de 200 mg, além da ocorrência de um provável sinergismo com o 5-FU, potencializando seu efeito frente as células do S180, uma vez que estudos citam sinergismo desse composto com a cisplatina. Conquanto, são importantes investigações aprofundadas para avaliar os efeitos antineoplásicos da luteolina isolada frente às células do S180.

Srivastava e Gupta (2007) em seu estudos, citaram também que os extratos aquosos e metanólicos da *M. recutita*, propiciaram uma inibição da proliferação celular e impulsionaram a apoptose em distintos tipos de células malignas. Os autores ainda elucidaram que distintas frações de ervas possuem constituintes com química diferente podendo demonstrar diferentes

formas de atividades. Os trabalhos de Nikseresht et al. (2017), corroboram os trabalhos de Srivastava e Gupta (2007), quando citam que o extrato hidroalcoólico da camomila monitora a indução do crescimento celular, além de interferir também na apoptose, advertindo ainda que esses efeitos também dependem da concentração ou dose e tempo. Além do mais, esses autores citam que o extrato dessa planta impede a colonização e a dispersão celular em linhagens de células malignas, como por exemplo as de mama (MCF-7 e MDA-MB-468).

O estudo de Nikseresht et al. (2017), condiz também com o nosso experimento no que diz respeito à inibição da dispersão e proliferação de células malignas e também em relação a concentração ou dose e tempo, uma vez que, a maior dose do extrato de camomila (200 mg/kg/dia) associada surtiu maior efeito antitumoral do que a dose menor (100 mg/kg/dia) associada. A dose maior sozinha demonstrou também uma pequena inibição tumoral em comparação a dose menor sozinha que não inibiu o tumor.

Srivastava e Gupta (2007) em seus trabalhos supõem que as atividades inibitórias do crescimento celular através de extratos aquosos e metanólicos dessa planta são baseadas na ideia de que os glicosídeos devem ser transformados em aglicona (grupo não glicídico que faz parte de um glicosídeo e é sugerido como possuidor de maior atividade anticâncer do que glicosídeos) para desempenhar suas atividades anticancerígenas. Pesquisas envolvendo células malignas humanas de próstata tratadas com glicosídeos de apigenina mostraram que o aglicona apigenina, apresenta atividades anticancerígenas provocando inibição da proliferação de células malignas. Esses dados nos sugerem a possibilidade da existência de glicosídeos de flavonoides nos nossos extratos (luteonina por exemplo) possuírem ações semelhantes, uma vez q são descritos na literatura como anticâncer.

Estudos com a quercetina também demonstraram efeitos anticâncer, embora o seu mecanismo de ação não seja esclarecido. Sugere-se que a inibição do receptor de tirosina quinase EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) pela quercetina, seja um fator diferencial para a indução de apoptose em células tumorais, como as colorretais. Estudos demonstraram também que a quercetina, administrada via i.p. por 7 dias de tratamento, em dose diferentes (25, 50, 100 mg/kg/dia) causou prolongamento da sobrevivência de camundongos swiss com S180 na forma ascítica, na dose de 100 mg/kg/dia (INDAP et al., 2006).

Indap e colaboradores (2006) ainda citam que, a quercetina pode apresentar resposta promissora em combinação com o antineoplásico cisplatina em modelo de S180 ascítico e relata que, combinar a quercetina, que é um inibidor da PI3K (Fosfatidil-inisitol 3-quinase) com o taxol por exemplo, outro agente quimioterápico, é eficiente para controlar a

proliferação do carcinoma de ovário, provocando mínimos efeitos adversos, em comparação com agentes isolados. A PKB (proteína cinase B) é ativada pela fosforilação da PI3K, que ao ser ativada pode acarretar ativação de inúmeras outras proteínas da célula e fatores de transcrição que vão culminar em alteração de processos metabólicos, proliferação, diferenciação e estímulos anti-apoptóticos (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Esses achados sugerem que a quercetina (presente no extrato) também possa ter interferido na ação do 5-FU, potencializando seu efeito.

O ácido cafeico, outro componente da *M. recutita*, é também citado como um importante composto com atividades antioxidantes em alimentos, quando comparados à outros compostos fenólicos como ácido ferúlico, *p*-cumárico e vanílico (SOARES, 2002). Além disso, pesquisas com análogos de ácido cafeico (AG490: inibidor JAK2/STAT3) demonstraram a inibição da proliferação de células cancerosas, aumentando a sensibilidade aos estímulos que induzem a apoptose pela inibição da via Jak2/STAT3 (JAK2: Janus quinase 2; STAT3: ativadores de transcrição em linfoma não-Hodgkin e mieloma). Inibidores dessa via, assim, são vistos como promissores compostos para o tratamento contra neoplasias malignas (ALAS; BONAVIDA, 2003).

Apesar dos estudos pré-clínicos enfatizarem que o uso de produtos naturais e ervas sejam favoráveis, seu uso em humanos envolve várias limitações, principalmente no que tange à distribuição sistêmica ineficaz e reduzida biodisponibilidade dos componentes naturais ativos (OZCELIK; ORHAN; TOKER, 2006), além da possibilidade da ocorrência de interações medicamentosas. Para Wu et al. (2008), estratégias para elevar a biodisponibilidade de substâncias naturais potencialmente eficazes e dirimir os riscos de toxicidade inesperada são cruciais.

Nesse sentido, quanto a análise de toxicidade e presença de efeitos adversos no nosso estudo, os animais do grupo associado EAMR 200 + 5-FU, apresentaram diminuição da massa corpórea e fezes amolecidas, evidenciando a possibilidade do extrato ter potencializado esses efeitos adversos do fármaco, que são bastante frequentes. Ainda, esses dados indicam que a associação poderia até aumentar a perda progressiva de massa corpórea ao longo do tratamento. Esse fato pode trazer consequências dramáticas ao paciente, uma vez que o 5-FU tem ação destruidora no epitélio gastrointestinal (RANG et al., 2012) além favorecer o aparecimento de leucopenia, estomatite, náuseas e cardiotoxicidade (SORRENTINO et al., 2012).

A perda de massa corpórea é uma característica comum decorrente do tratamento com quimioterápicos, isso porque esses fármacos atingem células que se renovam continuamente, levando a alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia) e ainda mucosites e estomatites, diminuindo assim o apetite. Os efeitos terapêuticos e tóxicos vão depender do tempo de exposição e da concentração da droga presente no plasma, além disso, a toxicidade é relativa a vários tipos de tecidos corporais (INCA, 2017; RANG et al., 2012; SORRENTINO et al., 2012). A associação pode ter potencializado o efeito adverso da perda da massa corpórea e a diarreia, podendo ter aumentado a biodisponibilidade da droga no plasma, como cita Nikseresht e colaboradores (2017), quando afirmam que o efeito dos extratos de camomila dependem da concentração ou dose e também do tempo.

Apesar da diminuição da massa corpórea nos grupos associados, não houve diferenças significativas no consumo de ração e água, o que se sugere um aumento da taxa de metabolismo nesses grupos, somando-se à ocorrência de diarreia no grupo associado de maior dose, o que provocou a diminuição do peso.

Ainda em relação à ocorrência de efeitos adversos, nosso trabalho não corrobora os trabalhos de Amaral et al. (2016) e Bezerra et al. (2008b), uma vez os autores obtiveram resultados positivos com as associações entre o 5-FU e o óleo da *Mentha x villosa*, e o 5-FU e a Pirplatina, respectivamente, frente a diminuição do efeito adverso de leucopenia, quando comparados ao controle positivo (5-FU 10 mg/kg/dia). Nas duas associações houve melhora da leucopenia, sendo esta revertida pela combinação. Além disso, apesar da associação com o 5-FU não ter aumentado a leucopenia induzida pelo quimioterápico sozinho, isso gera uma preocupação em relação ao uso contínuo desses tipos de associações por indivíduos em tratamento contra câncer.

