



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

INGREDE TATIANE SERAFIM SANTANA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O EXTRATO AQUOSO E O ÓLEO
ESSENCIAL DO *CYMOPOGON CITRATUS* E O 5-
FLUOROURACIL NA RESPOSTA ANTITUMORAL EM
CAMUNDONGOS COM SARCOMA 180**

SÃO CRISTÓVÃO

2022

INGREDE TATIANE SERAFIM SANTANA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O EXTRATO AQUOSO E O
ÓLEO ESSENCIAL DO *CYMBOPOGON CITRATUS* E
O 5-FLUOROURACIL NA RESPOSTA
ANTITUMORAL EM CAMUNDONGOS COM
SARCOMA 180**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Andrade Carvalho
Coorientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

SÃO CRISTÓVÃO

2022

INGREDE TATIANE SERAFIM SANTANA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O EXTRATO AQUOSO E O
ÓLEO ESSENCIAL DO *CYMBOPOGON CITRATUS* E
O 5-FLUOROURACIL NA RESPOSTA
ANTITUMORAL EM CAMUNDONGOS COM
SARCOMA 180**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Andrade Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

1º Examinador: Prof. Dr. Felipe José Aidar Martins

2º Examinador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro dos Santos

3º Examinador: Profa. Dra. Anny Giselly Milhome da Costa Farre

4º Examinador: Prof. Dr. Felipe Rodrigues de Matos

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista a Deus, pois sem ti não somos nada, aos meus amados pais Maria Adriana e Jorge, aos meus doces e queridos avós Terezinha e João e Maria e Manoel (*In memorian*), a meu amado esposo Daniel e a nossa pequena filha de 4 patas Maya e a todos aqueles que se fizeram presentes durante esta caminhada.

Vocês foram fundamentais para essa conquista e fazem parte desta vitória!

AGRADECIMENTOS

Quatro anos se passaram e, junto a eles, muitas histórias vividas e desafios perpassados, desafios em que muitas vezes duvidava que seria capaz de superar. Quatro anos de aprendizado e de crescimento em busca da tão sonhada linha de chegada – que representa o fim de um ciclo e o começo de uma história regada de novos sonhos!

Quatro anos em que muitas portas abertas foram encontradas, mas também muitas portas fechadas. Quatro anos de muitos sorrisos, mas também de lágrimas e superação.

Lutar por nossos sonhos muitas vezes nos fazem enfrentar desafios inimagináveis que nos mostram o quanto somos fortes em momentos de fraqueza; o quanto somos grandes, ao nos sentirmos pequenos. Mas o caminho até aqui não foi trilhado sozinho, há muito o que agradecer!

Agradeço, primeiramente, a Deus, que em sua tamanha bondade me permitiu chegar até aqui e que não me desamparou em nenhum momento; a cada dia o senhor me mostrou que eu não precisava me sentir sozinha, pois Ele e todos os que me amavam estariam sempre ao lado.

Aos meus pais, avós e familiares, por todo amor e por mesmo sem compreender bem o que representava essa caminhada, se fizeram presentes em cada momento, demonstrando o orgulho que sentiam por mais essa conquista.

A meu esposo, por todo amor e dedicação, pela compreensão nos momentos em que estive ausente e por sempre estar presente a cada passo, trilhando junto esta caminhada em busca da realização de sonhos e, principalmente, por sempre acreditar mais em mim do que eu mesma.

A Profa. Dr. Adriana Andrade Carvalho e ao Prof. Dr. James Almada da Silva por me proporcionarem a oportunidade de trabalhar com algo tão lindo, que são os produtos naturais, oportunidade que me proporcionou crescimento pessoal e profissional durante esses quatro anos.

Aos professores e amigos que também fizeram parte desta caminhada e que foram fundamentais para mais essa conquista, em especial a Profa. Dra. Anny Giselly Milhome da Costa Farre e o Prof. Dr. Felipe Rodrigues de Matos; vocês são parte importante desta conquista e me ensinaram muito do que hoje sei.

A minha espetacular equipe de trabalho e queridos amigos, sem vocês esse dia não seria possível; vivemos muitas histórias juntos, com muitas risadas e brincadeiras que tornaram esse momento mais leve. Agradeço especialmente a Ricardo Amaral, Luiz André, Ianne, Lorrane, Kananda, Cleverton e Salviano por estarem sempre ao meu lado ao trilhar essa caminhada; a

amizade e a presença de vocês foi fundamental para chegada desse dia, contem comigo sempre que precisarem.

A todos os professores e laboratórios que tão gentilmente abriram suas portas para que esse trabalho pudesse ser realizado, principalmente ao Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo, Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório, Laboratório de Química de Produtos Naturais, Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia, Laboratório de Ensaio Farmacêuticos e Toxicidade, Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de Sergipe, Laboratório de Neurociência e Ensaio Farmacológicos, Laboratório de Biologia e Imunologia do Câncer e Leishmania e ao Laboratório de Hematologia e Toxicologia da Universidade Federal de Sergipe e ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes.

A Capes, Fapitec, CNPq e a Universidade Federal de Sergipe (UFS) pelo apoio à realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós - graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIs), pela oportunidade de fazer parte dessa família.

Aos professores e mestres do PROCFIs, por todo conhecimento compartilhado e pela disponibilidade em contribuir para nosso crescimento diário.

Aos colegas de turma, por trilharmos juntos por essa caminhada, dando força um ao outro e incentivando nosso crescimento.

E aos amigos, pela compreensão em todas as vezes que pelo dever tive que me ausentar.

Uma jornada termina, para que outra possa iniciar.

“Entrega o seu caminho ao senhor, confie nele,
e ele agirá!”

(Salmo 37:5)

RESUMO

Associação entre o extrato aquoso e o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* e o 5-fluorouracil na resposta antitumoral em camundongos com sarcoma 180, Ingrede Tatiane Serafim Santana, São Cristóvão, 2022.

Na oncologia, a quimioterapia continua a ser a terapêutica mais prevalente, utilizando de antineoplásicos como o 5-fluorouracil (5-FU). No entanto, em virtude de apresentar limitações, como a não especificidade celular e efeitos adversos associados, o uso de terapias alternativas, como plantas medicinais, tem sido gradativamente observado entre pacientes oncológicos, principalmente, com a finalidade de amenizar efeitos adversos associados, como náuseas e vômitos. O *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecido por capim - santo, capim - limão ou capim - cidreira, está entre as plantas medicinais utilizadas por pacientes oncológicos; no entanto, apesar da identificação de propriedades benéficas em seu uso, a associação de suas preparações (como extratos e óleos essenciais) com antineoplásicos é pouco explorada. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo investigar a associação entre o extrato aquoso e o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* e o 5-fluorouracil na resposta antitumoral em camundongos com Sarcoma 180. Trata-se de estudo experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA), pareceres nº 17/2019 e nº 2726280621. Análise cromatográfica foi realizada para identificação de constituintes do extrato e do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*. Ensaios *in vitro* foram realizados para avaliação da citotoxicidade em linhagens tumorais do câncer de pulmão (A549), melanoma (B16 - F10) e glioma (C6), utilizando o método Suforodamina B, e para avaliação da presença de atividade hemolítica em eritrócitos, através de ensaio de hemólise. A avaliação da associação do extrato aquoso do *Cymbopogon citratus* (EACC) e do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (OECC) com o 5-FU foi realizada em ensaio *in vivo* utilizando o tumor experimental Sarcoma 180 em protocolo de 9 dias (1º dia - inoculação do tumor S180 na região axilar esquerda; 2º ao 8º dia - tratamentos por via oral (EACC, OECC e veículo) ou intraperitoneal (5-FU), e 9º dia - coleta de material sanguíneo, órgãos (fígado, rins e baço) e tumores); análises adicionais também foram realizadas com o citral, constituinte identificado como majoritário do OECC; as doses utilizadas corresponderam a 50 e 100 mg/kg/dia para o EACC, 25 e 50 mg/kg/dia para o OECC e para o citral e 25 mg/kg/dia para o 5-FU. Os parâmetros avaliados frente a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral com o 5-FU incluíram a inibição tumoral e aspectos toxicológicos relacionados a massa corpórea, ingestão de água e consumo de ração, massa dos órgãos, parâmetros bioquímicos renais (ureia, creatinina e ácido úrico) e hepáticos (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina), parâmetros hematológicos eritrocitários (hemácia, hemoglobina e hematócrito) e leucocitários (leucócito total e diferencial) e análise morfológica dos órgãos. Análises estatísticas incluíram a regressão não-linear, o teste de normalidade de *Shapiro wilk*, a análise de variância de uma e duas vias e o pós teste de *Tukey*, utilizando o programa Prisma versão 8.0.2 (*GraphPad Software*). Análise cromatográfica identificou que o ácido clorogênico está presente no EACC e que o citral representa o constituinte majoritário do OECC. Ensaios *in vitro* evidenciaram que o EACC apresentou atividade citotóxica fraca para as linhagens tumorais da A549, B16 - F10 e C6, com grau de inibição celular (GI%) < 50%; por sua vez, o OECC e o citral apresentaram atividade citotóxica alta para as linhagens avaliadas, com %GI > 75%; adicionalmente, o OECC apresentou concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) < 30 µg/mL para as linhagens da A549 e B16-F10, considerado promissor para oncologia. Ensaio de hemólise identificou que o EACC apresentou toxicidade leve a eritrócitos na concentração de 1000 µg/mL; por sua vez, o OECC e o citral apresentaram toxicidade nas concentrações de 500

e 1000 µg/mL e toxicidade leve na concentração de 250 µg/mL. Ensaio *in vivo*, para investigação da associação do EACC, OECC e do citral com o 5-FU, identificou que não houve influência significativa da associação em relação a inibição do crescimento tumoral do S180. No experimento com EACC, o tratamento do S180 com 5-FU apresentou crescimento tumoral de $0,36 \pm 0,07$ g e os tratamentos com EACC 50 e 100 mg/kg/dia + 5-FU de $0,67 \pm 0,08$ g ($p=0,3532$) e $0,57 \pm 0,06$ ($p=0,7539$), respectivamente. No experimento com OECC e com o constituinte isolado citral, o grupo 5-FU apresentou crescimento tumoral de $0,22 \pm 0,04$ g, os grupos tratados com 25 e 50 mg/kg/dia do OECC + 5-FU de $0,55 \pm 0,13$ g ($p=0,3235$) e $0,24 \pm 0,07$ g ($p>0,9999$) e para o citral 25 e 50 mg/kg/dia + 5-FU de $0,28 \pm 0,04$ g ($p=0,9971$) e $0,22 \pm 0,06$ g ($p>0,9999$), respectivamente. Análises toxicológicas identificaram que a associação do EACC com o 5-FU resultou em alterações de parâmetros bioquímicos renais; elevação de ácido úrico foi identificada frente a associação de EACC 100 mg/kg/dia com o 5-FU e redução da creatinina foi identificada frente a associação entre o EACC 50 e 100 mg/kg/dia com o 5-FU, sugerindo que apesar da presença de elevação de ácido úrico, papel nefroprotetor pode estar presente ao reduzir valores de creatinina em relação ao grupo tratado isolado do 5-FU. No uso do OECC 50 mg/kg/dia com o 5-FU, elevação da ingesta de água foi encontrada quando comparado ao tratamento isolado do 5-FU, sem diferença estatística com o controle negativo com tumor, sugerindo a preservação dos hábitos de ingesta de água alterados pelo 5-FU; não foram identificadas alterações toxicológicas relacionadas a associação do constituinte isolado citral com o 5-FU. Desse modo, os achados encontrados salientam que o OECC apresenta papel promissor frente as linhagens B16-F10 e A549, que pode estar relacionado, principalmente, ao citral, identificado como constituinte majoritário do OECC e que apresenta atividade citotóxica alta frente as linhagens tumorais avaliadas; no entanto, a presença de atividade hemolítica no OECC em concentrações $\Rightarrow 250$ µg/mL pode representar uma limitação em seu uso e deve ser considerada em análises posteriores. Adicionalmente, a associação do EACC, OECC e do citral com o antineoplásico 5-FU concluiu que não houve influência da associação frente a inibição tumoral do S180, nas doses utilizadas no presente estudo, e que alterações podem ocorrer na ingesta de água frente o tratamento associado do OECC com o 5-FU e em parâmetros renais frente o tratamento associado do EACC com o 5-FU, na terapêutica oncológica.

Descritores: Interações Ervas-Drogas; Plantas medicinais; Capim - santo; Anticarcinógenos; Fluoruracila.

ABSTRACT

Association between aqueous extract and essential oil of *Cymbopogon citratus* and 5-fluorouracil in the antitumor response in mice with sarcoma 180, Ingrede Tatiane Serafim Santana, São Cristóvão, 2022.

In oncology, chemotherapy remains the most prevalent therapy, using antineoplastic drugs such as 5-fluorouracil (5-FU). However, due to limitations, such as cellular non-specificity and associated adverse effects, the use of alternative therapies, such as medicinal plants, has gradually been observed among cancer patients, mainly with the aim of mitigating associated adverse effects, such as nausea and vomiting. The *Cymbopogon citratus*, popularly known as lemongrass, is among the medicinal plants used by cancer patients; however, despite the identification of beneficial properties in its use, the association of its preparations (such as extracts and essential oils) with antineoplastics is little explored. In this sense, the present study aimed to investigate the association between the aqueous extract and the essential oil of *Cymbopogon citratus* and 5-fluorouracil in the antitumor response in mice with Sarcoma 180. This is an experimental study approved by the Animal Research Ethics Committee (CEPA), opinions nº 17/2019 and nº 2726280621. Chromatographic analysis was performed to identify constituents of the extract and essential oil of *Cymbopogon citratus*. In vitro assays were performed to evaluate cytotoxicity in lung cancer (A549), melanoma (B16-F10) and glioma (C6) tumour cell lines, using the Sulforhodamine B method, and to evaluate the presence of hemolytic activity in erythrocytes, through of hemolysis assay. The evaluation of the association of the aqueous extract of *Cymbopogon citratus* (EACC) and *Cymbopogon* essential oil citratus (OECC) with 5-FU was performed in an in vivo assay using the experimental tumour Sarcoma 180 in a 9-day protocol (1st day - inoculation of the S180 tumour in the left axillary region; 2nd to 8th day - oral treatments (EACC, OECC and vehicle) or intraperitoneal (5 - FU), and 9th day - a collection of blood material, organs (liver, kidneys and spleen) and tumors); additional analyzes were also carried out with citral, the constituent identified as the majority of the OECC; the doses used corresponded to 50 and 100 mg/kg/day for EACC, 25 and 50 mg/kg/day for OECC and citral and 25 mg/kg/day for 5-FU. The parameters evaluated in relation to the association of EACC, OECC or the isolated citral constituent with 5-FU included tumour inhibition and toxicological aspects related to body mass, water intake and feed consumption, organ mass, renal biochemical parameters (urea, creatinine and uric acid) and liver (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase), erythrocyte hematological parameters (red blood cells, hemoglobin and hematocrit) and leukocytes (total and differential leukocytes) and morphological analysis of the organs. Statistical analyzes included non-linear regression, the Shapiro Wilk normality test, one-way and two-way analysis of variance and Tukey's post-test, using the Prisma program version 8.0.2 (GraphPad Software). The chromatographic analysis identified that chlorogenic acid is present in the EACC and that citral represents the major constituent of the OECC. In vitro assays showed that EACC showed weak cytotoxic activity for A549, B16 - F10 and C6 tumour lines, with a degree of cellular inhibition (GI%) < 50%; in turn, OECC and citral showed high cytotoxic activity for the evaluated strains, with %GI > 75%; additionally, the OECC showed an inhibitory concentration capable of causing 50% of the maximum effect (CI₅₀) < 30 µg / mL for A549 and B16-F10 strains, considered promising for oncology. Hemolysis assay identified that EACC showed low toxicity to erythrocytes at a concentration of 1000 µg / mL; in turn, OECC and citral showed toxicity at concentrations of 500 and 1000 µg / mL and low toxicity at concentrations of 250 µg / mL. An in vivo assay to investigate the association of EACC, OECC and citral with 5-FU, identified that there was no significant influence of the association

in relation to the inhibition of tumour growth of S180. In the experiment with EACC, the treatment of S180 with 5-FU showed tumor growth of $0,36 \pm 0,07$ g and the treatments with EACC 50 and 100 mg/kg/day + 5 - FU of $0,67 \pm 0,08$ g ($p=0,3532$) and $0,57 \pm 0,06$ ($p=0,7539$), respectively. In the experiment with OECC and with the isolated citral constituent, group 5 - FU showed tumor growth of $0,22 \pm 0,04$ g, the groups treated with 25 and 50 mg/kg/day of OECC + 5-FU of $0,55 \pm 0,13$ g ($p=0,3235$) and $0,24 \pm 0,07$ g ($p>0,9999$) and for citral 25 and 50 mg/kg/day + 5-FU of $0,28 \pm 0,04$ g ($p=0,9971$) and $0,22 \pm 0,06$ g ($p>0,9999$), respectively. Toxicological analyzes identified that the association of EACC with 5-FU resulted in changes in renal biochemical parameters; elevation of uric acid was identified against the association of EACC 100 mg/kg/day with 5-FU and a reduction in creatinine was identified against the association between EACC 50 and 100 mg/kg/day with 5-FU, suggesting that despite the presence of uric acid elevation, a nephroprotective role may be present in reducing creatinine values in relation to the 5-FU treated group alone. In the use of OECC 50 mg/kg/day with 5-FU, an increase in water intake was found when compared to the isolated treatment of 5-FU, with no statistical difference with the negative control with tumour, suggesting the preservation of drinking habits of water altered by 5-FU; no toxicological alterations related to the association of the isolated citral constituent with 5 - FU were identified. Thus, the findings point out that the OECC has a promising role against the B16 - F10 and A549 strains, which may be mainly related to citral, identified as the major constituent of the OECC and which has high cytotoxic activity against the tumour strains evaluated; however, the presence of hemolytic activity in the OECC at concentrations $\Rightarrow 250 \mu\text{g} / \text{mL}$ may represent a limitation in its use and should be considered in further analyses. Additionally, the association of EACC, OECC and citral with the antineoplastic 5-FU concluded that there was no influence of the association against tumour inhibition of S180, at the doses used in the present study, and that changes may occur in water intake against the treatment OECC associated with 5 - FU and in renal parameters compared to the associated treatment of EACC with 5 - FU, in oncological therapy.

Keywords: Herb-Drug Interactions; Plants, Medicinal; Cymbopogon; Anticarcinogenic Agents; Fluorouracil.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

No adoecimento por câncer, a quimioterapia continua sendo o principal tratamento realizado entre os pacientes; no entanto, sua utilização pode trazer diferentes efeitos indesejados para o indivíduo, como o convívio com sintomas que podem incluir náuseas e vômitos decorrentes do tratamento. Dessa forma, pacientes que vivenciam o câncer habitualmente utilizam de diferentes chás e óleos essenciais de plantas medicinais para melhoria de sintomas indesejados, como o chá e o óleo do capim - santo. No entanto, o chá e o óleo do capim - santo também podem apresentar atividades contra o câncer e até mesmo influenciar na atividade dos medicamentos utilizados na quimioterapia, o que pode trazer prejuízos ou benefícios para o tratamento. Dessa forma, o presente estudo foi realizado para conhecer propriedades do chá e do óleo essencial do capim - santo frente ao câncer e se sua associação com uma droga quimioterápica, o 5-fluorouracil, pode ser benéfica ou maléfica para o tratamento de um câncer experimental, o Sarcoma 180. Os resultados encontrados demonstraram que o óleo essencial do capim – santo pode ser uma droga em potencial para cânceres de pulmão e melanoma, e que seu principal constituinte, o citral, também apresenta importante atividade contra os cânceres avaliados; apesar disso, o óleo essencial também pode ser maléfico a componentes do sangue. Em experimento com animais, o chá e o óleo essencial do capim - santo não apresentaram atividade contra o câncer avaliado, mas trouxeram indicativos que poderiam trazer benefícios para o tratamento com o antineoplásico, como a possível proteção da atividade dos rins pelo chá do capim - santo e preservação de hábitos de ingestão de água pelo óleo essencial, no tratamento com o quimioterápico. Os achados do estudo trazem indícios de importantes atividades do capim - santo e reforçam que produtos naturais, como plantas medicinais, podem ser promissores para o tratamento do câncer. No entanto, o uso de chás, óleos essenciais ou compostos isolados em conjunto com o tratamento do câncer pode trazer consequências ruins a pessoa e alterar os efeitos dos medicamentos utilizados para doença; dessa forma, o uso de produtos naturais, como o óleo e o chá do capim - santo, em conjunto com medicamentos quimioterápicos deve ser evitado e, quando realizado, deve ser informado aos profissionais que o acompanham para que possam orientá-lo corretamente quanto ao uso de produtos naturais.

Palavras – chave: Câncer; Capim – santo; Quimioterapia.

ABSTRACT FOR SOCIETY

In cancer illness, chemotherapy remains the main treatment performed among patients; however, its use can bring different unwanted effects to the individual, such as living with symptoms that may include nausea and vomiting resulting from the treatment. Thus, patients who experience cancer usually use different teas and essential oils from medicinal plants to improve unwanted symptoms, such as tea and lemongrass oil. However, tea and lemongrass oil can also have activities against cancer and even influence the activity of drugs used in chemotherapy, which can bring harm or benefits to the treatment. Thus, the present study was carried out to know the properties of tea and the essential oil of lemongrass against cancer and if its association with a chemotherapy drug, 5-fluorouracil, can be beneficial or harmful for the treatment of experimental cancer, Sarcoma 180. The results found showed that the essential oil of lemongrass can be a potential drug for lung and melanoma cancers and that its main constituent, citral, also has important activity against the evaluated cancers; nevertheless, the essential oil can also be harmful to blood components. In an experiment with animals, the tea and the essential oil of lemongrass did not present activity against evaluated cancer, but they brought indications that could bring benefits to the treatment with the antineoplastic, such as the possible protection of the activity of the kidneys by the tea of lemongrass and preservation of habits of water intake by the essential oil, in the treatment with the chemotherapeutic. The findings of the study bring evidence of important activities of lemongrass and reinforce that natural product, such as medicinal plants, may be promising for the treatment of cancer. However, the use of teas, essential oils or isolated compounds together with the treatment of cancer can have bad consequences for the person and change the effects of the drugs used for the disease; therefore, the use of natural products, such as lemongrass oil and tea, together with chemotherapeutic drugs should be avoided and, when performed, it should be informed to the professionals who accompany the patient so that they can correctly guide him or her as to the use of natural products.

Keywords: Cancer; Lemongrass; Chemotherapy.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de divisão celular e ciclinas específicas que atuam em associação com quinases dependentes de ciclina (CDKs) na checagem do processo de divisão celular.....	27
Figura 2. Representação da fase de interfase e fase M no processo de divisão celular.....	27
Figura 3. Crescimento celular representativo de tumores benignos e malignos.....	28
Figura 4. Etapas de iniciação, promoção e progressão no processo de tumorigênese ou carcinogênese.....	29
Figura 5. Fórmula estrutural do 5-FU (C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂).....	34
Figura 6. Representação do <i>C. citratus</i>	39
Tabela 1. Metabólitos secundários presentes em extratos e óleos essenciais do <i>C. citratus</i>	42
Figura 7. Descrição do desenho metodológico do estudo.....	47
Figura 8. Folhas do <i>C. citratus</i> trituradas e homogeneizadas para preparo do EACC.....	48
Figura 9. Etapas do preparo do EACC por extração à quente por infusão.....	49
Tabela 2. Método gradiente utilizado para cromatografia líquida do EACC.....	51
Tabela 3. Linhagens de células tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	53
Figura 10. Ensaio de hemólise para avaliação da presença de atividade hemolítica no EACC e no OECC.....	57
Tabela 4. Grupos experimentais para avaliação da associação do EACC e o antineoplásico 5-FU e vias de administração.....	59
Tabela 5. Grupos experimentais para avaliação da associação do OECC e o antineoplásico 5-FU e vias de administração.....	60
Figura 11. Descrição do protocolo experimental para avaliação da associação do EACC e OECC com o antineoplásico 5-FU no S180.....	62
Figura 12. Análise cromatográfica do EACC obtida em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência.....	67
Tabela 6. Identificação de constituintes químicos presentes no OECC.....	68
Figura 13. Análise cromatográfica do OECC obtida em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.....	68
Figura 14. Espectro de massas do neral.....	69
Figura 15. Espectro de massas do geranial.....	69
Figura 16. Estrutura química do neral e geranial.....	69

Tabela 7. Grau de inibição celular do EACC, OECC e do constituinte isolado citral frente as linhagens de células tumorais da A549, B16-F10 e C6.....	70
Tabela 8. Concentração inibitória média capaz de produzir 50% do efeito máximo (CI ₅₀) do OECC e do constituinte isolado citral frente as linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6.....	70
Tabela 9. Atividade hemolítica do OECC e do constituinte isolado citral em eritrócitos.....	71
Figura 17. Efeito da associação entre o antineoplásico 5-FU e o EACC nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia frente ao crescimento da massa tumoral do S180.....	72
Figura 18. Efeito da associação entre o antineoplásico 5-FU e o OECC nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia frente ao crescimento da massa tumoral do S180.....	73
Figura 19. Efeito da associação entre o antineoplásico 5-FU e o constituinte isolado citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia frente ao crescimento da massa tumoral do S180.....	74
Tabela 10. Variação início ao fim da massa corporal dos grupos experimentais tratados com EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	75
Figura 20. Variação da massa corporal nos dias pares dos grupos experimentais tratados com EACC em mg/kg/dia associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	76
Tabela 11. Consumo médio de ração e de ingesta de água dos grupos experimentais tratados com EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	77
Tabela 12. Variação início ao fim da massa corporal dos grupos experimentais tratados com OECC ou com o constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	77
Figura 21. Variação da massa corporal nos dias pares dos grupos experimentais tratados com OECC associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	79
Figura 22. Variação da massa corporal dia a dia dos grupos experimentais tratados com o constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	79
Tabela 13. Consumo médio de ração e de ingesta de água dos grupos experimentais tratados com OECC ou com o constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU.....	80
Tabela 14. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU na massa dos órgãos de camundongos com e sem tumor S180.....	81
Tabela 15. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU na massa dos órgãos de camundongos com e sem tumor S180.....	82
Tabela 16. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros hepáticos e renais em camundongos com e sem tumor S180.....	83
Tabela 17. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros hepáticos e renais em camundongos com e sem tumor S180.....	84

Tabela 18. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros eritrocitários de camundongos com e sem tumor S180.....	86
Tabela 19. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros leucocitários de camundongos com e sem tumor S180.....	87
Tabela 20. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros eritrocitários de camundongos com e sem tumor S180.....	88
Tabela 21. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros leucocitários de camundongos com e sem tumor S180.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU.....	5-fluorouracil
rpm.....	Rotações por minuto
A549.....	Linhagem de carcinoma de pulmão
AD.....	Água destilada
ALT.....	Alanina aminotransferase
AST.....	Aspartato aminotransferase
B16-F10.....	Linhagem de melanoma
C6.....	Linhagem de glioma
<i>C. citratus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
CDKs.....	Quinases dependentes de ciclina
CI ₅₀	Concentração inibitória média capaz de produzir 50% do efeito máximo
CLAE.....	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DMEM.....	<i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
EACC.....	Extrato aquoso do <i>Cymbopogon citratus</i>
EDTA.....	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FA.....	Fosfatase Alcalina
FID.....	Detector por ionização em chama
GC.....	Cromatografia em fase gasosa
GI.....	Grau de inibição tumoral
H.....	Hemólise
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
IT.....	Inibição do crescimento tumoral
LD.....	Limite de detecção
LQ.....	Limite de quantificação
MS.....	Espectrometria de massas
OECC.....	Óleo essencial do <i>Cymbopogon citratus</i>
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
RNA.....	Ácido Ribonucléico
S180.....	Sarcoma 180

SFB.....	Soro fetal de bovino
SRB.....	Sulfrodamina B
UFS.....	Universidade Federal de Sergipe
UV/Vis.....	Ultravioletas visíveis
TA.....	Temperatura ambiente
tr.....	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Câncer.....	23
2.1.1 Epidemiologia do câncer.....	23
2.1.2 Fisiopatologia do câncer.....	24
2.1.3 Terapêutica oncológica quimioterápica e o 5-fluorouracil.....	31
2.2 Plantas medicinais e a terapêutica oncológica.....	35
2.2.1 O gênero <i>Cymbopogon</i> e o câncer.....	37
2.2.1.1 O <i>C. citratus</i>	39
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo geral.....	46
3.2 Objetivos específicos.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Desenho metodológico.....	47
4.2 Material utilizado.....	48
4.2.1 Kits, fármacos e reagentes.....	48
4.3 Obtenção do extrato aquoso e do óleo essencial do <i>C. citratus</i>.....	48
4.3.1 Preparo do EACC.....	48
4.3.2 Liofilização do EACC.....	50
4.4 Identificação de constituintes químicos presentes no EACC e OECC.....	50
4.4.1 Análise cromatográfica do EACC.....	50
4.4.2 Análise cromatográfica do OECC.....	52
4.5 Ensaios de citotoxicidade.....	53
4.5.1 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do EACC e do OECC em linhagens celulares tumorais.....	53
4.5.1.1 Obtenção e manutenção das linhagens tumorais.....	53
4.5.1.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagens de células tumorais e determinação da CI_{50}	54
4.5.1.2.1 Determinação do grau de inibição celular do EACC e do OECC na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$	54
4.5.1.2.2 Determinação da CI_{50} do EACC e OECC.....	56
4.5.2 Avaliação da presença de atividade hemolítica no EACC e no OECC.....	56

4.5.2.1	Atividade hemolítica do EACC e do OECC em eritrócitos.....	56
4.5.2.2	Procedimento experimental.....	56
4.6	Associação <i>in vivo</i> do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU.....	58
4.6.1	Animais.....	58
4.6.2	Tumor experimental sarcoma 180.....	58
4.6.3	Grupos experimentais.....	59
4.6.4	Avaliação da associação do EACC e OECC com o antineoplásico 5-FU no S180.....	61
4.6.4.1	Protocolo experimental.....	61
4.6.4.2	Avaliação de parâmetros toxicológicos.....	64
4.6.4.2.1	Determinação da massa corpórea.....	64
4.6.4.2.2	Determinação da ingesta de água e consumo de ração.....	64
4.6.4.2.3	Determinação da massa dos órgãos.....	64
4.6.4.2.4	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	65
4.6.4.2.5	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	65
4.6.4.2.6	Avaliação morfológica dos órgãos.....	66
4.7	Análise estatística.....	66
5	RESULTADOS.....	67
5.1	Constituintes químicos presentes no EACC e no OECC.....	67
5.2	Atividade citotóxica do EACC e do OECC <i>in vitro</i>.....	70
5.3	Atividade hemolítica do EACC e do OECC frente a eritrócitos.....	71
5.4	Associação <i>in vivo</i> do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU.....	72
5.5	Avaliação de aspectos toxicológicos frente a associação do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU <i>in vivo</i>.....	75
5.5.1	Massa corpórea, ingesta de água e consumo de ração.....	75
5.5.2	Massa dos órgãos.....	81
5.5.3	Parâmetros bioquímicos hepáticos e renais.....	83
5.5.4	Parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários.....	86
5.5.5	Análise morfológica dos órgãos.....	89
6	DISCUSSÃO.....	90
7	CONCLUSÃO.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107
	APÊNDICES.....	125
	ANEXOS.....	127

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um problema de saúde mundial e multifacetado (NATURE, 2020) descrito como um conjunto de mais de 100 doenças que possuem como característica comum o crescimento desordenado de células desdiferenciadas, com multiplicação descontrolada e aquisição de propriedades metastáticas através do processo de carcinogênese (INCA, 2020a). Seu desenvolvimento está associado, principalmente, ao desequilíbrio em mecanismos responsáveis pelo controle dos processos de proliferação e morte celular (FEITELSON *et al.*, 2016).

O câncer é considerado a segunda causa mais comum de morte (BARBOSA *et al.*, 2015; NAGAI; KIM, 2017). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 625 mil novos casos de neoplasias malignas para cada ano do triênio 2020 - 2022, com maior prevalência para os cânceres de próstata (66 mil) e mama (66 mil) entre homens e mulheres, respectivamente, excluindo-se o câncer de pele não melanoma; o cálculo global corrigido estima a ocorrência de 685 mil novos casos a cada ano (INCA, 2020b).

Elevadas taxas de adoecimento por câncer trazem consigo a importância da implementação da terapêutica adequada, com diferentes modalidades de tratamento sistêmico (quimioterapia, antiangiogênicos, hormonioterapia, terapia alvo e imunoterapia) e local (cirurgia, radioterapia e terapia fotodinâmica) têm sido estudadas e utilizadas na terapia oncológica curativa e paliativa (PALUMBO *et al.*, 2013; MARMÈ, 2016; GE *et al.*, 2017). Apesar disso, a terapia sistêmica quimioterápica continua sendo a mais utilizada, associada ou não a cirurgia e/ou radioterapia, como terapias locais (COSTA *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2017; ABBAS; REHMAN, 2018).

A terapia sistêmica quimioterápica apresenta limitações, como a não especificidade celular – que compromete a diferenciação entre células desdiferenciadas e normais – e efeitos adversos associados, como diarreia, náuseas, alopecia, imunossupressão e maior susceptibilidade a infecções, impulsionando a investigação contínua de novas terapias oncológicas (BRANDÃO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2015; FERNANDO; JONES, 2015).

A utilização de produtos naturais no câncer, por exemplo, tem sido avaliada (RAJESH *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2019), principalmente frente a gradativa observação clínica de seu uso como terapia alternativa entre pacientes oncológicos; e, entre os produtos naturais utilizados, destaca-se o uso de plantas medicinais, que são amplamente difundidas desde a antiguidade para o controle de diferentes doenças e que tem representado alvo da realização de diferentes estudos para sua caracterização e identificação de propriedades farmacológicas

(CORDELL; BEECHER; PEZZUT, 1991; POPOCA *et al.*, 1998; JAHANBAN-ESFAHLAN *et al.*, 2015; CAETANO *et al.*, 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2018).

No entanto, apesar do uso de plantas medicinais ser sugerido, em maioria, como confiável e vantajoso (WANG *et al.*, 2013), ao ser associado a fármacos antineoplásicos podem produzir interações ervas – drogas que resultem, por exemplo, na elevação ou diminuição da resposta terapêutica e em efeitos adversos, como citotoxicidade (GAUI, 2010) – principalmente ao considerar a estreita janela terapêutica do fármaco, em que alterações devido a interações podem trazer consequências letais ao paciente oncológico (TASCILAR *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2015).

A descoberta de métodos alternativos advindos de produtos naturais representa um caminho promissor na oncologia; no entanto, é fundamental compreender que o uso indiscriminado de plantas medicinais sem conhecimento prévio sobre suas características e propriedades pode trazer consequências ao paciente, que devem ser investigadas e conhecidas pelo profissional e paciente (RAJESH *et al.*, 2015; CRAGG; PEZZUTO, 2016; AMARAL *et al.*, 2019).