Supõe-se, nos nossos estudos, que os constituintes da camomila podem ter interferido no mecanismo de processamento do 5-FU por meio do sistema enzimático hepático, acentuando esse processo, segundo as descrições de NICOLETTI e colaboradores (2010). Sugere-se também a probabilidade de interferência dos compostos da camomila na inibição da timidilato sintetase, enzima associada à eficácia desse medicamento de acordo com Kuramochi et al. (2008).

De acordo com Talmadge et al. (2007), a perda de peso está geralmente associada à toxicidade e esta pode ser analisada também através da variação de massa dos órgãos. Nos nossos estudos, além da perda de massa corpórea, foi observada a atrofia esplênica dos três grupos tratados com o 5-FU (o controle positivo e os associados). Isso indica que as doses

associadas não amenizaram nem pioraram a toxicidade a nível macroscópico do baço, uma vez que não teve diferença estatística com o grupo controle positivo (5-FU). Em relação ao fígado, a dose de camomila de 100 mg/kg/dia associada ao 5-FU, pode ter sido menos tóxica em relação a maior dose, uma vez que nesse grupo o fígado não reduziu de tamanho. Não foi observada mudança significativa na massa dos rins dos grupos associados.

O baço é um órgão linfático com função importante em relação tanto aos glóbulos vermelhos como em relação ao sistema imune e o 5-FU pode causar uma supressão hematopoiética (CAO et al., 1998). A diminuição do baço é um efeito colateral que surge em decorrência do uso de grande parte dos quimioterápicos, culminando em uma atividade imunossupressora da droga, característica essa limitante na terapia contra a doença, uma vez que intensifica a suscetibilidade para processos infecciosos, a exemplo do 5-FU que causa atrofia no baço reduzindo leucócitos totais (BEZERRA et al., 2008b; BRITTO et al. 2011). Nesse contexto, podemos supor que o extrato da *M. recutita* em associação com o 5-FU nas duas doses em estudo não interage de forma a se evitar a atrofia esplênica.

Segundo Bezerra et al. (2008b), o fígado e os rins são órgãos cruciais para desintoxicação do organismo e em situações de intoxicação, seus volumes ou massas podem ser modificados. Os rins, em especial, são citados como alvos dos efeitos tóxicos dos fármacos, já que apresentam elevado fluxo de sangue circulante e são estruturas responsáveis por filtrar este, além de possuir importante papel endócrino e participar expelindo produtos de degradação (HENRY, 2008; PFALLER; GSTRANTHALER, 1998). Mudanças na função dos rins são um dos desfechos mais habituais de toxicidade farmacológica causada por excreção de drogas e metabólitos inapropriados (HENRY, 2008). Sugere-se, esse trabalho, que não houve alteração renal entre os grupos em estudo.

Houve também um aumento significativo do coração nos grupos associados 100 e 200 mg/kg/dia, em relação aos grupos controles. A toxicidade cardíaca provocada pelas fluoropirimidinas é um dos principais motivos de cardiotoxicidade desencadeada por antineoplásicos, toxicidade esta que, envolvendo o 5-FU, engloba diversas ocorrências como: vasosepasmos da coronária, problemas de angina, infarto do miocárdio, problemas isquêmicos, arritmias, cardiomiopatia e disfunção sinoatrial e atrioventricular (SORRENTINHO et al, 2012). Estudos relatam que esse efeito tóxico no coração, pode aparecer quando o 5-FU é administrado sozinho ou associado com dose intermediária de ácido folínico (SCHOBER, et al., 1993). Um elevado risco para o aumento da toxicidade também está relacionada a doses mais altas de 5-FU ou tratamentos associados com outros

quimioterápicos, como por exemplo a cisplatina (MEYER et al., 1997). Uma vez que no nosso estudo, as doses associadas (100 e 200 mg) ao 5-FU teve efeito sobre a massa coração, esse fato pode reforçar a ideia de que a combinação da planta com o medicamento, nesses grupos, pode ter potencializado o efeito do 5-FU e conseqüentemente ter aumentado o efeito adverso de cardiotoxicidade provocada por este quimioterápico. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmar possível correlação.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, os níveis da enzima AST apresentaram-se modificados no plasma sanguíneo em ambos os grupos associados e grupo controle positivo similarmemente, em relação ao controle negativo. Os grupos associados não diferiram entre si em relação à concentração dessa enzima no plasma, evidenciando que nenhuma das doses associadas superou a resposta do antineoplásico sozinho, como também não houve potencialização do efeito.

O motivo para a diminuição dos níveis dessa enzima nos grupos associados diz respeito ao tumor S180, o qual desenvolve na região axilar do animal, lesionando tecidos como o tecido muscular, trauma mecânico esse, que culmina em alterações bioquímicas e liberação das enzimáticas AST. A supressão da atividade AST nos grupos tratados com o 5-FU sozinho ou associado, em comparação com o controle negativo com tumor, é explicado pela diminuição do tumor e, portanto menor danificação do músculo esquelético. Esses dados comprovam uma diminuição na massa do tumor nos grupos com essa terapia, no entanto danos no fígado não podem ser confirmados apenas com a atividade dessa enzima (AMARAL et al., 2016).

Em contrapartida, a ALT é encontrada em elevadas concentrações dentro dos hepatócitos, tornando o seu aumento caracterizado por lesão hepática (HENRY, 2008). Nos nossos estudos, as concentrações de ALT não sofreram aumento considerável, entre os grupos associados, concluindo-se que não houve lesão hepática importante. Esses dados poderiam representar achados sem tanta relevância clínica.

Em relação à ureia e creatinina, os resultados desse trabalho mostram que nas doses e no tempo de tratamento avaliado, não ocorreu toxicidade renal. A ureia é um produto resultante da metabolização dos aminoácidos, sintetizada a partir da amônia no ciclo da ureia do fígado (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). Já a creatinina é um produto resultante da degradação da creatinina muscular. Ambas são filtradas através dos glomérulos, porém esta última não é reabsorvida pelos túbulos dos rins. A capacidade de filtração desse metabólito é um parâmetro singular para avaliação do desempenho do glomérulo

(BRENNER; LEVINE, 2004). Também os grupos associados não apresentaram alterações das BD e BT em relação ao grupo controle negativo.

Aproximadamente 70% da bilirrubina é proveniente da degradação da hemoglobina (Hb) de eritrócitos senescentes (≤ 300 mg/dia) e 20% são provenientes de células da medula degradadas precocemente e também de hemoproteínas do fígado, por exemplo. A bilirrubina liga-se a albumina e é carregada no fígado, sendo então conjugada com ácido glicurônico, cujo destino é o duodeno, onde é hidrolisada a bilirrubina não conjugada. A Bilirrubina conjugada (direta) está elevada em patologias hereditárias e em lesões hepáticas, já a não conjugada (indireta) está elevada em doenças hemolíticas do sangue, patologias hereditárias e no decorrer de terapias medicamentosas (WALLACH, 2009).

A fosfatase (FAL) alcalina mostrou-se diminuída nos grupos tratados com 5-FU sozinho e também associados. A FAL é uma enzima fosfohidrolase, podendo ser encontrada em elevadas concentrações no tecido hepático, no trato biliar e nos ossos. De modo geral, qualquer hepatopatia intensa pode elevar as taxas dessa enzima, sendo mais intensa em obstrução do trato biliar provocada por drogas. Ela é assim um marcador diferenciado da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante terapias medicamentosas e algumas doenças (WRIGHT; PLUMMER, 1974). As baixas concentrações de BD, BT e FAL, podem reforçar, então, a ausência de dano hepático nos grupos em estudo

Em relação aos parâmetros hematológicos, o que chamou mais atenção foi a ocorrência de plaquetopenia nos grupos associados e grupo controle positivo em relação ao grupo controle negativo, no entanto comparando-se as doses associadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre elas. Esse resultado demonstra que a diferença nas dosagens das associações entre o extrato e o fármaco não implicou em potencialização desse efeito adverso.

Há agentes quimioterápicos que são bastante agressivos à medula, cujas células são bem sensíveis (KATZUNG, 2010). A mielossupressão, condição em que a atividade da medula óssea está reduzida, é um dos efeitos colaterais do fármaco 5-FU (EL-SAYYAD et al., 2009). Os glóbulos brancos (leucócitos), glóbulos vermelhos (hemácias) e também as plaquetas são produzidos na medula óssea e podem ter sua síntese prejudicada, diminuindo suas concentrações no sangue. Os glóbulos vermelhos permanecem circulando por mais tempo que os leucócitos. Este último, célula de defesa do organismo, circula por alguns dias e depois se desloca para os tecidos onde atacam possíveis micro-organismos invasores

(KATZUNG, 2010). A plaquetopenia pode ter sido decorrência da mielossupressão provocada pela ação da droga sozinha e associada, porém sem potencialização do efeito.

Ainda relacionado ao parâmetro hematológico, os eritrócitos permanecem no sangue por mais tempo que os leucócitos, dessa forma, anemias (queda de glóbulos vermelhos no sangue) só seriam percebidas depois de alguns ciclos de tratamento com quimioterapia (KATZUNG, 2010), isso pode justificar não termos encontrado redução dessas células no sangue, já que o tempo de tratamento foi curto (apenas 7 dias).

Neste trabalho o grupo 5-FU e os grupos associados apresentaram leucopenia em comparação com o grupo controle negativo, não houve diferença estatística entre os grupos associados e controle positivo. Isso demonstra que a associação não potencializou a leucopenia a curto prazo, porém pode ter efeito mielossupressor (potencializado) a longo prazo, além disso, estes grupos estão tão sujeitos a infecções como o grupo controle positivo.

Quanto à contagem diferencial relativa de leucócitos (%), os grupos tratados com a associação de drogas demonstraram alterações no percentual de neutrófilos e linfócitos. Já na contagem absoluta de leucócitos os dois grupos associados apresentaram alterações (diminuição) de todos os leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos. Esse fato mostra a presença de efeitos imunossupressores diretos no sangue periférico, corroborando com os estudos de Ferreira et al. (2016), que também observou a mesma diminuição nos grupos tratados com 5-FU (25mg/kg/dia).

Em relação à análise anátomo-patológica e histomorfológica dos tumores existiram semelhanças entre os grupos e características de malignidade, com a presença de células poliédricas, invasão da musculatura esquelética e quantidade elevada de mitoses por campo (**Figura 18**), principalmente nos grupos sem o tratamento com o 5-FU e associados. A variedade genética e a flutuação do genoma das células malignas induzem a uma vasta modificação fenotípica das células, dificultando o tratamento no câncer, além de propiciar o aparecimento de resistência (McCUBREY et al., 2015). Nesse contexto, compostos naturais de plantas aparecem como uma opção para superar a resistência ao tumor, uma vez que os fitoquímicos podem atuar através de co-sinergismo químico (MONÇÃO et al., 2015).

Nos grupos associados observaram-se também áreas de apoptose, sugere-se que pode ter sido induzida por possíveis componentes da camomila, como por exemplo a luteonina, antioxidante natural, com inúmeras atividades farmacológicas como a anticâncer. Esse composto leva a morte da célula ativando as vias de apoptose, extinguindo as vias de

sobrevivência da célula, além de levar a uma prisão do ciclo celular e senescência em algumas células cancerosas (AMIN et al., 2009; JU et al., 2007; LEE et al., 2010; LIN et al., 2008).

Outros achados histopatológicos relevantes também foram encontrados como: padrão de interação margens tumorais/tecido hospedeiro circundante, em que os grupos associados e 5-FU sozinho se mostraram menos infiltrativos e com margens mais regulares quando comparados aos outros grupos; padrão e distribuição das áreas de necrose, em que nos grupos 5-FU e associados foram vistas áreas estreitas de necrose, em forma de trabiques, circundadas por áreas de células tumorais viáveis; e presença de atividade mitótica média por campo histológico principalmente nos grupos não tratados com 5-FU e associados.

Alas e Bonavida (2003) também citam em suas pesquisas o aumentando da sensibilidade aos estímulos que induzem a apoptose pela inibição da via Jak2/STAT3 por análogos de ácido caféico (AG490: inibidor JAK2/STAT3) como já foi supracitado. Isso demonstra a possibilidade dos compostos presentes na camomila terem induzido a formação de corpos apoptóticos nos grupos de 5-FU associados, porém testes de quantificação ou semiquantificação devem ser realizados para a comprovação desses achados.

Quanto às análises histopatológicas do baço (**Figura 24**), houve redução da poupa branca nos grupos tratados com o 5-FU e associados. O baço tem função na formação de linfócitos, na destruição de eritrócitos e defesa contra invasores. A poupa branca produz linfócitos, os quais são deslocados para a poupa vermelha, incorporado-se ao sangue presente ali (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Nos grupos controle positivo e grupos associados, os tratamentos, provavelmente, podem ter alterado essas áreas do baço, suprimindo-as. Como na análise bioquímica não houve grandes alterações toxicológicas aparentes entre os grupos tratados em relação aos rins e fígado, estes não foram analisados histologicamente.

Finalmente, sugere-se nesse trabalho, que o tratamento associado do extrato da *Matricaria recutita* com o antineoplásico 5-FU potencializou o efeito do 5-FU (aumentou a sua eficácia) por ação sinérgica para a maior dose, uma vez que houve uma maior diminuição do tumor e um aumento da taxa de inibição tumoral, como também intensificação de alguns efeitos adversos. Nesse contexto, apesar de estudos citarem que as associações entre fármacos antineoplásicos e ervas podem aumentar a resposta a cada aplicação e reduzir a possibilidade de resistência aos medicamentos, além de poder atuar em fases distintas do ciclo celular (MORINAGA et al., 2003), essas combinações também demonstram resultados que requerem alerta, uma vez que podem ocasionar efeitos inesperados ou intensificar os efeitos adversos.

Neste trabalho, sugere-se que a associação contribuiu para a potencialização de alguns efeitos adversos do 5-FU, como perda severa de massa corpórea e diarreia no grupo de maior dose associada e alteração da massa do coração nos dois grupos associados. Outros efeitos adversos como mielossupressão (plaquetopenia e leucopenia) e atrofia esplênica, surgiu similarmemente tanto nos grupos associados como no grupo controle positivo. Isso demonstra que o extrato associado não conseguiu amenizar esses efeitos adversos, como também não os intensificou, porem sugere-se potencialização do efeito em longo prazo. A intensificação dos efeitos adversos é um dado importante para ser discutido, uma vez que, segundo Bezerra et al (2008b), há a possibilidade de elevadas incidências de internações por toxicidade, o que leva a interrupções das terapias, elevando a taxa de ineficácia da quimioterapia.

De todo modo, o extrato de camomila foi eficiente para aumentar a resposta antitumoral do 5-FU, mas não reduziu os efeitos adversos induzidos por esse fármaco. Estudos posteriores devem ser realizados para compreender melhor os possíveis mecanismos de ação e interações entre ambos.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados e discussões apresentados, concluiu-se que a *Matricaria recutita* usada nesse estudo apresentou compostos bioativos anticancerígenos e antioxidantes importantes, o que refletiu na regressão da massa tumoral e no aumento da inibição tumoral *in vivo*, porém com ausência de citotoxicidade *in vitro*.