Em Sergipe, estudo realizado com 331 pacientes oncológicos identificou o uso de 33 plantas medicinais associadas a quimioterapia, entre os 164 pacientes que referiram o uso de produtos naturais associados ao tratamento oncológico convencional; e, entre as plantas medicinais descritas, o uso do *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (*C. citratus*), conhecido popularmente por capim-santo, capim-cidreira ou capim-limão, foi relatado. Potencial interação entre o *C. citratus* e o antineoplásico ciclofosfamida também foi levantada, suscitando que seu uso indiscriminado pode interferir diretamente em efeitos de antineoplásicos e salientando a necessidade da compreensão de possíveis associações entre a planta medicinal e agentes antineoplásicos (CAETANO *et al.*, 2018).

O *C. citratus* é utilizado pela população, principalmente, em forma de extratos e óleos essenciais; desse modo, seu uso tem influenciado estudos para investigação de propriedades farmacológicas existentes em preparações de extratos e óleos essenciais do *C. citratus*, a exemplo do potencial papel promissor de suas preparações como droga antitumoral e quimiopreventiva (PUATANACHOKCHAI *et al.*, 2002; BIDINOTTO *et al.*, 2010; BIDINOTTO *et al.*, 2012; PIARU *et al.*, 2012; STONE *et al.*, 2013; HALABI; SHEIKH, 2014; THANGAM *et al.*, 2014; BAO *et al.*, 2015; PHILION *et al.*, 2017; BAYALA *et al.*, 2018; MARUOKA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019).

Estudo realizado para avaliação do efeito do óleo essencial do *C. citratus* evidenciou que seu uso em linhagens de células tumorais foi associado a maior atividade antioxidante e

antitumoral (BAYALA *et al.*, 2018). No entanto, seu uso deve ser realizado com cautela, visto que preparações do *C. citratus* podem interagir com antineoplásicos e atuar na elevação ou redução de suas concentrações e em seus efeitos farmacológicos (BACHMANN *et al.*, 2006; CAETANO *et al.*, 2018).

A gradativa realização de estudos sobre produtos naturais no câncer salienta, desse modo, que apesar do conhecimento popular e científico já existente sobre os benefícios do *C. citratus* (PHILION *et al.*, 2017; BAYALA *et al.*, 2018; MARUOKA *et al.*, 2018), propriedades antitumorais de suas preparações, como extratos e óleos essenciais, também devem ser consideradas; adicionalmente, efeitos da interação ervas – drogas na quimioterapia também devem ser esclarecidos (BACHMANN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, considerando a importância do conhecimento sobre a atividade antitumoral e de efeitos associativos entre plantas medicinais e fármacos, por ambos serem constituídos por agentes farmacologicamente ativos e seu uso concomitante poder resultar em associações medicamentosas (SANTOS, 2018), o presente estudo teve por objetivo investigar a associação entre o extrato aquoso e o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* e o 5-fluorouracil na resposta antitumoral em camundongos com Sarcoma 180.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

2.1.1 Epidemiologia do câncer

O termo câncer provém do grego *Karkinus*, que significa caranguejo (INCA, 2020a); sua denominação é resultado, por exemplo, da observação de que os vasos sanguíneos dispostos ao lado de formações tumorais ou neoplasias malignas mamárias, se assemelhavam a patas de caranguejo (FAGUET, 2015).

O câncer é considerado um problema global de saúde pública, tornando fundamental a adoção de estratégias que visem o seu enfrentamento e, principalmente, a implementação de medidas de prevenção e promoção a saúde (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2019).

Cânceres são responsáveis por causar temores a população desde os tempos pré-históricos; no entanto, aumento gradativo de sua prevalência tem ocorrido nas últimas décadas, principalmente, frente a adoção de comportamentos de risco pela população e a maior exposição a agentes cancerígenos em diferentes locais, como a exposição ocupacional (FAGUET, 2015).

São caracterizados como doenças não transmissíveis e correspondem a segunda causa de mortalidade no mundo, estando atrás apenas de doenças cardiovasculares; e, apesar da ocorrência de redução na taxa de mortalidade por câncer entre os anos de 2005 e 2015, por exemplo, diferenças em seu enfrentamento são amplamente observadas entre países de alta e baixa renda, fator que ao ser associado ao aumento da taxa de sua incidência, fortalece a importância da adoção de estratégias de atenção à saúde para o enfrentamento da doença (NAGAI; KIM, 2017).

O câncer de pele, próstata e cânceres traqueal, brônquio e de pulmão foram evidenciados como os mais incidentes entre homens e, os cânceres de pele não melanoma, mama e colorretal, entre as mulheres no ano de 2017; maiores taxas de mortalidade foram evidenciadas para os cânceres de fígado, estômago, traqueal, brônquio e pulmão para o sexo masculino e de mama, traqueal, brônquio, pulmão e colorretal para o feminino (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2019).

No Brasil, dados sobre a mortalidade por câncer entre os anos de 1978 e 2017 demonstraram aumento progressivo nas taxas de neoplasias malignas entre homens e mulheres,

com maiores taxas de mortalidade incluindo o câncer de colo de útero, pulmão, mama, próstata e colorretal (SILVA *et al.*, 2020).

Estimativas do INCA para o triênio 2020-2022 indicaram a ocorrência de 625 mil novos casos de neoplasias malignas (685 mil novos casos em cálculo global corrigido) incluindo o câncer de pele não melanoma, com maior incidência apresentada para os cânceres de pele não melanoma, mama, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago, principalmente na região Sudeste; para mulheres, o câncer de mama foi considerado o mais prevalente em todas as regiões, e para os homens o de próstata, excluindo-se o câncer de pele não melanoma (que representou 27,1% de todos os casos para os homens e 29,5% para mulheres) (INCA, 2020b).

Dados do INCA também indicaram que para o estado de Sergipe, 5.950 novos casos de neoplasias malignas eram estimados, com 3.010 novos casos em sua capital, Aracaju; entre as neoplasias malignas mais prevalentes para o estado de Sergipe e para sua capital, o câncer de próstata foi considerado o mais prevalente entre os homens, seguido pelo câncer de pele não melanoma e, para as mulheres, o câncer de pele não melanoma foi considerado o mais prevalente, seguido pelo câncer de mama (INCA, 2020b).

O câncer tem apresentado uma ampla variação em relação a sua incidência e mortalidade em diferentes países, principalmente quando relacionado a questões socioeconômicas e hábitos de vida; seu crescimento tem ocorrido em todo o mundo, de forma independente ao crescimento demográfico, tornando fundamental o monitoramento de sua incidência e mortalidade para adoção de prioridades e de medidas que visem o seu controle, além da avaliação da eficácia das medidas implementadas (SILVA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a compressão da fisiopatologia do câncer torna-se fundamental para a adoção de medidas de prevenção, promoção, recuperação e reabilitação em saúde frente a neoplasias que, além de elevadas taxas de incidência e prevalência, associam-se a elevadas taxas de mortalidade no mundo.

2.1.2 Fisiopatologia do câncer

O câncer é considerado como um grupo de mais de 100 doenças que apresentam como característica comum o crescimento desordenado de células desdiferenciadas ou malignas, relacionado a diferentes fatores de risco intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo (INCA, 2020a).

Fatores intrínsecos incluem características não modificáveis pelo indivíduo, como erros aleatórios na replicação do DNA; por sua vez, fatores extrínsecos podem ser modificáveis,

como estilo de vida e exposição a carcinógenos, ou parcialmente modificáveis, como a imunidade, metabolismo e níveis hormonais do indivíduo (WU *et al.*, 2018).

A discussão sobre a influência de fatores intrínsecos no câncer é um fator amplamente presente na literatura, levantando-se aspectos, por exemplo, como a evidência de que não se são conhecidos todos os riscos extrínsecos relacionados ao favorecimento de neoplasias e que fatores como a exposição ambiental, a ativação de oncogenes e efeitos epigenéticos e não mutagênicos podem exercer papel fundamental no desenvolvimento de cânceres; de forma que a contribuição de fatores intrínsecos não modificáveis para a presença de mutações e o desenvolvimento de neoplasias pode ser pequena (ZHU; WU; HANNUN, 2017).

A epigenética, que corresponde a modificações dinâmicas e hereditárias que independem do genoma humano, ou seja, das informações contidas na cadeia de DNA do indivíduo, também tem sido gradativamente associada ao desenvolvimento de neoplasias; especialmente, por favorecerem a expressões genéticas inadequadas que podem atuar no processo de carcinogênese ou tumorigênese (LU *et al.*, 2020).

Alterações epigenéticas estão relacionadas a marcas químicas, como a presença de grupos fosfato, metil ou acetil no DNA ou em proteínas estruturais; podem incluir, por exemplo, a metilação do DNA e a reprogramação epigenética embrionária do DNA (BRETON-LARRIVÉE; ELDER; MCGRAW, 2019).

Dessa forma, fatores epigenéticos têm sido relacionadas a cooperação com alterações genéticas, atuando de forma conjunta no fenótipo de neoplasias (BAYLIN; JONES, 2016). Nesse sentido, o processo de carcinogênese estaria relacionado a associação entre mutações genéticas cumulativas, alterações epigenéticas e fatores ambientais (LU *et al.*, 2020), que podem influenciar diretamente em mecanismos importantes a célula, como o processo de divisão e morte celular, e favorecer o desenvolvimento de células mutadas.

As células que formam os diferentes sistemas corporais são dotadas de processos contínuos de divisão e morte celular, de forma organizada e controlada. No entanto, quando as células adquirem a capacidade de se desenvolver de forma rápida, agressiva e incontrolável, estas podem apresentar a capacidade de se espalhar para outras regiões do corpo e ocasionar transtornos funcionais, como o desenvolvimento de tumores, também conhecidos por cânceres ou neoplasias (INCA, 2020a).

Os eventos celulares e moleculares que estão envolvidos no processo de divisão celular são denominados de ciclo celular e abrangem duas etapas principais: a interfase, que consiste em uma etapa de repouso a qual as células estão se preparando para divisão, e a fase M, também conhecida por mitose, em que ocorre a divisão celular propriamente dita (TOTEJA, 2011). A

interfase é dividida nas etapas de G₁, S e G₂, e a fase M nas etapas de prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese (FOSTER, 2008; INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

A divisão celular é caracterizada por etapas bem definidas e relacionadas a um processo regulado e altamente orquestrado, através de um sistema de controle do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2002; ONG; TORRES, 2019); sistema com importante regulação de ciclinas específicas que atuam em associação com quinases dependentes de ciclina (CDKs) na checagem do processo de divisão celular (INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

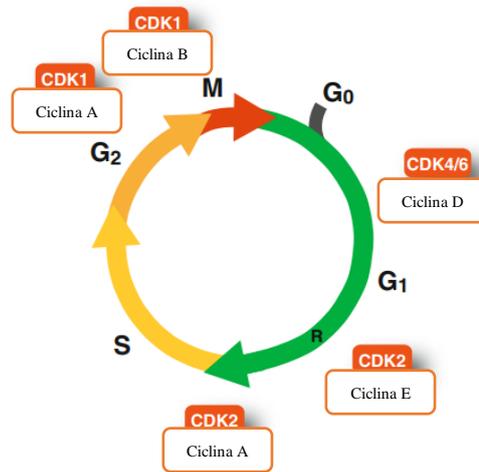
Na interfase, a fase G₁ corresponde a etapa de determinação se a célula entrará em processo de crescimento e divisão celular ou em quiescência (G₀); na fase S, ocorre a replicação do DNA para o processo de divisão celular; na G₂, a preparação para o processo de mitose e, na fase, M, o processo de divisão celular propriamente dito, com divisão do material genético e citocinese (WEINBERG, 2014; INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

No DNA, os cromossomos que contém o material genético do indivíduo estão dispostos em pares e envoltos por um envelope nuclear; na fase M, o material genético que foi duplicado na fase S da interfase, é dividido entre as células filhas.

A prófase corresponde a parte final da etapa de G₂, em que ocorre a condensação dos cromossomos; na prometáfase, intermediária entre a prófase e a metáfase, ocorre a quebra do envelope nuclear e o início da ligação dos cromossomos com os microtúbulos presentes nos dois polos do fuso mitótico; após o par de cromátides que formam os cromossomos moverem-se lentamente para um ponto no meio dos polos, tem-se a metáfase; na anáfase, as cromátides são separadas para cada polo mitótico e, em telófase, o material que foi duplicado e dividido é novamente envolto por um envelope nuclear; por fim, o processo de divisão celular finaliza com a separação das duas células filhas, em um processo de citocinese, em que ocorre a separação do citoplasma celular (POLLARD *et al.*, 2017).

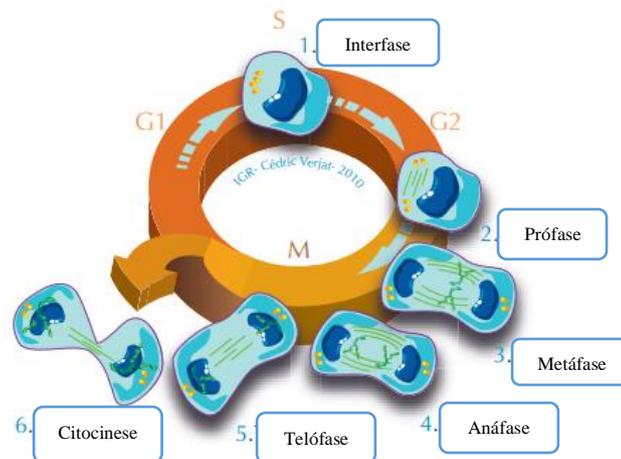
Os complexos CDKs e ciclinas atuarão de forma conjunta em pontos de checagem ou *Checkpoints* no processo de divisão celular, visando a identificação e correção de erros no processo de divisão celular; fator fundamental para manutenção e regulação da organização e divisão celular (POON, 2016). Etapas do processo de divisão celular e de regulação e checagem do processo de divisão celular são apresentadas na Figura 1 e 2.

Na oncogênese, as células malignas desenvolvem mecanismos que evadem o sistema imunológico e as atividades supressoras do crescimento, além de relacionar-se a transformação celular devido ao controle inadequado de sua proliferação (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2019).



FONTE: Adaptado de POON, R.Y.C. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. **Methods in Molecular Biology**, v. 1342, p. 3-19, 2016.

Figura 1. Etapas do processo de divisão celular e ciclinas específicas que atuam em associação com quinases dependentes de ciclina (CDKs) na checagem do processo de divisão celular.



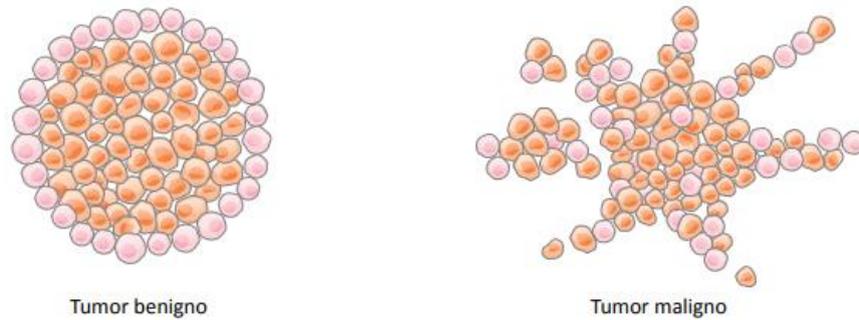
Fonte: Adaptado de LEVY, A. et al. Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques. *Bulletin du Cancer*, v. 98, n. 9, p. 1037-45, 2011.

Figura 2. Representação da fase de interfase e fase M no processo de divisão celular.

Dessa forma, considerando que a regulação de etapas do ciclo celular tem influência significativa na proliferação, propriedades metastáticas e recorrência de células neoplásicas, agentes quimioterápicos atuam principalmente em etapas do ciclo celular; o antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU) atua, por exemplo, destruindo a síntese de nucleotídeos e de replicação do DNA, inibindo a proliferação de células tumorais (SUN *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de neoplasias resulta em uma proliferação celular anormal e excessiva que pode acarretar o desenvolvimento de tumores benignos, quando restritos ao local

de origem e com características celulares fisicamente normais, ou tumores malignos, quando apresentam características celulares de crescimento anormal e incontrolável, com a capacidade de invasão a outros tecidos, frente ao desenvolvimento de propriedades metastáticas (SINHA, 2018). Tumores benignos e malignos são representados na Figura 3.



Fonte: INCA. Instituto Nacional do Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 6º ed. Rio de Janeiro: Ministério da saúde, 2020a.

Figura 3. Crescimento celular representativo de tumores benignos e malignos.

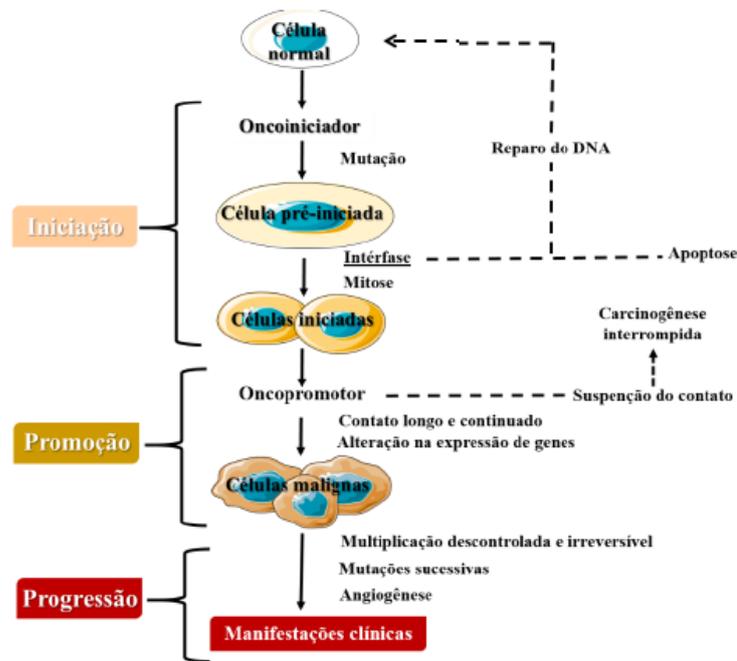
Oncogenes e genes supressores de tumor estarão relacionados ao desempenho de importantes funções no desenvolvimento de neoplasias, através da perda ou ganho de funções (ZHU *et al.*, 2015).

Proto-oncogenes atuam como reguladores do crescimento e proliferação celular e modificações nesses genes levam a formação de oncogenes, que atuarão no estímulo ao surgimento de células desdiferenciadas ou malignas; por sua vez, os genes supressores de tumor representam uma via de bloqueio do crescimento tumoral, contribuindo para o crescimento e proliferação de células normais e inibição tumoral (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020).

Oncogenes, geralmente estarão relacionados ao ganho de funções a células malignas, ao passo que genes supressores de tumor se relacionam a perda de função em células malignas, podendo influenciar diretamente no fenótipo maligno de neoplasias (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004). Alterações em genes supressores de tumor, por exemplo, podem ser utilizadas por células desdiferenciadas e relacionar-se ao processo de carcinogênese e malignidade.

O processo de carcinogênese ou tumorigênese, ativo principalmente pela associação entre fatores intrínsecos e extrínsecos, que atuarão como oncoiniciadores, inclui as etapas de iniciação, promoção e progressão. A descoberta da existência de oncogenes e de genes supressores de tumor representou um dos fatores associados a compreensão de que o processo

de carcinogênese seria dividido em etapas (BASU, 2018). As etapas de iniciação, promoção e progressão no processo de carcinogênese são representadas na Figura 4.



Fonte: AMARAL, R.G. Avaliação da atividade antitumoral do extrato das folhas da *Passiflora alata* Curtis. Tese [Doutorado em Ciências Fisiológicas] – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

Figura 4. Etapas de iniciação, promoção e progressão no processo de tumorigênese ou carcinogênese.

Na fase de iniciação, diferentes agentes cancerígenos (oncoiniciadores), como a indução de estresse oxidativo, inflamações crônicas, carcinógenos ambientais ou ocupacionais, mutações genéticas ou alterações epigenéticas, podem atuar como iniciadores no processo de carcinogênese (BASU, 2018) e resultar em alterações na cadeia do DNA que podem dar origem a uma célula pré-iniciada (AMARAL, 2018).

Mecanismos de reparo que atuam na proteção da cadeia de DNA poderão atuar na célula pré-iniciada e induzir ao processo de morte celular (MORITA *et al.*, 2010); no entanto, se falhas ocorrerem nesse processo, células malignas poderão se dividir e proliferar, dando continuidade ao processo de carcinogênese, principalmente, frente a exposição continuada aos agentes carcinógenos, seguindo para a etapa de promoção (AMARAL, 2018).

Na promoção, fatores como a indução de alterações epigenéticas e hiperplasia celular estarão envolvidos (BASU, 2018); de forma que a atuação de agentes oncopromotores poderá influenciar diretamente na expressão de genes e na divisão das células mutadas, promovendo a estimulação de células malignas se os estímulos não forem cessados (AMARAL, 2018). Na

promoção, efeitos clastogênicos e instabilidade genética estarão presentes, favorecendo a alterações na cadeia do DNA (BASU, 2018).

A progressão, etapa final do processo de carcinogênese, está relacionada a ocorrência de alterações genéticas e fenotípicas, além da presença de maior proliferação de células malignas; nessa etapa, rápido aumento da massa tumoral estará envolvido e mutações adicionais podem ocorrer, como a obtenção de características metastáticas pelo tumor, que podem favorecer a proliferação de células malignas para outras partes do corpo (SIDDIQUI *et al.*, 2015).

É na etapa de progressão do câncer que geralmente são apresentados os primeiros sintomas da doença (AMARAL, 2018) e a avaliação de fatores relacionados ao microambiente tumoral, como a vasculatura do tumor, torna-se fundamental para compreensão da doença e determinação da terapêutica oncológica e prognóstico do paciente (MBEUNKUI; JOHANN JR, 2009).

Na prevenção do câncer ou destruição de células malignas, os processos de morte celular representam pontos-chave a serem trabalhados. Desse modo, salienta-se que o processo de morte celular se relaciona a três principais vias de sinalização: apoptose (morte celular do tipo I), autofagia (tipo II) ou necrose (tipo III) (GREEN; LLAMBI, 2015).

Necrose, autofagia e apoptose podem estar presentes no processo de morte de células tumorais (CHAABANE *et al.*, 2013). A necrose está relacionada, principalmente, a lesões isquêmicas crônicas devido ao rápido crescimento do tumor, representando uma característica comum de tumores sólidos e geralmente associada ao aumento do potencial metastático e a piores prognósticos no câncer (LING *et al.*, 2020).

A autofagia representa um processo catabólico de morte celular altamente conservado e está relacionado ao empacotamento de complexos proteicos e organelas celulares para degradação e renovação de componentes citoplasmáticos, desencadeado por fatores como estresse oxidativo, hipóxia e estímulo de drogas (SU *et al.*, 2015).

Por sua vez, a apoptose é um dos mecanismos fundamentais em processos fisiológicos, como a destruição normal de células a serem substituídas, e em processos patológicos, como a morte celular induzida por drogas antitumorais e por células T citotóxicas (WONG, 2011).

O processo de apoptose é um dos processos fundamentais para manutenção da homeostase frente a divisão e morte celular; no entanto, desequilíbrios nesse processo podem ocorrer e favorecer diretamente a um crescimento/proliferação celular anormal, que representa um fator importante para o desenvolvimento de neoplasias malignas (OBENG, 2020).

As principais vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular por apoptose incluem a via intrínseca ou mitocondrial, que se relaciona, por exemplo, a atuação de proteínas

pró-apoptóticas Bcl-2 que atuam na permeabilização da membrana celular, e a via extrínseca ou via receptor de morte, que envolve a interação entre um ligante e um receptor de superfície celular, como a interação entre o ligante Fas e seu receptor FasL (GREEN; LLAMBI, 2015).

A via de morte celular induzida pela proteína p53, um gene supressor tumoral, é um importante exemplo do mecanismo de apoptose induzido por vias intrínseca e extrínseca, visto que sua ativação é realizada pelas duas vias. Na via intrínseca, sua ativação está relacionada a interação com a proteína pró-apoptótica Bcl-2 frente a situações de estresse, como a privação de citocinas, levando a ativação dos efetores de morte celular BAX e BAK; na via extrínseca, a p53 interage com membros da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), levando a ativação de caspases efetoras que induzem a morte celular (AUBREY *et al.*, 2018).

Desse modo, terapêuticas oncológicas, como a terapêutica oncológica quimioterápica, utilizam do conhecimento e compreensão de aspectos relacionados aos processos de morte celular para destruição de células malignas.

2.1.3 Terapêutica oncológica quimioterápica e o 5-fluorouracil

O termo quimioterapia foi associado a utilização de “químicos” frente o tratamento de doenças; na oncologia, seu uso foi difundido frente a identificação de que as taxas de cura relacionadas a remoção cirúrgica e a utilização da radioterapia em tumores havia estabilizado, principalmente devido a presença de micrometástases tumorais entre os pacientes; desse modo, a quimioterapia associada a cirurgia e/ou radioterapia passou a representar um papel importante frente a doença e atuação em micrometástases de células tumorais (DEVITA JR; CHU, 2008).

A quimioterapia representou a primeira abordagem farmacológica revolucionária na oncologia; apesar disso, a não especificidade celular do tratamento quimioterápico, ou seja, o fato das drogas quimioterápicas antitumorais não atingirem apenas as células tumorais, representa uma importante limitação (FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018).

Drogas utilizadas na terapia oncológica incluem diferentes classes, como agentes alquilantes, antimetabólitos de origem natural, antibióticos citotóxicos e antimetabólitos (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2014; FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018).

Agentes alquilantes representam uma das primeiras drogas a serem utilizadas no tratamento oncológico, atuando, por exemplo, na reticulação e quebra da fita de DNA, resultando em pareamento anormal de bases durante a replicação do DNA da célula maligna e, conseqüentemente, inibindo o processo de divisão e induzindo a morte celular; agentes

alquilantes incluem, por exemplo, a ciclofosfamida e a isofosfamida, eficazes principalmente em tumores de crescimento lento, como tumores sólidos e leucemia (RALLAN; KAUR, 2007).

Agentes alquilantes exercem suas atividades em todo o ciclo celular e atuam através da adição de um grupo alquila na cadeia de DNA. Seu uso associado a outros antineoplásicos tem se mostrado eficaz em relação a seu uso isolado; no entanto, a resistência intrínseca e adquirida a agentes alquilantes ainda representa um desafio a ser superado, podendo levar a recorrência da doença, metástases e até mesmo ao óbito (LEHMANN; WENNERBERG, 2021).

Agentes antimitóticos incluem drogas como o paclitaxel e a vimblastina, que atuam inibindo a dinâmica da polimerização dos microtúbulos no processo de divisão celular e ativam um ponto de checagem ou *checkpoint* presente entre as etapas de metáfase e anáfase, inibindo que o processo de divisão celular passe para a etapa de anáfase, o que induz a parada do ciclo celular e apoptose celular ou estado de G1 similar a senescência (VUREEN *et al.*, 2015).

Agentes antimitóticos se ligam a proteína tubulina nos microtúbulos e inibem a formação do fuso mitótico, resultando na interrupção da fase M do processo de divisão celular (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2014).

Antibióticos citotóxicos são produtos químicos produzidos por microrganismos e que apresentam propriedades antitumorais, a exemplo das antraciclínas, como a doxorrubicina, epirrubicina e mitoxantrona; efeitos citotóxicos da doxorrubicina podem estar relacionados, por exemplo, a inibição da atividade da topoisomerase II, levando a quebra da dupla fita de DNA das células malignas (GAO *et al.*, 2020).

Antibióticos citotóxicos atuam principalmente na geração de danos ao DNA a partir da topoisomerase II e através da geração de espécies reativas de oxigênio e indução de estresse oxidativo (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2014).

Antraciclínas são consideradas inibidores da topoisomerase II (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2014). Topoisomerasas do DNA são enzimas nucleares que auxiliam na restauração do DNA, divididas em tipo I e II; o tipo I atua na quebra e união de uma única fita e a do tipo II atua na divisão e união da dupla fita de DNA (CHAUDHARY *et al.*, 2022).

Agentes inibidores da topoisomerase I também atuam como drogas antitumorais, sendo derivados, principalmente da camptocetina, como o irinotecano (CPT-11) e o topotecano, que atuam inibindo o processo de replicação do DNA de células tumorais e induzem a morte celular (EWESUEDO; RATAIN, 1997).

Desse modo, inibidores da topoisomerase levam a danos no DNA de células malignas através da mediação pela topoisomerase I e II, que estão envolvidas em processos como a

replicação e transcrição do DNA e remodelação da cromatina, importantes no processo de divisão celular (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2014).

Terapias hormonais direcionadas também podem atuar na atividade antitumoral. Hormônios, como o tamoxifeno, podem atuar na inibição do crescimento de tumores sensíveis a alterações hormonais (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2014).

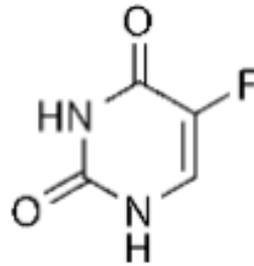
Os cânceres de mama e de próstata, por exemplo, apresentam uma relação bem definida frente a dependência da sinalização de receptor hormonal, representando alvo de terapias hormonais direcionadas; o uso do antagonista do receptor de estrogênio (ER), o tamoxifeno, foi aprovado para uso no câncer de mama e o uso do antagonista do receptor de andrógeno, o bicalutamida, no câncer de próstata (METCALFE; FRIEDMAN; HAGER, 2018).

Adicionalmente, agentes antimetabólitos representam um dos pilares no tratamento quimioterápico e incluem medicamentos que são estruturas químicas semelhantes aos nucleotídeos - com o 5-FU, um antagonista de pirimidina - e ao folato - como o metotrexato, um antagonista do folato/ácido fólico. Antagonistas do folato atuam, principalmente, inibindo enzimas folatodependentes, reduzindo a síntese de DNA, RNA e de proteínas; por sua vez, antagonistas de pirimidina atuam no bloqueio da síntese de nucleotídeos, importantes para formação de fitas de DNA e/ou RNA no processo de divisão celular (SCAIFE; KERR, 2008).

O 5-FU foi introduzido no ano de 1957 por Charles Heidelberger, representando uma revolução no tratamento de cânceres gastrointestinais, especialmente em tumores sólidos, como o câncer colorretal; o 5-FU tem sido amplamente utilizado em diferentes protocolos quimioterápicos, como o protocolo FOLFOX e FOLFIRI (FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018).

O protocolo FOLFOX compreende a combinação do ácido folínico (leucovorina), 5-FU e da oxaliplatina (RUVINOV *et al.*, 2019) ou do 5-FU com a oxaliplatina; por sua vez, o protocolo FOLFIRI corresponde a associação entre o 5-FU e o irinotecano. O 5-FU também pode estar associado ao irinotecano e a oxaliplatina, em protocolo FOLFORINOX (CAPARICA *et al.*, 2019).

O 5-FU atua inibindo a enzima timidilato sintetase, prejudicando funções de síntese de DNA em células tumorais; substratos do 5-FU, como trifosfato de fluorouridina, também podem ser incorporados de forma errônea ao RNA ou DNA de células tumorais, resultando em prejuízos na tradução e expressão proteica (AZWAR *et al.*, 2020). A fórmula estrutural do 5-FU está representada na Figura 5.



Fonte: VICENTE NETO, O. J. Avaliação de estratégias de fenotipagem da enzima diidropirimidina desidrogenase na predição da exposição ao 5-fluorouracil e a ocorrência de toxicidade grave à quimioterapia em pacientes com neoplasia gastrointestinal. Dissertação [Mestrado em Toxicologia e análises toxicológicas] – Universidade Feevale, 2018.

Figura 5. Fórmula estrutural do 5-FU (C₄H₃FN₂O₂).

Salienta-se que a quimioterapia utiliza de diferentes drogas na terapia oncológica. No entanto, frente a apresentação de limitações, como a não especificidade celular e efeitos adversos associados (BRANDÃO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2015; FERNANDO; JONES, 2015), a descoberta de novas drogas a serem utilizadas no tratamento oncológico é fundamental. Desse modo, os produtos naturais têm marcado a história da descoberta de novas drogas na oncologia (HUANG; LU; DING, 2021).

Adicionalmente, em virtude de antineoplásicos estarem sendo utilizados de forma concomitante com outras preparações, como preparações naturais de plantas medicinais (CAETANO *et al.*, 2018), é fundamental a avaliação de parâmetros associativos entre drogas antineoplásicas e plantas medicinais, como aspectos toxicológicos e antitumorais.

Nesse sentido, o 5-FU, tem sido amplamente utilizado em estudos para avaliação da presença de atividade antitumoral e/ou de efeitos associativos entre plantas medicinais ou seus constituintes isolados e antineoplásicos (AMARAL *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2016; SANTOS, 2018), sendo utilizado no estudo realizado para investigação de efeitos associativos entre o antineoplásico 5-FU e o *C. citratus*.

Ademais, por ser o 5-FU um antineoplásico utilizado em diferentes tumores sólidos (CHRISTENSEN *et al.*, 2019), como o câncer de mama e o câncer colorretal (SETHY; KUNDU, 2021), o tumor experimental sarcoma 180 foi utilizado como modelo experimental *in vivo*.

Sarcomas são tumores de origem mesenquimal, que podem se desenvolver em tecidos moles e ósseos (BURNINGHAM *et al.*, 2012) e, na avaliação de tumores sólidos, o tumor experimental sarcoma 180 ou tumor de Crocker tem representado um importante aliado

(FERREIRA *et al.*, 2019), inclusive para avaliação da atividade de produtos naturais no câncer (BEZERRA *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2008a; BEZERRA *et al.*, 2008b; AMARAL *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2016; SANTOS, 2018).

2.2 Plantas medicinais e a terapêutica oncológica

Produtos naturais são amplamente utilizados como fonte para descoberta de novas drogas a serem utilizadas no tratamento oncológico, drogas que possam ser mais eficazes e que apresentem menores efeitos adversos que aquelas já utilizadas. Estima-se, por exemplo, que cerca de 60% de drogas sintéticas utilizadas na oncologia sejam derivadas de fontes naturais (SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

Drogas antitumorais derivadas de produtos naturais incluem, por exemplo, o irinotecano, vincristina, etoposídeo e o paclitaxel como derivados de plantas, a actinomicina D e mitomicina C como derivadas de bactérias e a bleomicina, de origem marinha; entre as drogas oncológicas que representam importante sucesso frente ao desenvolvimento na oncologia e que são derivadas de produtos naturais, estão a camptotecina e o taxol, descobertos entre 1950 e 1960 (HUANG; LU; DING, 2021).

Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população na terapêutica de diferentes enfermidades, representando uma importante fonte de medidas terapêuticas no dia a dia da população. Estima-se, por exemplo, que o uso de plantas medicinais e fitoterápicos aumentou gradativamente nas últimas três décadas e que cerca de 80% das pessoas as utilizam de forma indiscriminada, como medidas de atenção primária a saúde (EKOR, 2014).

Entre pacientes oncológicos, seu uso também tem sido amplamente visualizado, principalmente, como forma de amenizar efeitos adversos associados a terapêutica oncológica decorrentes, especialmente, da quimioterapia; observou-se, por exemplo, que pacientes oncológicos utilizam de gengibre, camomila, hortelã, cardamomo e cebola para redução da náusea decorrente da quimioterapia (HABIBED *et al.*, 2020).

No entanto, o uso de produtos naturais por pacientes oncológicos deve ser realizado com cautela, visto que apesar das plantas medicinais serem consideradas pela maioria das pessoas como produtos seguros, estas podem conter substâncias que possam ser tóxicas ao paciente, bem como interajam com terapias convencionais e ter impacto em sua segurança e eficácia; além de poderem atuar nas etapas da farmacocinética (absorção, distribuição, metabolização e excreção) de drogas utilizadas, afetando sua toxicidade (ORFI *et al.*, 2021).

A interação entre plantas medicinais e drogas quimioterápicas representa um dos principais riscos e consequências clínicas a quimioterapia, tornando-se, gradativamente, uma importante área da farmacoterapia a assumir espaço em pesquisas científicas; interações entre ervas e quimioterápicos podem resultar, por exemplo, em alterações na relação dose – efeito e em toxicidades, consequências resultantes, por exemplo, de efeitos inibitórios das plantas e/ou da indução de enzimas metabolizadoras de drogas e de proteínas de transporte, que podem alterar a farmacocinética da droga quimioterápica (FASINU; RAPP, 2019).

Plantas medicinais podem associar-se e interagir com quimioterápicos em virtude, por exemplo, da estreita janela terapêutica de quimioterápicos (ALNAIM, 2007), ou seja, devido ao intervalo de doses em que estes são eficazes sem a ocorrência de efeitos adversos associados (TAMARGO; HEUZEY; MABO, 2015).

Plantas medicinais podem interagir com quimioterápicos e inibir enzimas metabólicas importantes para os efeitos farmacológicos das drogas, atuando, por exemplo, na inibição do citocromo P450 (CYP), uma enzima importante para biotransformação de quimioterápicos, como a ciclofosfamida e a ifosfamida (FASINU; RAPP, 2019).

Constatações iniciais de que produtos naturais/plantas medicinais poderiam interagir com medicamentos foi decorrente, por exemplo, da identificação de que o suco de toranja poderia interagir com o felodipino, um bloqueador de canais de cálcio utilizado no tratamento da hipertensão, levando a um aumento de cerca de 2,8 vezes em sua biodisponibilidade oral (BAILEY *et al.*, 1991), informação que direcionou a realização de novos estudos para avaliação de efeitos associativos entre drogas e produtos naturais.

No câncer, análises associativas também foram sendo gradativamente realizadas. Pesquisas científicas sobre interações e aspectos associativos entre quimioterápicos e plantas medicinais/produtos naturais identificaram, por exemplo, que o uso do alho pode reduzir a depuração do quimioterápico docetaxel e elevar efeitos adversos associados (COX *et al.*, 2006); o uso da erva de são João também foi associado a redução significativa da concentração plasmática do docetaxel (GOEY *et al.*, 2014).

Análises associativas com o antineoplásico 5-FU evidenciaram que a utilização concomitante do 5-FU com um complexo composto de ervas chinesas não resultou em alterações significativas entre os tratamentos, considerando segura a administração do complexo de ervas com o 5-FU (LIU *et al.*, 2018).

No entanto, estudo realizado para avaliar evidências da associação entre a *Matricaria recutita* L., popularmente conhecida como camomila, e o 5-FU evidenciou que, apesar da associação ter se mostrado positiva na redução do tumor experimental S180 - ao potencializar

o efeito antitumoral do 5-FU -, a associação também potencializou efeitos adversos, como a redução da massa corporal e cardíaca e a ocorrência de quadros de diarreia (SANTOS, 2018).

Dados dos estudos sugerem que produtos naturais podem ou não se associar/interagir com antineoplásicos e que o conhecimento dessas associações é de fundamental importância, visto que seu uso é cada vez mais frequente entre pacientes oncológicos. Tornando fundamental, inicialmente, a identificação de produtos naturais utilizados por pacientes oncológicos.

Estudo realizado na capital do estado de Sergipe para identificação de plantas medicinais e/ou fitoterápicos utilizados por pacientes oncológicos em tratamento oncológico quimioterápico, por exemplo, identificou que, dos 331 pacientes entrevistados, 164 referiram o uso de plantas medicinais ou fitoterápicos concomitantemente ao tratamento oncológico; entre os pacientes, o uso de 33 plantas medicinais foi identificado e as principais relatadas foram a *Melissa officinalis L.* ou erva-cidreira (43,29%), a *Matricaria recutita L.* ou camomila (39,02%) e *Plectranthus barbatus Andrews* ou boldo (29,89%) (CAETANO *et al.*, 2018).

O *C. citratus* ou capim-santo também foi identificado entre os entrevistados (CAETANO *et al.*, 2018), salientando-se, adicionalmente, que o uso desta planta pode resultar em interação com o agente antineoplásico ciclofosfamida, ocasionando elevação ou redução em concentrações plasmáticas; a interação poderia estar relacionada, por exemplo, a indução do citocromo P450 subfamília 2B pela estimulação do constituinte isolado beta-mirceno ou por inibição do citocromo P450, isoforma 2B1, pelo constituinte isolado citral ou pineno, presentes na planta (BACHMANN *et al.*, 2006; CAETANO *et al.*, 2018)

Nesse contexto, pesquisas científicas devem ser amplamente encorajadas para avaliação de aspectos associativos com antineoplásicos e plantas medicinais e/ou produtos naturais utilizados por pacientes oncológicos, para promoção do uso cauteloso desses produtos e para compreensão dos aspectos associativos que possam direcionar as condutas terapêuticas.

2.2.1 O gênero *Cymbopogon* e o câncer

Espécies do gênero *Cymbopogon* estão entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população mundial, sendo amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América e famosas por seu alto conteúdo de óleos essenciais utilizados em indústrias cosméticas, farmacêuticas e de perfumaria (AVOSEH *et al.*, 2015).

O gênero *Cymbopogon* faz parte da família das gramíneas (*Poaceae*) (BARUAH *et al.*, 2016); é composto por cerca de 180 espécies, subespécies, variedades e subvariedades e

caracterizado por plantas altas e perenes, formadas por folhas densas e longas (ZAHRA; HARTATI; FIDRIANNY, 2021).

Espécies do gênero *Cymbopogon* são amplamente utilizadas na aromaterapia (AVOSEH *et al.*, 2015; BARUAH *et al.*, 2016; ZAHRA; HARTATI; FIDRIANNY, 2021) e incluem espécies como o *Cymbopogon martinii*, *C. citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon westratus*, *Cymbopogon nardus* e o *Cymbopogon winterianus* (ZAHRA; HARTATI; FIDRIANNY, 2021).

As espécies do *C. citratus* (capim-limão) e do *Cymbopogon Flexuosos* são consideradas as duas principais espécies do gênero *Cymbopogon* e diferentes estudos estão sendo realizados para conhecimento de suas atividades biológicas ou farmacológicas, que podem vir a ser utilizada na atenção à saúde, como o efeito antiinflamatório e antifúngico do *C. citratus* (BOUKHATEM *et al.*, 2014) e a atividade antimicrobiana do *Cymbopogon Flexuosos* (ADUKWU *et al.*, 2016).

Atividades biológicas de outras espécies do gênero *Cymbopogon* também já foram evidenciadas em estudos, como a atividade antimicrobiana (HASHIM *et al.*, 2017) e anti-helmíntica do *Cymbopogon schoenanthus* (KATIKI *et al.*, 2011) e atividade antifúngica do *Cymbopogon Nardus*, também conhecido por citronela (DE TOLEDO *et al.*, 2016).

O gênero *cymbopogon* tem sido amplamente utilizado para tratar condições como indigestão, depressão, dores de cabeça, problemas respiratórios e de pele, anti-hipertensivo, auto tratamento para perda de peso e em uso diário como agentes aromatizantes, limpeza do corpo após a menstruação e até mesmo como higienizador dental (ZAHRA; HARTATI; FIDRIANNY, 2021)

Desse modo, plantas medicinais do gênero *Cymbopogon* podem apresentar diferentes propriedades. Propriedades farmacológicas frente a doenças, infecções e outras enfermidades estão associadas, principalmente, a metabólitos secundários presentes na planta, como terpenos, alcalóides e compostos fenólicos; metabólitos secundários são amplamente utilizados pela planta frente a situações que requerem proteção e adaptação, como estresse biótico e abiótico, e têm sido amplamente utilizados em técnicas moleculares para conhecimento de suas propriedades para atuação em enfermidades (AVOSEH *et al.*, 2015).

No câncer, espécies do gênero *Cymbopogon* também são consideradas promissoras drogas antitumorais e quimiopreventivas (AVOSEH *et al.*, 2015) e, com o aumento do uso de plantas medicinais entre pacientes em tratamento oncológico, tem-se a necessidade do conhecimento sobre a atividade antitumoral de espécies de plantas de diferentes gêneros, para possível utilização na terapia oncológica e conhecimento de possíveis interações ou aspectos

associativos com agentes quimioterápicos, como efeitos adversos associados (ABU-DARWISH; EFFERTH, 2018).

A possível associação do *C. citratus* com o agente quimioterápico ciclofosfamida, por exemplo, torna necessário o maior conhecimento sobre a espécie e o levantamento de possíveis associações que possam estar relacionadas ao seu uso (BACHMANN *et al.*, 2006; CAETANO *et al.*, 2018), visto que, apesar de diferentes estudos estarem sendo realizados para o conhecimento da atividade antitumoral em espécies do gênero *Cymbopogon* (SHARMA *et al.*, 2009; BAO *et al.*, 2015; BAYALA *et al.*, 2018), pouco se é conhecido sobre possíveis associações/interações deste gênero com antineoplásicos.

2.2.1.1 O *C. citratus*

O *C. citratus*, membro da família das gramíneas (*Poaceae*) e nativo da Índia, é também conhecido como capim-santo, capim-limão ou capim-cidreira e se desenvolve, principalmente, em regiões tropicais, apresentando longas e estreitas folhas verdes e cheirosas, com caráter áspero e cortante (OLIVEIRA; SANTOS, 2021).

Flores do *C. citratus* são de difícil visualização, visto que quando presentes, reúnem-se em panículas de pequenas espigas escuras (BRITO, 2011). O *C. citratus* é representado na Figura 6.



Fonte: PROMILA.; MADAN, V.K. A Review on the Phytochemistry and Pharmacology of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Lemongrass). *The Pharma Innovation Journal*, v. 7, n. 3, p. 300-304, 2018.

Figura 6. Representação do *C. citratus*.

O *C. citratus* é amplamente utilizado como preparações de extrato e óleos essenciais e o odor de limão a ele atribuído é resultante de um dos seus metabólitos secundários, o citral (MAJEWSKA *et al.*, 2019; OLADEJI *et al.*, 2019). O citral é formado por uma combinação de dois aldeídos monoterpênicos estereoisoméricos: o geranial (isômero trans) ou citral A e o neral (isômero cis) ou citral B; em sua composição, o geranial prevalece em relação ao neral (MAJEWSKA *et al.*, 2019).

Propriedades farmacológicas de plantas medicinais, como o *C. citratus* relacionam-se, principalmente, a presença de metabólitos secundários. No metabolismo de plantas, metabólitos primários estão relacionados a funções vitais, como a síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos e açúcares, e estão presentes em maior quantidade em sua formação; por sua vez, metabólitos secundários geralmente estão presentes em menor quantidade e em determinados tipos de plantas, relacionando-se, por exemplo, a adaptação da planta frente ao estresse biótico e abiótico (OLIVEIRA; SANTOS, 2021).

Metabólitos secundários permitem a plasticidade e adaptação da planta (REZENDE *et al.*, 2016) e são esses princípios ativos vegetais que geralmente estão presentes em produtos e terapias utilizadas (OLIVEIRA; SANTOS, 2021).

A produção de metabólitos secundários por plantas é influenciada por condições geográficas e conseqüentes variações quanto a características bióticas e abióticas (BONT *et al.*, 2020), como diferenças de temperatura, umidade, intensidade da luz e fornecimento de água, minerais e gás carbônico (CO₂) (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

Metabólitos secundários presentes em plantas são divididos em três principais grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (MIRANDA, 2012; OLIVOTO *et al.*, 2017).

Os terpenos correspondem a maior classe de metabólitos secundários conhecidos, sendo formado pela união de carbonos e divididos em: monoterpênicos (10 carbonos), sesquiterpênicos (15 carbonos) e diterpênicos (20 carbonos); triterpênicos (30 carbonos), tetraterpênicos (40 carbonos) e politerpenóides (>40 carbonos) também podem ser encontrados (OLIVOTO *et al.*, 2017).

Terpenoides ou isoprenoides abrangem cerca de 40.000 estruturas e, entre suas atividades biológicas, estão a atuação frente a inflamações e tumores, propriedades neuroprotetoras em condições neurodegenerativas, promoção do bem-estar neuronal e propriedades antimicrobianas e quimiopreventivas (MOHIUDDIN, 2019). Terpenos também são responsáveis pela fragrância, sabor e pigmento de algumas plantas, além de apresentarem funções de termoproteção e sinalização para plantas (COX-GEORGIAN *et al.*, 2019).

Compostos fenólicos são amplamente presentes em partes superiores de plantas, como frutas e grãos, e desempenham importantes funções fisiológicas da planta, como atuação em sua qualidade, coloração, sabor e adaptação ao estresse; compostos fenólicos incluem os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanas fenólicas e estilbenos fenólicos (ZHANG *et al.*, 2022).

Compreendem cerca de 8.000 estruturas identificadas até o momento e são amplamente explorados na saúde humana por seu alto poder antioxidante relacionado, principalmente, a sua atuação como agentes redutores, doadores de hidrogênio, inibidores de oxigênio e quelantes de metal em reações redox; seu alto potencial antioxidante permite que os compostos fenólicos atuem em fatores como a conservação de alimentos e prevenção de patologias, como doenças cardiovasculares, arteriosclerose, câncer, diabetes, catarata e doenças neurológicas (ZELJKOVIĆ *et al.*, 2021).

Além de sua capacidade antioxidante, propriedades farmacológicas investigadas e descritas na literatura sobre os compostos fenólicos também incluem sua utilização como anticancerígenos, antibacterianos, agentes cardioprotetores, anti-inflamatórios, promotores do sistema imunológico e proteção da pele contra radiação ultravioleta, atuando como agentes promissores para indústria farmacêutica e para medicina (TUNGMUNNITHUM *et al.*, 2018).

Adicionalmente, ampla gama de metabólitos secundários possui nitrogênio em sua estrutura, sendo conhecidos como compostos nitrogenados; compostos nitrogenados incluem, por exemplo, alcaloides, glicosídeos e aminoácidos não proteicos (OLIVOTO *et al.*, 2017).

Metabólitos alcaloides incluem cerca de 12.000 substâncias (MOHIUDDIN, 2019) e abrangem tropanos, pirrolidinas, purinas de isoquinolina, imidazóis, quinolizidinas, indóis, piperidinas e pirrolizidinas, entre outros; atividades biológicas relacionadas a alcaloides podem incluir sua atuação como agente anticancerígeno, antibacteriano, antidepressivo, herbicida, anti-histamínico, estimulante do sistema nervoso central, inseticida e fungicida (THAWABTEH *et al.*, 2019).

Glicosídeos compreendem um conjunto de substâncias resultantes da ligação a um grupo glicosil, que representa um dos processos biológicos mais comuns em células vivas. Estima-se a ocorrência de cerca de 85.000 espécies de plantas medicinais glicolisadas e utilizadas na terapêutica, incluindo metabólitos como saponinas esteróides e terpenóides; o grupo glicosil é importante, por exemplo, para o equilíbrio da lipofilicidade molecular e permeabilidade da membrana (GRYNKIEWICZ; SZEJA, 2015).

Aminoácidos não proteicos podem ser encontrados tanto como intermediários do metabolismo primário da planta, quanto como metabolitos secundários, e são importantes em funções de defesa da planta; são exemplos de aminoácidos não proteicos a meta – tirosina, o L-

3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e a metionina sulfoximina (HUANG; JANDER; VOS, 2011; FIPKE; VIDAL, 2016).

No *C. citratus*, metabólitos secundários presentes no óleo essencial incluem, por exemplo, o mirceno, linalol, citronelol, citronelal e, principalmente, o geranial (cital a) e neral (cital b) (KAPUR *et al.*, 2016; BAYALA, 2018; BAILLY, 2020).

No extrato, metabólitos secundários encontrados podem incluir o elemol, calameneno, humuleno, beta-eudesmol, piperitona, citral, isoflavona e isorubrina (HALABI; SHEIKH, 2014). Metabólitos secundários presentes e identificados em preparações do *C. citratus* são exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1. Metabólitos secundários presentes em extratos e óleos essenciais do *C. citratus*.

Preparação	Metabólitos identificados	Referência
Extrato	Ácido clorogênico Ácido gálico Pirogalol Ácido p-cumárico Ácido ferúlico Ácido cinâmico Quercetina Rutina Apigenina Ácido carnósico	MÉABED <i>et al.</i> , 2018
Extrato	Myrtenal Piperitona Nonadiina α -Cubebeno α -Copaeno L-calameneno Elemol Humuleno Cariofileno Cubenol Cubebol Carvona β -Eudesmol; Nonanenitrila	HALABI; SHEIKH, 2014
Extrato	Ácido clorogênico Isoorientina Isoscoparina Ácido cafeico Swertiajaponin Isoorientina 2-O-ramnósido Orientina Quecetina	CHEEL <i>et al.</i> , 2005
Óleo essencial	6-metil-hept-5-en-2-ona Mirceno (Z)-beta-ocimeno (E)-beta-ocimeno exo-isocitral citronelal (E)-isocitral	JESUS <i>et al.</i> , 2021

	Citronelol Neral Geraniol Geranial undecan-2-ona acetato de geranila (E)-cariofileno alfa-(trans)-bergamoteno	
Óleo essencial	6-metil-hept-5-en-2-ona Beta-mirceno Neral Geranial Geraniol undecan-2-ona	BIDINOTTO <i>et al.</i> , 2010

Dessa forma, o *C. citratus* apresenta em sua composição monoterpenos, como o citral, mirceno, limoneno e outros terpenos como o terpinoleno, ocimeno, pineno, cariofileno, o felandreno e oxobisaboleno; compostos fenólicos que incluem ácidos fenólicos como o ácido cafeico e o p-cumárico e flavonoides como a quercetina, campferol, isoorientina e a isoscoparina e taninos, como o ácido gálico (OLIVEIRA; SANTOS, 2021).

O citral está presente em cerca de 65-85% do OECC, relacionando-se a suas propriedades farmacológicas (SHARMA *et al.*, 2019). Atividades antimicrobianas são encontradas, por exemplo, para o citral (PINO *et al.*, 2018).

Atividades biológicas do *C. citratus* incluem, por exemplo, propriedades anti-amebicas, antibacterianas, antidiarreicas, antifilárias, antifúngicas e anti-inflamatórias (SHAH *et al.*, 2011).

O uso popular do capim-imão inclui propriedades reparadoras, digestivas, antitussígenas, contra resfriados, analgésicas, anticardiopáticas, antitérmicas, anti-inflamatórias urinárias, diuréticas, antiespasmódicas, diaforéticas e antialérgicas (NEGRELLE; GOMES, 2007); propriedades tranquilizantes também são encontradas (OLORUNNISOLA *et al.*, 2014).

A avaliação de propriedades farmacológicas do óleo essencial do *C. citratus* evidenciou a presença de atividade antifúngica promissora frente ao *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Aspergillus niger* e efeito anti-inflamatório dose-dependente frente ao modelo de edema de orelha em camundongo, induzido por óleo de cróton (BOUKHATEM *et al.*, 2014).

Propriedades anti-inflamatórias também foram identificadas para o citral, ao atuar na inibição de mediadores inflamatórios e em tratamentos de quadros inflamatórios (SÁ; ANDRADE; SOUSA, 2013). Na inflamação, inibição da secreção de prostaglandinas e óxido nítrico também foi associada aos constituintes isolados do *C. citratus*, como o citral, luteolina e a carvona (SEPÚLVEDA-ARIAS *et al.*, 2013).

Efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores em convulsões induzidas por pentilenotetrazol em peixes-zebra identificou que o óleo essencial, o extrato hidroalcolico e os constituintes isolados geraniol e citral apresentaram efeitos anticonvulsivantes, representando uma estratégia promissora para epilepsia (HACKE *et al.*, 2021).

Propriedades bactericidas estão presentes para os constituintes isolados α -citral (geraniol) e β -citral (neral) do *C. citratus* frente a bactérias gram positivas e negativas (OLADEJI *et al.*, 2019). Melhor atividade antibacteriana foi encontrada para o OECC quando comparado ao extrato metanólico do *C. citratus*; não sendo identificada atividade antibacteriana para o extrato fervido do *C. citratus* (SUBRAMANIAM; YEW; SIVASAMUGHAM, 2020).

Inibição de danos hepatotóxicos foi encontrada para o extrato do *C. citratus* frente a danos hepáticos causados pela cisplatina em ratos; a inibição dos danos hepáticos foi resultante, principalmente, de propriedades antioxidantes presentes no extrato (ARHOGHRO; KEH; PROHP, 2014).

Efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos dose-dependente foram encontrados para o extrato do *C. citratus*, em ratos, apresentando baixa toxicidade na administração oral (ADENEYE; AGBAJE, 2007). Atividade antinociceptiva também foi descrita para o *C. citratus*, sendo utilizado para redução de dores e ansiedade e como método analgésico na antiguidade (OLADEJI *et al.*, 2020).

Propriedades repelentes também são encontradas, principalmente, para o óleo essencial do *C. citratus*, que apresentou atividade repelente, por exemplo, contra o *Aedes aegypti* e a mosca doméstica (KIMUTAI *et al.*, 2017).

No câncer, propriedades antitumorais e quimiopreventivas do *C. citratus* também têm sido observadas. Potencial atividade antitumoral e imunomoduladora foi encontrada frente ao uso de polissacarídeos do *C. citratus*; com atividade antitumoral *in vivo* alcançada por imunoestimulação (BAO *et al.* 2015).

O tratamento oral com OECC frente a danos induzidos por N-metil-N-nitrosurea (MNU) em experimento *in vivo* com camundongos Balb/c, foi associado a papel protetor do DNA e a atividade antitumoral, em lesões hiperplásicas mamárias (BIDINOTTO *et al.*, 2010).

Atividade antitumoral seletiva *in vitro* foi encontrada para o extrato do *C. citratus* frente ao câncer de próstata, influenciando positivamente na apoptose de células tumorais ao ser associado com os antineoplásicos taxol e mitoxantrona; *in vivo*, o extrato do *C. citratus* administrado por via oral apresentou atividade antitumoral em xenoenxertos de câncer de próstata (NGUYEN *et al.*, 2019).

A associação do extrato aquoso do *C. citratus* com o docetaxel *in vitro* em linhagens de câncer de próstata identificou que melhoria da atividade quimioterápica foi observada, de forma que seu uso na quimioterapia poderia potencializar a atividade antitumoral do antineoplásico (GOMES *et al.*, 2021). Tratamento de linhagens tumorais de câncer de pulmão identificaram que o OECC apresenta atividade antitumoral, desempenhando importantes efeitos apoptóticos (TRANG *et al.*, 2021).

Desse modo, salienta-se que o *C. citratus* apresenta importantes propriedades farmacológicas para a saúde; propriedades que também estão presentes na oncologia. No entanto, apesar de propriedades antitumorais e quimiopreventivas sobre a planta medicinal serem descritas na literatura, efeitos de sua associação com antineoplásicos são pouco trabalhados e representaram alvo deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a associação entre o extrato aquoso e o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* e o 5-fluorouracil na resposta antitumoral em camundongos com Sarcoma 180.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar constituintes químicos presentes no extrato aquoso e no óleo essencial do *Cymbopogon citratus*.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* em linhagens celulares tumorais.
- Identificar a presença de atividade hemolítica no extrato aquoso e no óleo essencial do *Cymbopogon citratus*.
- Avaliar a associação *in vivo* do extrato aquoso e do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* com o fármaco antineoplásico 5-fluorouracil sobre o crescimento tumoral em animais transplantados com o tumor experimental Sarcoma 180.
- Avaliar o efeito da associação *in vivo* do extrato aquoso e do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* com o fármaco antineoplásico 5-fluorouracil sobre aspectos toxicológicos, bioquímicos, hematológicos e morfológicos em animais transplantados com o tumor experimental Sarcoma 180.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho metodológico

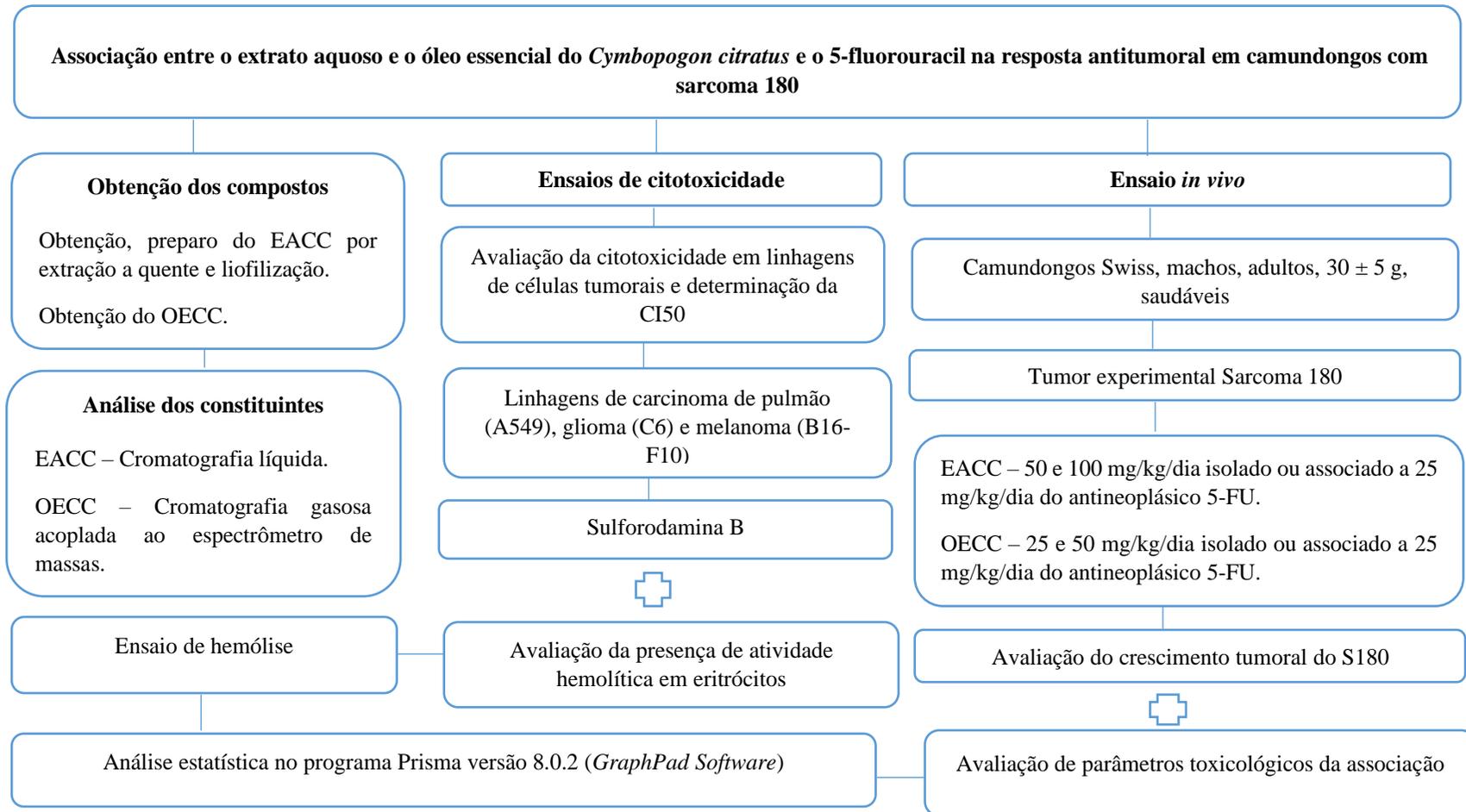


Figura 7. Descrição do desenho metodológico do estudo.

4.2 Material utilizado

4.2.1 Kits, fármacos e reagentes

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Tripsina, *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), Dimetilsulfóxido (DMSO), Sulforodamina B (SRB), Azul de Tripán, Triton X 100, Soro Fetal de Bovino (SFB), antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL), Cloridrato de Doxorrubicina (Libbis, Embu das Artes, São Paulo, Brasil), Ácido tricloroacético (Neon, São Paulo, Brasil), Ácido acético (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), Álcool metílico (Neon, São Paulo, Brasil), TRIS-base (Inlab Confiança, Brasil), Isoflurano 1,5%, solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM), Ringer Lactato, 5-fluorouracil (Sigma), Kits *Labtest* para análises bioquímicas, Formaldeído (Dinâmica), tubos coletores estéreis, tubos com Heparina.

4.3 Obtenção do extrato aquoso e do óleo essencial do *C. citratus*

As folhas do *C. citratus* para preparo do extrato aquoso do *C. citratus* (EACC) foram obtidas em sua forma orgânica comercial desidratada, doadas por empresa especializada em chás e especiarias orgânicas no estado de Sergipe (LOTE 081913). O óleo essencial do *C. citratus* (OECC) foi obtido em empresa responsável por seu preparo e pureza (composição: *C. citratus oil*, 100% natural, LOTE BSA Fev/2022). O cronograma e orçamento da pesquisa são apresentados nos Apêndices A e B, respectivamente.

4.3.1 Preparo do EACC

Após obtenção de 1kg de amostra orgânica desidratada, as folhas do *C. citratus* foram armazenadas em temperatura ambiente (TA), utilizando-se de recipientes de vidro com tampa vedante para proteção completa contra a entrada de luz, umidade, poeira e calor em seu interior, condições essenciais para conservação das folhas por período variável (COSTA, 2002; JAHANBAN-ESFAHLAN *et al.*, 2015).

O preparo do EACC foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Campus Lagarto, respeitando a proporção de 1 – 3 g

para 150 mL de água, de acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011; BRASIL, 2021).

No preparo do EACC, realizou-se, inicialmente, a padronização e homogeneização do tamanho das partículas por meio da pulverização das folhas por 1 minuto, com auxílio de um liquidificador (KIRAITHE *et al.*, 2015). As folhas trituradas e homogeneizadas foram pesadas e acondicionadas em *becker* para preparo do EACC (Figura 8).



Figura 8. Folhas do *C. citratus* trituradas e homogeneizadas para preparo do EACC.

O EACC foi preparado utilizando-se o método de extração à quente por infusão, considerando-se a proporção de 3 g de folhas secas trituradas para 150 mL de água destilada (AD) (total de 12 g de folhas para 600 mL de AD em cada preparo), em temperatura aproximada de 100°C.

As etapas para o preparo do EACC corresponderam a: 1 - Fervura da AD até 100°C; 2 – Transferência da AD para o *becker* contendo as folhas do *C. citratus* e manutenção do conteúdo em repouso e resfriamento em 25°C, por período de 15 min; 3 – Filtração em papel filtro; e 4 – Distribuição do filtrado em bandejas inox e armazenamento em freezer a -20°C por período mínimo de 72h, para total congelamento e posterior liofilização (Figura 9).



Figura 9. Etapas do preparo do EACC por extração à quente por infusão.

O repouso e resfriamento em TA no preparo do EACC foi realizado com a finalidade de simular o preparo dos chás utilizados como terapia alternativa por pacientes oncológicos (LORENZI; MATOS, 2002).

4.3.2 Liofilização do EACC

Após congelamento por período mínimo de 72 horas, as amostras do EACC foram colocadas em aparelho Liofilizador Modelo L101 da *Liotop*®, disponível no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia da UFS, Campus Lagarto, para realização do processo de liofilização.

O aparelho Liofilizador L101 utilizado era constituído de 8 adaptadores para encaixe de frascos de vidro - além de estante com quatro prateleiras para bandejas com até 18 cm - e uma bomba de vácuo de duplo estágio com palhetas rotativas banhadas a óleo e velocidade de 10,2 m³/h (170 lpm ou 6 cfm), sendo formado por: uma unidade condensadora em aço inox; capacidade de até 3 L de gelo dentro de 24h e capacidade total de 5 L; temperatura de até 55°C, possuindo refrigeração por compressor hermético com proteção térmica; e dupla ventilação, com indicação digital de vácuo na escala de 15.000 a 1 µHg. A secagem das amostras por liofilização foi realizada ajustando-se a temperatura do condensador para -52°C, voltagem de corrente alternada de 360 Vca, a uma pressão de vácuo de aproximadamente 115 µHg.

Após obtenção da massa final do extrato liofilizado, o rendimento total do extrato foi calculado por meio da 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). No preparo do EACC, a utilização de 72 g de folhas desidratadas de *C.citratus* resultou em 14,1563 g de EACC liofilizado, apresentando rendimento total de cerca de 19,6615% ($Re = (14,1563 / 72) \times 100$) a cada extração.

4.4 Identificação de constituintes químicos presentes no EACC e no OECC

4.4.1 Análise cromatográfica do EACC

Análise cromatográfica do EACC foi realizada no Laboratório de Ensaio Farmacêuticos e Toxicidade (LEFT) da UFS, Campus São Cristóvão, com a utilização de Cromatógrafo

Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (*Shimadzu, Kyoto, Japan*), composto por duas bombas LC-20D, degaseificador (DGU-20 A3), auto injetor (SIL-20A HT), detector de arranjos de diodos (SPD-M20A) e controlador de dados (CBM-20A).

A análise cromatográfica realizada consistiu na utilização de padrões internos para identificação de constituintes químicos presentes no EACC. Para tanto, foram utilizados padrões internos para detecção da presença do ácido caféico, ácido gálico e ácido clorogênico no EACC, constituintes amplamente descritos na literatura como presentes em preparações de extratos do *C. citratus* (CHEEL *et al.*, 2005; TAVARES *et al.*, 2015; MÉABED; ABOU-SREEA; ROBY, 2018; MUALA; DESOBGO; JONG, 2021; SOUSA *et al.*, 2021).

Para análise cromatográfica, solução padrão de 2000 µg/mL do EACC diluída em metanol/água (50:50, v/v) foi preparada, inicialmente, e submetida a banho de ultrassom durante 15 minutos; posteriormente, realizou-se a filtragem da solução padrão em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com poro de 0,45 µm.