O efeito da associação da planta com o fármaco antineoplásico 5-FU mostrou a potencialização da ação da droga frente à diminuição da massa tumoral demonstrando a existência de sinergismo entre seus compostos. A associação potencializou também alguns efeitos adversos do 5-FU como a perda de peso, diarreia e alteração na massa do coração, sem amenização de outros efeitos adversos importantes como leucopenia e plaquetopenia. Estes achados demonstraram que as plantas medicinais, em especial a *M. recutita*, tem importante papel em terapias medicamentosas oncológicas associadas, e, portanto, é de grande interesse para a indústria farmacêutica e empresas de chás.

Esse trabalho tem um cunho translacional, pois reflete um resultado de uma pesquisa básica *in vivo* para uma vertente clínica e vice e versa, objetivando alertar, através de dados consistentes, a população geral e a comunidade científica, quanto à existência de sinergismos e potencialização de efeitos decorrentes de associações entre plantas medicinais e antineoplásicos. A realização de estudos futuros é importante para a descoberta dos prováveis mecanismos de ação envolvidos nas associações estudadas nesse trabalho.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 488 - 496, 2007.
- AGBOR, A. M.; NAIDOO, S. Ethnomedicinal plants used by traditional healers to treat oral health problems in Cameroon. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, p. 1-10, 2015.
- AJANI, J. A. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. **Oncologist**, v. 10, n. 3, p. 49-58, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5^a ed., Porto Alegre: Artemed, p.1205, 2010.
- ALJURAISSY, Y. H.; MAHDI, N. K.; AL-DARRAJI, M. N. Cytotoxic effect of Chelidonium majus on cancer cell lines. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, p. 85–90, 2012.
- ALMEIDA, J. R. C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, p. 84- 200, 2004.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.
- ALAS, S.; BONAVIDA, B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v.9, n. 1, p. 316-26, 2003.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; VILLARREAL, M. L.; SALAZAR-OLIVO, L. A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal Ethnopharmacol**, v. 133, p. 945–972, 2011.
- ALSHATWI, A. A.; SHAFI, G.; HASAN, T. N.; AL-HAZZANI, A. A.; ALSAIF, M. A.; ALFAWAZ, M. A.; LEI, K. Y.; MUNSHI, A. Apoptosis-mediated inhibition of human breast cancer cell proliferation by lemon citrus extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 1555–9, 2011.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V. AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de Atividade Antioxidante *In Vitro* em Substratos Orgânicos. **Revista Química Nova**, V. 33, N. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMARAL, R. G.; ANDRADE, L. N. DÓRIA, G. A. A. BARBOSA-FILHO, J. M. SOUSA, D. P. ; CARVALHO, A. A. THOMAZZI, S. M. Antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* combined with 5-fluorouracil in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, p. 250–254, 2016.
- AMARAL, R. G.; FONSECA, C.S.; SILVA, T. K. M.; ANDRADE, L. N. FRANÇA, M. E. ; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, D. P. ; MORAES, M. O.; PESSOA, C. O. CARVALHO, A. A.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential

oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, p. 250–254, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society; 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). The history of câncer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

AMIN, A. R.; KUCUK, O.; KHURI, F. R.; SHIN, D. M. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 2712–25, 2009.

ANDERSON, C.; LIS-BALCHIN, M.; KIRK-SMITH, M. Evaluation of massage with essential oils on childhood atopic eczema. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 452–456, 2000.

ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T.; FERRAZ, C.; FERRAZ, S.M. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, p. 209–215, 2006.

ASSEF, M.L.M, CARNEIRO-LEÃO, A.M, MORETÃO, M.P et al. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an adglucan from the lichen *Ramalina celastri*. *BRAZILIAN JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCE* 19(2): 49–54, 2002.

ASTIN, J. A.; PELLETIER, K. R.; MARIE, A.; HASKELL, W. L. Complementary and alternative medicine use among elderly persons: one year analysis of Blue Shield medicare supplement. **The journals of gerontology**, v. 55, p. M4–M9, 2000.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSC, C. UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances - Journal**, v. 33, p. 1582–1614, 2015.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic prolife. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, n. 1, p. 27–36, Jan. 2005.

ATTOUB, S.; HASSAN, A. H.; VANHOECKE, B.; IRATNI, R.; TAKAHASHI, T.; GABEN, A. M.; ET AL. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 651, p. 18–25, 2011.

BADRIA F. A.; ZIDAN, O. A., “Natural products for dental caries prevention”. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 3, p. 381–384, 2004.

BASER, K. H.; DEMIRCI, B.; ISCAN, G. HASHIMOTO T, DEMIRCI F, NOMA Y, ASAKAWA Y. The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis*

aciphylla BOISS. var. *discoidea* BOISS. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 222-225, 2006.

BELAYACHI L, ACEVES-LUQUERO C, MERGHOUB N, BAKRI Y, DE MATTOS SF, AMZAZI S, VILLALONGA P. Screening of North African medicinal plant extracts for cytotoxic activity against tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, p. 310–332, 2013.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. 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.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, p.14-19, 1996.

BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *piper*. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.801-807, 2006.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N M N; MESQUITA, R O ; LIMA, M W ; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O D L ;

BEZERRA, D.P.; DE CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; DE ALENCAR, N.M.N.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of applied toxicology**, v.28, p.156-163, 2008b.

BHASKARAN, N.; SHUKLA, S.; SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S. Chamomile, an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 26, p. 935–940, 2010.

BONASSA, E.M.A.; GATO, M.I.R. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. São Paulo: Ed. Atheneu, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed.– Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 290 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. Guanabara Koogan, 7ª Ed., Rio de Janeiro, p. 43-236, 2006.

BRENNER, B. M.; LEVINE, S. A. **Brenner & Rector – The Kidney**. 7. Ed. Philadelphia: Sanders Company, 2004.

BRITTO, A.C.S.; OLIVEIRA, A.C.A.; HENRIQUE, R.M.; CARDOSO, G.M.B.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M.L.B.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta med**, p.1-6, 2011.

BRONCKAERS, A.; GAGO, F.; BALZARINI, J.; LIEKENS, S. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Medicinal Research Reviews*, v. 29, p. 903–953, 2009.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in câncer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 737-749, 2008.

CAETANO, NA. L. B. **Uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos por pacientes em tratamento antineoplásico: possíveis interações**. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe. 2016.

CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; RICOUX, L.; LAMAISON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of Roman chamomile tea. **Fitoterapia**, v. 75, p. 32-38, 2004.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.S.A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, M.S. **A célula**. 2ªed, Barueri, SP: Manole, 2007.

CASALE, F.; CANAPARO, R.; SERPE, L.; MUNTONI, E.; PEPA, C. D.; COSTA, M.; MAIRONE, L.; ZARA, G. P.; FORNARI, G.; EANDI, M. Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 173–179, 2004.

CEYLAN, S.; HAMZAOGLU, O.; KOMURCU, S.; BEYAN, C.; YALCIN, A. Survey of the use of complementary and alternative medicine among Turkish cancer patients. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 10, p. 94-99, 2002.

CHANDRASHEKHAR, V. M.; HALAGALI, K.S.; NIDAVANI, R. B.; SHALAVADI, M. H.; BIRADAR, B. S. BISWAS, D.; MUCHCHANDI, I.S. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 137, p. 336– 340, 2011.

CHEN, J.; LIN, H.; HU, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 1228–1235, 2003.

CHEZ, R. A.; JONAS, W. B. Complementary and alternative medicine. Part I: Clinical studies in obstetrics. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 52, n. 11, p. 704- 8, 1997.

CHIEN, C. F.; WU, Y.T.; LEE, W. C.; LIN, L. C.; TSAI, T. H. Herb–drug interaction of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on the pharmacokinetics of theophylline in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, p. 458–465, 2010.

CORDELL, G.; BEECHER, C.; PEZZUT, J. Can ethnopharmacology contribute to development of new anti-cancer? **J. Ethnopharmacol**, n. 32, p. 117-133, 1991.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gulbenkian- Lisboa/ Serviços de Educação e Bolsas. Vol. 2. Ed. 5. 2002.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. ROBBINS. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 233-293, 2000.

CROTTEAU, C. A.; WRIGHT. S. T.; EGLASH, A. Clinical inquiries; what is the best treatment for infants with colic? **The Journal of Family Practice**, v. 55, p. 634-636, 2006.

CUI, Y.; SHU, X. O.; GAO, Y.; WEN, W.; RUAN, Z. X.; JIN, F.; ZHENG, W. Use of complementary and alternative medicine by Chinese women with breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 85, p. 263-270, 2004.

DASHWOOD, R. H. Frontiers in polyphenols and cancer prevention. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 267–269, 2007.

DIASIO, R. B.; HARRIS, B. E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics - Journals**, v. 16, n. 4, p. 215-37, 1989.

DOUILLARD, J. Y.; CUNNINGHAM, D.; ROTH, A. D.; NAVARRO, M.; JAMES, R. D.; KARASEK, P.; JANDIK, P.; IVESON, T.; CARMICHAEL, J.; ALAKL, M.; GRUIA, G.; AWAD, L.; Rougier, P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 355, p. 1041–1047, 2000.

DRAGLAND, S.; SENOO, H.; WAKE, K.; HOLTE, K.; BLOMHOFF, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. **Journal of Nutrition**, v.133, n.5, p.1286-1290, 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. ; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Revista de Ciência, Tecnologia e Alimentos**, Campinas, V. 26, N. 2, p. 446-452, abr/jun, 2006.

ELOUADDARI, A.; EL AMRANI, A.; EDDINE, J. J.; CORREIA, A. I. D.; BARROSO, J. G. B.; PEDRO, L. G. P.; FIGUEIREDO, A. C. Yield and chemical composition of the essential oil of Moroccan chamomile [*Cladanthus mixtus* (L.) Chevall.] growing wild at different sites in Morocco. **Flavour Fragrancy Journal**, n. 28, p.360–366, 2013.

EL-SAYYAD , H. I. ISMAIL1, M. F.; SHALABY, F. M.; ABOU-EL-MAGD, R. F.; GAUR, R. L.; FERNANDO, A.; RAJ, M. H. G.; OUHTIT, A. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. **International Journal Biological Sciences**, v 5, p. 466-473, 2009.

EVANS, S.; DIZEYI, N.; ABRAHAMSSON, P. A.; PERSSON, J. The effect of a novel botanical agent TBS-101 on invasive prostrate cancer in animal models. **Anticancer Research**, v. 10, p. 3917-3924, 2009.

FAJEMIROYE, J. O.; FERREIRA, N. L.; DE OLIVEIRA, L. P.; ELUSIYAN, C. A.; PEDRINO, G. R.; DA CUNHA, L. C.; DA CONCEIÇÃO, E. C. Matricaria recutita and its Isolate-Apigenin: Economic Value, Ethnopharmacology and Chemico-Biological Profiles in Retrospect. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.4, n. 4, 2016.

FACCHINI, J. M. **Atividade antitumoral de frações polissacarídicas de Pleurotus ostreatus DSM 1833 sobre tumor ascítico de Ehrlich e Sarcoma 180**. Joiville. Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente/Biotecnologia da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE. 2011.

FAJEMIROYE, J. O.; DA SILVA, D. M.; DE OLIVEIRA, D. R.; COSTA, E. A. Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 198-215, 2016.

FAN, L.; DING, S.; AI, L.; DENG, K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from Inonotus obliquus. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 870-4, 2012.

FERLAY, J. I.; SOERJOMATARAM. R.; DIKSHIT, S.; ESER, C.; MATHERS, M.; REBELO, D.M.; PARKIN, D.; FORMAN, F. B. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p: 359-86, 2014.

FERNANDÉZ, M. J. H.; BAENA-CAÑADA J. M.; BAUTISTA, M. J. M.; ARELLANO, E. A.; PALACIOS, M. V. G. Impact of computerized chemotherapy prescriptions on the prevention of medication errors. **Clinical Translation Oncology**, v. 8, n. 11, p. 821-25, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N. COSTA, M. P. FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N. FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L. Chammas, Roger. Alves, A. P. N. N. Moraes, M. O. Pessoa, Claudia. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from Casearia sylvestris and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 186, p. 270-279, 2016.

FISCHER, P. M., GLOVER, D. M., LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Disc. Today**, v.1, n. 4, p. 417 - 423, 2004.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v.14, p.144-149, 2008.

FRAGOSO, L.R.; ESPARZA, J.R.; BURCHIEL, S. W.; RUIZ, D.H.; TORRES, E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 227, p. 125-135, 2008.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v.25, p.4798-4811, 2006.

GARDINER, P. Complementary, holistic, and integrative medicine: chamomile. **Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics**, v. 28, n. 4, p. 168, 2007.

GAUI, M. F. D. Interações medicamentosas no paciente oncológico. **Revista Onco&**. Agosto/setembro, 2010.

GERBER, B.; SCHOLZ, C.; REIMER, T.; BRIESE, V.; JANNI, W. Complementary and alternative therapeutic approaches in patients with early breast cancer: a systematic review. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 95, p. 199-209, 2006.

GEWIRTZ, D. A.; HOLT, S. E.; ELMORE, L. W. Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 8, p. 947-957, 2008.

GREM, J. L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 7, p. 249-259, 1997.

GRESSETT, S. M.; STANFORD, B. L.; HARDWICKE, F. Management of hand-foot syndrome induced by capecitabine. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 12, p. 131-141, 2006.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v 46, p. 273-276, 1996.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, M.A.; ALVES, R.S.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S.; BEZERRA, D.P.; JÚNIOR, L.J.Q. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene presente in the essential oil of orégano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological interations**, v.227, p.69-76, 2015.

GUPTA, V.; MITTAL, P.; BANSAL, P.; KHOKRA, S. L.; KAUSHIK, D. Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*-A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 1, p. 12-16, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation, **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HANSEN, H. V. CHRISTENSEN, K. I. The common chamomile and the scentless may weed revisited. **Taxon**, v. 58, p. 261-264, 2009.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HIETALA, M.; HENNINGSON, M.; INGVAR, C.; JONSSON, P.E.; ROSE, C.; JERNSTROM, H. Natural remedy use in a propsective cohort of breast cancer patients in Southern Sweden. **Acta Oncologica**, v.50, p.134-143, 2011.

HO, D.H.; TOWNSEND, L.; LUMA, M.A; BODELY, G P. Distribuiand inhibition of dihydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as a substrate. **Anticancer Research**. v.6, p.781-784, 1986.

HUANG, Y. T.; KUO, M. L.; LIU, J. Y.; HUANG, S. Y.; LIN, J. K. Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin. *European Journal of Cancer*, v. 32, p. 146 –151, 1996.

HUERTA, S.; GOULET, E.J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E.H. Screening and detection of apoptosis. *The journal of surgical research*, v.139, p.143-156, 2007.

INC. Instituto Nacional do Câncer. Tratamento do câncer. 2015. Disponível em: <<http://www.itcancer.com.br/tratamentos/cirurgia-oncol>>. Acesso em: 30/09/2017.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**. Coordenação de Prevenção e vigilância. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer/ Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011a.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Comunicação Social. **Radioterapia: orientações aos pacientes** / Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Comunicação Social. – 2ª reimp. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva. – 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2017.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Coordenação de Prevenção e vigilância de câncer. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011b.

INDAP, M. A.; RADHIKA, S.; MOTIWALE, LEENA; . RAO, K. V. K. Quercetin: Antitumor Activity and Pharmacological Manipulations for Increased Therapeutic Gains. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Jul., Ago., 2006.