Os solventes orgânicos utilizados na análise foram de alta eficiência (grau HPLC (*High performance liquid chromatography*)) e, para o desenvolvimento do método analítico, utilizou-se fase móvel constituída de água/ácido acético: metanol. A água para fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (*Millipore, São Paulo, Brasil; Direct-Q® 3UV*) e os solventes metanol e ácido acético de grau HPLC de 98% de pureza, obtidos da *Sigma Aldrich* e *Fluka Analytica (St Louis, MO, EUA)*.

Na análise cromatográfica, a taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção da amostra de 20 µL, durante 58 minutos de análise em TA. Para a aquisição dos cromatogramas, o comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 325 nm (detector de arranjo de diodos). O método gradiente utilizado para cromatografia líquida do EACC é descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Método gradiente utilizado para cromatografia líquida do EACC.

Tempo (min)	%B*
0 – 10	0
10 – 15	5
15 – 25	25
25 – 40	30
40 – 50	35
50 – 56	0
58	STOP

*% de metanol

Os padrões do ácido gálico, ácido caféico e ácido clorogênico foram injetados no aparelho nas mesmas condições que o EACC. Ao final da corrida no CLAE, os gráficos com as curvas com os espectros de absorvância, índice (tempo) de retenção e dados ultravioletas visíveis

(UV/vis), foram comparados através de recursos do detector de arranjo de fotodiodos e os cromatogramas foram processados utilizando o *Software Lab Solutions - Shimadzu*.

A linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados seguindo a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). A linearidade foi estabelecida avaliando o coeficiente de correlação (R^2) de uma curva de calibração obtida com a substância padrão em cinco concentrações diferentes: 1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os LD e LQ foram determinados pela relação sinal/ruído, utilizando a relação 3:1 e 10:1, respectivamente.

4.4.2 Análise cromatográfica do OECC

A análise cromatográfica do OECC foi realizada por cromatografia gasosa no Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de Sergipe (LABORGANICS) da UFS, Campus São Cristóvão, em equipamento de cromatografia em fase gasosa/espectrômetro de massas (GC-MS) da marca Shimadzu (Quioto, Japão), modelo QP2010 Ultra, contendo um amostrador automático AOC-20i e detector por ionização em chama (FID).

A separação dos constituintes do OECC foi realizada utilizando coluna capilar de sílica fundida *Restek Rtx®-5MS* revestida com 5%-difênil-95%-dimetilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25mm de espessura do filme). Hélio (99,995%) foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e as amostras (1,0 μL da solução em acetato de etila) foram injetadas com razão do split de 1:10. A temperatura do forno foi programada para 60°C (permanecendo por 4 min) com taxa de aquecimento de 3°C min^{-1} até 220°C, e então aquecida até 280°C à 20°C min^{-1} , ambas as temperaturas do injetor e interface foram de 280°C.

Os dados de espectrometria de massas (MS) e detecção por ionização em chama (FID) foram simultaneamente adquiridos empregando-se sistema de divisor de fluxo para os detectores; a razão de divisão de fluxo foi 5:1 (MS:FID). Um tubo restritor (coluna capilar) 0,4 m x 0,15 mm d.i. foi usado para conectar o divisor ao detector MS; um tubo restritor 0,5 m x 0,22 mm d.i. foi usado para conectar o divisor ao detector FID.

Os dados MS (cromatograma de íons totais, CIT) foram adquiridos no modo *full scan* (m/z 40–550) com velocidade de varredura de 0,3 scan/s, utilizando ionização por elétrons (EI) a 70 eV. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram 280°C e 200°C, respectivamente. A temperatura do FID foi mantida a 300°C e os gases utilizados para o FID foram hidrogênio, ar e hélio numa vazão de 30, 300 e 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente.

A quantificação de cada constituinte foi estimada pela normalização da área do pico (%) do FID. O percentual dos compostos foi calculado através das áreas dos picos e dispostos em ordem de eluição do GC. Os índices de retenção foram obtidos injetando-se uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C₇-C₃₀) e a identificação dos compostos foi feita com base nos índices de retenção (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) e na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas do sistema GC/MS (NIST107 e NIST21; WILEY8), juntamente com espectros de massas da literatura (ADAMS, 2007).

4.5 Ensaios de citotoxicidade

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do EACC e do OECC em linhagens celulares tumorais

4.5.1.1 Obtenção e manutenção das linhagens tumorais

A avaliação da citotoxicidade do EACC e do OECC foi realizada frente as linhagens tumorais do carcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10) e glioma (C6) (Tabela 3), obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e armazenadas para cultivo no Laboratório de Biologia e Imunologia do Câncer e Leishmania (LaBICel) da UFS, Campus de São Cristóvão.

Tabela 3. Linhagens de células tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

Histotipo	Linhagem	Origem	Aquisição
Carcinoma de pulmão	A549	<i>Homo sapiens</i>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Melanoma	B16-F10	<i>Mus musculus</i>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Glioma	C6	<i>Rattus norvegicus</i>	Universidade Federal do Rio de Janeiro

As linhagens tumorais foram mantidas em garrafas de cultivo em meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado a 10% (10% de Soro Fetal de Bovino (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) e incubadas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, com a finalidade de simular condições fisiológicas do organismo.

Na manutenção celular, após obtenção de confluência de 80% na garrafa, as células eram desprendidas da garrafa por meio de tratamento com solução Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25%;

EDTA 0,53 Mm) entre 5 e 15 min à 37°C; em seguida, a solução de Tripsina-EDTA era inativada por adição de meio DMEM suplementado a 10% (1:3) e o meio contendo as células era transferido para tubo Falcon de 15 mL, para centrifugação do conteúdo a 259 x g por 10 min à 4°C.

Após centrifugação, o sobrenadante era retirado e o pellet de células formado era ressuspenso em meio DMEM suplementado a 10%; em seguida, uma alíquota de 10 µL era retirada da amostra e acrescida de 10 µL de Azul de Tripán para determinação da viabilidade celular através da contagem de células viáveis em câmara de Neubauer; após determinação das células viáveis, a concentração de células era ajustada para subcultivo e/ou realização de experimentos.

4.5.1.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagens de células tumorais e determinação da CI_{50}

A determinação do potencial citotóxico do EACC e do OECC frente as linhagens da A549, B16-F10, e C6 foi realizada utilizando o método da Sulforodamina B (SRB), um corante aniônico que possibilita a avaliação da viabilidade celular através da medição do teor de proteínas ligadas a este eletrostaticamente (FERNANDES, 2014).

4.5.1.2.1 Determinação do grau de inibição celular do EACC e do OECC na concentração de 100 µg/mL

O potencial citotóxico do EACC e do OECC foi avaliado, inicialmente, utilizando-se concentração única de 100 µg/mL para avaliação do grau de inibição tumoral (GI) frente as linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6. A triagem inicial em concentração única realizada teve por objetivo a identificação dos compostos com a capacidade de inibir o crescimento tumoral em pelo menos 75% em cada linhagem tumoral (MAHMOUD *et al.*, 2011).

Para tanto, as linhagens celulares da A549, B16-F10 e C6 foram semeadas em placas de 96 poços (1 x 10⁴ células/poço – A549 e C6; 3 x 10³ células/poço – B16-F10) contendo meio DMEM suplementado a 10% e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 h, para promoção da aderência celular. Após 24 h, as células foram tratadas com a concentração de 100 µg/mL do EACC ou OECC e incubadas, posteriormente, pelo período de 72 h.

Após 72 h de incubação das amostras, o meio contendo os tratamentos, controle negativo e controle positivo foram descartados e as células fixadas com ácido tricloroacético (30%) por

uma hora à 4°C; posteriormente, realizou-se a lavagem da placa por 4 vezes com água destilada e secagem em TA por 24 h. Após esse período, 100 µL da solução de SRB 0,057% (p/v) dissolvida em ácido acético (1%) foi adicionada aos poços e mantida por 30 min em TA, realizando-se, posteriormente, a lavagem da placa por 4 vezes com ácido acético (1%) para remoção do excesso de corante; posteriormente, a placa foi mantida por 24 h para secagem em TA.

Após 24 h de secagem, 200 µL de solução de leitura TRIS base (10 mM; pH 10,5) foi acrescentada aos poços para diluição do SRB por 30 min e posterior leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HI*, Biotek, VT, EUA) por espectrofotometria, em comprimento de onda de 510 nm. Após a leitura, os valores de absorbância obtidos foram convertidos em porcentagem de GI, com a utilização da fórmula (FRANCA, 2021):

$$\%GI = \left\{ 100 - \left[\left(\frac{\text{Abs.}(tratamentos)}{\text{Abs.}(controle\ negativo)} \right) \times 100 \right] \right\}$$

Os controles negativo e positivo utilizados corresponderam ao dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 100 µg/mL, equivalente a concentração utilizada dos compostos testes e o cloridrato de doxorrubicina na concentração de 0,3 µg/mL, respectivamente.

O DMSO foi utilizado como controle negativo por tratar-se de tensor ativo utilizado na diluição dos compostos testes, tornando necessária a avaliação da presença de atividade citotóxica em seu uso frente as linhagens tumorais avaliadas. A concentração do cloridrato de doxorrubicina (doxorrubicina, pureza > 98%; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi determinada de acordo com a literatura (ANDRADE *et al.*, 2015).

A doxorrubicina representa um importante antineoplásico utilizado em tratamentos quimioterápicos em diferentes cânceres (TOMANKOVA *et al.*, 2015) e seu uso como controle positivo tem sido amplamente difundido em experimentos *in vitro* para avaliação da citotoxicidade de produtos naturais frente a linhagens tumorais (SILVA *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2020).

Os experimentos foram realizados em triplicata e avaliados em média e desvio - padrão. Após a determinação do GI os compostos foram classificados como atividade citotóxica fraca (GI < 50%), atividade citotóxica intermediária (GI entre 51% e 75%) e atividade citotóxica alta (GI > 75%), frente a capacidade de cada composto em inibir a proliferação celular nas linhagens da A549, B16-F10 e C6 (ANDRADE *et al.*, 2015).

4.5.1.2.2 Determinação da CI_{50} do EACC e OECC

A determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50% (CI_{50}) do efeito máximo e inibir 50% da viabilidade celular das linhagens tumorais foi realizada frente aos compostos que apresentaram $GI > 75\%$ para os tratamentos do EACC e OECC na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Desse modo, para determinação da CI_{50} , as linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6 foram tratadas com diferentes concentrações do EACC e OECC. As concentrações utilizadas foram 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 3,12 $\mu\text{g/mL}$ e 1,56 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.2 Avaliação da presença de atividade hemolítica no EACC e no OECC

4.5.2.1 Atividade hemolítica do EACC e do OECC em eritrócitos

A determinação da presença de atividade hemolítica do EACC e OECC foi realizada através de ensaio de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*).

As concentrações utilizadas para determinação da presença de atividade hemolítica do EACC e do OECC em eritrócitos foram determinadas seguindo protocolo anteriormente realizado e respeitando os limiares de concentrações descritas na literatura (DA SILVA *et al.*, 2019; AMARAL *et al.*, 2020).

4.5.2.2 Procedimento experimental

Amostras sanguíneas de 2 camundongos Swiss foram utilizadas para avaliação do potencial hemolítico do EACC e OECC em eritrócitos; os experimentos foram realizados em duplicata, com a utilização de amostra sanguínea de 1 animal para cada experimento independente.

Inicialmente, para coleta sanguínea em região orbicular do olho, os animais foram submetidos a anestesia transitória por inalação de isoflurano (1,5%), com a utilização de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela). Após anestesia, amostras sanguíneas foram coletadas com auxílio de um capilar de vidro heparinizado e as amostras armazenadas em tubos estéreis heparinizados.

Posteriormente, para obtenção de solução de eritrócitos, 2 mL do sangue total coletado foi diluído em 10 mL de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o pellet de células ressuspensas em solução salina; o processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes. Após lavagem inicial, os eritrócitos foram ressuspensos em solução salina para obtenção de solução de eritrócitos a 2% a ser utilizada no ensaio de hemólise.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, com a utilização de quatro concentrações do EACC e OECC - 1000 µg/mL (primeira fileira), 500 µg/mL (segunda fileira), 250 µg/mL (terceira fileira) e 125 µg/mL (quarta fileira). Solução salina foi utilizada como controle negativo e Triton X-100 a 1% como controle positivo; adicionalmente, potencial hemolítico do DMSO também foi avaliado (última fileira).

Inicialmente, 100 µL das diferentes concentrações do EACC ou OECC, controles positivo e negativo e DMSO foram colocados na placa e, em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos a 2% foram plaqueadas em todos os poços. As placas foram incubadas sob agitação constante em TA (25 ± 2°C) por período de 60 minutos e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O experimento é representado na Figura 10.

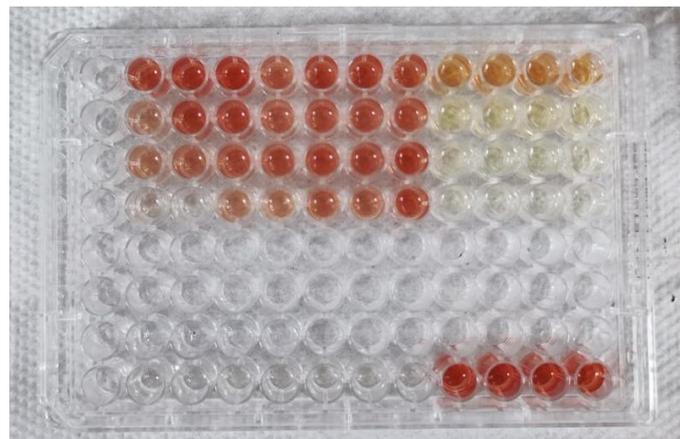


Figura 10. Ensaio de hemólise para avaliação da presença de atividade hemolítica no EACC e no OECC.

Após centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e transferido para outra placa para a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm (KANG *et al.*, 2009; PITA *et al.*, 2012). Os valores obtidos foram convertidos para percentual de hemólise com a utilização da fórmula (NI; MAHDAVI; GHEZI, 2019):

$$\% \text{ Hemólise} = [(T - CN)/(CP-CN)] \times 100$$

Sendo:

T: absorvância do EACC ou OECC.

CN: absorvância do controle negativo.

CP: absorvância do controle positivo.

A atividade hemolítica do EACC e OECC foi classificada em não tóxica (% hemólise < 10%), levemente tóxica (% hemólise – 10 a 49%), tóxica (% hemólise – 50 a 89%) e altamente tóxica (% hemólise – 90 a 100%) (ORSINE *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2019).

4.6 Associação *in vivo* do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU

4.6.1 Animais

No ensaio *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss, com massa corpórea de 30 ± 5 g, machos, adultos, jovens, saudáveis, e que não tinham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. Os animais foram divididos em pequenos grupos de 10 camundongos e alojados dentro de caixas de polipropileno (48.7 cm de comprimento, 33.1 cm largura e 21.4 cm altura) cobertas com forro de maravalha e proteção de grades metálicas apropriadas; a temperatura do local correspondente era de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e a umidade relativa de 30 a 70%. A iluminação era realizada por meio de ciclos de claro-escuro, com alternância de 12 h de luz e 12 h de obscuridade (FERREIRA *et al.*, 2016) e os animais tinham livre acesso a alimentação e água.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA), pareceres nº 17/2019 (ANEXO A) e nº 2726280621 (ANEXO B). Os animais foram tratados conforme os princípios éticos do CEPA, Brasil, respeitando as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Resolução Normativa Nº 12, 20/09/2013) e o número mínimo de animais necessários para alcançar os objetivos científicos.

4.6.2 Tumor experimental sarcoma 180

A associação do EACC ou OECC e o antineoplásico 5-FU *in vivo* foi realizada em modelo animal de tumor experimental sarcoma 180 (S180); as células do S180 utilizadas no presente

estudo foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), pertencentes a espécie *Mus musculus* e derivadas do sítio metastático (ascite).

As células do S180 foram mantidas em modelo animal na forma de tumor ascítico; a manutenção era realizada em camundongos Swiss provenientes do Biotério setorial da UFS e alojados no Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI) da UFS.

Para manutenção da viabilidade celular do S180, manutenção das células tumorais era realizada a cada 15 dias. Para realização da manutenção, o animal que continha as células tumorais era, inicialmente, anestesiado por inalação de isoflurano a 1,5%; e, após anestesia, as etapas do protocolo de manutenção consistiam em: 1. Eutanásia do animal que continha as células do S180 em tumor ascítico, por meio de deslocamento cervical; 2. Antissepsia alcoólica do abdômen; 3. Extração de 0,5 mL de líquido ascítico da cavidade abdominal por meio de punção ascítica; e 4. Mistura do líquido ascítico coletado a 5,0 mL de Ringer Lactato, para formação de uma suspensão de células a ser avaliada quanto a viabilidade celular.

A avaliação da viabilidade celular era realizada através do método de ensaio por exclusão com Azul de Tripán, que permitia distinguir as células tumorais viáveis das não viáveis. A identificação de células viáveis torna-se possível porque com a utilização do Azul de Tripán, as células não viáveis ficam com coloração azulada, enquanto as viáveis ficam brancas/translúcidas, permitindo sua contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Após avaliação da viabilidade celular, realizava-se a inoculação de 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal de animais saudáveis (BEZERRA *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2008b; CHEN *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2020).

4.6.3 Grupos experimentais

A avaliação da associação entre o EACC ou OECC e o antineoplásico 5-FU foi realizada em experimentos independentes. Em cada experimento, os animais foram divididos em 7 grupos (n = 10 animais por grupo), sendo os grupos identificados no exterior das caixas e mantidos em condições adequadas durante o protocolo experimental. Os grupos experimentais e vias de administração dos compostos estão descritas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Grupos experimentais para avaliação da associação do EACC e o antineoplásico 5-FU e vias de administração.

Grupos	Inoculação de células tumorais do S180	Administração terapêutica	Via
Controle negativo sem tumor	-	Veículo*	VO ¹

(Salina S)			
Controle negativo com tumor (Salina S180)	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	Veículo	VO
Controle positivo (5-FU)	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	5-FU (25 mg/kg/dia)	IP ²
EACC³ 50	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	EACC (50 mg/kg/dia)	VO
EACC 50 + 5-FU	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	EACC (50 mg/kg/dia) + 5-FU (25 mg/kg/dia)	VO + IP
EACC 100	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	EACC (100 mg/kg/dia)	VO
EACC 100 + 5-FU	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	EACC (100 mg/kg/dia) + 5-FU (25 mg/kg/dia)	VO + IP

* DMSO + Água ultrapura (AU).

¹ Via oral (gavagem).

² Via intraperitoneal.

³ Extrato aquoso do *Cymbopogon citratus*.

Tabela 5. Grupos experimentais para avaliação da associação do OECC e o antineoplásico 5-FU e vias de administração.

Grupos	Inoculação de células tumorais do S180	Administração terapêutica	Via
Controle negativo sem tumor (Salina S)	-	Veículo*	VO ¹
Controle negativo com tumor (Salina S180)	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	Veículo	VO
Controle positivo (5-FU)	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	5-FU (25 mg/kg/dia)	IP ²
OECC³ 25	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	OECC (25 mg/kg/dia)	VO
OECC 25 + 5-FU	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	OECC (25 mg/kg/dia) + 5-FU (25 mg/kg/dia)	VO + IP
OECC 50	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	OECC (50 mg/kg/dia)	VO
OECC 50 + 5-FU	2 x 10 ⁶ células/0,5mL/camundongos)	OECC (50 mg/kg/dia) + 5-FU (25 mg/kg/dia)	VO + IP

*DMSO + Água ultrapura (AU).

¹ Via oral (gavagem).

² Via intraperitoneal.

³ Óleo essencial do *Cymbopogon citratus*.

Obs. As doses utilizadas para os tratamentos com citral, identificado como constituinte majoritário do OECC, corresponderam as mesmas doses utilizadas para o OECC.

Na administração terapêutica, cálculo apropriado para a determinação da dose a ser administrada em cada animal foi realizado, considerando-se a dose por quilograma (kg) relacionada à média de massa corpórea do animal e a quantidade de aplicações que seria realizada ao longo do experimento. Os animais foram pesados diariamente e os ajustes necessários as doses a serem administradas foram realizados.

O antineoplásico 5-FU foi utilizado como controle positivo na dose de 25 mg/kg/dia por via intraperitoneal (IP), seguindo protocolo prático do tumor S180 descrito na literatura (AMARAL *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2020); por sua vez, o DMSO + Água ultrapura (AU) foram utilizados como controle negativo frente a sua utilização para preparo e diluição do EACC e OECC. As doses utilizadas encontram-se de acordo com a literatura (BIDINOTTO *et al.*, 2012; LULEKAL *et al.*, 2019; UMUKORO *et al.*, 2019).

A inclusão de grupo controle negativo com animais saudáveis (Salina S) justifica-se pela necessidade de avaliar parâmetros toxicológicos da associação; a utilização de duas doses diferentes de cada composto para realização dos experimentos justifica-se pela necessidade de identificar e comparar variações nos resultados encontrados frente a utilização de doses diferentes dos compostos.

4.6.4 Avaliação da associação do EACC e OECC com o antineoplásico 5-FU no S180

Com o objetivo de avaliar a associação entre o EACC ou OECC e o antineoplásico 5-FU, células tumorais do S180 foram inoculadas em camundongos Swiss saudáveis para experimentação *in vivo* e posterior análise por comparação entre os grupos quanto a redução do crescimento tumoral e a aspectos toxicológicos.

4.6.4.1 Protocolo experimental

A avaliação da associação do EACC ou OECC e o antineoplásico 5-FU foi realizada seguindo protocolo de 9 dias descrito em estudos anteriormente realizados. A descrição do protocolo experimental é apresentada na Figura 11.

O protocolo consistiu em: 1º dia: inoculação do tumor S180 (2×10^6 células/0,5 ml/camundongo) na região subcutânea axilar esquerda; 2º ao 7º dia: início do tratamento após 24h da inoculação do tumor e manutenção do tratamento por 7 dias consecutivos; 9º dia: coleta sanguínea e excisão de órgãos e tumores para realização de análises posteriores, após 24h da última administração dos tratamentos (AMARAL *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016).

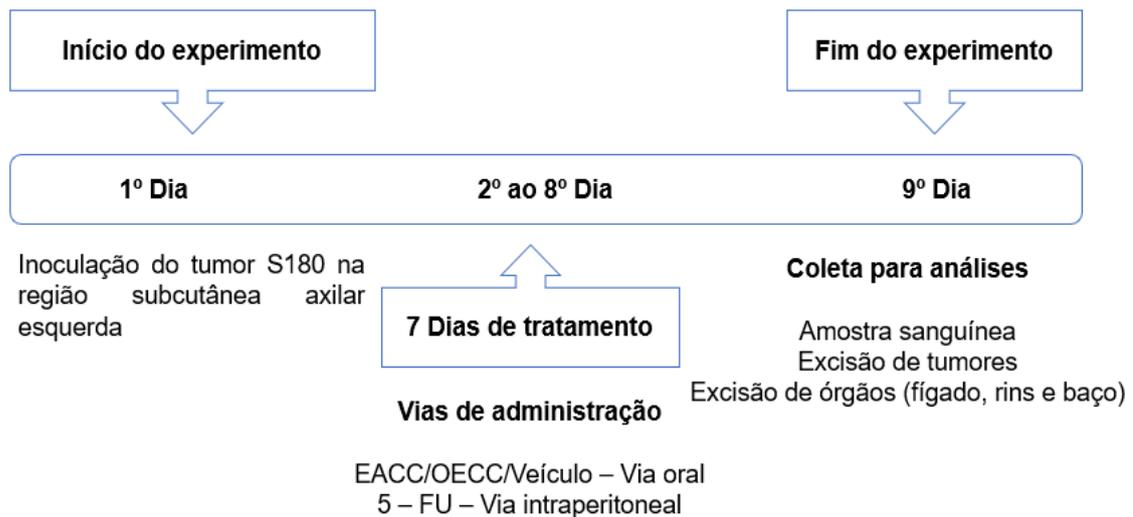


Figura 11. Descrição do protocolo experimental para avaliação da associação do EACC e OECC com o antineoplásico 5-FU no S180.

No primeiro dia experimental, as células do S180 utilizadas na experimentação *in vivo* foram obtidas dos animais da manutenção do S180 em modelo animal. Para tanto, animais que possuíam células tumorais do S180 em forma ascítica foram, inicialmente, anestesiados por inalação de isoflurano a 1,5% e eutanasiados por meio de descolamento cervical. Em seguida, após antissepsia do abdome, foi realizada a retirada de 5mL de líquido ascítico contendo as células tumorais, com posterior acréscimo de 20mL de ringer lactato, totalizando 25mL.

Para determinação da viabilidade celular do S180, uma alíquota de 50 µL da mistura foi retirada e acrescida de 50 µL de Azul de tripan, com posterior contagem de células viáveis (incolores) e diferenciação das células não viáveis (azuis) em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico. Após identificação das células viáveis, 2×10^6 células/0,5 mL foram transplantadas na região subcutânea axilar esquerda de camundongos saudáveis (BEZERRA *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2008a; AMARAL *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016).

Do 2º ao 8º dia experimental, a administração do EACC ou OECC nos animais foi realizada por meio de gavagem; veículo também foi administrado por gavagem entre os animais do grupo salina (FERREIRA *et al.*, 2016). A administração por via oral (gavagem) foi realizada com auxílio de uma cânula de gavagem para camundongos, sendo realizada uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos; por sua vez, a administração do 5-FU foi realizada por via intraperitoneal (AMARAL *et al.*, 2016).

Durante a realização dos tratamentos experimentais, a dor e o sofrimento dos animais foram minimizados e os animais que apresentaram sinais intensos e persistentes de dor e

sofrimento foram sacrificados por intervenção humana, de acordo com os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para tanto, a avaliação do bem-estar dos animais foi realizada diariamente, utilizando uma ficha para acompanhamento individual diário de sinais e sintomas durante o período de execução do experimento (ANEXO C), para observação de alterações comportamentais indicativas de sofrimento animal (movimentação, agitação, vocalização, agressividade, feridas/ulcerações, sinais evidentes de toxicidade, alimentação, ingesta hídrica e escores de dor). Por ser a dor considerada um fator estressor, antes de qualquer procedimento invasivo que pudesse causar dor, ou antes da eutanásia por deslocamento cervical, os animais foram submetidos a anestesia inalatória por isoflurano 1,5%.

No 9º dia experimental, após transcorrer período de 24h após a última administração dos tratamentos, os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (1,5%), com auxílio de um vaporizador associado a cilindro de oxigênio em ambiente com exaustão (capela) (AMARAL *et al.*, 2016), e realizou-se, inicialmente, a coleta de 1,0 mL de amostra sanguínea pelo plexo retrorbital (WAYNFORTH, 1980) que foi armazenada em tubos/filamentos estéreis heparinizados para avaliação dos parâmetros hematológicos (0,5 mL) e em tubos não heparinizados (0,5 mL) para análise bioquímica.

Após coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical e, após confirmação da morte do animal - através da observação da ausência da frequência cardíaca e respiratória, desaparecimento dos movimentos e do tônus muscular e perda da ação reflexa a estímulos táteis, térmicos e dolorosos dos camundongos -, realizou-se a excisão e pesagem dos tumores e órgãos a serem avaliados.

Fígado, rins, baço e tumores foram excisados, realizando-se análise macroscópica – avaliação morfológica quanto ao tamanho, cores, presença de áreas de necrose, supuração e/ou fibrose, bem como consistência do tecido e ocorrência de hemorragias (FERREIRA *et al.*, 2016).

A mensuração das massas dos tumores foi realizada para comparação do percentual de Inibição do crescimento Tumoral (IT) entre os grupos. O IT foi calculado através da fórmula (AMARAL *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016):

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Sendo:

A – Média dos pesos do tumor no grupo controle;

B – Média dos pesos do tumor nos animais tratados.

Ao final do experimento, os animais foram armazenados em freezer no biotério setorial do Departamento de Fisiologia da UFS, para posterior coleta pelo serviço de lixo seletivo da universidade.

4.6.4.2 Avaliação de parâmetros toxicológicos

A avaliação da toxicidade da associação entre o EACC ou OECC com antineoplásico 5-FU foi realizada entre os grupos. Os parâmetros avaliados corresponderam a massa corpórea, ingesta de água e consumo de ração, massa dos órgãos, parâmetros hematológicos e bioquímicos e análise morfológica dos órgãos.

4.6.4.2.1 Determinação da massa corpórea

Os animais de cada grupo foram submetidos a pesagem corporal a partir do dia 0 de experimentação, realizando-se diariamente a verificação da massa corpórea com auxílio de balança analítica, permitindo ao final a avaliação da variação da massa corpórea durante e ao final do protocolo experimental.

4.6.4.2.2 Determinação da ingesta de água e consumo de ração

O acompanhamento da ingesta de água e consumo de ração por grupo foi realizado diariamente durante todo o experimento, de forma a permitir a verificação do consumo médio de ração e ingesta de água por grupo durante o protocolo experimental e de variações indicativas de alterações na ingesta alimentar e hídrica frente os tratamentos realizados.

4.6.4.2.3 Determinação da massa dos órgãos

Fígado, rins e baço foram excisados dos animais para avaliação macroscópica. Após excisão, realizou-se a análise macroscópica dos órgãos quanto a mudanças de coloração, presença de hemorragia, necrose, entre outras alterações, e a determinação da massa de cada órgão. A massa dos órgãos foi determinada através de pesagem em balança analítica e posterior

padronização para 100 g de massa corpórea, utilizando-se a fórmula (AMARAL, 2018; SANTOS, 2018):

$$\text{Massa dos órgãos g/100g} = \text{MMO (g)} \times 100 \text{ (g)} / \text{MMCA (g)}$$

Sendo:

MMO = Média da massa dos órgãos

MMCA = Média da massa corpórea dos animais

4.6.4.2.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Parâmetros hematológicos avaliados incluíram parâmetros eritrocitários (hemácias, hemoglobina e hematócrito) e leucocitários (leucócito total e diferencial). Análises hematológicas eritrocitárias e leucocitárias foram realizadas em analisador automatizado (Icounter 3D). Análise leucocitária diferencial foi realizada através do preparo de extensões sanguíneas com aproximadamente 20 µL de amostra sanguínea em lâmina, que foram posteriormente coradas pelo método de Leishmann (BAIN *et al.*, 2011) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos circulantes.

4.6.4.2.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Parâmetros bioquímicos avaliados corresponderam a aqueles que poderiam refletir alterações na função hepática e renal dos animais em grupos experimentais. Análises para avaliação hepática incluíram a determinação da alanina aminotransferase (ALT), anteriormente denominada por transaminase glutâmica-pirúvica (TGP), o aspartato aminotransferase (AST), anteriormente denominado por transaminase glutâmica-oxalacética (TGO), e a fosfatase alcalina (FA). Por sua vez, análises para avaliação renal incluíram a determinação da ureia, creatinina e ácido úrico.

Para avaliação bioquímica, as amostras coletadas em tubo sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação por 15 minutos, com 3000 rpm, para obtenção do soro utilizado para as dosagens bioquímicas em analisador semiautomatizado (*Prietest Touch*) com kits da *Labtest*.

Análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas em parceria ao Laboratório de Hematologia e Toxicologia (HEMATOX) da UFS.

4.6.4.2.6 Avaliação morfológica dos órgãos

Fígado, rins e baço foram avaliados macroscopicamente quanto a morfologia e presença de alterações (tamanho, cores, presença de áreas de necrose, supuração e/ou fibrose, bem como consistência do tecido e ocorrência de hemorragias).

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a média e desvio padrão ou erro padrão da média. A CI_{50} foi determinada por regressão não-linear. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de *Shapiro Wilk*. Não foi encontrado impedimento para a aplicação de testes paramétricos. Os dados foram comparados por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) com pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$), utilizando o programa Prisma versão 8.0.2 (*GraphPad Software*).

5 RESULTADOS

5.1 Constituintes químicos presentes no EACC e no OECC

O cromatograma obtido na análise cromatográfica do EACC liofilizado é apresentado na Figura 12.

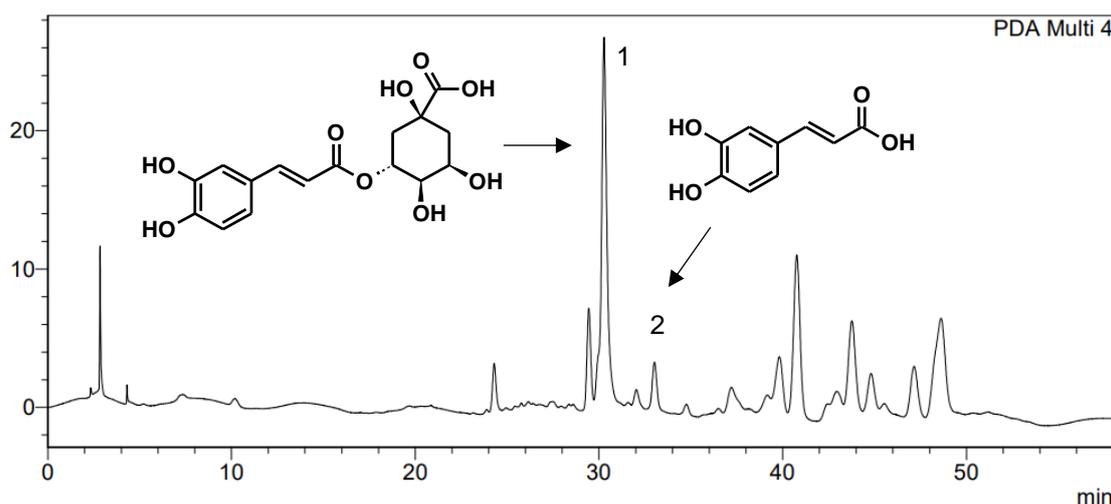


Figura 12. Análise cromatográfica do EACC obtida em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência. Representação da fórmula estrutural do ácido clorogênico (pico 1) e do ácido caféico (pico 2).

Os constituintes identificados na análise cromatográfica corresponderam ao ácido clorogênico (pico 1) e ao ácido caféico (pico 2), com tempo de retenção de 31 e 33 min, respectivamente; as fórmulas estruturais do ácido clorogênico e do ácido caféico também são representadas na Figura 11.

O ácido clorogênico apresentou maior resposta na análise cromatográfica realizada. Desse modo, a curva de calibração para quantificação do ácido clorogênico nas condições propostas obteve a equação da reta de $y = 89672x - 111411$ e R^2 de 0,9907, comprovando a linearidade do método. Os valores dos LD e LQ foram 0,81 e 2,44 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, demonstrando a sensibilidade do método.

O preparo de soluções (MeOH:H₂O) do EACC em concentração de 2,4 mg/mL, para quantificação do ácido clorogênico, obteve o valor de 2,5 mg de ácido clorogênico por grama do EACC.

Os principais constituintes encontrados na análise cromatográfica do OECC são apresentados na Tabela 6. O cromatograma obtido e a representação dos constituintes majoritários são apresentados na Figura 13.

Tabela 6. Identificação de constituintes químicos presentes no OECC.

	Compostos	tr (min)	IRR exp.*	IRR lit.**	GC-FID (% área do pico)
					OECC
1	a-fencheno	9.105	945	945	0,60
2	6-metilhept-5-en-2-ona	10.655	985	981	1,84
3	Dihidro-1,8-cineol	11.005	989	988	0,18
4	limoneno	12.495	1027	1024	0,16
5	7-metiloctan-4-ona	14.535	1070	-	0,59
6	linalol	15.875	1099	1095	0,25
7	citronelal	18.450	1152	1148	0,84
8	(Z)-isocitral	19.025	1163	1160	0,87
9	(E)-isocitral	19.925	1182	1177	1,61
10	citronelol	22.495	1235	1223	0,48
11	neral	23.070	1247	1235	37,22
12	geraniol	23.595	1261	1249	0,74
13	geranial	24.235	1271	1264	46,75
14	undecan-2-ona	25.315	1294	1293	0,31
15	acetato de geranila	29.445	1384	1379	1,91
16	b-elemeno	29.840	1392	1389	0,15
17	(E)-cariofileno	31.140	1422	1417	2,44
18	a-humuleno	32.600	1455	1452	0,27
19	g-cadineno	35.215	1516	1513	1,14
20	óxido de cariofileno	38.135	1587	1582	0,82
Total					99,83

* Índice de retenção experimental calculado de acordo com van den Dool & Kratz (1963);

** Índice de retenção da literatura (Adams, 2007);

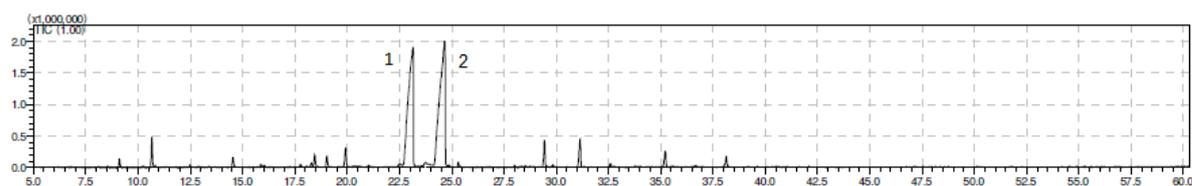


Figura 13. Análise cromatográfica do OECC obtida em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. Representação dos picos dos constituintes majoritários do OECC: neral (pico 1) e geranial (pico 2).

Os principais constituintes encontrados no OECC corresponderam ao geranial (46,75%) e ao neral (37,22%); o espectro de massas do neral e geranial são apresentados nas Figuras 14

e 15, respectivamente. O geranial (trans – isômero) e o neral (cis-isômero) são isômeros que formam o constituinte isolado citral (DI MOLA *et al.*, 2017). A fórmula molecular do geranial e neral corresponde a $C_{10}H_{16}O$ e suas estruturas químicas são apresentadas na Figura 16.

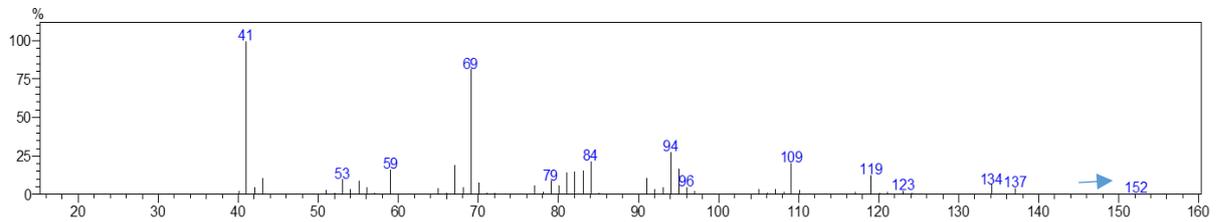


Figura 14. Espectro de massas do neral. A massa molecular do neral é representada pela seta (152 MM).

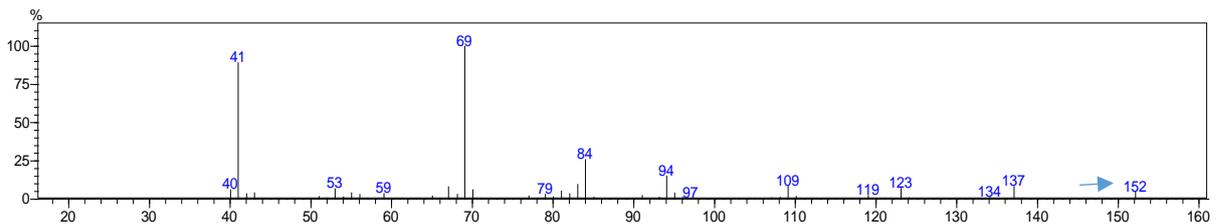
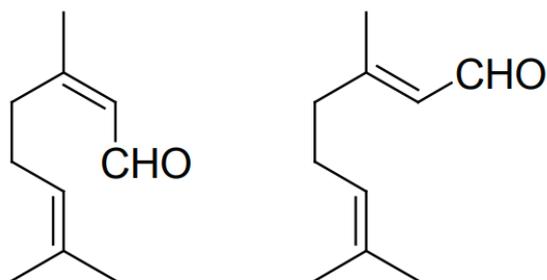


Figura 15. Espectro de massas do geranial. A massa molecular do geranial é representada pela seta (152 MM).



Fonte: Adaptado de FURLAN, M.R. et al. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC) Staf, Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 686-691, 2010.

Figura 16. Estrutura química do neral e geranial.

Na análise também foram identificados traços dos compostos: triciclono, α -pineno, β -pineno, n-octanal, (*Z*)- β -ocimeno, (*E*)- β -ocimeno, nonan-2-ona, rosefurano epóxido, n-decanal, acetato de citronelila, eugenol, ácido nérico, dodecanal, germacreno D, γ -cadineno, elemol e humuleno epóxido II.

Desse modo, a análise cromatográfica identificou que o citral representa o constituinte majoritário do OECC avaliado; nesse sentido, o constituinte isolado citral foi obtido em parceria ao Laboratório de Neurociência e Ensaios Farmacológicos (LANEF) da UFS, Campus São Cristóvão – Lote S47170-258, *Sigma-Aldrich* e incluído em análises comparativas posteriores.

5.2 Atividade citotóxica do EACC e do OECC *in vitro*

O %GI para o EACC, OECC e para o constituinte isolado citral em concentração única de 100 µg/mL frente a linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6 são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Grau de inibição celular do EACC, OECC e do constituinte isolado citral frente as linhagens de células tumorais da A549, B16-F10 e C6.

	A549	B16-F10	C6
	%GI	%GI	%GI
EACC	30,02 ± 7,10	45,50 ± 9,14	24,73 ± 13,83
OECC	83,81 ± 2,70	90,53 ± 1,05	86,87 ± 2,77
Citral	81,91 ± 3,39	90,73 ± 1,23	86,55 ± 4,38
Doxorrubicina	81,66 ± 0,95	88,66 ± 2,90	76,22 ± 4,77

Os valores de % GI são apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Atividade citotóxica fraca foi identificada nos tratamentos das linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6 com o EACC (GI<50%). Por sua vez, atividade citotóxica alta foi identificada nos tratamentos das linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6 com o OECC ou citral (GI>75%). Desse modo, por apresentarem GI > 75% e atividade citotóxica alta, realizou-se a determinação da CI₅₀ do OECC e do constituinte isolado citral para as três linhagens tumorais, sendo apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração inibitória média capaz de produzir 50% do efeito máximo (CI₅₀) do OECC e do constituinte isolado citral frente as linhagens tumorais da A549, B16-F10 e C6.

	A549	B16-F10	C6
	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
OECC	12,87 (11,07 - 15,07)	6,77 (5,09 - 8,93)	32,13 (24,10 - 42,25)
Citral	18,32 (14,37 - 23,68)	6,2 (4,8 - 7,8)	28,55 (20,90 - 37,71)

Os dados são apresentados como valores de CI₅₀ em µg/mL e intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A determinação da CI_{50} auxilia na identificação de compostos promissores para a terapêutica oncológica, por sua atividade citotóxica frente a linhagens tumorais. Para tanto, óleos e constituintes isolados são considerados promissores quando apresentam $CI_{50} < 30$ $\mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} < 4$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2016).

Nesse sentido, dados da CI_{50} do OECC e do citral frente as linhagens da A549, B16-F10 e C6 salientam que o OECC apresenta atividade citotóxica promissora frente as linhagens tumorais da B16-F10 e da A549 ($CI_{50} < 30$ $\mu\text{g/mL}$).

5.3 Atividade hemolítica do EACC e do OECC frente a eritrócitos

Na avaliação da atividade hemolítica do EACC, OECC e do citral, 100% de hemólise foi encontrada para o Triton X 1%, utilizado como controle positivo, caracterizando toxicidade alta para membrana eritrocitária no estudo.

O EACC apresentou toxicidade leve a membrana eritrocitária na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($18,27 \pm 0,72$; %H 10 a 49%), não sendo identificada atividade hemolítica nas concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo a ausência de toxicidade em eritrócitos em concentrações ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$. Dados sobre a atividade hemolítica do OECC e do constituinte isolado citral são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade hemolítica do OECC e do constituinte isolado citral em eritrócitos.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	OECC	Citral	<i>p</i> valor
1000	$73,31 \pm 3,84$	$59,40 \pm 3,08^*$	0,0030
500	$63,87 \pm 2,21$	$52,53 \pm 0,84^*$	0,0226
250	$31,34 \pm 2,10$	$18,00 \pm 1,54^*$	0,0047
125	$2,85 \pm 1,04$	$2,52 \pm 1,16$	-

Os dados foram apresentados como média \pm o erro padrão da média do %Hemólise. Os experimentos foram realizados em duplicata. Triton X 1% foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao OECC.

O OECC e o constituinte isolado citral apresentaram toxicidade a membrana eritrocitária nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, toxicidade leve na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ e ausência de toxicidade na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo a ausência de toxicidade em eritrócitos em concentrações ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$. O citral apresentou $<$ %Hemólise nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado ao OECC.

5.4 Associação *in vivo* do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU

Na avaliação da associação *in vivo* do EACC, OECC e do constituinte isolado citral com o 5-FU, foi considerado grau de inibição tumoral igual a 0 para o controle negativo, tratado com veículo.

Na avaliação da associação do EACC com o antineoplásico 5-FU, o controle negativo apresentou média de crescimento tumoral de $1,52 \pm 0,08$ g; por sua vez, o controle positivo apresentou média de crescimento tumoral de $0,36 \pm 0,07$ g, com %IT de 76,00%. Diferença significativa foi observada entre o controle negativo e positivo ($p < 0,0001$). Dados sobre o crescimento da massa tumoral do S180 nos grupos experimentais são descritos na Figura 17.

No tratamento do S180, grupos tratados apenas com EACC 50 e 100 mg/kg/dia apresentaram crescimento tumoral médio de $1,16 \pm 0,17$ g e $1,26 \pm 0,11$ g, respectivamente, sem diferença significativa em relação ao crescimento da massa tumoral do grupo salina ($p = 0,2044$ e $p = 0,5132$, respectivamente). Adicionalmente, não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados com 50 e 100 mg/kg/dia do EACC ($p = 0,9858$).

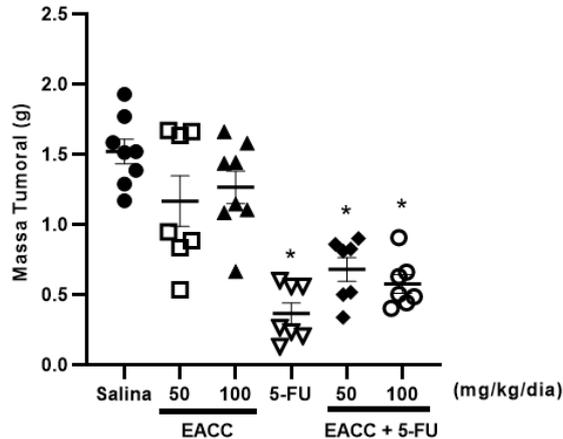


Figura 17. Efeito da associação entre o antineoplásico 5-FU e o EACC nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia frente ao crescimento da massa tumoral do S180. Dados foram apresentados como valores individuais e média \pm o erro padrão da média ($n = 7$ a 10 animais/grupo) e os resultados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

A associação entre o 5-FU e o EACC nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia identificou que o grupo tratado com EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU apresentou crescimento tumoral médio de $0,67 \pm 0,08$ g e %IT de 55,29% e o tratado com EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU de $0,57 \pm 0,06$ g e 62,09%, respectivamente.

Diferença significativa foi observada entre o grupo salina e os grupos tratados com EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU ($p < 0,0001$). No entanto, não houve diferença significativa em relação ao crescimento da massa tumoral e %IT entre o grupo tratado apenas com 5-FU e os grupos tratados com a associação entre o EACC nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia e o 5-FU ($p = 0,3532$ e $p = 0,7539$, respectivamente).

Dessa forma, os dados da associação do EACC com o 5-FU sugerem que o EACC nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia não interferiu no crescimento tumoral do S180, frente ao tratamento dos animais com 5-FU.

No tratamento do S180 com o OECC, o controle negativo apresentou crescimento tumoral médio de $1,09 \pm 0,17$ g e o controle positivo de $0,22 \pm 0,04$ g, com %IT de 79,74%; diferença significativa foi encontrada entre os grupos ($p < 0,0001$). Na Figura 18 são apresentados os dados comparativos sobre o crescimento tumoral do S180 entre os tratamentos.

Grupos tratados com OECC nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia apresentaram médias de $0,68 \pm 0,13$ g e $0,99 \pm 0,16$ g em crescimento da massa tumoral, respectivamente; o tratamento com o OECC frente o S180 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia demonstrou que não houve diferença significativa quanto a massa tumoral (g) e o %IT do controle negativo ($p = 0,2187$ e $p = 0,9949$). Não foi identificada diferença significativa entre os grupos tratados com OECC 25 e 50 mg/kg/dia ($p = 0,4922$).

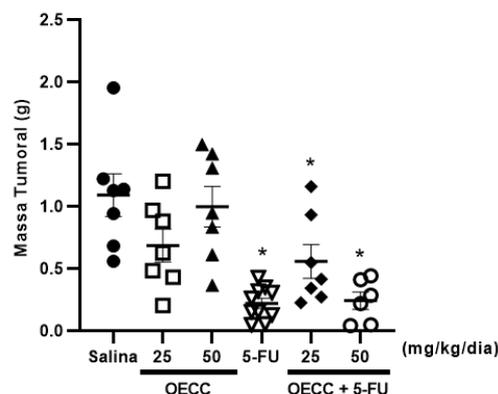


Figura 18. Efeito da associação entre o antineoplásico 5-FU e o OECC nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia frente ao crescimento da massa tumoral do S180. Dados foram apresentados como valores individuais e média \pm o erro padrão da média ($n = 6$ a 10 animais/grupo) e os resultados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado com o grupo salina.

No tratamento em associação do OECC e o 5-FU, o grupo tratado com OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU apresentou média de $0,55 \pm 0,13$ g em crescimento tumoral e %IT de 48,88%; o tratado com OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU de $0,24 \pm 0,07$ g e 77,78%, respectivamente.

Diferença significativa foi encontrada entre o controle negativo e os grupos tratados com OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU ($p=0,0475$ e $p=0,0006$); no entanto, entre o grupo 5-FU e os grupos OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU não foi identificada diferença significativa em relação ao crescimento tumoral e %IT ($p=0,3235$ e $p>0,9999$, respectivamente).

Os dados da associação do OECC com o 5-FU sugerem que o OECC nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia não interferiu no crescimento tumoral do S180, frente ao tratamento dos animais com 5-FU.

Análises da associação entre o constituinte isolado citral, identificado como majoritário do OECC, e o 5-FU, também foram realizadas; para tanto, considerou-se os controles negativo e positivo do OECC. Dados sobre o crescimento tumoral do S180 entre os grupos experimentais são visualizados na Figura 19.

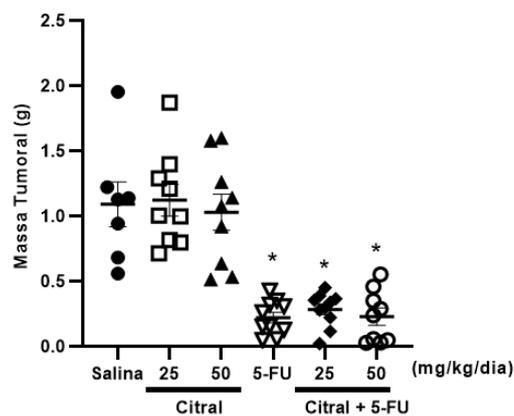


Figura 19. Efeito da associação entre o antineoplásico 5-FU e o constituinte isolado citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia frente ao crescimento da massa tumoral do S180. Dados foram apresentados como valores individuais e média \pm o erro padrão da média ($n = 6$ a 10 animais/grupo) e os resultados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p<0,05$ comparado com o grupo salina.

Grupos tratados com o constituinte isolado citral, nas mesmas doses que o OECC – 25 e 50 mg/kg/dia, apresentaram crescimento tumoral médio de $1,12 \pm 0,12$ g e $1,02 \pm 0,13$ g, respectivamente, sem diferença significativa em relação ao controle negativo ($p>0,9999$ e $p=0,9985$, respectivamente) e entre as doses de 25 e 50 mg/kg/dia ($p=0,9858$).

A associação do constituinte isolado citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia com o antineoplásico 5-FU identificou média de crescimento tumoral de $0,28 \pm 0,04$ g com %IT de 74,01% para o grupo tratado com Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e de $0,22 \pm 0,06$ g e %IT de 79,03% no tratamento com Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU.

Diferença significativa foi encontrada entre o controle negativo e os grupos tratados com 5-FU, Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU ($p < 0,0001$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo 5-FU e os grupos Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU ($p = 0,9971$) e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU ($p > 0,9999$).

Os dados da associação do constituinte isolado citral com o 5-FU sugerem que, assim como para o OECC, seu constituinte majoritário citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia não interferiu no crescimento tumoral do S180, frente ao tratamento dos animais tratados com 5-FU.

Análises adicionais para avaliação de diferenças entre os grupos tratados nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia do OECC ou do constituinte isolado citral, associado ou não ao 5-FU, não evidenciaram diferença significativa em relação ao crescimento tumoral do S180 e %IT entre os grupos tratados com OECC ou com seu constituinte majoritário, o citral.

5.5 Avaliação de aspectos toxicológicos frente a associação do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU *in vivo*

5.5.1 Massa corpórea, ingestão de água e consumo de ração

Dados sobre a variação da massa corporal do início ao fim do protocolo experimental de 9 dias frente o tratamento com EACC associado ou não ao 5-FU são apresentados na Tabela 10 e a variação da massa corporal nos dias pares do experimento é visualizada na Figura 20.

Tabela 10. Variação início ao fim da massa corporal dos grupos experimentais tratados com EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU.

Grupos experimentais	Δ Massa corporal (g)	<i>p</i> valor
Salina S	$-0,22 \pm 1,02$	-
Salina S180	$6,30 \pm 0,51^*$	$<0,0001$
EACC 50	$4,10 \pm 1,22^*$	0,0084
EACC 100	$6,00 \pm 0,74^*$	$<0,0001$
5-FU	$0,00 \pm 0,49^\#$	$<0,0001$
EACC 50 + 5-FU	$0,80 \pm 0,66^\#$	0,0002
EACC 100 + 5-FU	$2,60 \pm 0,80^\#$	0,0301

O efeito da associação do EACC em mg/kg/dia e o antineoplásico 5-FU na variação da massa corpórea (g). Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados

avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo sem tumor; # $p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

Diferença significativa na variação da massa corpórea do início ao fim do experimento foi encontrada entre o grupo Salina S e os grupos Salina S180, EACC 50 mg/kg/dia e EACC 100 mg/kg/dia, que apresentaram aumento da massa corpórea, e entre o grupo Salina S180 e os grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, que apresentaram discreto ou ausente aumento de massa corpórea ao final do protocolo experimental.

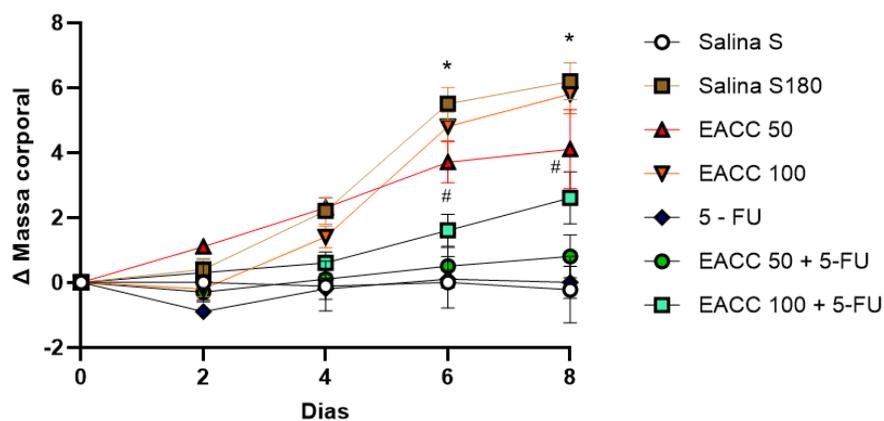


Figura 20. Variação da massa corporal nos dias pares dos grupos experimentais tratados com EACC em mg/kg/dia associado ou não ao antineoplásico 5-FU. Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo sem tumor; # $p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

A associação do EACC com o antineoplásico 5-FU não apresentou papel significativo na variação da massa corporal do início ao fim do experimento nos grupos tratados com 5-FU, visto que não foi encontrada diferença significativa entre o grupo 5-FU e os grupos EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU.

A variação dia a dia da massa corporal identificou que, no dia 6 experimental diferença significativa já era identificada entre o grupo Salina S e os grupos Salina S180, EACC 50 mg/kg/dia e EACC 100 mg/kg/dia ($p < 0,0001$), e entre o grupo Salina S180 e os grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU ($p < 0,0001$).

Hábitos de ingestão de água e, principalmente, consumo de ração durante o protocolo experimental podem influenciar diretamente na variação da massa corporal dos grupos experimentais. Desse modo, dados sobre o consumo médio de ração e de ingestão de água durante o experimento são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Consumo médio de ração e de ingesta de água dos grupos experimentais tratados com EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU.

Grupos experimentais	Ração (g)	<i>p</i> valor	Água (mL)
Salina S	53,13 ± 1,99	-	70,43 ± 4,38
Salina S180	57,63 ± 2,13	-	77,13 ± 4,83
EACC 50	57,50 ± 2,58	-	83,00 ± 3,12
EACC 100	62,25 ± 2,47	-	84,25 ± 4,46
5-FU	46,63 ± 1,41 [#]	0,0140	74,75 ± 2,93
EACC 50 + 5-FU	50,00 ± 2,07	-	75,50 ± 2,46
EACC 100 + 5-FU	51,00 ± 2,42	-	79,00 ± 2,98

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. [#]*p* < 0,05 comparado ao controle negativo com tumor.

O consumo médio de ração e de ingesta de água entre os grupos evidenciou que ao final do protocolo experimental diferença significativa no consumo médio de ração por grupo foi observada apenas entre o grupo Salina S180 e o grupo 5-FU, que apresentou consumo de ração menor quando comparado ao controle negativo com tumor, não sendo identificada diferença significativa na ingesta de água entre os grupos experimentais.

A associação do EACC 50 e 100 mg/kg/dia com o 5-FU identificou que o EACC também não influenciou na ingesta de água e consumo de ração dos animais tratados com 5-FU, visto que diferença significativa não foi encontrada entre o grupo 5-FU e os grupos EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU.

A associação do OECC ou do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU e sua relação com a variação da massa corporal dos grupos experimentais do início ao fim do protocolo experimental são apresentados na Tabela 12.

Dados sobre a variação da massa corporal dia a dia durante o protocolo experimental com o OECC e com o constituinte isolado citral são apresentados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Tabela 12. Variação início ao fim da massa corporal dos grupos experimentais tratados com OECC ou com o constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU.

	Δ Massa corporal (g)	<i>p</i> valor
Salina S	-1,40 ± 0,40	-
Salina S180	3,00 ± 0,74*	0,0012
OECC 25	5,20 ± 0,78*	<0,0001
Citral 25	1,66 ± 0,76*	0,0305
OECC 50	4,60 ± 0,70*	<0,0001
Citral 50	2,00 ± 0,53*	0,0083
5-FU	-3,80 ± 0,44 [#]	<0,0001

OECC 25 + 5-FU	$-1,90 \pm 0,88^{\#}$	0,0002
Citral 25 + 5-FU	$-2,80 \pm 0,71^{\#}$	<0,0001
OECC 50 + 5-FU	$-3,00 \pm 0,94^{\#}$	<0,0001
Citral 50 + 5-FU	$-3,50 \pm 0,87^{\#}$	<0,0001

Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo sem tumor; $^{\#}p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

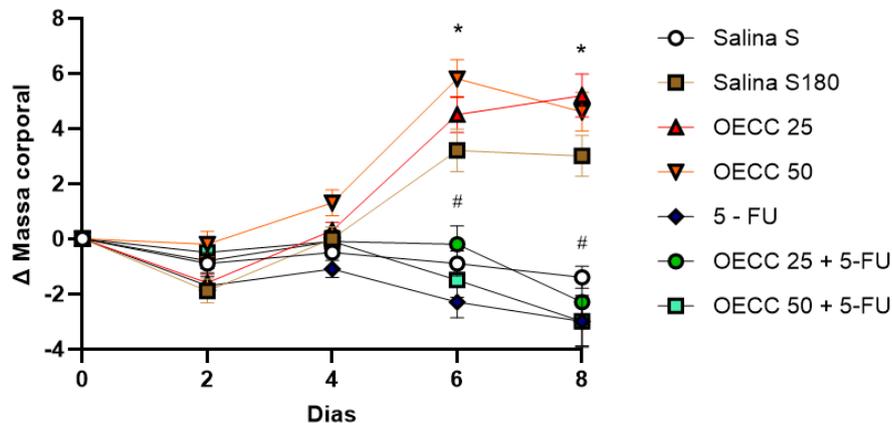


Figura 21. Variação da massa corporal nos dias pares dos grupos experimentais tratados com OECC associado ou não ao antineoplásico 5-FU. Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo sem tumor; $^{\#}p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

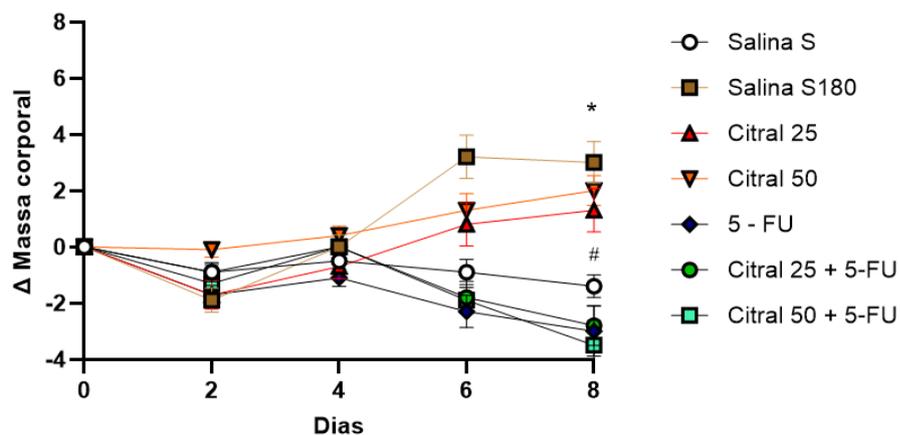


Figura 22. Variação da massa corporal dia a dia dos grupos experimentais tratados com o constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU. Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo sem tumor; $^{\#}p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

Diferenças significativas foram observadas entre o grupo Salina S e os grupos Salina S180, OECC 25 mg/kg/dia e OECC 50 mg/kg/dia, que apresentaram aumento da massa corporal ao final do experimento. Redução da massa corporal também foi encontrada nos grupos tratados com 5-FU, OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU quando comparado ao grupo Salina S180.

Os dados também evidenciaram que, assim como para o OECC, diferenças significativas foram encontradas na massa corporal entre os grupos Salina S e os grupos Citral 25 mg/kg/dia e Citral 50 mg/kg/dia, que apresentaram aumento da massa corporal ao final do experimento, e entre os grupos Salina S180 e os grupos Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU, que apresentaram redução da massa corporal ao final do experimento.

Diferenças significativas na variação da massa corporal dos grupos experimentais tratados com OECC associado ou não ao 5-FU foram observadas a partir do dia 6 experimental entre o grupo Salina S e os grupos Salina S180, OECC 25 mg/kg/dia e OECC 50 mg/kg/dia ($p < 0,0001$), que apresentaram aumento da massa corpórea, e entre o grupo Salina S180 e os grupos tratados com 5-FU, OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU, que apresentaram redução da massa corpórea ($p < 0,0001$).

No tratamento com o constituinte isolado citral, diferenças significativas na variação da massa corpórea foram encontradas, principalmente, no dia 8 experimental. Diferenças foram encontradas entre o grupo Salina S e os grupos Citral 25 mg/kg/dia ($p = 0,0018$) e Citral 50 mg/kg/dia ($p < 0,0001$), que apresentaram aumento da massa corporal, e entre o grupo Salina S180 e os grupos Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU ($p < 0,0001$), que apresentaram redução da massa corporal.

No entanto, a avaliação de parâmetros da associação do OECC e do constituinte isolado citral com o 5-FU não identificou diferença significativa entre a massa corporal do grupo 5-FU e os grupos OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU, sugerindo que a associação não interferiu na massa corpórea dos animais tratados com 5-FU.

Dados sobre a ingestão de água e consumo de ração nos grupos experimentais tratados com OECC ou com o constituinte isolado citral associado ou não ao 5-FU são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Consumo médio de ração e de ingesta de água dos grupos experimentais tratados com OECC ou com o constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU.

Grupos experimentais	Ração (g)	<i>p</i> valor	Água (mL)	<i>p</i> valor
Salina S	62,43 ± 6,40	-	121,1 ± 2,40	-
Salina S180	53,13 ± 3,62	-	97,50 ± 4,40*	<0,0001
OECC 25	51,88 ± 3,91	-	82,38 ± 3,85*	<0,0001
Citral 25	60,00 ± 2,65	-	64,25 ± 3,49*#	<0,0001 0,0482
OECC 50	47,50 ± 4,89	-	68,57 ± 5,00*#	<0,0001 0,0002
Citral 50	63,50 ± 1,42	-	81,50 ± 2,02*#	<0,0001
5-FU	39,50 ± 3,16*	0,0098	68,63 ± 2,82*#	<0,0001
OECC 25 + 5-FU	43,75 ± 3,97	-	74,14 ± 3,26*#	<0,0001 0,0047
Citral 25 + 5-FU	42,57 ± 6,11*	0,0255	75,63 ± 3,88*#	<0,0001 0,0007
OECC 50 + 5-FU	53,13 ± 3,88	-	93,38 ± 5,84*#&	0,0005 0,0015
Citral 50 + 5-FU	35,50 ± 3,57*#	*0,0005 #0,0398	62,25 ± 3,72*#	<0,0001

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. **p*<0,05 comparado com o controle negativo sem tumor; #*p*<0,05 comparado ao controle negativo com tumor; &*p*<0,05 comparado ao controle positivo, tratado com 5-FU.

Os dados evidenciaram que, ao final do experimento, diferença significativa em relação ao consumo médio de ração foi observada entre o grupo Salina S e o grupo tratado com 5-FU, que apresentou menor consumo médio de ração. Redução do consumo de ração também foi encontrado para os grupos Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU em relação ao grupo Salina S e para o grupo Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao grupo Salina S180.

No tratamento com OECC, dados sobre a ingesta de água identificaram que diferenças significativas foram encontradas entre o grupo Salina S e os grupos experimentais com S180, que apresentaram redução na ingesta de água e entre o grupo Salina S180 e os grupos OECC 50 mg/kg/dia, 5-FU e OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU, que apresentaram redução da ingesta de água quando comparado ao controle negativo com tumor.

Sobre a ingesta de água, a associação do OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com 5-FU, sugerindo que a associação atenuou a redução da ingesta de água encontrada frente ao tratamento isolado com o 5-FU.

Nos tratamentos com o constituinte isolado citral, diferenças sobre a ingesta de água foram encontradas entre o grupo Salina S180 e os grupos tratados com Citral 25 mg/kg/dia, Citral 50 mg/kg/dia, 5-FU, Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU, em que também foi evidenciada menor ingesta de água ao final do experimento.

Análises de parâmetros associativos do 5-FU com o constituinte isolado citral salientam que não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo tratado com 5-FU e os grupos Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU com relação a massa corporal, ingesta de água e consumo de ração.

Dessa forma, os dados encontrados identificaram que a associação do OECC 25 e 50 mg/kg/dia e o 5-FU não influenciou na massa corpórea e no consumo de ração; no entanto, a associação do OECC 50 mg/kg/dia com o 5-FU, influenciou a maior ingesta de água, quando comparado ao grupo tratado apenas com 5-FU, sugerindo a preservação dos hábitos de ingesta de água frente a associação.

Adicionalmente, a associação do Citral 25 e 50 mg/kg/dia e o 5-FU não influenciou na massa corpórea, no consumo de ração e na ingesta de água entre os grupos.

Análises comparativas entre o OECC e o Citral nas doses de 25 e 50mg/kg/dia associado ou não ao antineoplásico 5-FU frente aos parâmetros de massa corporal, consumo médio de ração e de ingesta de água identificaram diferença significativa apenas entre o grupo Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU, com relação a ingesta de água ($p < 0,0001$), de modo que o grupo OECC 50 mg/kg/dia ao ser associado ao 5-FU pode ter atenuado a redução da ingesta de água pelo 5-FU, mas o mesmo não ocorreu frente a associação do Citral 50 mg/kg/dia com o 5-FU.

5.5.2 Massa dos órgãos

Dados sobre os efeitos da associação do EACC com o antineoplásico 5-FU na massa do fígado, rins e baço são apresentados na Tabela 14. A associação do EACC 50 e 100 mg/kg/dia com o 5-FU não influenciou significativamente na massa do fígado, rins e baço dos animais tratados com 5-FU.

Tabela 14. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU na massa dos órgãos de camundongos com e sem tumor S180.

	Fígado (g)	Rins (g)	Baço (g)	<i>p valor</i>
Salina S	5,86 ± 0,23	1,39 ± 0,04	0,59 ± 0,06	-
Salina S180	6,14 ± 0,23	1,24 ± 0,04	0,78 ± 0,03	-
EACC 50	6,27 ± 0,20	1,33 ± 0,03	0,77 ± 0,06	-
EACC 100	6,33 ± 0,16	1,26 ± 0,04	0,81 ± 0,05	-
5-FU	5,59 ± 0,09	1,25 ± 0,03	0,53 ± 0,01 [#]	0,0113
EACC 50 + 5-FU	5,47 ± 0,12	1,32 ± 0,03	0,53 ± 0,03 [#]	0,0112
EACC 100 + 5-FU	5,50 ± 0,08	1,33 ± 0,04	0,52 ± 0,06 [#]	0,0075

Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. $^{\#}p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

Diferença significativa foi encontrada apenas entre os grupos Salina S180 e os grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, que apresentaram redução da massa esplênica.