ISHIKAWA, F.; MIYAZONO, K.; HELLMAN, U.; DREXLER, H.; WERNSTEDT, C.; et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature*, v. 338, 1989.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; MODAEINAMA, SINA.; ABASI, M.; ABBASI, M. M.; JAHANBAN-ESFAHLAN, R. Anti Proliferative Properties of Melissa officinalis in Different Human Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 16, 2015.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. **Global Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69–90, 2011.

JEMAL, A.; VINEIS, P.; BRAY, F.; TORRE, L.; FORMAN, D(Eds). **The Cancer Atlas**. 2 Ed. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2014. Disponível no: www.cancer.org/canceratlas Acesso em: Jul 2014.

JANUS, N.; THARIAT. J. BOULANGER, H.; DERAY, G.; LAUNAY-VACHER, V. Proposal for dosage adjustment and timing of chemotherapy in hemodialyzed patients. **Annals of Oncology**. v. 21, n. 7, p. 1395-1403, 2010.

JOHNSTON, P. G.; KAYE, S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 639–646, 2001.

JOSHI, G.; OGUNNAIKE, B. Consequences of inadequate postoperative pain relief and chronic persistent postoperative pain. **Anesthesiol Clin North America**, n. 23, p. 21-36, 2005.

JOY, P.P.; THOMAS, J.; MATHEW, S.; SKARIA, B.P. **Medicinal Plants. Tropical Horticulture**, Naya Prokash, Calcutta, v. 2., p. 449- 632, 2001.

JU, W.; WANG, X.; SHI, H.; CHEN, W.; BELINSKY, S. A.; LIN, Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 71, p. 1381–8, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLONGG, E. A.; STEENS, P. F.; DONOGUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 612., 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JURANIĆ, Z.; ZIZAK, Z. Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. **Biofactors**, v. 23, p. 207–211, 2005.

KAMBLE, B.; GUPTA, A.; MOOTHEDATH, I.; KHATAL, L.; JANRAO, S.; JADHAV, A.; DURAISWAMY, B. Effects of *Gymnema sylvestre* extract on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of Glimperide in streptozotocin induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, May. 2015.

KATO, A.; MINOSHIMA, Y.; YAMAMOTO, J.; ADACHI, I.; WATSON, A. A.; NASH, R. Protective Effects of Dietary Chamomile Tea on Diabetic Complications. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v 56, p. 8206-8211, 2008.

KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**. 10^a ed., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.1088, 2010.

KEITH, W.; VANCE, S. C.; GERALD, B. Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas. **Cancer Research**; 65: 2260-2268, 2005.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Res** 72: 3125–3130, 2012.

KIRAITHE, M. N.; NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; KIAMA, S. G. Evaluation of the use of *Ocimum suave* Willd. (Lamiaceae), *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae) and *Zanthoxylum chalybeum* Engl. (Rutaceae) as antimalarial remedies in Kenyan folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

KRYSKO, O.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, V. D.; BACHERT, C. Impairment of phagocytosis of apoptotic cells and its role in chronic airway diseases. **Apoptosis**, vol. 15, pp. 1137-1146, 2010.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**. 10^a ed., WB Saunders, China, p.260, 2010.

KURAMOCHI, H.; TANAKA, K.; OH, D.; LEHMAN, B. J.; DUNST, C. M.; YANG, D. Y.; DE MEESTER, S. R.; HAGEN, J. A.; DANENBERG, K. D.; DE MEESTER, T. R.; DANENBERG, P. V. Thymidylate synthase polymorphisms and mRNA expression are Independent chemotherapy predictive markers in esophageal adenocarcinoma patients. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 201-208, 2008.

KURASHIGE, S., MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann Gan**, v. 73, p. 85-90, 1982.

KYOKONG, O.; CHARULUXANANAN, S.; MUANGMINGSUK, V.; RODANANT, O.; SUBORNSUG, K.; PUNYASANG, W. Efficacy of chamomile-extract spray for prevention of post-operative sore throat. **Journal of the medical association of thailand**, v. 85, p. 180-185, 2002.

LEE, C. F.; CHANG, S. Y.; HSIEH, D. S.; YU, D. S. Treatment of bladder carcinomas using recombinant BCG DNA vaccines and electroporative gene immunotherapy. **Cancer Gene Ther**, 11 (3): 194-207, 2003.

LEE, H. Z.; YANG, W. H.; BAO, B.Y.; LO, P. L. Proteomic analysis reveals ATP-dependent steps and chaperones involvement in luteolin-induced lung cancer CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, p.19–27, 2010.

LI, J.; SUN, G. Z.; LIN, H. S.; PEI, Y. X.; QI, X.; AN, C.; YU, J.; HUA, B. J. The herb medicine formula ‘Yang Wei Kang Liu’ improves the survival of late stage gastric cancer patients and induces the apoptosis of human gastric cancer cell line through Fas/Fas ligand and Bax/Bcl-2 pathways. **International Immunopharmacol**, v. 8, p. 1196-1206, 2008.

LIN, J. K.; CHE, Y. C.; HUANG, Y.T.; LIN, S.S.Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 28, n. 29, p. 39 – 48, 1997.

LIN, Y.; SHI, R.; WANG, X.; SHEN, H. M. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, p. 634–46, 2008.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. Progress the microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411; p. 375 - 379, 2001.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDelta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, V.60, p. 233-9, Feb., 2013.
- LOMAX, M.E.; FOLKES, L.K.; NEIL, P.O. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. **Clinical Oncology**, p.1-8, 2013.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Publishing Group**, v 3, May, 2003.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 544, 2002.
- MADDIKA, S.; RAO ANDE, S.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHI, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHARIGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancertherapy. **Drug Resistance Updates**, v. 10, p.13-29, 2007.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, p. 222 - 231, 2001.
- MANJU, V.; NALINI, N. Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. **Cell Biochemistry and Function** , v. 25, p. 189-94, 2007.
- MARTENS, D. Chamomile: the herb and the remedy. **Journal of the Academy of Chiropractic Philosophers**, v. 6, p. 15-18, 1995.
- MATIĆ, I. Z.; JURANIĆ, Z.; SAVIKIN, K.; ZDUNIĆ, G.; NAĐVINSKI, N.; GOĐEVAC, D. Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 852-858, 2013.
- MCCUNE, J. S.; HATFIELD, A. J.; BLACKBURN, A. A.; LEITH, P. O.; LIVINGSTON, R. B.; ELLIS, G. K. Potential of chemotherapy-herb interactions in adult cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 12, p. 454-462, 2004.
- MCCUBREY, J.A.; ABRAMS, S.L.; FITZGERALD, T.L.; COCCO, L.; MARTELLI, A.M.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; SCALISI, A.; CANDIDO, S.; LIBRA, M.; STEELMAN, L.S. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, p. 75-101, 2015.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B.; A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20; p. 519-530, 2006.
- MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. Herb-drug interactions in oncology: focus on mechanisms on induction. **The oncologist** , v.11, p. 742-752, 2006.

MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 950–961, 2010.

MEYER, C. C.; CALIS, K. A.; BURKE, L. B.; WALAWANDER, C. A.; GRASELA, T. H. Symptomatic cardiotoxicity associated with 5-fluorouracil. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 729–736, 1997.

MITOSHI, M.; KURIYAMA, I.; NAKAYAMA, H.; MIYAZATO, H. SUGIMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; JIPPO, T.; KANAZAWA, K.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Effects of Essential Oils from Herbal Plants and Citrus Fruits on DNA Polymerase Inhibitory, Cancer Cell Growth Inhibitory, Antiallergic, and Antioxidant Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 11343-11350, 2012.