Na Tabela 15 são apresentados os dados sobre a associação do OECC e de seu constituinte majoritário citral com o antineoplásico 5-FU em relação a massa dos órgãos avaliados.

Tabela 15. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU na massa dos órgãos de camundongos com e sem tumor S180.

	Fígado (g)	p valor	Rins (g)	Baço (g)	
Salina S	5,44 \pm 0,21	-	1,34 \pm 0,07	0,44 \pm 0,01	-
Salina S180	5,79 \pm 0,24	-	1,27 \pm 0,02	0,76 \pm 0,07*	<0,0001
OECC 25	5,50 \pm 0,19	-	1,19 \pm 0,03	0,67 \pm 0,04*	0,0107
Citral 25	5,86 \pm 0,20	-	1,34 \pm 0,05	0,66 \pm 0,03*	0,0012
OECC 50	5,36 \pm 0,22	-	1,26 \pm 0,03	0,68 \pm 0,04*	0,0052
Citral 50	5,85 \pm 0,14	-	1,32 \pm 0,05	0,61 \pm 0,02*	0,0224
5-FU	4,84 \pm 0,12 [#]	0,0079	1,44 \pm 0,05	0,44 \pm 0,02 [#]	<0,0001
OECC 25 + 5-FU	5,01 \pm 0,16	-	1,34 \pm 0,02	0,49 \pm 0,01 [#]	0,0012
Citral 25 + 5-FU	4,90 \pm 0,12 [#]	0,0203	1,40 \pm 0,03	0,41 \pm 0,02 [#]	<0,0001
OECC 50 + 5-FU	4,54 \pm 0,52 [#]	0,0282	1,20 \pm 0,14	0,40 \pm 0,05 [#]	<0,0001
Citral 50 + 5-FU	4,79 \pm 0,15 [#]	0,0042	1,39 \pm 0,04	0,42 \pm 0,01 [#]	<0,0001

Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. $^*p < 0,05$ comparado com o controle negativo sem tumor; $^{\#}p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor.

A avaliação dos órgãos identificou que a associação entre o OECC ou o constituinte isolado citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia com o antineoplásico 5-FU não influenciou significativamente na massa hepática, renal e esplênica.

Redução da massa hepática foi identificada para os grupos 5-FU, Citral 25 mg/kg/dia, OECC 50 mg/kg/dia e Citral 50 mg/kg/dia, em relação ao grupo Salina S180.

Aumento da massa esplênica foi encontrada nos grupos Salina S180, OECC 25 e 50 mg/kg/dia e Citral 25 e 50 mg/kg/dia em relação ao grupo Salina S. Adicionalmente, redução da massa esplênica foi encontrada para os grupos 5-FU, OECC 25 e 50 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 25 e 50 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao grupo Salina S180.

Análises comparativas entre o OECC e o constituinte majoritário citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia associado ou não ao 5-FU em relação a massa do fígado, rins e baço não identificaram diferenças significativas.

5.5.3 Parâmetros bioquímicos hepáticos e renais

Parâmetros bioquímicos hepáticos (ALT, AST e FA) e renais (ureia, creatinina e ácido úrico) frente a utilização do EACC associado ou não ao 5-FU são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros hepáticos e renais em camundongos com e sem tumor S180.

	ALT (U/L)	<i>p</i> valor	AST (U/L)	<i>p</i> valor	FA (mg/dL)	<i>p</i> valor
Salina S	30,00 ± 3,28	-	109,1 ± 7,64	-	104,3 ± 5,73	-
Salina S180	28,60 ± 1,57	-	246,9 ± 10,80*	<0,0001	60,00 ± 3,87*	<0,0001
EACC 50	29,00 ± 2,33	-	248,4 ± 32,98*	<0,0001	71,22 ± 7,46*	0,0012
EACC 100	23,60 ± 2,12	-	215,8 ± 9,350*	0,0003	50,00 ± 5,78*	<0,0001
5-FU	25,00 ± 1,64	-	172,2 ± 9,589 [#]	0,0193	62,70 ± 4,42*	<0,0001
EACC 50 + 5 - FU	25,00 ± 1,69	-	147,8 ± 10,95 [#]	0,0014	58,38 ± 6,58*	<0,0001
EACC 100 + 5 - FU	24,20 ± 1,91	-	149,4 ± 10,05 [#]	0,0007	59,40 ± 3,36*	<0,0001
	Ácido úrico (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		Ureia (mg/dL)	
Salina S	1,98 ± 0,44	-	0,45 ± 0,02	-	44,44 ± 3,28	-
Salina S180	3,08 ± 0,26	-	0,36 ± 0,04	-	50,40 ± 3,77	-
EACC 50	3,11 ± 0,20	-	0,36 ± 0,03	-	49,30 ± 4,32	-
EACC 100	3,57 ± 0,35*	0,0360	0,38 ± 0,05	-	45,90 ± 3,21	-
5-FU	3,32 ± 0,19	-	0,60 ± 0,04 [#]	0,0007	48,20 ± 3,72	-
EACC 50 + 5-FU	2,86 ± 0,21	-	0,40 ± 0,01 ^{&}	0,0079	40,60 ± 2,16	-
EACC 100 + 5-FU	5,10 ± 0,51 ^{**&}	<0,0001 0,0014 0,0071	0,41 ± 0,02 ^{&}	0,0170	46,30 ± 2,22	-

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. **p*<0,05 comparado com o controle negativo sem tumor; [#]*p*<0,05 comparado ao controle negativo com tumor. [&]*p*<0,05 comparado ao controle positivo. ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FA – fosfatase alcalina.

A avaliação de parâmetros hepáticos e renais identificou que a associação do EACC 50 ou 100 mg/kg/dia com o 5-FU, não alterou significativamente parâmetros hepáticos; no entanto, alterações nos parâmetros renais foram identificadas, com identificação da elevação nos valores de ácido úrico frente a associação do EACC 100 mg/kg/dia e o 5-FU e redução da creatinina frente a associação do EACC 50 e 100 mg/kg/dia e o 5-FU.

Parâmetros hepáticos identificaram aumento significativo nos valores de AST para os grupos Salina S180, EACC 50 mg/kg/dia e EACC 100 mg/kg/dia, quando comparado ao controle negativo sem tumor. Redução nos valores de AST foram identificados nos grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor. Redução significativa de valores da FA foi encontrada entre os grupos com tumor experimental S180, em relação ao controle negativo sem tumor.

Na avaliação de parâmetros renais, diferenças significativas também foram encontradas entre o grupo Salina S e o grupo EACC 100 mg/kg/dia, que apresentou elevação nos valores do ácido úrico, e entre o grupo Salina S180 e o grupo EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, com elevação do ácido úrico frente a associação do EACC 100 mg/kg/dia com o 5-FU quando comparado ao controle negativo com tumor.

Papel da associação do EACC 100 mg/kg/dia com o 5-FU na elevação do ácido úrico é reforçada frente a identificação de diferença significativa entre o grupo EACC 100 mg/kg/dia e o grupo EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU ($p=0,0415$), com elevação do ácido úrico ao ser associado ao 5-FU.

Diferença significativa entre os grupos EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU também foi identificada, com valores mais elevados de ácido úrico no grupo EACC tratado na dose de 100 mg/kg/dia ($p=0,0052$).

Parâmetros hepáticos e renais frente a associação do OECC e do constituinte isolado citral com o 5-FU são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5 - FU em parâmetros hepáticos e renais em camundongos com e sem tumor S180.

	ALT (U/L)	<i>p</i> valor	AST (U/L)	<i>p</i> valor	FA (mg/dL)	<i>p</i> valor
Salina S	42,22 ± 3,51	-	85,22 ± 7,24	-	110,4 ± 4,72	-
Salina S180	44,50 ± 3,98	-	235,8 ± 16,46*	<0,0001	74,70 ± 9,58	-
OECC 25	32,20 ± 1,58	-	253,0 ± 17,82*	<0,0001	59,80 ± 12,79*	0,0020
Citral 25	39,00 ± 5,55	-	184,6 ± 26,05*	0,0005	80,63 ± 13,25	-
OECC 50	34,00 ± 2,70	-	295,2 ± 21,72*	<0,0001	52,33 ± 4,31*	0,0004
Citral 50	40,67 ± 3,33	-	195,2 ± 13,97*	<0,0001	80,63 ± 13,25	-
5-FU	35,75 ± 3,76	-	153,8 ± 10,55*#	0,0323 0,0038	94,33 ± 9,07	-
OECC 25 + 5-FU	27,43 ± 4,27#	0,0284	150,4 ± 12,41*#	0,0487 0,0023	79,63 ± 7,32	-
Citral 25 + 5-FU	40,50 ± 6,83	-	167,6 ± 13,58*#	0,0091 0,0425	89,40 ± 19,84	-
OECC 50 + 5-FU	26,67 ± 6,19#	0,0291	158,30 ± 9,79*#	0,0332 0,0156	64,33 ± 9,73*	0,0261
Citral 50 + 5-FU	36,75 ± 3,31	-	155,3 ± 9,153*#	0,0421 0,0089	93,70 ± 9,42	-
	Ácido úrico (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		Ureia (mg/dL)	
Salina S	4,30 ± 0,46	-	0,46 ± 0,03	-	58,70 ± 3,55	-
Salina S180	3,87 ± 0,25	-	0,47 ± 0,04	-	45,90 ± 3,53*	0,0363
OECC 25	3,01 ± 0,19	-	0,42 ± 0,03	-	38,00 ± 2,40*	<0,0001
Citral 25	3,80 ± 0,45	-	0,46 ± 0,05	-	45,90 ± 1,80*	0,0095
OECC 50	3,66 ± 0,52	-	0,39 ± 0,03	-	37,78 ± 3,69*	<0,0001
Citral 50	4,15 ± 0,26	-	0,41 ± 0,03	-	45,90 ± 2,00*	0,0095
5-FU	3,13 ± 0,50	-	0,45 ± 0,06	-	43,10 ± 2,47*	0,0048
OECC 25 + 5-FU	4,52 ± 0,81	-	0,47 ± 0,03	-	38,89 ± 1,43*	0,0002
Citral 25 + 5-FU	2,97 ± 0,35	-	0,38 ± 0,04	-	41,60 ± 1,62*	0,0002

OECC 50 + 5-FU	3,67 ± 0,75	-	0,50 ± 0,04	-	40,67 ± 2,38*	0,0010
Citral 50 + 5-FU	4,02 ± 0,40	-	0,59 ± 0,04	-	42,60 ± 1,44*	0,0004

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo sem tumor; # $p < 0,05$ comparado ao controle negativo com tumor. ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FA – fosfatase alcalina.

Os dados evidenciaram que a associação do OECC ou do constituinte isolado citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia com o 5-FU não influenciou significativamente em parâmetros hepáticos e renais.

Parâmetros hepáticos identificaram redução significativa em ALT nos grupos tratados com OECC 25 mg/kg/dia + 5-FU e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor, mas sem diferença em relação ao grupo 5-FU. Diferença significativa foi encontrada entre o grupo Salina S e os grupos com tumor experimental S180 em relação aos valores de AST, que apresentaram elevação em AST comparado ao controle negativo sem tumor.

Elevação em AST foi encontrada, principalmente, no tratamento com ausência do 5-FU; de forma que grupos tratados com 5-FU apresentaram redução de AST em relação ao controle negativo com tumor. Adicionalmente, redução significativa da FA nos grupos OECC 25 mg/kg/dia, OECC 50 mg/kg/dia e OECC 50 mg/kg/dia + 5-FU foi encontrada, em relação ao controle negativo sem tumor.

Na avaliação de parâmetros renais, diferença significativa foi encontrada em relação aos valores de ureia entre o grupo Salina S e os grupos experimentais com tumor S180, que apresentaram redução em seus valores.

Análises comparativas entre o OECC e o constituinte majoritário citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia em relação aos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais identificou que não houve diferença significativa em relação aos parâmetros renais.

No entanto, diferença significativa foi encontrada em parâmetros hepáticos em relação a AST e FA entre os tratamentos com OECC e Citral na dose de 50 mg/kg/dia, ao qual observou-se elevação de AST ($p=0,0010$) e redução de FA ($p=0,0092$) no grupo tratado com OECC 50 mg/kg/dia, em comparação ao Citral 50 mg/kg/dia.

5.5.4 Parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários

Nas Tabelas 18 e 19 são descritos os parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários frente aos tratamentos experimentais com EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU, respectivamente.

Os dados evidenciaram que a associação do EACC 50 e 100 mg/kg/dia não influenciou significativamente em parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários.

Tabela 18. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros eritrocitários de camundongos com e sem tumor S180.

	Hemácias (10 ⁶ /mL)	<i>p</i> valor	Hemoglobina (g/dL)	<i>p</i> valor	Hematócrito (%)	<i>p</i> valor
Salina S	9,36 ± 0,28	-	15,20 ± 0,27	-	53,91 ± 0,93	-
Salina S180	9,25 ± 0,12	-	14,37 ± 0,24	-	51,80 ± 0,63	-
EACC 50	9,42 ± 0,17	-	15,10 ± 0,30	-	53,46 ± 1,01	-
EACC 100	9,14 ± 0,08	-	14,20 ± 0,14	-	51,76 ± 0,56	-
5-FU	8,54 ± 0,11*#	0,0165 0,0451	13,61 ± 0,17*	0,0007	48,72 ± 0,52*	0,0008
EACC 50 + 5-FU	8,31 ± 0,15*#	0,0007 0,0022	12,86 ± 0,25*#	<0,0001 0,0016	46,18 ± 0,87*#	<0,0001 0,0001
EACC 100 + 5-FU	8,39 ± 0,16*#	0,0024 0,0072	13,04 ± 0,30*#	<0,0001 0,0082	47,38 ± 1,01*#	<0,0001 0,0050

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. **p*<0,05 comparado com o controle negativo sem tumor; #*p*<0,05 comparado ao controle negativo com tumor.

Parâmetros hematológicos eritrocitários identificaram que redução significativa de hemácias, hemoglobina e % de hematócrito foram encontrados nos grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao controle negativo sem tumor.

Comparado ao controle negativo com tumor, redução de hemácias foi encontrada nos grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU; por sua vez, redução de hemoglobina e de % de hematócrito foi encontrada apenas nos grupos EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU.

Na avaliação de parâmetros leucocitários, contagem total de leucócitos identificou que os grupos tratados com 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo sem e com tumor S180, apresentando leucopenia na presença do 5-FU (*p*<0,0001).

Os principais leucócitos encontrados foram os linfócitos, neutrófilos e monócitos. Redução de linfócitos foi encontrada nos grupos Salina S180 e EACC 50 mg/kg/dia, em relação ao controle negativo sem tumor; por sua vez, aumento de linfócitos foi encontrado nos grupos

5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor.

Tabela 19. Efeito do EACC associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros leucocitários de camundongos com e sem tumor S180.

	Contagem diferencial de leucócitos (%)							
	Leucócitos totais (10 ³ cels/μL)	<i>p</i> valor	Linfócitos	<i>p</i> valor	Monócitos	<i>p</i> valor	Neutrófilos	<i>p</i> valor
Salina S	6833 ± 403,0	-	67,11 ± 7,07	-	0,11 ± 0,11	-	31,11 ± 6,59	-
Salina S180	6696 ± 666,2	-	42,60 ± 2,60*	0,0019	1,5 ± 0,37*	0,0483	55,70 ± 2,64*	0,0013
EACC 50	5692 ± 429,3	-	47,60 ± 5,27*	0,0252	2,2 ± 0,62*	0,0004	49,40 ± 5,35*	0,0354
EACC 100	5998 ± 394,5	-	51,50 ± 3,07	-	0,70 ± 0,30	-	50,63 ± 2,15*	0,0328
5-FU	2730 ± 129,8*#	<0,0001	77,80 ± 2,78#	<0,0001	0,10 ± 0,10#	0,0363	21,60 ± 2,94#	<0,0001
EACC 50 + 5-FU	3070 ± 750,1*#	<0,0001	79,40 ± 2,92#	<0,0001	0,20 ± 0,13	-	20,00 ± 3,01#	<0,0001
EACC 100 + 5-FU	2150 ± 129,0*#	<0,0001	84,00 ± 3,67#	<0,0001	0,10 ± 0,10#	0,0363	15,90 ± 3,61#	<0,0001

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey. **p*<0,05 comparado com o controle negativo sem tumor; # <0,05 comparado ao controle negativo com tumor.

Monócitos foram encontrados principalmente nos grupos Salina S180 e EACC 50 mg/kg/dia, apresentando diferença significativa em relação aos grupos Salina S e 5-FU, em que se observou redução no quantitativo de monócitos para o grupo 5-FU. Redução também foi encontrada no grupo EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor.

Neutrófilos foram encontrados em maior número nos grupos S180, EACC 50 mg/kg/dia e EACC 100 mg/kg/dia, em relação ao grupo Salina S; por sua vez, redução do número de neutrófilos foi identificado nos grupos 5-FU, EACC 50 mg/kg/dia + 5-FU e EACC 100 mg/kg/dia + 5-FU, quando comparado ao grupo Salina S180.

Parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU são apresentados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente.

Os dados evidenciaram que a associação entre o OECC e o constituinte isolado citral com o 5-FU não alterou significativamente parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários.

Nos tratamentos experimentais com OECC, redução significativa da hemoglobina e do % de hematócrito foi encontrada nos grupos com tumor experimental S180, em relação ao controle negativo sem tumor.

Tabela 20. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros eritrocitários de camundongos com e sem tumor S180.

	Hemácias (10 ⁶ /mL)	Hemoglobina (g/dL)	<i>p</i> valor	Hematócrito (%)	<i>p</i> valor
Salina S	9,45 ± 0,14	15,69 ± 0,23	-	54,54 ± 1,06	-
Salina S180	8,84 ± 0,22	13,73 ± 0,37*	0,0002	49,02 ± 1,51*	0,0092
OECC 25	8,77 ± 0,16	13,79 ± 0,28*	0,0003	47,70 ± 1,02*	0,0006
Citral 25	9,41 ± 0,14	15,14 ± 0,24	-	57,22 ± 3,5	-
OECC 50	9,06 ± 0,13	13,96 ± 0,20*	0,0014	49,22 ± 0,61*	0,0135
Citral 50	9,35 ± 0,19	14,62 ± 0,33	-	52,05 ± 1,20	-
5-FU	9,28 ± 0,22	14,21 ± 0,29*	0,0248	49,13 ± 0,77*	0,0433
OECC 25 + 5-FU	8,58 ± 0,09	13,27 ± 0,21*	<0,0001	46,53 ± 0,60*	<0,0001
Citral 25 + 5-FU	9,13 ± 0,11	14,54 ± 0,21*	0,0373	51,06 ± 0,64	-
OECC 50 + 5-FU	8,78 ± 0,27	13,47 ± 0,41*	<0,0001	47,22 ± 1,50*	0,0003
Citral 50 + 5-FU	9,32 ± 0,08	14,49 ± 0,13*	0,0262	51,16 ± 0,44	-

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 6 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey. **p*< 0,05 comparado com o controle negativo sem tumor.

Nos tratamentos com o constituinte isolado citral, redução de hemoglobina foi encontrada apenas ao ser associado ao 5-FU, mas sem diferença significativa em relação ao tratamento isolado do 5-FU.

Tabela 21. Efeito do OECC e do constituinte isolado citral associado ou não ao antineoplásico 5-FU em parâmetros leucocitários de camundongos com e sem tumor S180.

	Contagem diferencial de leucócitos (%)							
	Leucócitos totais (10 ³ cels/ μ L)	<i>p</i> valor	Linfócitos	<i>p</i> valor	Monócitos	<i>p</i> valor	Neutrófilos	<i>p</i> valor
Salina S	4102 ± 520,3	-	77,00 ± 2,61	-	3,70 ± 1,05	-	17,80 ± 2,10	-
Salina S180	5118 ± 361,6	-	40,90 ± 3,35*	<0,0001	1,60 ± 0,49	-	56,60 ± 3,13*	<0,0001
OECC 25	4924 ± 314,8	-	40,50 ± 4,00*	<0,0001	1,00 ± 0,29*	0,0061	57,90 ± 4,16*	<0,0001
Citral 25	5857 ± 371,9	-	47,89 ± 2,00*	<0,0001	4,00 ± 0,84	-	47,44 ± 2,01*	<0,0001
OECC 50	5084 ± 398,1	-	42,00 ± 4,78*	<0,0001	1,40 ± 0,26*	0,0310	55,90 ± 4,88*	<0,0001
Citral 50	4870 ± 649,2	-	59,50 ± 3,08**	0,0001	2,37 ± 0,53	-	37,13 ± 3,31**	<0,0001
5-FU	1553 ± 141,1**	<0,0001	94,75 ± 0,81**	0,0139	1,00 ± 0,26*	0,0117	4,12 ± 0,76#	<0,0001
OECC 25 + 5-FU	1922 ± 147,3**	0,0005	84,89 ± 3,08#	<0,0001	0,55 ± 0,24*	0,0012	14,33 ± 3,03#	<0,0001
Citral 25 + 5-FU	1934 ± 184,2**	<0,0001	84,20 ± 2,84#	<0,0001	0,70 ± 0,26*	0,0113	14,90 ± 2,90#	<0,0001
OECC 50 + 5-FU	1882 ± 154,4**	0,0004	87,33 ± 3,34#	<0,0001	0,33 ± 0,23*	0,0004	12,11 ± 3,04#	<0,0001
Citral 50 + 5-FU	2250 ± 335,2**	<0,0001	92,80 ± 0,72**	0,0001	0,20 ± 0,13*	0,0018	6,90 ± 0,70**	<0,0001

Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 7 a 10 animais por grupo e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey. **p*<0,05 comparado com o controle negativo sem tumor; #*p*<0,05 comparado ao controle negativo com tumor.

A avaliação de parâmetros leucocitários identificou que leucopenia foi encontrada nos grupos tratados com 5-FU, em relação ao controle negativo sem e com tumor. Linfócitos, neutrófilos e monócitos estiveram presentes em análise diferencial de leucócitos.

Redução de linfócitos foi observado nos grupos tratados na ausência do 5-FU, em relação ao controle negativo sem tumor; por sua vez, aumento de linfócitos foi encontrado nos grupos tratados com 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor.

No tratamento com OECC, redução de monócitos foi identificada entre os grupos com S180, em relação ao controle negativo sem tumor. Redução de monócitos também foi observada nos grupos Citral 25 mg/kg/dia + 5-FU e Citral 50 mg/kg/dia + 5-FU, em relação ao controle negativo sem tumor.

Elevação de neutrófilos foi observada nos grupos tratados na ausência de 5-FU, em relação ao controle negativo sem tumor; por sua vez, redução foi observada, principalmente, nos grupos tratados na presença do 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor.

Análises comparativas entre o OECC e o constituinte majoritário citral nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia associado ou não ao 5-FU em relação aos parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários evidenciaram diferença significativa em relação a hemoglobina e % de hematócrito entre os grupos Citral 25 mg/kg/dia e OECC 25 mg/kg/dia, com redução da hemoglobina e do % de hematócrito no grupo tratado com OECC ($p=0,0416$ e $p=0,0003$, respectivamente), sem diferença significativa em relação ao controle negativo com tumor.

Em relação a parâmetros leucocitários, diferença foi encontrada entre o citral e o OECC na dose de 50 mg/kg/dia, com maior número de neutrófilos e menor número de linfócitos para o OECC ($p=0,0026$ e $p=0,0082$). Em relação aos monócitos, maior número foi encontrado para o citral quando comparado ao OECC, no tratamento com 25 mg/kg/dia ($p=0,0031$).

5.5.5 Análise morfológica dos órgãos

Após 24h do último dia de tratamento com EACC, OECC ou com o constituinte isolado citral em associação ou não ao antineoplásico 5-FU, os órgãos excisados (fígado, rins e baço) foram pesados e analisados macroscopicamente quanto ao tamanho, cores, presença de áreas de necrose, supuração e/ou fibrose, bem como consistência do tecido e ocorrência de hemorragia. Não foram identificadas alterações macroscópicas nos órgãos avaliados (dados não mostrados).

6 DISCUSSÃO

Propriedades biológicas/farmacológicas do extrato aquoso e do óleo essencial do *C. citratus* podem estar relacionadas a metabólitos secundários presentes em sua composição. Desse modo, o principal constituinte identificado em análise cromatográfica correspondeu ao ácido clorogênico para o EACC e ao citral para o OECC.

No extrato do *C. citratus*, a presença do ácido clorogênico é descrita na literatura (FRANCISCO *et al.*, 2015; GUNAWAN-PUTERI; RUSTANDI; HENDRA, 2018), corroborando o achado do presente estudo. O ácido clorogênico (CGA, 3-CQA), importante composto fenólico e isômero mais abundante do ácido cafeoilquínico (3-, 4- e 5-CQA), desempenha importantes atividades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, antibacteriana, hepatoprotetora e cardioprotetora (NAVEED *et al.*, 2018).

No câncer, identificou-se que o ácido clorogênico pode atuar em vias metabólicas relacionadas ao processo de carcinogênese e apoptose celular, como a via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), podendo afetar quinases montante que medeiam a fosforilação da AMPK e atuar como um quimiossensibilizador na supressão do crescimento tumoral (LUKITASARI; NUGROHO; WIDODO, 2018).

O papel do ácido clorogênico na indução de danos do DNA e na ativação de complexos topoisomerase - DNA, importantes na morte celular de células cancerígenas, também foi levantado (BURGOS-MÓRON *et al.*, 2012). No entanto, frente a identificação do papel do ácido clorogênico no câncer, a determinação de vias eficazes para sua administração ainda representa importante desafio a ser trabalhado (LUKITASARI; NUGROHO; WIDODO, 2018).

O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), identificado como constituinte majoritário do OECC, é um aldeído insaturado formado pela mistura de dois aldeídos monoterpenos: o geranial (isômero trans) e o neral (isômero cis); o citral é amplamente conhecido por seu odor característico de limão e utilizado em diferentes áreas, como a indústria alimentícia e cosmética (TAMER; SUNA; ÖZCAN-SINIR, 2019).

Sua identificação como constituinte majoritário do OECC corrobora estudos anteriormente realizados (MING *et al.*, 1996; SANTIN *et al.*, 2009; PINO *et al.*, 2018; SPRENGER *et al.*, 2022). E, assim como o encontrado, o geranial é comumente identificado em quantidade superior ao neral na composição de óleos essenciais do *C. citratus* (PINO *et al.*, 2018).

O citral, presente em cerca de 65-85% em óleos essenciais do *C. citratus*, apresenta diferentes atividades biológicas, como atividades antimicrobiana, antioxidante, antidiabética e

anti-inflamatória (SHARMA *et al.*, 2019). No câncer, atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* foi relatada, atuando, por exemplo, na redução da proliferação de células tumorais de câncer de mama e na massa de tumores mamários em modelo animal (NIGJEH *et al.*, 2019).

Estudo com encapsulamento do citral em nanopartículas identificou, por exemplo, que o citral pode induzir a apoptose de células cancerígenas e que o encapsulamento pode melhorar sua estabilidade e aproveitamento; a utilização local do citral encapsulado identificou que este poderia atuar na prevenção a recorrência de células cancerosas no leito tumoral após remoção cirúrgica do rhabdomyosarcoma (WHITE *et al.*, 2017).

A análise de constituintes presentes no EACC e no OECC salienta que preparações do *C. citratus* apresentam constituintes químicos que podem desempenhar importantes funções biológicas. Metabólitos secundários presentes podem justificar, por exemplo, a presença de atividade antitumoral e ou quimiopreventiva em plantas medicinais e de potenciais associações/interações com quimioterápicos; desse modo, a presença do ácido clorogênico no EACC e do citral no OECC podem ser responsáveis por atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

Ensaio *in vitro* para avaliação da citotoxicidade do EACC, OECC e do constituinte isolado citral frente as linhagens tumorais do carcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10) e do glioma (C6) identificaram que o EACC apresentou atividade citotóxica fraca e que o óleo essencial e seu constituinte majoritário, o citral, apresentaram atividade citotóxica alta frente as linhagens tumorais avaliadas; adicionalmente, o OECC apresentou CI_{50} promissora frente as linhagens tumorais do carcinoma de pulmão e do melanoma ($CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$).

A atividade citotóxica do EACC, OECC e do citral frente a linhagens tumorais tem sido alvo de diferentes estudos na literatura (NORDIN *et al.*, 2019; ROJAS – ARMAS *et al.*, 2020; SAYED *et al.*, 2021).

Na avaliação da citotoxicidade do extrato do *C. citratus*, estudos sobre a atividade citotóxica do extrato do *C. citratus* frente as linhagens da B16 – F10 e da C6 não foram identificados na literatura; no entanto, sua avaliação em outras linhagens, incluindo a A549, evidenciou que a avaliação da viabilidade celular de linhagens da A549, HepG2 (hepatocarcinoma humano) e MCF – 7 (câncer de mama) utilizando extratos do *C. citratus* preparados em hexano, acetato de etila e etanol 80%, identificou, por exemplo, que o extrato preparado em acetato de etila apresentou melhor atividade citotóxica frente as linhagens tumorais ($64,09 \pm 1,11$, $41,22 \pm 0,34$ e $66,24 \pm 1,50\%$, respectivamente) (SAYED *et al.*, 2022).

Diferenças do efeito antiproliferativo frente as linhagens do carcinoma de cólon humano (HCT-116), carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB 231) e carcinoma de ovário (SKOV-3 e COAV) em relação ao solvente utilizado no preparo do extrato também foi observada, visto

que no preparo do extrato do *C. citratus* com água, etanol 50% e etanol 90%, extratos preparados em etanol apresentaram maior eficácia frente a linhagens tumorais (HALABI; SHEIKH, 2014).

Estudo realizado para avaliação da atividade citotóxica do OECC em linhagens de câncer de pulmão também evidenciou efeitos citotóxicos do óleo essencial do *C. citratus*; efeitos citotóxicos do OECC estiveram relacionados, principalmente, pela indução de apoptose celular e parada no ciclo celular pelo OECC; CI_{50} de $1,73 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$ para a A549 foi identificada para o OECC (TRANG *et al.*, 2020) caracterizando CI_{50} menor do que a encontrada no presente estudo e salientando o potencial papel de óleos essenciais do *C. citratus* na quimioprevenção e potencial utilização na terapêutica oncológica.

Características e variações de atividade de preparações de plantas medicinais podem estar relacionadas, por exemplo, ao fato que propriedades de plantas medicinais podem variar de região para região (WANG; SASSE; SHERIDAN, 2019). A avaliação da atividade citotóxica de óleos essenciais do *C. citratus* cultivados na província de Phu tho, por exemplo, identificou CI_{50} variando de $4,01 \pm 0,39$ a $6,3 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$ para A549 em suas preparações (VAN *et al.*, 2016), caracterizando CI_{50} menor que a aqui encontrada, mas salientando variações que podem ocorrer; e, apesar das variações na CI_{50} identificadas na literatura, a CI_{50} esteve dentro do que é considerado promissor para a oncologia ($CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$).

Atividade citotóxica dose dependente no OECC foi evidenciada frente a linhagem da A549, identificando sua atuação na parada do ciclo celular e indução de apoptose celular por alteração em proteínas regulatórias de morte celular, como a caspase-3, Bax e Bcl-2 e, principalmente, através da ativação da proteína p53 – que corresponde a um dos primeiros resultados frente o tratamento com o óleo essencial do *C. citratus* (ABDULHASAN, 2021).

Na avaliação da atividade antiproliferativa do OECC e do seu constituinte majoritário, o citral, frente o câncer de pulmão de pequenas células, identificou-se, por exemplo, que o OECC e o citral atuam na inibição da reprodução e sobrevivência de pequenas células, principalmente, por atuar impedindo que proteínas da família Src de tirosina quinases não receptoras (SRC-TK) realizem a fosforilação da via de sinalização da Stat3 (*Signaling Transducer and Activator of Transcription 3*) - via também envolvida em processos de morte celular -, reduzindo assim a expressão de genes antiapoptóticos, como o Bcl-xL e Mcl-1, e suprimindo a proliferação das células tumorais (MARUOKA *et al.*, 2018; ABDULHASAN, 2021).

No melanoma, ensaio citotóxico com a linhagem da B16-F10 identificou que o citral apresenta efeitos antiproliferativos e citotóxicos frente a linhagem tumoral e ensaios de morte celular identificaram que o citral foi capaz de induzir apoptose, necrose e autofagia celular e

que a indução de apoptose pelo citral pode associar-se, principalmente, a indução de estresse oxidativo; o citral atuou na indução de estresse oxidativo, em lesões de DNA e translocação nuclear de p53, além da redução dos níveis de óxido nítrico e fator nuclear kappa B, ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) e AKT (Serina-treonina cinase AKT), influenciando a apoptose celular (SANCHES *et al.*, 2017).

A capacidade do citral atuar na elevação de níveis da p53 também foi anteriormente relatada (DUERKSEN-HUGHES, YANG, OZCAN, 1999), podendo sugerir que a elevação da p53 pode relacionar-se a indução do estresse oxidativo observado no tratamento com o citral em linhagens tumorais (KAPUR *et al.*, 2016).

Atividade citotóxica alta frente a linhagem da B16-F10 foi encontrada para o citral e para o OECC e, apesar de que dados sobre a atividade citotóxica do OECC frente a linhagem da B16-F10 não foram identificados na literatura, sugere-se que mecanismos relacionados a atividade citotóxica do OECC podem estar relacionados a aqueles induzidos por seu constituinte majoritário, o citral.

Além disso, salienta-se que óleos essenciais podem ser citotóxicos em linhagens tumorais humanas e animais e, apesar de não ter sido identificada atividade citotóxica do OECC em linhagem da B16-F10 na literatura - linhagem de melanoma de origem animal -, dados na literatura descrevem a identificação de atividade citotóxica do OECC em melanócitos humanos (SK-MEL-28) (KPADONOU *et al.*, 2022) e redução da viabilidade e proliferação de células tumorais de melanoma humano (SK-MEL 147) ao atuar na indução de processos de apoptose, necrose e autofagia (VILLAVERDE *et al.*, 2013), identificando atividade citotóxica do OECC em linhagens humanas.

A identificação do papel do OECC na indução de necrose, apoptose e autofagia celular reforça a hipótese de que o citral pode ser importante na atividade citotóxica do OECC em neoplasias malignas da pele, visto que processos de necrose, apoptose e autofagia também foram identificados na atividade citotóxica do citral frente a linhagem da B16-F10 (SANCHES *et al.*, 2017).

A necrose, a apoptose e a autofagia são processos de morte celular que podem estar presentes em células tumorais. A necrose está associada, principalmente, ao aumento do volume celular, ruptura da membrana celular e perda de conteúdo; a autofagia está relacionada a uma via de degradação celular amplamente conservada, e a apoptose, ou morte celular programada, é a principal responsável pela homeostase do organismo (CHAABANE *et al.*, 2013).

Salienta-se que, apesar do citral apresentar $CI_{50} > 4 \mu\text{g/mL}$, ou seja, CI_{50} maior do que é considerado promissor na oncologia (RODRIGUES *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2016), o

constituente isolado apresentou atividade citotóxica alta frente a linhagens tumorais, fator que deve ser considerado para realização de novos estudos *in vitro* e *in vivo*.

Os dados apresentados salientam que, apesar de atividade citotóxica fraca ter sido encontrada para o EACC em linhagens tumorais, o OECC e seu constituinte majoritário apresentam atividade citotóxica alta. Além disso, CI_{50} promissora para oncologia foi identificada no tratamento com OECC nas linhagens da A549 e B16-F10, e, considerando a importante atividade citotóxica encontrada dos tratamentos com citral, mecanismos citotóxicos presentes no OECC podem estar relacionados a este constituinte majoritário.

A presença de citotoxicidade frente a linhagens tumorais é fundamental para identificação de novas drogas antitumorais; no entanto, considerando que uma das principais limitações da quimioterapia é a ausência de especificidade celular, aspecto fundamental a ser considerado na descoberta de novas drogas é a especificidade celular e a toxicidade de potenciais novas drogas frente a células não tumorais, que incluem, por exemplo, a avaliação da presença de atividade hemolítica em eritrócitos.

No presente estudo, a avaliação da atividade hemolítica do EACC, OECC e do constituinte isolado citral frente a eritrócitos evidenciou que o EACC apresentou toxicidade leve em eritrócitos na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e que o OECC e o citral apresentaram toxicidade em eritrócitos nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, com ausência de toxicidade observada apenas na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$.

Ensaio de hemólise geralmente correspondem ao primeiro parâmetro de toxicidade avaliado (GRECO *et al.*, 2020) e a atividade hemolítica está relacionada a capacidade de determinado composto ser tóxica a membrana eritrocitária.

A toxicidade a eritrócitos pode ser decorrente de diferentes fatores, como através da indução de estresse oxidativo e redução de antioxidantes endógenos (BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004) e a formação de poros e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária, dependente ou independente de colesterol (HU; KONOBI; TACHIBANA; 1996; VO; FUKUSHIMA; MURUNAKA, 2016).

Atividade hemolítica no EACC foi identificada apenas em concentração mais elevada, sugerindo que em concentrações mais baixas o EACC não apresente toxicidade em eritrócitos. A reduzida toxicidade em eritrócitos frente ao tratamento com extratos do *C. citratus* foi identificada anteriormente, identificando-se, por exemplo, que o *C. citratus* atuou na estabilidade osmótica de eritrócitos, que poderia estar associada a presença de flavonoides em sua composição ou a prevenção da lipoperoxidação (FREITAS *et al.*, 2008).

O ácido clorogênico, identificado como presente no EACC, é um importante antioxidante conhecido e já foi associado a importante atividade protetora em eritrócitos, atuando como um estabilizador da membrana eritrocitária frente a formação de radicais livres (TANG; LIU, 2008), sugerindo que o ácido clorogênico pode estar associado a reduzida atividade hemolítica encontrada para o EACC.

A presença de atividade hemolítica identificada no óleo essencial do *C. citratus* e no constituinte isolado citral é um importante fator a ser considerado e tem representado alvo de diferentes estudos. Atividade hemolítica foi identificada na literatura para o óleo essencial do *C. citratus* (REZENDE *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2018; HACKE *et al.*, 2022) e para o constituinte isolado citral (TAMIR *et al.*, 1984; HACKE *et al.*, 2022).

Atividade hemolítica do OECC nas concentrações utilizadas no presente estudo, é pouco discutida na literatura. No entanto, estudo anteriormente realizado para avaliação de atividade hemolítica do OECC nas concentrações de 125 a 4000 µg/mL identificou porcentagem de atividade hemolítica não tóxica em concentrações <500 µg/mL (DA SILVA *et al.*, 2019), diferindo dos achados do presente estudo, em que toxicidade leve a membrana eritrocitária ainda foi visualizada na concentração de 250 µg/mL.

Adicionalmente, apesar de maior atividade hemolítica ter sido evidenciada para o OECC, salienta-se que o citral, como constituinte majoritário, pode apresentar importante papel na atividade hemolítica do OECC, visto que o papel da atividade hemolítica do citral foi levantado na literatura, com a identificação de atividade hemolítica do citral mesmo em baixas concentrações; de forma que sua associação e mecanismos relacionados podem incluir, por exemplo, a depleção de antioxidantes, como a glutatona, e/ou atuação de radicais livres e estresse oxidativo (TAMIR *et al.*, 1984).

Os dados encontrados evidenciam que, em ensaios *in vitro*, o EACC apresentou atividade citotóxica fraca frente a linhagens tumorais e presença de toxicidade a eritrócitos apenas em concentrações \Rightarrow 1000 µg/mL e que, apesar do OECC apresentar atividade citotóxica promissora frente as linhagens tumorais da A549 e da B16-F10, também apresentou toxicidade em eritrócitos em concentrações \Rightarrow 500 µg/mL, atividades biológicas que podem estar relacionadas a seu constituinte majoritário, o citral.

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do EACC, OECC e do constituinte isolado citral é descrita em diferentes estudos (BIDINOTTO *et al.*, 2010; BIDINOTTO *et al.*, 2012; PHILION *et al.*, 2017; NIGJEH *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2019); no entanto, estudos que descrevam aspectos sobre a associação de extratos e óleos essenciais do *C. citratus* ainda são escassos na literatura, salientando a importância do objetivo principal do estudo, a investigação

da associação entre o extrato aquoso e do óleo essencial do *C. citratus* com o antineoplásico 5-fluorouracil na resposta antitumoral em camundongos com Sarcoma 180.

A avaliação da associação do EACC e do OECC com o antineoplásico 5-FU no tumor experimental Sarcoma 180 é de grande relevância; visto que cânceres ósseos, como sarcoma ósseo, são responsáveis por cerca de 3 a 8% de neoplasias malignas entre indivíduos de 0 a 19 anos e de 3% entre jovens adultos de 0 a 29 anos e, apesar de melhorias advindas do tratamento, ainda representa uma das causas de mortalidade nesta faixa etária (RAINUSSO; WANG; YUSTEIN, 2013; BALMANT *et al.*, 2019).

Ademais, apesar dos dados encontrados estarem relacionados a modelo único *in vivo*, com informações que poderiam ser mais direcionadas a sarcomas, o 5-FU é um antineoplásico amplamente utilizado em outros tipos de cânceres e tumores sólidos, como o câncer de mama e o câncer colorretal (SETHY; KUNDU, 2021).

Dessa forma, os achados sobre aspectos das associações entre o 5-FU e o EACC, OECC e o constituinte isolado citral no S180 poderão direcionar a realização de estudos comparativos, que visem identificar se os dados identificados poderiam ser encontrados em outros tipos de cânceres, além de levantar indícios importantes sobre sua associação com plantas medicinais.

A inibição tumoral do tumor experimental S180 frente a utilização do EACC, OECC e do constituinte isolado citral identificou que os compostos não apresentaram atividade antitumoral significativa em relação ao controle negativo e que, ao serem associados ao 5-FU, não houve interferência significativa frente a inibição tumoral realizada pelo 5-FU, nas doses avaliadas.

Desse modo, apesar de atividade antitumoral do extrato do *C. citratus* já ter sido identificada em modelos *in vitro*, como para linhagens de Leucemia mielomonocítica crônica, Linfoma histiocítico não Hodgkin e linfomas de Hodgkin, e em modelo *in vivo* de xenoenxertos de linfoma não-Hodgkin, frente a utilização de extrato etanólico (PHILION *et al.*, 2017) e na redução de xenoenxertos de câncer de próstata frente a administração de extrato etanólico por via oral (NGUYEN *et al.*, 2019), atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* não foi identificada para o EACC.

Preparações em extrato do *C. citratus* podem apresentar atividades biológicas distintas em ensaios *in vitro* e *in vivo*; ademais, a via de administração utilizada também pode representar um fator limitante a avaliação de efeitos farmacológicos de plantas medicinais; visto que a farmacocinética pode influenciar diretamente na eficácia, por exemplo, de compostos com recursos de ervas (SUN *et al.*, 2019).

Desse modo, apesar da via oral ter sido considerada promissora para administração do extrato do *C. citratus* frente a inibição do infoma não-Hodgkin (PHILION *et al.*, 2017), sugere-se a importância da avaliação de outras vias de administração para avaliação de efeitos farmacológicos antitumorais e associativos do EACC em modelos *in vivo*.

Além disso, apesar de não ter sido identificada associação significativa do EACC com o antineoplásico 5-FU em relação a inibição tumoral, sua associação com outros agentes quimioterápicos deve ser considerada, visto que a utilização do extrato do *C. citratus* isolado ou em combinação com o docetaxel frente a linhagem tumoral do câncer de próstata, por exemplo, identificou efeitos antitumorais e associativos com antineoplásico, evidenciando melhoria na atividade quimioterápica do docetaxel (GOMES *et al.*, 2021).

Interações entre o extrato do *C. citratus* e os antineoplásicos que compõem o protocolo FOLFOX – combinação de ácido folínico (leucovorina), 5-fluorouracil e oxaliplatina – e com o antineoplásico Taxol no câncer de cólon evidenciaram que, em análises *in vitro*, o extrato não influenciou na atividade do Taxol, mas resultou em maior indução apoptótica do protocolo FOLFOX frente ao câncer de cólon; *in vivo*, a combinação com o protocolo FOLFOX identificou que o extrato atuou na redução do modelo tumoral e aumentou sua eficácia (RUVINOV *et al.*, 2019), diferindo do aqui encontrado em relação ao uso do 5-FU de forma isolada.

A presença de atividade citotóxica *in vitro* para o OECC e para seu constituinte majoritário, o citral, e a ausência de atividade antitumoral *in vivo*, pode estar relacionada, inicialmente, a utilização de modelos distintos para avaliação; no entanto, também reforça a importância da realização de estudos com diferentes vias de administração do OECC e do citral, para identificação de vias promissoras a serem utilizadas na oncologia.

A via de escolha para administração de fármacos requer a compreensão da farmacocinética da droga; nesse sentido, dados sobre o metabolismo do *C. citratus* apontam que seus constituintes são geralmente absorvidos de forma rápida após administração por via oral, pulmonar e dérmica e que alguns metabólitos secundários, após absorção pelo intestino delgado, podem sofrer processos de oxidação, glucuronidação, sulfatação e/ou metilação, sendo posteriormente excretados pela urina, fezes ou exalados como CO₂ (EKPENYONG; AKPAN; NYOH, 2015).

Nesse sentido, apesar de atividade citotóxica do OECC ter sido identificada no presente estudo e em outros estudos em modelos *in vitro*, como o câncer de próstata e o glioblastoma (BAYALA *et al.*, 2018) e em modelos animais, como o câncer de mama (ROJAS-ARMAS *et al.*, 2020) e na proteção de lesões mamárias induzidas por N-metil-N-nitrosourea (MNU)

(BIDINOTTO *et al.*, 2012), a administração oral do OECC no modelo experimental S180, não influenciou significativamente na inibição tumoral nas doses utilizadas.

A administração de polissacarídeos do *C. citratus* por via intraperitoneal frente ao S180 para avaliação da atividade antitumoral e imunomoduladora identificou, por exemplo, que houve inibição significativa do crescimento tumoral, melhorando a imunidade dos camundongos de forma dose-dependente (BAO *et al.*, 2014).

Nesse sentido, a administração do OECC por outras vias de administração pode apresentar resultado positivo frente a inibição tumoral ao ser utilizado de forma isolada ou em associação com antineoplásicos. E, apesar de dados da associação do OECC com antineoplásicos não ter sido identificada na literatura, a avaliação da associação do OECC frente drogas antineoplásicas é fundamental, visto que sua associação com fármacos de outras classes tem mostrado resultados promissores, como frente sua associação com o antifúngico nistatina em candidíase oral de pacientes oncológicos (PAIVA *et al.*, 2022)

Potencial atividade antitumoral tem sido identificada para o citral, constituinte majoritário do OECC, relacionadas, por exemplo, a mecanismos de indução do estresse oxidativo e lesões no DNA (BAILLY, 2020).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* com o citral tem identificado que o constituinte isolado apresenta atividade antitumoral frente ao câncer de mama, com efeitos potencializados em nanopartículas, de forma que o encapsulamento do citral em nanopartícula melhorou a bioeficácia do constituinte por via oral (NORDIN *et al.*, 2020), sugerindo que a administração do citral por via oral no presente estudo também pode ter influenciado em sua eficácia.

O citral tem apresentado importante atividade antitumoral descrita e, além da administração por via oral, o tempo de tratamento também corresponde a uma variável que deve ser considerada; estudo realizado para avaliação de atividade antitumoral do citral em xenoinxerto mamário, por exemplo, na dose de 50 mg/kg/dia – também utilizada no estudo – identificou redução de 50% do tumor após 2 semanas de tratamento com citral, comparado ao controle negativo (NIGJEH *et al.*, 2019). Desse modo, vias de administração e o tempo de tratamento poderiam influenciar, por exemplo, na associação com antineoplásicos.

Apesar da associação do citral com o 5-FU não ter influenciado na inibição tumoral do S180, outros modelos tumorais devem ser considerados, visto que em modelo de xenoinxerto colorretal utilizado para avaliar a eficácia do tratamento combinado do citral com a pirarrubicina em quimioperfusão intraperitoneal hipertérmica, identificou-se que o citral foi um aditivo eficaz na terapia (FANG *et al.*, 2017). E, sendo o citral o constituinte majoritário do OECC, potencial associação do OECC também deve ser avaliada.

Dessa forma, os dados encontrados evidenciaram que em modelo *in vivo* o EACC, OECC e o constituinte isolado citral não apresentaram atividade antitumoral frente ao S180; adicionalmente, ao ser associado ao antineoplásico 5-FU, não influenciaram na inibição tumoral pelo antineoplásico. No entanto, apesar de não influenciarem no crescimento ou redução tumoral, aspectos toxicológicos também devem ser considerados frente a utilização concomitante de antineoplásicos e plantas medicinais.

A toxicidade de uma droga está relacionada ao grau que determinada substância/mistura pode causar danos ao organismo (RILEY; KOHUT, 2010; CAMPBELL, 2020).

Nesse sentido, considerando que alterações na massa corpórea, na ingesta de água e no consumo de ração podem ser um dos primeiros fatores a indicarem presença de toxicidades relacionadas a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU, ao indicarem a possível presença de alterações gastrointestinais, corresponderam aos primeiros parâmetros avaliados.

Na avaliação dos parâmetros, evidenciou-se que a associação do EACC e do constituinte isolado citral com o 5-FU não resultou em alterações na massa corpórea, consumo de ração e ingesta de água; no entanto, alteração na ingesta de água foi observada na associação do OECC 50 mg/kg/dia com o 5-FU.

Nos tratamentos realizados, aumento da massa corpórea foi evidenciado, principalmente, nos grupos tratados sem a utilização do 5-FU, com diferença significativa em relação ao controle sem tumor; e, considerando que redução tumoral foi encontrada nos grupos tratados na presença do 5-FU – além de ganho da massa corpórea sem diferença em relação ao grupo sem tumor -, o aumento da massa corpórea evidenciado pode estar associado ao crescimento tumoral do S180.

Redução da massa corpórea induzida pelo 5-FU e alterações em hábitos alimentares é encontrada na literatura (CAO *et al.*, 2014), podendo justificar alterações no consumo de ração e água encontradas.

Desse modo, diferenças significativas no consumo de ração e ingesta de água entre os grupos foram encontradas, principalmente, em relação ao controle negativo sem tumor ou com tumor, com redução do consumo de ração e ingesta de água especialmente no grupo 5-FU.

No entanto, a associação do OECC 50 mg/kg/dia e o 5-FU demonstrou que os hábitos de ingesta de água podem ter sido preservados frente a associação, visto que diferença foi encontrada em relação ao controle positivo com tumor (tratado com 5-FU), que apresentou redução da ingesta de água; no entanto, não houve diferença em relação ao controle negativo com tumor.

Redução da ingesta de água é comumente visualizada em grupos tratados com 5-FU (AMARAL, 2018); desse modo, a redução da ingesta de água frente ao tratamento com 5-FU pode ter sido atenuada pela associação do OECC 50 mg/kg/dia com o 5-FU.

Nesse sentido, a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral não foi capaz de influenciar negativamente em alterações nos grupos avaliados, apresentando boa tolerância em sua administração. A boa tolerância da administração do extrato do *C. citratus* já foi descrita, por exemplo, em relação a massa corpórea ao ser associada com antineoplásicos (RUVINOV *et al.*, 2019).

Alterações no metabolismo de drogas antineoplásicas podem resultar em redução da resposta terapêutica e aumento de toxicidades (BERTHOLEE; MARING; KUILENBURG, 2017), podendo influenciar também na massa dos órgãos e em parâmetros bioquímicos e hematológicos – também avaliados no presente estudo.

Órgãos que podem ter sua fisiologia alterada frente a utilização de antineoplásicos incluem o fígado, rins e baço (ANDRADE *et al.*, 2016), tornando fundamental sua avaliação frente a associação EACC, OECC ou do constituinte isolado citral com o 5-FU.

Os resultados encontrados identificaram que a associação do EACC, OECC e do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU não influenciou significativamente na massa hepática, renal e esplênica, quando comparado ao tratamento isolado com o 5-FU.

A metabolização do 5-FU é realizada, principalmente, no fígado; ademais, danos hepáticos são descritos como presentes frente ao tratamento com o 5-FU, favorecendo a ocorrência de hepatotoxicidades (GELEN *et al.*, 2017). Por outro lado, propriedades hepatoprotetoras já foram descritas em relação ao *C. citratus* (ERAJ; SARFARAZ; USMANGHANI, 2016; UCHIDA *et al.*, 2017).

Os tratamentos realizados identificaram que, apesar de não terem sido identificadas alterações na massa hepática frente a associação do EACC, OECC e do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU, redução da massa hepática foi identificada no tratamento com OECC na dose de 50 mg/kg/dia associada ao 5-FU e nos tratamentos do Citral 25 e 50 mg/kg/dia associados ao 5-FU, em relação ao controle negativo com tumor, mas sem diferença significativa em relação ao 5-FU - que também apresentou redução da massa hepática em relação ao controle negativo com tumor.

Nesse sentido, atenção deve ser dada frente a utilização de doses mais elevadas de OECC e do constituinte isolado citral, visto que se a redução do tamanho do fígado estiver associada a condições que resultem na redução do fluxo sanguíneo hepático e no comprometimento em relação ao metabolismo de drogas, pode favorecer a maior biodisponibilidade da droga e a

ocorrência de toxicidades. Desse modo, para avaliação da presença de lesões hepáticas, dosagem bioquímica foi realizada.

Análise bioquímica identificou que parâmetros hepáticos não foram alterados frente a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU.

Elevação de AST foi identificada nos grupos com S180, em relação ao controle negativo sem tumor; no entanto, salienta-se que a elevação de AST pode não estar associada a danos hepáticos e sim ao crescimento tumoral do S180, visto que AST também está presente em músculos esqueléticos e cardíacos, além de rins, pâncreas e eritrócitos, sendo sua elevação anteriormente identificada no S180 (AMARAL *et al.*, 2020).

A redução de AST identificada em grupos tratados na presença do 5-FU fortalece a concepção de que níveis elevados de AST podem estar relacionados ao S180, considerando que frente a inibição do crescimento tumoral na utilização do 5-FU, a elevação dos valores de AST foi atenuada; dado também identificado anteriormente (AMARAL *et al.*, 2020).

No protocolo experimental com o EACC, redução da FA também foi identificada nos grupos com S180, em relação ao controle negativo sem tumor, fator que também pode estar relacionado a presença do S180.

A fosfatase alcalina é liberada, principalmente pelo fígado (LOWE; SANVICTORES; JOHN, 2022), mas também está presente em outros tecidos, como tecido ósseo, endotélio vascular, túbulos renais, epitélio biliar, superfície mucosa das vias aéreas, cérebro e folículos pilosos (FONTES *et al.*, 2018).

A fosfatase alcalina é um importante indicador para distúrbios hepáticos e ósseos (KANG; DO; KIM, 2021). Em modelo de tumor ascítico do S180, níveis reduzidos de FA foram identificados anteriormente, devido a presença de aspectos pouco conhecidos e relacionados a indução de reabsorção óssea (SUZUKI; YAMADA, 1991); desse modo, considerando que sarcomas podem acometer tecidos moles e ósseos (VOLTAN; BAPTISTA; ETCHEBEHERE, 2021), alterações na FA podem ser decorrentes da formação e agressividade do S180.

No protocolo experimental com o OECC, parâmetros hepáticos também identificaram redução de ALT nos grupos tratados com a associação do OECC com o 5-FU em relação ao controle negativo com tumor, mas sem diferença em relação ao grupo tratado apenas com 5-FU.

A ALT está presente principalmente no fígado; dessa forma, apesar de ser encontrada em níveis mais reduzidos na musculatura esquelética, a elevação de ALT está relacionada, principalmente, a lesões hepáticas (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). Nesse sentido, a redução dos níveis de ALT presentes na associação do OECC com o 5-FU podem sugerir

potencial atividade hepatoprotetora do OECC, embora não tenha sido observada diferença estatística com o grupo tratado apenas com 5-FU.

Parâmetros renais identificaram que não houve diferença significativa em relação a massa dos rins entre os grupos, sugerindo que a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral não interfere na massa renal. No entanto, alterações em parâmetros bioquímicos renais foram identificados frente a associação com o 5-FU, sugerindo que alterações renais podem ter ocorrido em virtude da associação.

O ácido úrico é considerado um resíduo inerte do metabolismo das purinas, sintetizado por órgãos como fígado e rins; níveis elevados de ácido úrico têm sido associados, por exemplo, a distúrbios renais e cardiovasculares (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2019). No presente estudo, a associação do EACC com o antineoplásico 5-FU identificou elevação dos valores de ácido úrico no grupo tratado na dose de 100 mg/kg/dia associado ao 5-FU, em relação ao controle positivo (5-FU).

Níveis elevados de ácido úrico foram identificados no grupo tratado apenas com 100 mg/kg/dia de EACC, em relação ao controle negativo sem tumor; no entanto, quando associado ao 5-FU, a elevação do ácido úrico foi potencializada. Os dados sugerem que doses elevadas de EACC podem resultar na elevação de ácido úrico e que, quando associado a antineoplásicos, elevação dos níveis de ácido úrico pode ser potencializada.

No entanto, para identificação de potenciais lesões renais, outros parâmetros devem ser avaliados; desse modo, redução dos níveis de creatinina foram identificados nos grupos em que se realizou a associação do EACC com o 5-FU, em relação ao grupo 5-FU - que apresentou níveis mais elevados de creatinina sérica.

Redução de parâmetros bioquímicos renais já foi identificada anteriormente, sugerindo que o extrato do *C. citratus* pode desempenhar papel nefroprotetor; o estudo observou que o tratamento de ratos com cisplatina elevou níveis de parâmetros bioquímicos renais, ao passo que o tratamento com o extrato do *C. citratus* reduziu os parâmetros avaliados (HAGGAG, 2015).

Efeito nefroprotetor do extrato do *C. citratus* também foi observado ao ser associado com o fármaco gentamicina; de forma que o extrato apresentou papel protetor frente as alterações induzidas pela gentamicina, ao influenciar, por exemplo, no peso corporal, na creatinina sérica, no ácido úrico sérico, eletrólitos séricos, volume urinário, proteína urinária, lactato desidrogenase urinária e fosfatase alcalina (ULLAH *et al.*, 2013).

Dessa forma, apesar da elevação dos níveis de ácido úrico na dose de 100 mg/kg/dia frente a associação com o 5-FU, papel nefroprotetor pode ser sugerido para o EACC, visto que o grupo

tratado apenas com o antineoplásico apresentou níveis mais elevados de creatinina, elevação que foi atenuada frente a associação com o EACC de 50 e 100 mg/kg/dia – sem diferença entre as doses.

Nos grupos tratados com OECC ou com o constituinte isolado citral, diferença significativa em parâmetros renais foram presentes apenas em relação a ureia, em comparação ao controle negativo sem tumor - identificando-se redução dos valores de ureia entre os grupos com S180. No entanto, a associação do OECC ou do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU não influenciou em parâmetros bioquímicos renais entre os grupos.

Na avaliação do baço, redução da massa esplênica foi identificada em todos os grupos tratados na presença do 5-FU. A relação entre a redução da massa esplênica e tratamentos com antineoplásicos, como o 5-FU, tem sido identificada em estudos anteriormente realizados (SANTOS, 2018; AMARAL *et al.*, 2020).

Adicionalmente, por ser um órgão associado ao sistema imune e atuar no armazenamento de células de defesa, uma das marcas frente o tratamento com 5-FU é a leucopenia, ou seja, a redução de leucócitos que pode favorecer a imunossupressão (VANDERVEEN *et al.*, 2020).

No presente estudo, a avaliação de parâmetros hematológicos leucocitários identificou-se que a leucopenia foi observada em todos os grupos tratados na presença do 5-FU, sem diferença entre os grupos tratados apenas com o 5-FU e os grupos com a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral com o 5-FU. Salienta-se que redução de leucócitos foi encontrada apenas na presença do 5-FU.

Ciclos repetidos de 5-FU já foram associados a prejuízo na função de linfócitos T, salientando a importância do início precoce da imunoterapia como forma de melhorar o efeito antitumoral da terapêutica oncológica (WU *et al.*, 2016).

Alterações percentuais em análise diferencial de leucócitos também é identificada frente ao tratamento com 5-FU, principalmente em relação a neutrófilos e linfócitos, com identificação de redução de neutrófilos e elevação de linfócitos nos grupos tratados na presença do 5-FU (AMARAL *et al.*, 2020). Os achados do estudo em relação a análise diferencial de leucócitos corroboram o descrito na literatura.

O baço, em associação a medula óssea e ao fígado, também pode atuar na homeostase hematopoiética (WOLBER *et al.*, 2002) e, considerando que tratamentos com antineoplásicos podem, adicionalmente, associar-se a supressão da medula óssea e resultar em mielotoxicidade, alterações em seu metabolismo devido a associações com plantas medicinais podem influenciar, por exemplo, na supressão direta ou indireta de eritrócitos (BARRETO *et al.*, 2014).

A avaliação de parâmetros hematológicos eritrocitários identificou que a associação do EACC, OECC ou do constituinte isolado citral com o antineoplásico 5-FU não influenciou significativamente nos parâmetros avaliados. No entanto, no protocolo experimental com o EACC, redução do número de eritrócitos frente ao tratamento com 5-FU foi evidenciada nos grupos tratados com 5-FU ou com a associação do 5-FU com o EACC.

Os grupos tratados frente a associação do EACC com o 5-FU também apresentaram redução de hemoglobina e de hematócrito, mas sem diferença significativa com o grupo 5-FU, sugerindo que a associação do EACC com o antineoplásico não interferiu em parâmetros eritrocitários.

Nesse contexto, os dados encontrados identificaram que em modelo *in vivo*, a associação do EACC, OECC e do constituinte isolado citral com o 5-FU não influenciou na inibição tumoral do S180.

No entanto, parâmetros toxicológicos identificaram que: a associação do EACC com o 5-FU não influenciou na massa corpórea, nos hábitos de ingestão de água e de consumo de ração, na massa dos órgãos e em parâmetros hematológicos eritrocitários e leucocitários; no entanto, parâmetros bioquímicos identificaram que não houve influência em parâmetros hepáticos, mas os parâmetros renais de ácido úrico e creatinina foram alterados frente a associação do EACC com o 5-FU, com elevação do ácido úrico frente a associação de 100 mg/kg/dia do EACC com o 5-FU e redução da creatinina frente a associação do EACC 50 e 100 mg/kg/dia do EACC com o 5-FU, sem diferença entre as doses.

Parâmetros toxicológicos frente a associação do OECC ou do constituinte isolado citral com o 5-FU identificaram que: a associação do OECC ou do constituinte isolado citral com o 5-FU não influenciou na massa corpórea, no hábito de consumo de ração, na massa dos órgãos e em parâmetros bioquímicos e hematológicos eritrocitários e leucocitários; no entanto, o tratamento com OECC 50 mg/kg/dia associado ao 5-FU pode ter preservado os hábitos de ingestão de água, quando comparado ao 5-FU isolado no tumor experimental S180.

As limitações do estudo corresponderam a sua realização em modelo único experimental e com a utilização de única via de administração; no entanto, a realização do estudo frente ao S180 justifica-se por sua ampla utilização para avaliação de propriedades antitumorais e associativas entre produtos naturais e antineoplásicos, trazendo também importantes indícios sobre o antineoplásico 5-FU, amplamente utilizado na oncologia. Adicionalmente, a utilização da via oral para administração justifica-se por representar a principal via de administração utilizada por pacientes oncológicos, que nortearam a realização do estudo.

A não realização de análises comparativas entre o extrato aquoso do *C. citratus* e o ácido clorogênico, identificado como principal constituinte em análise cromatográfica, também representou uma limitação. No entanto, a não realização justifica-se pela dificuldade na obtenção de padrões internos de constituintes bioativos a serem utilizados para identificação dos constituintes presentes no EACC em análise cromatográfica.

Importantes aplicações práticas estão relacionadas aos achados, visto que os dados encontrados direcionam profissionais quanto a orientações que devem ser prestadas aos pacientes oncológicos em relação ao uso de produtos naturais associados a antineoplásicos e direcionam a conduta terapêutica ao salientar que práticas alternativas por pacientes podem influenciar diretamente no efeito terapêutico de antineoplásicos, influências que devem ser conhecidas e consideradas.

As informações levantadas também direcionam a importância de que os pacientes oncológicos tenham o conhecimento sobre a necessidade de comunicar o uso de produtos naturais em conjunto a terapêutica oncológica, e que seu uso pode trazer efeitos maléficos para a atividade do antineoplásico e para o curso da doença; além de direcionar a importância de novos estudos *in vitro* e *in vivo* com produtos naturais e antineoplásicos.

Ademais, frente a riqueza da flora brasileira, os achados direcionam e estimulam a realização de novos estudos para avaliação de diferentes propriedades farmacológicas de produtos naturais, como a presença de propriedades antioxidantes e quimiopreventivas que poderiam ser benéficas a oncologia.

7 CONCLUSÃO

Diante dos achados sobre a associação do extrato aquoso e do óleo essencial do *C. citratus* com o antineoplásico 5-fluorouracil, concluiu-se que a associação do extrato aquoso nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia e do óleo essencial do *C. citratus* nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia não influenciou significativamente na inibição tumoral do tumor experimental Sarcoma 180 nos animais tratados com o 5-FU.

No entanto, a avaliação de parâmetros toxicológicos da associação identificou que a associação do extrato aquoso do *C. citratus* com o 5-FU influenciou a alteração de parâmetros bioquímicos renais, observando-se elevação de ácido úrico na associação da dose de 100 mg/kg/dia com o 5-FU e redução da creatinina na associação das doses de 50 e 100 mg/kg/dia com o 5-FU, sugerindo que a associação do extrato aquoso do *C. citratus* com o 5-FU pode apresentar papel nefroprotetor.

Por sua vez, a associação do óleo essencial do *C. citratus* na dose de 50 mg/kg/dia com o 5-FU influenciou em parâmetros toxicológicos de ingesta de água, apresentando efeito sugestivo de preservação nos hábitos de ingesta de água frente ao tratamento com 5-FU.

Dessa forma, considerando que o 5-FU é um importante antineoplásico utilizado na oncologia, os dados encontrados podem ampliar o olhar de pesquisadores e profissionais frente a sua utilização concomitante com preparações e isolados do *C. citratus*, direcionando as condutas e orientações na terapêutica oncológica e na formação de futuros profissionais. Adicionalmente, sugere-se a necessidade da realização de estudos *in vitro* e *in vivo* mais amplos para avaliação de aspectos associativos da espécie *C. citratus* com antineoplásicos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Z; REHMAN, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. London: **IntechOpen**, 2018.

ABDULHASAN, G.A. Lemongrass essential oil shows an antiproliferative effect on lung cancer cells and its role in expression of p53 gene. **Iraqi Journal of Agricultural Sciences**, v. 52, n. 2, p. 359-366, 2021.

ABU-DARWISH, S.M.; EFFERTH, T. Medicinal Plants from Near East for Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 56, 2018.

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4th ed. Allured Publishing, Carol Stream, IL, 2007.

ADENEYE, A.A.; AGBAJE, E.O. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 440-444, 2007.

ADUKWU, E.C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 9619–9627, 2016.

ALBERTS, B. et al. **Components of the Cell-Cycle Control System**. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.

ALNAIM, L. Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 13, p. 207–221, 2007.

ANDRADE, L.N. et al. Evaluation of the Cytotoxicity of Structurally Correlated *p*-Menthane Derivatives. **Molecules**. v. 20, p. 13264-13280, 2015.

ANDRADE, L.N. et al. In vivo anti-tumor activity and toxicological evaluations of perillaldehyde 8,9-epoxide, a derivative of perillyl alcohol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 2–11, 2016.

AMARAL, R. G. et al. 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. 67, n. 8, p. 1100-6, 2015.

AMARAL, R. G. et al. Antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* combined with 5-fluorouracil in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 3, p. 250–254, 2016.

AMARAL, R.G. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato das folhas da *Passiflora alata* Curtis**. Tese [Doutorado em Ciências Fisiológicas] – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

- AMARAL, R.G. et al. Investigation of the Possible Antioxidant and Anticancer Effects of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae). **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 253-258, 2018.
- AMARAL, R. G. et al. Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. **Clinical Oncology**, v. 4, n. 1, 2019.
- AMARAL, R.G. et al. Cytotoxic, Antitumor and Toxicological Profile of *Passiflora alata* Leaf Extract. **Molecules**, v. 25, p. 4814, 2020.
- ARHOGHRO, E.M.; KEH, C.I.; PROHP, T.P Cymbopogon citratus aqueous extract alleviates cisplatin-induced hepatic oxidative stress and toxicity in albino rats. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 586-604, 2014.
- AUBREY, B.J. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, p. 104–113, 2018.
- AVOSEH, O. et al. Cymbopogon species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, p. 7438–7453, 2015.
- AZWAR, S. et al. Recent Updates on Mechanisms of Resistance to 5 Fluorouracil and Reversal Strategies in Colon Cancer Treatment. **Biology** v. 10, p. 854, 2021.
- BACHMANN, K.A. et al. **Interações medicamentosas. O novo padrão de interações medicamentosas e fitoterápicas**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2006.
- BAILEY, D.G. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. **The lancet**, v. 337, 1991.
- BAILLY, C. Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereoisomers. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 871:172945, 2020.
- BAIN, B. J. et al. **Dacie and Lewis practical haematology**. 11 Ed. Elsevier Limited, 2011.
- BALMANT, N.V. et al. Incidence and mortality of bone cancer among children, adolescents and young adults of Brazil. **Clinics**, v. 74, p. e858, 2019.
- BAO, X.L. et al. Polysaccharides from *Cymbopogon citratus* with antitumor and immunomodulatory activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p.117–124, 2015.
- BARBOSA, I. R. et al. Cancer mortality in Brazil. **Medicine**, v. 94, n. 16, p. e746, 2015.
- BARRETO, J.N. et al. Antineoplastic Agents and the Associated yelosuppressive Effects: A Review. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 5, p. 440-6, 2014.
- BARUAH, J. et al. Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, 2016.
- BASU, A.K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 970, 2018.