MLADENKA, P.; ZATLOUKALOVA, L.; FILIPSKY, T.; HRDINA, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 963–975, 2010.

MOHAMMED, O. J.; MCALPINE, R.; CHIEWHATPONG, P.; LATIF, M. L.; PRATTEN, M. K. Assessment of developmental cardiotoxic effects of some commonly used phytochemicals in mouse embryonic D3 stem cell differentiation and chick embryonic cardiomyocyte micromass culture models. **Reproductive Toxicology**, v. 64, p. 86-97, 2016.

MONÇÃO, N.B.N.; ARAÚJO, B.Q.; SILVA, J.N.; LIMA, D.J.B.; FERREIRA, P.M.P.; AIROLDI, F.P.S.; PESSOA, C.; CITÓ, A.M.G.L.. Assessing Chemical Constituents of *Mimosa caesalpinifolia* Stem Bark: Possible Bioactive Components Accountable for the Cytotoxic Effect of *M. caesalpinifolia* on Human Tumour Cell Lines. **Molecules**, v. 20, p. 4204–4224, 2015.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUNEOKA, K.; SHIRAI, Y.; YOKOYAMA, N.; WAKAI, T.; HATAKEYAMA, K. 5-Fluorouracil cardiotoxicity induced by alpha-fluoro-beta-alanine. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 10, p. 441–443, 2005.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, V. 92, N. 4, p. 327-332, 2011.

NCCAM. **National Center for Complementary and Alternative Medicine**. 2009 [updated 2009 Jan 16; cited 2009 Jan 16]; Available from: <http://nccam.nih.gov/health/whatiscam/overview.htm>.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-37, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.. Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NEMA, R.; KHARE, S.; JAIN, P.; PRADHAN, A.; GUPTA, A.; SINGH, D. Natural products potential and scope for modern cancer research. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 1270–1277, 2013.

NICHOLSON, K. M.; ADERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 5, p. 381 – 95, 2002.

NIKSERESHT, M.; KAMALI, A. M.; RAHIMI, H. R.; DELAVIZ, H.; TOOR, M. A.; KASHANI, I. R.; MAHMOUDI, R. The hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* suppresses migration and invasion of human breast cancer MDAMB- 468 and MCF-7 cell lines. **Journl Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 1, p. 87-95, 2017.

NICOLETTI, M. A.; CARVALHO, K. C.; OLIVEIRA JR., M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSSI, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Uso popular de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e/ou plantas medicinais: principais interações decorrentes. **Revista Saúde**, v. 4 n. 1, 2010.

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JÚNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSSI, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de Medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v.19, n 1/2, 2007.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WIT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. Incorporation into rna and dna in relation to thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals onco**, v. 15, p. 1025 – 1032, 2004.

NOOROZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.67, n.6, p.1210-1218, 1998.

NOVAKOVA, L.; VILDOVA, A.; MATEUS, J. P.; GONÇALVES, T.; SOLICH, P. Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. **Talanta**, v. 82, p. 1271-1280, 2010.

OLIVEIRA, A. E.; COSTA, T. D. Interações Farmacocinéticas entre as Plantas Medicinais *Hypericum perforatum*, *Gingko biloba* e *Panax gingseng* e Fármacos Tradicionais. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 567-78, 2004.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 1, p.32 – 40, 2014.

ORTIZ, M. I.; CARINO-CORTES, R. PONCE-MONTER, H. A.; GONZALEZ-GARCIA, M. P.; CASTANEDA-HERNANDE, G. SALINAS-CABALLERO, M. Synergistic Interaction of *Matricaria Chamomilla* Extract with Diclofenac and Indomethacin on Carrageenan-Induced Paw Inflammation in Rats. **Drug Development Research**, p. 1- 8, 2017

OZCELIK, B.; ORHAN, I.; TOKER, G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 632–638, 2006.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity in vitro – what we know and what we need to know. **Environment Health Perspectives**, v. 106, p. 559-568, 1998.

PHILIP, R. B. Herbal remedies: the good, the bad, and the ugly. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v.1, p. 1-11, 2004.

PIRZAD, A.; ALYARI, M.; SHAKIBA, S.; MOHAMMADI, A. Essential Oil Content and Composition of German Chamomile (*Matricaria Chamomilla* L.) at Different Irrigation Regimes. **Journal of Agronomy**, v. 5, p. 4515, 2006.

POPOCA, J.; AGUILAR, A.; ALONSO, D.; VILLARREAL, M. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. **J. Ethnopharmacol**, n. 59, p. 173-177, 1998.

QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic Med. Chem. Letters** 16 (16): 4243-4245, 2006.

RAINA, H.; SONI, G.; JAUHARI, N.; SHARMA, N.; BHARADVAJA, N.; Phytochemical importance of medicinal plants as potential sources of anticancer agents. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 1027-1035, 2014.

RAJKUMAR, V.; GUNJAN, G.; ASHOK, K. R, LAZAR, M. Evaluation of cytotoxic potential of *Acorus calamus* rhizome. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 13, p. 832–9, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. Ed. Guabanara Koogan AS. 7^a ed, 2012.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11, n. 4, p. 342-57, 2006.

ROMBI, M. **Cento Piante Medicinali**. Nuovo Istituto d'Arti Grafiche, Bergamo, Italy, p. 63-65, 1993.

RODRIGUES, T.S.; GUIMARÃES, S.F.; RODRIGUES-DAS-DÔRES, R.G.; GABRIEL, J.V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, p.587-590, 2011.

SCHOBER, C.; PAPAGEORGIOU, E.; HARSTRICK, A.; BOKEMEYER, C.; MUGGE, A.; et al. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil in combination with folinic acid in patients with gastrointestinal cancer. **Cancer**, v. 72, p. 2242–2247, 1993.

SCHWARTSMANN, G. Developing anticancer agents from natural sources. **Clinical Advances in Hematology & Oncology**, v. 5, p. 359-61, 2006.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n. 13, p.1107-1112, 1990.

SINGH, O.; KHANAM, Z.; MISRA, N.; SRIVASTAVA, M. K. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, p. 82–95, 2011.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Vol.15, n1, Campinas, Jan. 2002.

SOOBRAATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. **Biofactors**, v. 27, p. 19–35, 2006.

SORRENTINO, M. F.; KIM, J.; FODERARO, A. E.; TRUESDELL, A. G. 5-fluorouracil induced cardiotoxicity: review of the literature. **Cardiology Journal**, v. 19, p. 453–458, 2012.

SPANDIDOS, D. A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of BUON**, v. 1, p. 9 – 12, 2007.

SPEISKY, H.; ROCCO, C.; CARRASCO, C.; LISSI, E. A.; LÓPEZ-ALARCÓN, C. Antioxidant screening of medicinal herbal teas. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 6, p. 462–467, 2006.

SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S: Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9470-9478, 2007.

SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S. Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 1, n. 138, 2009.

SRIVASTAVA, J. K.; PANDEY, M.; GUPTA, S Chamomile, a novel and selective Cox-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. **Life Sciences**, v. 85, p. 663-669, 2009.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. **Molecular medicine reports**, v. 3, n. 6, p. 895901, 2010.

STEWART, H. L.; SNEU, K. C.; DUNHAM, L. J.; SCHLYIEN, S. M. Transplantable and transmissible tumor of animals. **Armed Forces Institute of pathology**, p. 324-329, Washigton: 1959.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in câncer. **Journal of oncology**, v. 2013, p.1-14, 2013.

SUGIURA, M., IMAI, S., SAKURADA, K., MIYAZAKI, T., OSATO, T. Cryptic dysfunctional cellular immunity in asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) carriers and its actualization by an environmental immunosuppressive factor. **In vivo**, v. 8, n. 6, p. 1019-1022. 1994.