BAYALA, B. et al. Cymbopogon citratus and Cymbopogon giganteus essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. **Biochimie**, 2018.

BAYLIN, S.B.; JONES, P.A. Epigenetic Determinants of Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, p. a019505, 2016.

BERTHOLEE, D.; MARING, J.G.; KUILENBURG, A.B.P. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 5, p. 317–337, 2017.

BRETON-LARRIVÉE, M.; ELDER, E.; MCGRAW, S. DNA methylation, environmental exposures and early embryo development. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, 2019.

BEZERRA, D.P. et al. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and peperine, two alkaloid amides from *piper*. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, v.39, n. 6, p.801-807, 2006.

BEZERRA, D. P. et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from Piper species. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 599-607, 2008a.

BEZERRA, D.P. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of applied toxicology**, v. 28, n.2, p.156-163, 2008b.

BIDINOTTO, L.T. et al. Modifying Effects of Lemongrass Essential Oil on Specific Tissue Response to the Carcinogen N-Methyl-N-Nitrosurea in Female BALB/c Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 2, p. 161–168, 2012.

BIDINOTTO, L.T. et al. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 536–544, 2011.

BONT, Z. et al. Heritable variation in root secondary metabolites is associated with recent climate. **Journal of Ecology**, v. 108, p. 2611–2624, 2020.

BOUKHATEM, M. N. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, 2014.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1 ed. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2 ed. Brasília: Anvisa, 2021. 222p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 2017.

BRITO, E.S. et al. Caracterização Odorífera dos Componentes do Óleo Essencial de Capim-Santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae) por Cromatografia Gasosa (CG) – Olfatometria. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2011.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 73–84, 2004.

BURGOS-MORÓN, E. et al. The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I– and II–DNA Complexes in Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7384–7391, 2012.

BURNINGHAM, Z. et al. The Epidemiology of Sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**, v. 2, p. 14, 2012.

CAETANO, N.L.B. et al. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos a tratamento antineoplásico no serviço de saúde privado no estado de Sergipe – Brasil. **Cadernos de graduação – Ciências biológicas e da Saúde UNIT**, v. 5, n. 1, p. 163-176, 2018.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M. et al. Effect of DNA Repair Deficiencies on the Cytotoxicity of Drugs Used in Cancer Therapy - A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 3419-3454, 2014.

CAMPBELL, R. Drug Toxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Development**, v. 5, n. 2, 2020.

CAO, Z. et al. Antitumor and immunomodulatory effects of low-dose 5-FU on hepatoma 22 tumor-bearing mice. **Oncology letters**, v. 7, p. 1260-1264, 2014.

CAPARICA, R. et al. FOLFIRI as second-line treatment of metastatic biliary tract cancer patients. **Autops Case Rep [Internet]**, v. 9, n. 2, p. e2019087, 2019.

CHAABANE, W. et al. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, p. 43–58, 2013.

CHAUDHARY, C.L. Design, Synthesis, and Cytotoxicity and Topoisomerase I/II Inhibition Activity of Pyrazolo[4,3-f]quinoline Derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 399, 2022.

CHEN, J.; LIN, H.; HU, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 1228–1235, 2003.

- CHEEL, J. et al. Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2511-2517, 2005.
- CHRISTENSEN, S. et al. 5-Fluorouracil treatment induces characteristic T>G mutations in human câncer. **Nature Communications**, v. 10, p. 4571, 2019.
- CORDELL, G.; BEECHER, C.; PEZZUT, J. Can ethnopharmacology contribute to development of new anti-cancer? **Journal of Ethnopharmacol**, n. 32, n. 1-3, p. 117-133, 1991.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gulbenkian- Lisboa/ Serviços de Educação e Bolsas. v. 2. ed. 5. 2002.
- COSTA, T. C. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: an integrative review of the literature. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, n. 2, p. 0335–0345, 2015.
- COSTA, E.V. et al. Diversity of the diterpenes in the leaves of *Xylopiia laevigata* (Annonaceae) and their cytotoxicities. **Quimica Nova**, v. 43, n. 4, p. 419-425, 2020.
- COX, M.C. Influence of Garlic (*Allium sativum*) on the Pharmacokinetics of Docetaxel. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 15, 2006.
- COX-GEORGIAN, D. et al. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. **Medicinal Plants**, p. 333–59, 2019.
- CRAGG, G.M.; PEZZUTO, J.M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25 (suppl 2), p. 41–59, 2016.
- CRUZ-LÓPEZ, K.G.L. et al. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 1143, 2019.
- DA SILVA, N. B. et al. Anti-Biofilm and Hemolytic Effects of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf Essential Oil. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 19, p. e5011, 2019.
- DA SILVA, T.B.C. et al. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 199, 2016.
- DEVITA JR, V.T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, 2008.
- DE TOLEDO, L.G. et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1252, 2016.
- DI MOLA, A. et al. Effect of citral and citral related compounds on viability of pancreatic and human B-lymphoma cell lines. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, p. 631–639, 2017.

DUERKSEN-HUGHES, P.J.; YANG, J.; OZCAN, O. p53 Induction as a Genotoxic Test for Twenty-Five Chemicals Undergoing in vivo Carcinogenicity Testing. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 10, p. 805 – 812, 1999.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 177, 2013.

EKPENYONG, C.E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 5, p. 321–337, 2015.

ERAJ, A.; SARFARAZ, S.; USMANGHANI, K. Hepato-protective potential and phytochemical screening of *cymbopogon citratus*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical research**, v. 3, n. 6, p. 14–12, 2016.

EWESUEDO, R.B.; RATAIN, M.J. Topoisomerase I Inhibitors. **The Oncologist**, v. 2, p. 359-364, 1997.

FAGUET, G.B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 2022–2036, 2015.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1300, 2018.

FANG, Z. et al. Combination Treatment of Citral Potentiates the Efficacy of hyperthermic Intraperitoneal Chemoperfusion with Pirarubicin for colorectal Cancer. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, p. 3588–3597, 2017.

FASINU, P.S.; RAPP, G.K. Herbal Interaction with Chemotherapeutic Drugs—A Focus on Clinically Significant Findings. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 1356, 2019.

FEITELSON, M.A. et al. Sustained proliferation in cancer.: mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35(Suppl), p. S25–S54, 2015.

FERNANDES, R. A. C. **Citotoxicidade de materiais indicados em proteções pulpares diretas: estudo in vitro**. Dissertação [Mestrado em Medicina Dentária] - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, 2014.

FERNANDO, J.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 33, n.3, p. 131–135, 2015.

FIPKE, M.V.; VIDAL, R.A. Non-proteinogenic amino acids potential use as allelochemicals. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.15, n.1, p.256-262, 2016.

FERREIRA, P. M.P et al. **Biologia e aplicações pré-clínicas do modelo experimental sarcoma 180**. In book: *Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2*, Editora Atena, p. 270-287, 2019.

FERREIRA, P. M. P. et al. 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**, v. 186, p. 270–279, 2016.

FONTES, R. et al. Alkaline phosphatase: reference interval transference from CALIPER to a pediatric Brazilian population. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 4, p. 227-231.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144–149, 2008.

FRANCA, M.N. F. **Efeito antiproliferativo e pró-apoptótico de derivados de lausona em células de melanoma**. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

FRANCISCO, V. et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 126-34, 2013.

FREITAS, M.V. et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 219–224, 2008.

FURLAN, M.R. et al. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC) Staf, Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 686-691, 2010.

GAO, Y. et al. Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. **Journal of Cancer**, v.11, n.17, p. 5135-5149, 2020.

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

GE, C. et al. Advances in evidence-based cancer adoptive cell therapy. **Chinese Clinical Oncology**, v. 6, n. 2, p. 18–18, 2017.

GELEN, V. et al. The protective effect of rutin and quercetin on 5-FU-induced hepatotoxicity in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 647–653, 2017.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-79, 2005.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017. **JAMA Oncol**, v. 5, n. 12, p. 1749-1768, 2019.

GOEY, A.K.L. et al. The Effect of St John's Wort on the Pharmacokinetics of Docetaxel. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, p. 103–110, 2014.

GRECO, I. et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13206, 2020.

GREEN, D.R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, p. a006080, 2015.

GRYNKIEWICZ, G.; SZEJA, W. New Perspectives in Exploiting Secondary Metabolite Glycosides as Drug Leads. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 6, p. 6, 2015.

GOMES, L.F. et al. Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) Presents Antitumoral Effect and Improves Chemotherapy Activity in Prostate Cancer Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)**, v. 21, n. 17, p. 2337-2350, 2021.

GUNAWAN-PUTERI, M.D.P.T.; RUSTANDI, F.; HENDRA, P. Aktivitas in vitro dan in vivo anti hiperglisemia dari ekstrak air serai (*Cymbopogon citratus*) yang dikeringkan dengan metode spray-drying. **Jurnal Farmasi Sains Dan Komunitas**, v. 15, n. 2, 2013.

HABIBED, B. et al. The role of herbal medicine in the side effects of chemotherapy. **Revista Latinoamericana de Hipertensión**, v. 15, n. 1, p. 64-70, 2020.

HACKE, A.C.M. et al. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 275, p. 114142, 2021.

HACKE, A.C.M. et al. Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 291, p. 115147, 2022.

HAGGAG, M.H. Protective Effect of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) Water Extract Against Nephrotoxicity Induced by Cisplatin of Male Rats. **Egyptian Journal of Nutrition and Health**, v. 10, n. 1, 2015.

HALABI, M.F.; SHEIKH, B.Y. Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. **BioMed Research International**, 2014.

HASHIM, G.M. et al. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 1458–1464, 2017.

HU, M.; KONOBI, K.; TACHIBANA, K. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1299, n. 2, p. 252-258, 1996.

HUANG, C.Y. et al. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer. **BioMedicine**, v. 7, n. 4, p.12-23, 2017.

HUANG, M.; LU, J.; DING, J. Tumor necrosis as a poor prognostic predictor on postoperative survival of patients with solitary small hepatocellular carcinoma. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, p. 5–13, 2021.

HUANG, T.; JANDER, G.; VOS, M. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1531–1537, 2011.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 6º ed. Rio de Janeiro: **Ministério da saúde**, 2020a.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2020 / Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Ministério da Saúde**, 2020b.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G.K. Cell-Cycle Therapeutics Come of Age. **Journal of Clinical Oncology (JCO)**, v. 35, n. 25, p. 2949-2959, 2017.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A. et al. Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in Different Human Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 14, p. 5703-7, 2015.

JESUS, J.G. et al. Elaboração de fórmulas farmacêuticas de uso tópico utilizando óleo essencial extraído do capim limão. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p.21800-21815, 2021.

KANG, C. et al. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 85–90, 2009.

KANG, S.H.; DO, J.Y.; KIM, J.C. Association Between Alkaline Phosphatase and Muscle Mass, Strength, or Physical Performance in Patients on Maintenance Hemodialysis. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**, 2021.

KATIKI, L.M. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 103– 108, 2011.

KAPUR, A. et al. Modulation of oxidative stress and subsequent induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress allows citral to decrease cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27530, 2016.

KIMUTAI, A. et al. Repellent effects of the essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Tagetes minuta* on the sandfly, *Phlebotomus duboscqi*. **BMC Research Notes**, v. 10, p. 98, 2017.

KIRAITHE, M. N. et al. 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**, v. 178, p. 266-71, 2015.

KONTOMANOLIS, E.N. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. **Anticancer Research**, v. 40, p. 6009-6015, 2020.

KPADONOU, D. et al. Effects of the chemical composition of essential oils from seven plants used in traditional medicine in Benin on the growth of eleven pathogenic bacteria in antimicrobial control. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 11, n. 1, p. 23-31, 2022.

LEHMANN, F.; WENNERBERG, J. Evolution of Nitrogen-Based Alkylating Anticancer Agents. **Processes**, v. 9, p. 377, 2021.

LEVY, A. et al. Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques. **Bulletin du Cancer**, v. 98, n. 9, p. 1037-45, 2011.

LING, Y. et al. Tumor necrosis as a poor prognostic predictor on postoperative survival of patients with solitary small hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 20, p. 607, 2020.

LIU, J. et al. The Herb–Drug Pharmacokinetic Interaction of 5-Fluorouracil and its Metabolite 5-Fluoro-5,6-Dihydrouracil with a Traditional Chinese Medicine in Rats. **International Journal of Molecular Sciences is an international**, v. 19, p. 25, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 544, 2002.

LOWE D.; SANVICTORES, T.; JOHN, S. **Alkaline Phosphatase**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

LU, Y. et al. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. **Molecular Cancer**, v. 19, p. 79, 2020.

LUKITASARI, M.; NUGROHO, D.A.; WIDODO, N. Chlorogenic Acid: The Conceivable Chemosensitizer Leading to Cancer Growth Suppression. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 23, p. 1-6, 2018.

LULEKAL, E. et al. Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of Cymbopogon citratus essential oil in mice and rabbit. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1289–1294, 2019.

MAGALHÃES, D.B. et al. Melissa officinalis L. ethanolic extract inhibits the growth of a lung cancer cell line by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis. **Food & Function - Royal Society of Chemistry**, n. 6, 2018.

MAHMOUD, T. S. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456–464, 2011.

MAJEWSKA, E. et al. Lemongrass (Cymbopogon citratus) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and uses for Food Preservation - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 69, n. 4, p. 327- 341, 2019.

MARMÉ, D. Advances in Cancer Therapy: Targeted Therapies. **Oncology Research and Treatment**, v. 39, n. 12, p. 758–759, 2016.

MARUOKA, T. Lemongrass essential oil and citral inhibit Src/Stat3 activity and suppress the proliferation/survival of small-cell lung cancer cells, alone or in combination with chemotherapeutic agentes. **International Journal of Oncology**, v. 52, p. 1738-1748, 2018.

MBEUNKUI, F.; JOHANN JR, D.J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, n. 4, p. 571–582, 2009.

- MÉABED, E.M.H.; ABOU-SREEA, A.I.B.; ROBY, M.H.H. Chemical analysis and giardicidal effectiveness of the aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. **Parasitology Research**, 2018.
- METCALFE, C.; FRIEDMAN, L.S.; HAGER, J.H. Hormone-Targeted Therapy and Resistance. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 2, p. 291-31, 2018.
- MING, L.C. et al. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) stape) poaceae. **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 555-559, 1996.
- MIRANDA, V. C. **Influência de condições de secagem, sombreamento, horário de colheita e procedência das plantas sobre o teor de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf**. Tese (Pós-graduação em Produção vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, 2012.
- MOHIUDDIN, A.K. Chemistry of Secondary Metabolites. **Annals of Clinical Toxicology**, v. 2, n. 1, p.1014, 2019.
- MORITA, R. et al. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. **Journal of Nucleic Acids**, 2010.
- MUALA, W.C.B.; DESOBGO, Z.S.C.; JONG, N.E. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from *Cymbopogon citratus* and evaluation of phenolics and aroma profiles of extract. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06744, 2021.
- MUKHOPADHYAY, P. et al. Uric Acid and Its Correlation with Various Metabolic Parameters: A Population-Based Study. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 23, p. 134-9, 2019.
- NAGAI, H.; KIM, Y.H. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 3, p. 448-451, 2017.
- NATURE. The global challenge of cancer. **Nature Cancer**. v. 1, p. 1–2, 2020.
- NAVEED, M. et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.
- NEGRELLE, R.R.B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 1, p. 80-92, 2007.
- NGUYEN, C. et al. Dandelion Root and Lemongrass Extracts Induce Apoptosis, Enhance Chemotherapeutic Efficacy, and Reduce Tumour Xenograft Growth In Vivo in Prostate Cancer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2019.
- NI, J.; MAHDAVI, B.; GHEZI, S. Chemical Composition, Antimicrobial, Hemolytic, and Antiproliferative Activity of Essential Oils from *Ephedra intermedia* Schrenk & Mey. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 6, p. 1562 – 1570, 2019.

- NIGJEH, S.E. et al. In Vivo Anti-Tumor Effects of Citral on 4T1 Breast Cancer Cells via Induction of Apoptosis and Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase Activity. **Molecules**, v. 24, p. 3241, 2019.
- NORDIN, M. et al. Antitumor and Anti-Metastatic Effects of Citral-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in 4T1-Induced Breast Cancer Mouse Model. **Molecules**, v. 25, p. 2670, 2020.
- OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4 p.1133-114, 2021.
- OLADEJI, O.S. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scientific African**, v. 6, p. e00137, 2019.
- OLIVEIRA, C.C.A.; SANTOS, J.S. Compostos ativos de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*): uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e263101220281, 2021.
- OLIVOTO, T. et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p. 71-84, 2017.
- OLORUNNISOLA, S.K. et al. Biological properties of lemongrass: An overview. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 455-462, 2014.
- ONG, J.Y.; TORRES, J.Z. Dissecting the mechanisms of cell division. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 30, p. 11382–11390, 2019.
- ORFI, N.E. et al. Use of medicinal plants by cancer patients at the National Institute of Oncology, Rabat: a crosssectional survey. **Pan African Medical Journal**, v. 40, n. 18, 2021.
- OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 361-77, 2004.
- ORSINE, J.V.C. et al. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* through hemolytic activity on human erythrocyte. **International Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 4, n. 11, p. 19-23, 2012.
- PAIVA, L.F. et al. Association of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf with nystatin against oral cavity yeasts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, p. e20200681, 2022.
- PALUMBO, M. O. et al. Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 57, 2013.
- PIARU, S.P. Chemical composition, anti-angiogenic and cytotoxicity activities of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) against colorectal and breast carcinoma cell lines. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 5, p. 453-459, 2012.

PINO, J.A. et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* [D.C.] Stapf.) leaves grown in Amazonian Ecuador. **Revista CENIC**, v. 49, n. 1, p. 1-8, 2018.

PITA, J. C. L. R. et al. In Vitro and in Vivo antitumor effect of trachylobane-360, a diterpene 141 from *Xylopiya langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9573–9589, 2012.

PHILION, C. et al. *Cymbopogon citratus* and *Camellia sinensis* extracts selectively induce apoptosis in cancer cells and reduce growth of lymphoma xenografts in vivo. **Oncotarget**, v. 8, n. 67, p. 110756 – 110773, 2017.

POLLARD, T.D. et al. **Chapter 40 - Introduction to the Cell Cycle**. Cell Biology (Third Edition). Elsevier, 2017.

POON, R.Y.C. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. **Methods in Molecular Biology**, v. 1342, p. 3-19, 2016.

POPOCA, J. et al. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n. 3, p. 173-177, 1998.

PROMILA.; MADAN, V.K. A Review on the Phytochemistry and Pharmacology of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Lemongrass). **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 3, p. 300-304, 2018.

PUATANACHOKCHAI, R. et al. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v. 183, p. 9–15, 2002.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

RAINUSSO, N.; WANG, L.L.; YUSTEIN, J.T. The adolescent and young adult with cancer: state of the art - bone tumors. **Current Oncology Reports**, v. 15, n. 4, p. 296-307, 2013.

RALLAN, R.; KAUR, J. Alkylating agents and cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 17, n. 9, p. 1061-1075, 2007.

RAJESH, E. et al. Naturally occurring products in cancer therapy. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7 (Suppl 1), p. S181-3, 2015.

REZENDE, D.A.C.S. **Estudo etnobotânico de plantas medicinais de Lavras e região: caracterização química e potencialidades biológicas dos óleos essenciais**. Dissertação [Mestrado em Agroquímica] - Universidade Federal de Lavras, 2016.

REZENDE, D. A. C.S. et al. Essential Oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: Inhibition of Phospholipase A2 and Cytotoxicity to Human Erythrocytes. **American Journal of Plant Sciences**, v.8, p. 2196-2207, 2017.

RILEY, A.S.; KOHUT, S. **Drug Toxicity**. In: Stolerman, I.P. (eds) Encyclopedia of Psychopharmacology, 2010.

RODRIGUES, T.S. et al. 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**, v.13, p.587-590, 2011.

RODRIGUES, A. et al. Antitumor Properties of the Essential Oil From the Leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Medica**, v. 81, n. 10, p. 798–803, 2015.

ROJAS – ARMAS, J.P. et al. The Essential Oil of *Cymbopogon citratus* Stapf and Carvacrol: An Approach of the Antitumor on 7,12-Dimethylbenz-[α]-anthracene (DMBA)-Induced Breast Cancer in Female Rats. **Molecules**, v.25, p. 3284, 2020.

RUVINOV, I. et al. Lemongrass Extract Possesses Potent Anticancer Activity Against Human Colon Cancers, Inhibits Tumorigenesis, Enhances Efficacy of FOLFOX, and Reduces Its Adverse Effects. **Integrative Cancer Therapies**, v. 18, 2019.

SÁ, R.C.S.; ANDRADE, L.N.; SOUSA, D. P. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. **Molecules**, v. 18, p. 1227-1254, 2013.

SANCHES, L.J. et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumour Biol**, v. 39, n. 3, 2017.

SANTIN, M.R. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1489–1496, 2009.

SANTOS, S. A. **Evidência de interação entre a camomila (*Matricaria recutita*) e o 5-fluorouracil frente à atividade antineoplásica em camundongos com sarcoma 180**. Dissertação [Mestrado em Ciências Fisiológicas] – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

SAYED, H.K. et al. Cytotoxic Activities of *Cymbopogon citratus* Extracts against Three Different Human Cancer Cell Lines: Lung Carcinoma (A549), Breast Cancer (MCF-7) and Hepatocellular Carcinoma (Hep G2). **Jornal of Modern Research**, v. 4, p. 21-26, 2022.

SCAIFE, J.; KERR, D. Antimetabolites in Cancer Therapy. **Anticancer Therapeutics**, 2008.

SHAH, G. et al. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, Stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 1, 2011.

SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C. Anti-inflammatory effects of the main constituents and epoxides derived from the essential oils obtained from *Tagetes lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* and *Eucalyptus citriodora*. **Journal of Essential Oil Research**, 2013.

SETHY, C.; KUNDU, C.N. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111285, 2021.

SHARIFI-RAD, J. et al. Natural Products and Synthetic Analogs as a Source of Antitumor Drugs. **Biomolecules**, v. 9, p. 679, 2019.

SHARMA, P.R et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v.179, p.160–168, 2009.

SHARMA, S. et al. Chemical Properties and Therapeutic Potential of Citral, a Monoterpene Isolated from Lemongrass. **Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 1, 2019.

SIDDIQUI, I.A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 1 – 12, 2015.

SILVA, T.B.C. et al. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 199, 2016.

SILVA, G.A. Cancer mortality in the Capitals and in the interior of Brazil: a four-decade analysis. **Revista de Saude Publica**, v. 54, n. 126, 2020.

SINHA, T. Tumors: Benign and Malignant. **Cancer therapy & Oncology International Journal**, v. 10, n. 3, 2018.

SOUSA, R. et al. Formulation Effects in the Antioxidant Activity of Extract from the Leaves of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4518, 2021.

SPRENGER, S. et al. Lemongrass essential oil and its major constituent citral isomers modulate adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. e14037, 2022.

STONE, S.C. et al. Evaluation of potential use of *Cymbopogon* sp. Essential oils, (R)-citronellal and N-citronellylamine in cancer chemotherapy. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 6, n. 4, p. 11-15, 2008 - 2013.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, p. 48, 2015.

SUBRAMANIAM, G.; YEW, X.Y.; SIVASAMUGHAM, L.A. Antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* against clinically importante bactéria. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 26–30, 2020.

SUN, S. et al. Influence Factors of the Pharmacokinetics of Herbal Resourced Compounds in Clinical Practice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 1983780, 2019.

SUN, Y. et al. The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 6923, 2021.

SUZUKI, K.; YAMADA, S. Ascites sarcoma 180, an animal model of humoral hypercalcemia of malignancy, produces a factor(s) exhibiting potent bone-resorbing activity without any parathyroid hormone-like activity. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 1991.

THAWABTEH, A. et al. The Biological Activity of Natural Alkaloids Against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. **Toxins**, v. 11, p. 656, 2019.

TAMARGO, J.; HEUZEY, J.L; MABO, P. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 549–567, 2015.

TAMER, C.E.; SUNA, S.; ÖZCAN-SINIR, G. **Toxicological Aspects of Ingredients Used in Nonalcoholic Beverages**. In Non-Alcoholic Beverages, p. 441–481, 2019.

TAMIR, I. et al. The hemolytic activity of citral: evidence for free radical participation. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n.19, p. 2945-2950, 1984.

TANG, Y.; LIU, Z. Chemical Kinetic Behavior of Chlorogenic Acid in Protecting Erythrocyte and DNA Against Radical-Induced Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11025–11029, 2008.

TASCILAR, M. et al. Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence. **The Oncologist**, v. 11, n. 7, p. 732-741, 2006.

TAVARES, F. et al. Cymbopogon citratus industrial waste as a potential source of bioactive compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 13, p. 2652-9, 2015.

THANGAM, R. et al. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by Cymbopogon citratus polysaccharide fractions. **Carbohydrate Polymers**, v.107, p. 138–150, 2014.

TRANG, D. T. et al. Essential Oils of Lemongrass (Cymbopogon citratus Stapf) Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in A549 Lung Cancer Cells. **BioMed Research International**, 2020.

TOMANKOVA, K. et al. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 949–961, 2015.

TOTEJA, R. Cell Cycle and Cell Cycle Regulation. **Cell and molecular Biology**, 2011.

TUNGMUNNITHUM, V. et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v. 5, p. 93, 2018.

UCHIDA, N.S. et al. Protective Effect of Cymbopogon citratus Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Liver Injury. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 3, p. 1–18, 2017.

ULLAH, N. et al. Cymbopogon citratus Protects against the Renal Injury Induced by Toxic Doses of Aminoglycosides in Rabbits. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2013.

UMUKORO, S. et al. Evaluation of the anticonvulsant and anxiolytic-like activities of aqueous leaf extract of Cymbopogon citratus in mice. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 2019.

- VAN, H.T.K. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oils of *Cymbopogon citratus* L. grown in phu tho province. **Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 683-687, 2016.
- VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p. 463-471, 1963.
- VANDERVEEN, B.N. et al. The Acute Effects of 5 Fluorouracil on Skeletal Muscle Resident and Infiltrating Immune Cells in Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 593468, 2020.
- VICENTE NETO, O. J. **Avaliação de estratégias de fenotipagem da enzima diidropirimidina desidrogenase na predição da exposição ao 5-fluorouracil e a ocorrência de toxicidade grave à quimioterapia em pacientes com neoplasia gastrointestinal**. Dissertação [Mestrado em Toxicologia e análises toxicológicas] – Universidade Feevale, 2018.
- VILLAVERDE, J.M. et al. Efeitos do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT). **Biosaúde**, v. 15, n. 1, 2013.
- VO, N.N.Q.; FUKUSHIMA, E.O.; MURUNAKA, T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and saponins. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 1, p. 50-58, 2017.
- VOLTAN, K.; BAPTISTA, A.M.; ETCHEBEHERE, M. Extremities Soft Tissue Sarcomas, more Common and as Dangerous as Bone Sarcomas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 56, n. 4, p. 419–424, 2021.
- VUREEN, R.J.V. et al. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 76, p. 1101–1112, 2015.
- WANG, J.; SASSE, A.; SHERIDAN, H. Traditional Chinese Medicine: From Aqueous Extracts to Therapeutic Formulae. **Plant Extracts**, 2019.
- WANG, X. et al. Licorice, a unique “guide drug” of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions. **Journal Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 781–790, 2013.
- WAYNFORTH, B.H. **Injection Techniques: Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. Academic Press, London, 1980.
- WEINBERG, R.A. **The Biology of Cancer**. New York, NY, Garland Science, 2014.
- WHITE, B. et al. Improved delivery of the anticancer agent citral using BSA nanoparticles and polymeric wafers. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 10, p. 163–175, 2017.
- WOLBER, F.M. et al. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 1010–1019, 2020.

- WONG, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, p. 87, 2011.
- WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, 2018.
- WU, Y. et al. Repeated cycles of 5-fluorouracil chemotherapy impaired anti-tumor functions of cytotoxic T cells in a CT26 tumor-bearing mouse model. **BMC Immunology**, v. 17, p. 29, 2016.
- YU, C. et al. Herbal medicine Guan Chang Fu Fang enhances 5-fluorouracil cytotoxicity and affects drug-associated genes in human colorectal carcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 9, n. 2, p. 701-708, 2015.
- ZELJKOVIĆ, S.C. et al. Phenolic Compounds and Biological Activity of Selected Mentha Species. **Plants**, v. 10, p. 550, 2021.
- ZAHRA, A.A.; HARTATI, R.; FIDRIANNY, I. Review of the Chemical Properties, Pharmacological Properties, and Development Studies of Cymbopogon sp. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 10341 – 10350, 2021.
- ZHANG, Y. et al. A Brief Review of Phenolic Compounds identified from Plants: their Extraction, analysis, and Biological Activity. **Natural Product Communications**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2022.
- ZHENG, Y. et al. 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.
- ZHU, K. et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. **BMC Genomics**, v. 16, n. Suppl 7, p. S8, 2015.
- ZHU, W.; WU, S.; HANNUN, Y.A. Contributions of the Intrinsic Mutation Process to Cancer Mutation and Risk Burdens. **EBioMedicine**, v. 24, p. 5–6, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Período de execução: agosto de 2018 a julho de 2022.

Quadro 1. Cronograma de atividades desenvolvidas.

QUADRIMESTRES	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
ATIVIDADES												
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Disciplinas e atividades complementares do doutorado	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do projeto de pesquisa	X	X										
Submissão ao Comitê de Ética			X						X			
Preparo e liofilização do EACC							X	X				
Análise dos constituintes do OECC e EACC					X						X	X
Ensaio <i>in vitro</i>								X	X	X	X	
1º Experimento <i>in vivo</i> - EACC										X		
2º Experimento <i>in vivo</i> – OECC e citral											X	
Análises do material <i>in vivo</i>										X	X	X
Análise estatística										X	X	
Preparação de resumos para congressos												X
Elaboração de artigos para submissão												X
Qualificação da Tese de doutorado												X
Defesa da Tese de doutorado												X

Observações: As atividades foram representadas por quadrimestres. Em virtude da pandemia pela COVID – 19, o cronograma de atividades foi realizado de acordo com o retorno gradativo das atividades e disponibilidade de animais e dos laboratórios parceiros.

APÊNDICE B

ORÇAMENTO DA PESQUISA

Tabela 22. Orçamento de materiais utilizados no desenvolvimento das atividades experimentais.

Descrição	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Frasco para cultura celular 250 mL	30	33,58	1.007,40
Placa para cultura de células com 96 poços, fundo chato com tampa	45	10,43	469,35
Máscara respiratória PFF2	100	2,805	280,50
Seringa Desc SR 1ML C/AG 13 X 4,5	300	0,429	128,70
Seringa Desc SR 10ML C/AG LS UNID	100	0,605	60,50
Seringa Desc SR 5ML C/AG L.S	200	0,418	83,60
Tubo vacutainer 2ML pediátrico EDTA lilás	300	0,473	141,90
Coletor estéril 50 mL PCT 100	4	52,635	210,54
Microtubo tipo eppendorf 1,5 mL com 1000 unidades	1	74,19	74,20
Máscara descartável cirúrgica	5	23,50	117,50
Avental descartável manga longa PCT c/10	3	90,00	270,00
Soro Fisiológico 0,9% 500 mL	5	7,65	38,25
Soro Ringer Lactato 500 mL	3	7,20	21,60
Luva de procedimento (G) Cx/100	1	96,00	96,00
Luva de procedimento (M) Cx/100	3	96,00	288,00
Luva de procedimento (P) Cx/100	3	96,00	288,00
LABTEST Transaminase AST/GOT 200ML	KIT	136,40	136,40
LABTEST Transaminase ALT/GPT 200ML	KIT	136,40	136,40
LABTEST Fosfatase Alcalina 120ML	KIT	101,09	101,09
LABTEST Acido Úrico 250ML	KIT	134,20	134,20
LABTEST Creatinina K 300ML	KIT	52,25	52,25
LABTEST Ureia UV LIQUIFORM 500 ML	KIT	363,00	363,00
Formaldeído PA GL. C/5 LT	1	70,00	70,00
Tubo Capilar C/Heparina C/100	2	24,00	48,00
TOTAL			3.694,04

Observações: Apoio ao financiamento da pesquisa foram obtidos junto a Capes, Fapitec, CNPq e a programas da UFS. Itens não listados corresponderam a financiamento próprio ou obtidos em parceria aos laboratórios da UFS.

ANEXOS

ANEXO A

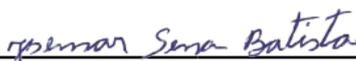


**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Interação entre a *Melissa Officinalis L.* (erva cidreira), *Plectranthus Barbatus Andrews* (boldo) e *Cymbopogon Citratus* (DC.) *Stapf* (capim santo) e o 5-fluorouracil na resposta antitumoral em camundongos com sarcoma 180.**”, registrada com o nº 17/2019, sob a responsabilidade da Profª. Drª. 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 **05/08/2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 09/2019, Término: 08/2021
Espécie/linhagem/raca	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de animais	126
Peso/Idade	30 ± a 5 g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia – UFS.


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

ANEXO B



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Atividade antitumoral do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas do *Cymbopogon Citratus*", protocolada sob o CEUA nº 2726280621 (ID 000460), sob a responsabilidade de **Adriana Andrade Carvalho e equipe; Ingrede Tatiane Serafim Santana; RICARDO GUIMARÃES AMARAL; Sara Albuquerque dos Santos; Enilton Aparecido Camargo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 02/02/2022.

We certify that the proposal "Anti-tumor activity of aqueous extract and essential oil from *Cymbopogon Citratus* leaves", utilizing 350 Heterogenics mice (350 males), protocol number CEUA 2726280621 (ID 000460), under the responsibility of **Adriana Andrade Carvalho and team; Ingrede Tatiane Serafim Santana; RICARDO GUIMARÃES AMARAL; Sara Albuquerque dos Santos; Enilton Aparecido Camargo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 02/02/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2022](#) a [08/2022](#) Área: [Fisiologia](#)

Origem: [Biotério da Universidade Federal de Sergipe](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [45 a 60 dias](#)

N: [350](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 35 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI) □ UFS.

São Cristóvão, 31 de março de 2022

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