SUSANTI, S.; IWASAKI, H.; ITOKAZU, Y., NAGO M, TAIRA N, SAITOH S, OKU H. Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctium lappa* L. **Journal of Natural Medicines**, 66:614–21, 2012.

SYNOLD, T. W.; DUSSAULT, I. FORMAN, B. M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. **Nature Medicine**, v. 7, p. 584–590, 2001.

SZOKE, E.; MADAY, E.; MARCZAL, G.; LEMBERKOVICS, E. Analysis of biologically active essential oil components of chamomiles in Hungary (in vivo – in vitro). **Acta Horticulturae**, v. 597, p. 275 – 284, 2003.

TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n 3, p. 793-804, 2007.

TASCILAR, M.; JONG, F.A.; VERWEIJ, J.; MATHIJSSSEN, R.H.J. Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence. **The Oncologist**, v. 11, p. 732-741, 2006.

TANNOCK, I. F. **The basic science of oncology**. 4th ed. 30. New York: McGraw Hill; 2005.

TEIXEIRA, C. C.; FUCHS, F. D. The efficacy of herbal medicines in clinical models: the case of Jambolan. **Journal Ethnopharmacology**, v. 108, n. 16-9, 2006.

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed., p.327-352, London: Academic Press, 1997.

TODER, V.; CARP, H.; FEIN, A.; TORCHINSKY, A. The role of pro- and anti- apoptotic molecular interactions in embryonic maldevelopment. **American journal of reproductive immunology**, v. 48, n4, p. 23544, 2002.

TRIPATHY, G.; PRADHAN, D. Evaluation of in vitro anti-proliferative activity and in vivo immunomodulatory activity of Beta vulgaris. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, p. 127–30, 2013.

UNDEVIA, S.D.; GOMES-ABUIN, G.; RATAIN, M.J. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 447–458, 2005.

UCHIDA, N. S.; SILVA-FILHO, S. E.; AGUIAR, R. P. WIIRZLER, L. A. M.; CARDIA, G. F. E. CAVALCANTE, H. A. O. SILVA-COMAR, F. M. S.; B. T. C. A.; SILVA, E. L.; BERSANI-AMADO C. A. CUMAN, R. K. N. Protective Effect of Cymbopogon citrates Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Liver Injury. **The American Journal of Chinese Medicine**, V. 45, N. 3, p. 1–18, 2017.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A.C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v. 84, p 627-639, 2005.

VIEIRA, R. C. F. **Estudo do uso de plantas medicinais e/ou produtos à base de plantas medicinais como tratamento complementares, por pacientes atendidos no Centro de Pesquisa Oncológicas – CEPON/SC**. 176f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. **Multequina**, v. 18, p. 87-115, 2009.

WALLACH, J. B. **Interpretação de exames laboratoriais**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, L.; SHAN, L.; FAN, G.; GAO, X. Liquorice, a unique “guide drug” of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions. **Journal Ethnopharmacol**, v. 150, n. 3, p.: 781–790, 2013.

WAY, T.D.; KAO, M. C; LIN, J. K. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/ neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol- 3'-kinase/Akt-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 279, p. 4479-4489, 2004.

WAYNFORTH, B.H. **Injection Techniques: Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. Academic Press, London, 1980.

WARD, L. S. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica*, n. 26, p. 103-7, 2000.

WEISS, R. F. **Herbal Medicine**. Gothenburg and BEAMConsfield: AB Arcanum and BEAMConsfield Publishers, p. 22-28, 1988.

WIGMORE, P. M.; MUSTAFA, S.; EL-BELTAGY, M.; LYONS, L.; UMKA, J.; BENNETT, G. Effects of 5-FU. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 678, p. 157-64, 2010.

WHO, World Health Organization. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva, v.1, 295p, 1999.

WOODCOCK, T.M.; MARTIN, D.S.; DAMIM, L.E.M.; KEMENY, N.E.; YOUNG C.W. Combination clinical trials with thymine and fluorouracil: a phase I and clinical pharmacologic evaluation. **Cancer**. v.45, p.1135-1143, 1980.

WRIGHT, P. J.; PLUMMER, D. T. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, p. 65-73, 1974.

WU, B.; ZHANG, Q.; SHEN, W.; ZHU, J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 313, p. 125–32, 2008.

YOU, J.S.; JONES, P.A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two sides of the same coin? **Cancer cell**, v.22, p.9-20, 2012.

YU, P.; ROWLEY, D. A.; FU, Y. X, SCHREIBER, H. The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 226–31, 2006.

YU, C.; LIU, S. L.; QI, M. H.; ZOU, X.; WU, J. ZHANG, J. Herbal medicine Guan Chang Fu Fang enhances 5-fluorouracil cytotoxicity and affects drug-associated genes in human colorectal carcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 9, p. 701-708, 2015.

ZAITER, L.; BOUHEROUM, M.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; LEÓN, F.; BROUARD, I.; QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F.; BERMEJO, J. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, n.8, p.533-538, 2007.

ZHENG, Y.; ZHOU, F.; WU, X.; WEN, X.; LI, Y.; YAN, B.; ZHANG, J.; HAO, G.; YE, W.; WANG, G. 23-hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.128, n. 3, p.615-617, 2010.

ZIVKOVIC, J.; RAZIC, S.; ARSENIJEVIC, J.; MAKSIMOVIC, Z. Heavy metals contents in *Veronica* species and soil from mountain area in Serbia. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, p. 959-970, 2012.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, n. 33, p.: 2278 - 2282, Oct. 1973.

ANEXO A –Protocolo de acompanhamento de Sinais e Sintomas

Sinais Indicativos de Sofrimento:

A) Foi formulada uma tabela a fim de avaliar alguns parâmetros para a sinalização de dor, tais como: movimentação, agitação, vocalização, presença de feridas abertas ou ulceração da pele, agressividade, sinais que evidenciam toxicidade, alteração no consumo de água e ração dos animais durante os nove dias de experimento. Essa tabela foi elaborada e adaptada com base nos artigos de WALL (1994) e MICH & HELLYER (2009).

B) Na tabela constam os parâmetros qualitativos (tipo de comportamento) e quantitativos (escores) avaliados para cada animal em experimentação, com uma frequência diária durante período de experimentação.

C) Os animais que apresentarem comportamento com mais de 2 parâmetros alterados e níveis de escores elevados (escore de 2 ou maior) serão sacrificados a fim de minimizar seu sofrimento (parâmetros preconizados pela OECD).

D) ESCORES DE CORTE

Comportamento alterado: Os animais que demonstrarem sinais intensos e persistentes de dor e sofrimento serão sacrificados por intervenção humana, incluindo o animal que apresentar dificuldade ao andar, se alimentar, brusca redução de peso, agressividade (dificuldade ao manipular o animal), apresentar salivação em excesso e/ou presença de vômitos, diarreia, ulcerações ou sangramentos.

Pontuação Nível de dor: 0 Sem dor, 1 Dor ligeira, 2 Dor moderada, 3 Dor intensa e 4 Dor excruciante.

Referência

Mich & Hellyer. Classificação da dor: Adaptada de: The Ohio State University Veterinary TEAMChing Hospital Pain Scale and Pain Management Form. 2009.

WALL, P.D. Defining “pain in animals”. In: SHORT, C.E., POZNAK, A.V. **Animal pain**. New York : Churchill Livingstone, cap.3. 63-79, 1994.

ANEXO B – Declaração do CEPA (Comitê de Ética em Pesquisa com Animais)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de interações entre plantas medicinais e o fármaco antineoplástico 5-fluorouracila aplicados em camundongos transplantados com o tumor sarcoma 180", registrada com o nº 60/2016, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Adriana Andrade Carvalho 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 20/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/07/2016, Término: 01/07/2017
Espécie/linhagem/raca	Camundongo Heterogênico
Nº de animais	144
Peso/Idade	25-30g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.


 Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS