



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

KARIELY GONÇALVES DE MOURA

**EFEITOS ANTITUMORAIS DO MONOTERPENO ALFA-TERPINEOL EM
MODELO ANIMAL DE SARCOMA 180**

PICOS – PI

2018

KARIELY GONÇALVES DE MOURA

**EFEITOS ANTITUMORAIS DO MONOTERPENO ALFA-TERPINEOL EM
MODELO ANIMAL DE SARCOMA 180**

**Monografia apresentada como pré- requisito para obtenção do Grau de Licenciatura
em Biologia, da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de
Barros.**

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro
e Sousa

PICOS – PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

M929e Moura, Kariely Gonçalves de
Efeitos antitumorais do monoterpeno alfa-terpineol em modelo animal de sarcoma 180 / Kariely Gonçalves de Moura– 2018.
CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (86f.)
Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.
Orientador(A): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa.

1. Produtos Naturais. 2. Monoterpeno. 3. Genotoxicidade. Câncer. I. Título.

CDD 581.636

KARIELY GONÇALVES DE MOURA

**EFEITOS ANTITUMORAIS DO MONOTERPENO ALFA-TERPINEOL EM
MODELO ANIMAL DE SARCOMA 180**

**Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do Grau de
Licenciatura em Biologia, da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador
Helvídio Nunes de Barros.**

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora:

João Marcelo de Castro e Sousa

Presidente – Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa - UFPI

[Assinatura]
Prof. Dr. Leonardo Henrique G. de M. Lima

Examinador 1 – 1. Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes Lima - UFPI

Victor Alves de Oliveira

Examinador 2 – Prof. Me. - Victor Alves de Oliveira - UFPI

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 O uso de plantas medicinais e a investigação de suas atividades farmacológicas	9
2.2 Câncer e atividade antitumoral	13
2.3 Óleos essenciais	14
2.4 Monoterpenos e alfa-terpineol	16
2.5 Toxicologia de compostos naturais	20
2.6 Bioensaios para avaliação toxicogénica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	222
2.6.1 Ensaio para estudos de viabilidade celular.....	22
2.6.2 Ensaio cometa versão alcalina	25
2.6.3 Ensaios de avaliação da viabilidade celular e determinação de apoptose/necrose em linhagens celulares	276
2.6.4 Linhagem de células cancerígenas de Sarcoma 180	27
ARTIGO	Erro! Indicador não definido.46
1. Introdução	48
2. Material e métodos	50
2.2 Cultura primária de Sarcoma 180	50
2.3 Viabilidade celular por azul de Tripán em cultura primária de S180	50
2.4 Ensaio cometa	51
2.5 Fragmentação de DNA revelada por eletroforese em gel.....	51
2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).....	52
2.6.1 IDN e IDNC dos grupos testados no teste de CBMN.....	52
2.7 Quantificação da apoptose usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) com dupla coloração por iodeto de propídeo e laranja de acridina.....	53
2.8 Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo.....	53
2.9 Análise estatística.....	Erro! Indicador não definido.4
3. Resultados.....	54
3.1 Viabilidade por azul de Tripán	Erro! Indicador não definido.54
3.2 Teste Cometa versão alcalina	Erro! Indicador não definido.55

3.3 Avaliação da apoptose por fragmentação de DNA em gel ...Erro! Indicador não definido.	56
3.4 Efeitos citogenéticos do alfa-terpineol em S180 avaliados por CBMN	57
3.5 Quantificação de apoptose e necroses usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF)	60
3.6 Viabilidade celular por Citometria de fluxo	61
DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
Anexo A – Normas da Revista	755
ANEXO B- Carta de aceite para manutenção do Sarcoma 180 e realização do projeto.....	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é considerado uma das maiores causas de mortalidade no mundo e tem etiologia complexa, com envolvimento de diversos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares (Ferlay et al., 2015). Os sarcomas são neoplasias malignas heterogêneas, de origem mesenquimal, que podem ocorrer em vários tecidos, tais como osteossarcomas, rabdomiossarcomas e lipossarcomas. O estudo dos mecanismos moleculares e citogenéticos envolvidos na doença, investigados em diferentes modelos, contribui para o avanço das terapias dessas neoplasias (Post, 2012). Assim, pesquisas de novos fármacos naturais candidatos à antitumorais são necessárias para elucidar danos citogenéticos nesse tipo de neoplasias (Husain & Verma, 2011; Taylor et al., 2013).

A maioria dos fármacos antineoplásicos utilizados clinicamente são isolados de espécies de plantas ou são fundamentados em tais substâncias (Kuźma et al., 2016). Estudos como os de (Suhail et al., 2011; Manjamalai & Grace, 2012; Girola et al., 2015; Fitsiou, Xavier, Lima & Sousa 2016) relatam sobre a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de vários óleos essenciais obtidos de plantas. Os óleos essenciais são produtos naturais com grande potencial farmacológico contra diversos tipos de tumores (Sobral et al., 2014). Essa atividade antitumoral desses óleos essenciais de diferentes espécies vegetais tem sido associadas à existência de monoterpenos em sua composição (Maggi et al., 2013). O alfa terpineol é um componente monoterpeneo importante presente em óleos essenciais e tem demonstrado atividade antitumoral (Hassan, Gali-Muhtasib, Goransson & Larsson 2010).

O alfa-terpineol é um álcool monoterpênico oxigenado volátil que possui fórmula $C_{10}H_{18}O$ e peso molecular 154.24. É amplamente utilizado na fabricação de perfumes, cosméticos, sabonetes e agentes antissépticos. Estudos sobre esse composto revelam excelente atividade neuroprotetora (Parvardeh, Moghimi, Eslami & Masoudi, 2016), antibacteriana (Li et al., 2014), efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes (Moghimi, Parvardeh, Zanjani & Ghafghazi, 2016) atividade antifúngica (Hammer, Carson & Riley, 2003), antibacteriana (Zengin, Çolak, & Kiliç, 2014) e atividade nematicida (Echeverrigaray, Zacaria, & Beltrão, 2010).

Diversos estudos com fitoquímicos apontam para atividades antitumorais de produtos naturais, por indução de apoptoses e inibição de proliferação celular (Beevi, Mangamoori, Subathra, & Edula, 2010; Wu, Blackburn, Amburgey, Jaworska, &

Federle, 2017). Ademais, a instabilidade cromossômica e os danos ao DNA estão bem associados a diversas doenças, especialmente o câncer. Portanto, as anormalidades citogenéticas são importantes para o entendimento dos mecanismos da tumorigênese (Grade et al., 2015). As alterações citogenéticas envolvem aneuploidia, deleções, inserções, quebras e perdas de cromossomos (Samuelson et al., 2012; Giam & Rancati, 2015). Diversas metodologias toxicogenéticas são utilizadas para avaliação *in vitro* desses tipos de mutações bem como a avaliação da capacidade de induzir morte celular.

Dentre os testes, o bioensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) pode determinar níveis de danos citogenéticos de vários agentes citotóxicos, com perspectivas para atividade antitumoral, em células binucleadas (Fenech, 2006; Fenech et al., 2011).; Nankamura et al., 2016). Em outras abordagens, o ensaio cometa versão alcalina e a teste fragmentação de DNA podem detectar baixos níveis de danos ao DNA, a exemplo de quebras de fitas simples e duplas (Kawaguchi et al., 2010; Fangavison et al., 2015). Ademais, bioensaios mais refinados como citometria de fluxo e marcação por fluorescência são importantes testes biológicos para detecção de morte celular provocados pela substância teste avaliada (Davison, 2016).

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Além disso, em uma abordagem mais específica aos medicamentos, os antineoplásicos também estão intimamente relacionados aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância sua origem

relacionada a uma fonte natural, como mostrado na **Tabela 1**. Porém, a grande heterogeneidade das células tumorais dificulta o tratamento e facilita a manifestação de resistência, fatores que estimulam a pesquisa por novos quimioterápicos (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

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

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

Fonte: COSTA-LOTUFO et al., 2010.

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

Essa variedade de mecanismos contido nos compostos bioativos faz com que as plantas sejam consideradas fonte nobre de moléculas para o tratamento de várias formas de câncer e, mesmo que a molécula isolada do vegetal não possa ser usada diretamente como medicamento, pode servir de modelo para síntese ou para gerar um pró-fármaco para o desenvolvimento de novos agentes (BRANDÃO et al., 2010).

Portanto, há uma extrema necessidade de agilizar detalhes etnobotânicos, estudos farmacológicos, toxicológicos e clínicos sobre as plantas medicinais inexploradas, o que poderia levar ao desenvolvimento de drogas seguras e novas, com ênfases para atividades antitumorais (TARIQ et al., 2018).

2.2 Câncer e atividade antitumoral

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

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

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

A quimioterapia constitui uma das modalidades de maior escolha para produzir cura e palição. A quimioterapia envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por via sistêmica e pode ser classificada de acordo com a sua finalidade como: quimioterapia neoadjuvante, quimioterapia primária, quimioterapia paliativa, monoquimioterapia e poliquimioterapia (SPENCE; JOHNSTON, 2003). Nos últimos anos, a quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas e alguns tipos de tumores sólidos, em especial os derivados de células germinais (COSTA-LOTUFO et al., 2010). É importante ressaltar que muitos desses agentes anticancerígenos são constituintes ativos isolados de ervas medicinais. Por isso, o conhecimento etnofarmacológico é útil para liderar a pesquisa de plantas com potencial atividade antitumoral, a fim de buscar novos produtos naturais (RUFFA et al., 2002).

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

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

2.3 Óleos essenciais

Explorar produtos vegetais naturais como uma opção para encontrar novas moléculas químicas como agentes antitumorais é uma das áreas de pesquisa que mais crescem. Recentemente, na última década, os óleos essenciais vêm sendo estudados para

indicar seus constituintes como agentes anticancerígenos na terapia do câncer (GAUTAM et al., 2014). Eles são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, grammas, raízes, rizomas e caules das plantas através de processos adequados de extração (MORAIS et al., 2006).

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e microondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação que se divide em duas técnicas – arraste a vapor (CRAVEIRO et al., 1981) e coação (SANTOS et al., 1998).

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

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

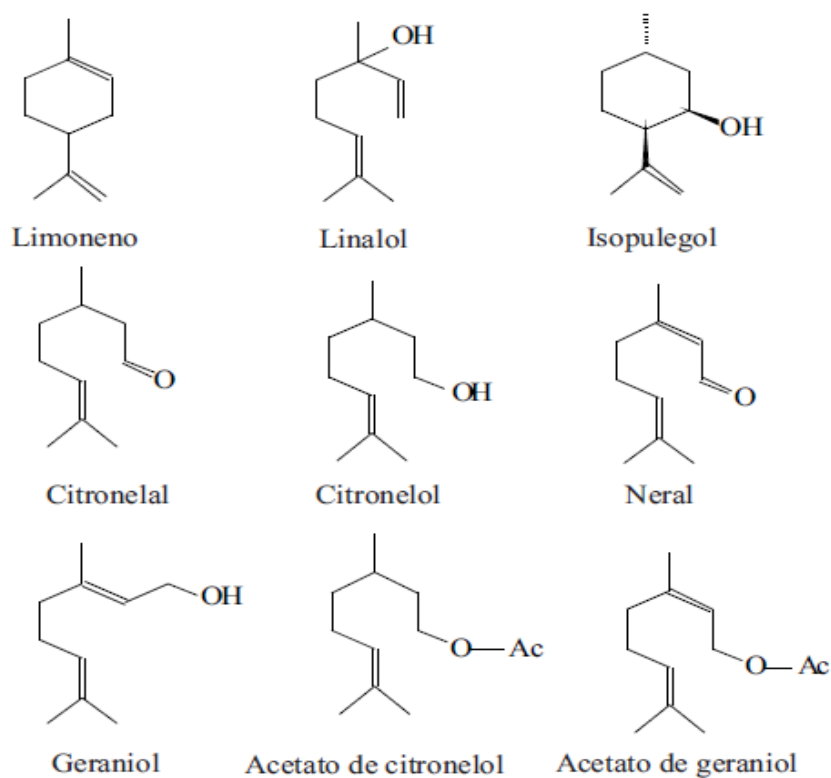
Considerando que os monoterpenos são comuns em muitas espécies de plantas e são usados em preparações cosméticas e farmacêuticas, bem como na indústria de alimentos, é importante estudar o potencial toxicológico e farmacológico dos monoterpenos com atividade anticancerígena (SOBRAL et al., 2014).

2. 4 Monoterpenos e alfa-terpineol

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

Os monoterpenos pertencem à classe dos terpenoides de produtos naturais e são biossintetizados através da via do ácido mevalônico. Seu pequeno peso molecular acoplado à alta natureza não polar os torna os componentes mais abundantes de óleos essenciais e são construídos a partir de unidades repetitivas de blocos básicos de 5 carbonos chamados isoprenos. Eles existem como hidrocarbonetos ou como partes oxigenadas com funcionalidades de aldeído, álcool, cetona, éster e éter. Além disso, eles podem ter estrutura acíclicas, monocíclicas, bicíclicas ou tricíclicas (HABTEMARIAM, 2017; THOLL, 2015; DEWICK, 2002) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química de alguns constituintes monoterpênicos presentes em óleos essenciais.

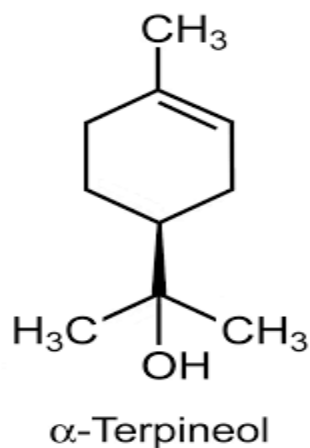


Fonte: GUILHON DE CASTRO et al., 2010.

O isolamento dos monoterpenos primeiramente se dar por procedimentos de extração e destilação. Monoterpenos individuais são geralmente identificados nestes óleos essenciais pelas técnicas tradicionais como ponto de ebulição, ponto de fusão, índice de refração, atividade óptica, densidade, análise elementar, solubilidade, testes de reação química e dados espectrais através de espectroscopia de massa, absorção de infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) do composto isolado. Hoje, a maioria dos óleos essenciais extraídos de plantas é analisada por cromatografia gasosa combinada a espectrometria de massa (GC-MS) e, por vezes, por cromatografia gasosa em espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IR) (GERON et al., 2000).

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

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

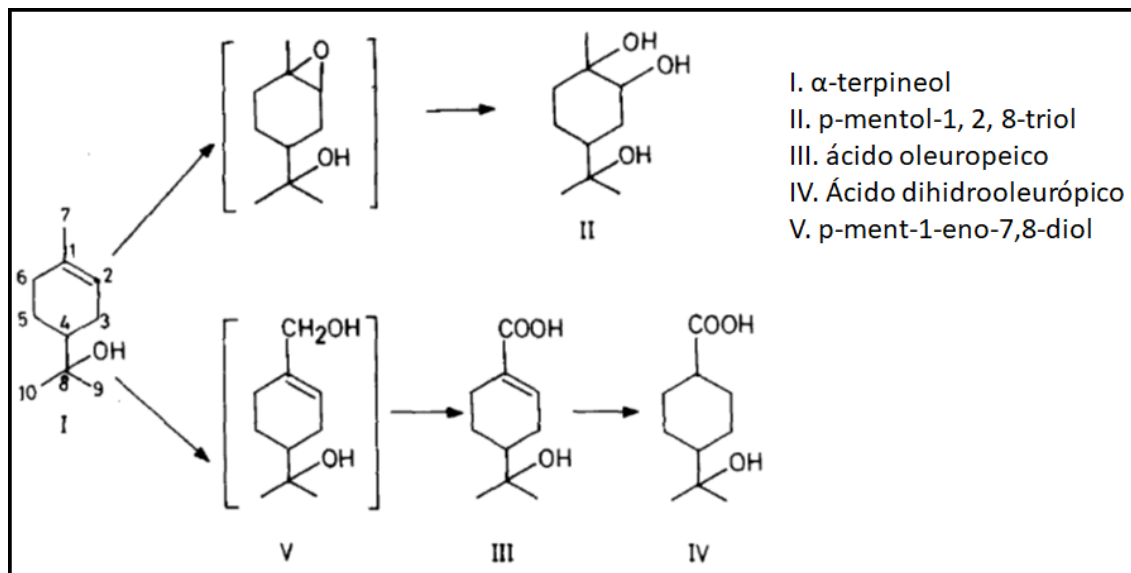
Figura 2: Estrutura química do alfa-terpineol.

Fonte: DIEMER, 2016.

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

Quanto a sua biotransformação, os esforços de Horning e colaboradores (1976) mostrou que o alfa-terpineol, quando administrado em humanos, é hidroxilado em p-mentol-1, 2, 8-triol. Um outro estudo coordenado por Madyastha e Srivatsan (1988) com o objetivo de determinar o destino metabólico do alfa-terpineol e seus efeitos no sistema microsomal do citocromo P-450 hepático após administração oral em ratos, mostrou que a oxidação do metil alílico e a redução da ligação dupla 1,2 na porção cíclica são as principais vias para o metabolismo do alfa-terpineol. A oxidação do metil alílico no alfa-terpineol formará o álcool p-ment-1-eno-7,8-diol, o qual provavelmente não se acumula, sendo prontamente oxidado ainda mais ao ácido oleuropeico. Já a redução da dupla ligação endocíclica é o que forma o ácido dihidrooleurópico a partir do ácido oleuropeico (**Figura 3**).

Figura 3: Biotransformação do alfa-terpineol em ratos.



Fonte: HORNING et al., 1976.

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

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

2.5 Toxicologia de compostos naturais

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

A avaliação da segurança de agentes farmacológicos pode ser realizada através de ensaios toxicológicos (ERNST, 2005). Os estudos toxicológicos desempenham um papel significativo na compreensão das ações nocivas dos agentes ativos ou fitoquímicos nos tecidos. Fitoquimicamente, as espécies vegetais possuem compostos valiosos, incluindo triterpenos, alcaloides e flavonoides, que podem contribuir para sua atividade biológica (MONGALO et al., 2016). A partir deles é possível ter uma visão das ações químicas, reações, interações, mudanças consequentes de estrutura em tecidos biológicos e uma gama de concentrações para o uso seguro de plantas para curar uma doença particular (OLEJNICZAK et al., 2001) e para determinar a faixa de doses, responsável por produzir o efeito máximo (REDDY; KAMBLE, 2014). Também, dados observacionais são coletados e usados para prever os resultados da exposição a animais e também a humanos. Esses resultados mostram que a dose mais baixa não é tóxica, enquanto doses altas são letais. Além disso, algumas doses podem ter efeitos benéficos, mas o aumento da exposição irá, em algum momento, causar um efeito prejudicial (SHARWAN et al., 2015).

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

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

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

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

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

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

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

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

Nos últimos 30 anos, diferentes metodologias, estratégias e abordagens foram desenvolvidas para avaliar substâncias químicas que poderiam demonstrar efeitos genotóxicos e / ou carcinogênicos. O estabelecimento desses protocolos tem sido baseado em estudos que demonstram a correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade, e a correlação de ambos os parâmetros com genotoxicidade (WATERSETAL, 1999). Desde então, procedimentos estabelecidos têm sido utilizados para a avaliação do risco genotóxico associado ao uso de drogas, aditivos alimentares, pesticidas, produtos químicos industriais e ambientais e também produtos naturais, incluindo plantas medicinais e seus óleos (VILAR et al., 2008; SPONCHIADO et al., 2016).

2.6.1 Ensaio para estudos de viabilidade celular

Os métodos de exclusão de corante são tradicionalmente usados para avaliar a viabilidade celular, sendo o azul de tripan um dos mais comuns. O azul de tripan é uma coloração vital que deixa as células não viáveis com uma cor azulada quando observadas ao microscópio, enquanto as células viáveis aparecem sem coloração. As

células viáveis possuem membranas celulares intactas e, portanto, não absorvem o corante do meio circundante. Por outro lado, as células não viáveis não têm uma membrana intacta e funcional e, portanto, absorvem o corante de seus arredores. Isto resulta na capacidade de distinguir facilmente entre células viáveis e não viáveis, uma vez que as primeiras são não coradas, pequenas e redondas, enquanto as últimas são coradas e inchadas. Entretanto, é importante salientar que o método não diferencia entre células apoptóticas e necróticas (LOUIS; SIEGEL, 2011).

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

Além disso, a comparação detalhada das estimativas de células vivas versus células mortas usando a exclusão do azul de tripan avaliada manualmente e avaliada eletronicamente por citometria de fluxo, indica que as duas técnicas fornecem resultados muito semelhantes, embora haja entre si uma larga diferença de robustez. Porém, considerando que a técnica de exclusão do corante descrita é mais provável a erro devido à subjetividade do operador, a abordagem da citometria de fluxo é menos adequada para a avaliação da viabilidade celular durante o desempenho de técnicas complexas e demoradas de purificação celular (STROBER, 2015).

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

Senso assim, o ensaio com MTT é um dos testes mais populares para avaliar a atividade de potenciais compostos antitumorais potenciais, e ele também é o ensaio mais popular para examinar interações entre compostos. O teste em questão foi criado e descrito por Mosmann em 1983 (ŚLIWKA et al., 2016). O ensaio é significativamente influenciado por compostos que modificam o metabolismo de células individuais que possuem a capacidade metabólica de converter o brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil-tetrazólio (MTT) do sal de tetrazólio de cor amarela em seu metabólito roxo chamado formazano que é insolúvel em água. Essa reação ocorre aumentando o nível de NADPH ou a atividade de LDH (*lactato desidrogenase*). O reagente MTT tetrazol é

impermeável à membrana celular. Ele é absorvido pelas células através de endocitose e é reduzido a seus metabólitos de formazan insolúveis e puros por enzimas oxidoreduases dependentes de NADPH, principalmente nos compartimentos citosólicos (WANG; HENNING; HEBER, 2010; MIRZAYANS et al., 2017 a; MIRZAYANS et al., 2017 b; MIRZAYANS et al., 2017 c).

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

O ensaio de MTT unicelular é simples porque envolve apenas a adição do reagente MTT ao meio de cultura, a incubação das células durante 1 a 2 horas, avaliação microscópica e a aquisição de imagens celulares. A avaliação de dados também é direta. Independentemente do nível da atividade metabólica de uma célula, se a mesma é capaz de converter o MTT em seu metabólito formazan para dar origem a grânulos de cristais escuros, então a célula não pode estar morta. Portanto, supondo que um tratamento genotóxico particular possa resultar em uma diminuição na atividade metabólica de um subconjunto de células (por exemplo, refletindo mudanças nas enzimas oxidoreduases), essas células ainda serão capazes de metabolizar o MTT. Por outro lado, as células mortas não metabolizam o MTT e, portanto, permanecem livres de grânulos e cristais de tetrazólio. Dessa forma, MTT é particularmente muito útil para a avaliação da viabilidade de células individuais por microscopia de uma maneira simples, mas altamente informativa e reproduzível (MIRZAYAN et al., 2018).

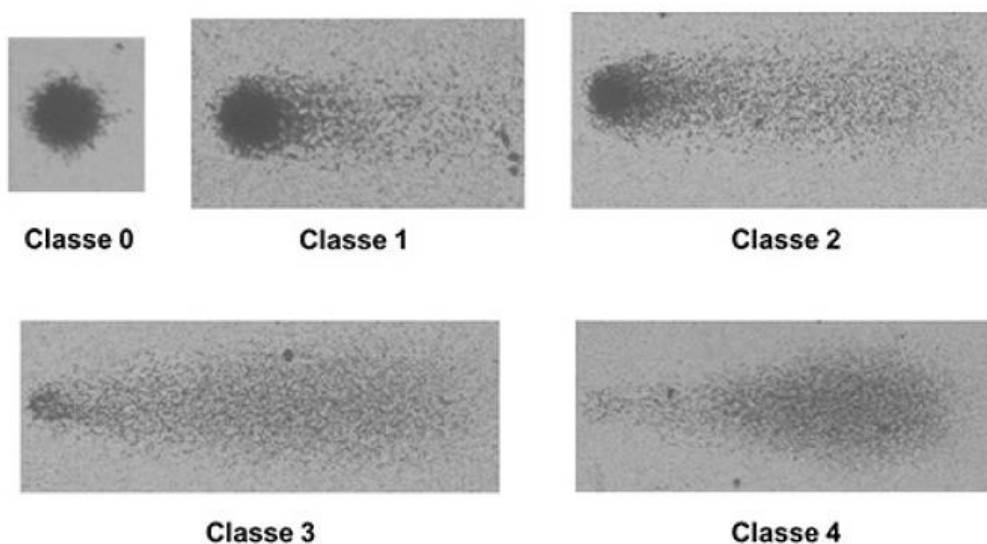
, antiviral e antimicrobiana (MACBAE et al., 1988), antiparasitária (SAHPAZ et al., 1994), antitripanossoma (ZANI et al., 1995), antiplasmódica (DO AMARANTE et al., 2011) e antitumoral (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN; ROGERS, 1988; NUNES et al., 2009; ARCANJO et al., 2012).

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

2.6.2 Ensaio cometa versão alcalina

O teste cometa, conhecido como eletroforese em gel de célula única, (SCGE – *Single Cell Gel Eletrophoresis Assay*) (HEUSER et al., 2008; TAKASAWA et al., 2015; ZAPATA et al., 2016) vem sendo reconhecido, internacionalmente, assim como o de micronúcleos *in vivo*, para avaliação do potencial genotóxico de químicos carcinógenos pela indução dos danos ao DNA e eficácia de reparo (KANG et al., 2013). Na sua versão alcalina (pH alcalino) apresenta mais sensibilidade para identificação de agentes genotóxicos (NESSLANY et al., 2007; DHAWAN et al., 2009; VALVERDE; ROJAS, 2009; CORREDOR et al., 2016), por detectar diversos danos tais como: quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* (VILLELA et al., 2003; HEUSER et al., 2007; VALVERDE; ROJAS, 2009; SOLONESKI; NIKOLOFF; LARRAMENDY, 2016; ZHOU et al., 2016) e danos oxidativos (LU et al., 2017). Os danos genéticos, são classificados e contabilizados pelas classes de 0 a 4, que medem a capacidade genotóxica da substância teste (Figura 6).

Figura 6: Classificação de danos do DNA. Imagem visualizada em microscópio óptico por coloração com prata.



Fonte: VALENTE et al., 2017.

Entretanto, não tem efeitos na detecção de mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos, que são eventos associados a carcinogenicidade e mecanismos epigenéticos (COLLINS, 2004), com sensibilidade na identificação de lesões pré-

mutagênicas, de reparo, utilizando qualquer tipo de células nucleadas e não exigindo que as mesmas se encontrem em divisão (LEAL et al., 2009). O teste cometa pode ser aplicado em estudos de monitoramento clínico, entendimento da patogênese do câncer e de doenças degenerativas, predição de tumores, radiações e quimioterapias e estudos de infertilidades, assim como avaliação de riscos ocupacionais e ambientais (STANG, 2010; TICE, 2015; GUNASEKARANA; GLADWIN; CHAND, 2015), além de monitoramento de exposição a antineoplásicos (GOMES JÚNIOR et al., 2015). Diversas células podem ser usadas em estudos de biomonitoramento clínico, tais como: células mononucleares do sangue periférico, células do epitélio bucal, nasal, epitelial, espermatozoides, bem como, biópsias de tecidos (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009).

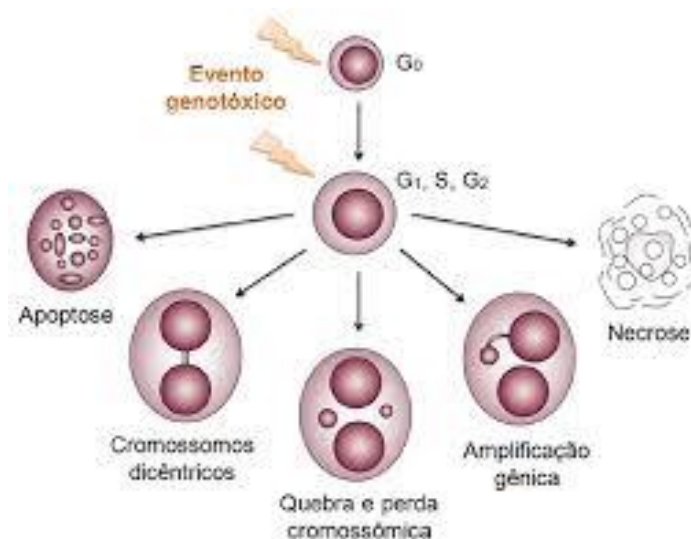
2.6.3 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

Para avaliação de genotoxicidade de químicos *in vitro*, o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese é recomendado (CBMN) (NERSESYAN et al., 2014; ELZEIN; VRAL; ETZEL, 2011). No que se refere à metodologia do CBMN, a mesma é desenvolvida com o uso da citocalasina B para identificar células que se dividem em cultura. A citocalasina B é um inibidor de polimerização de actina, a qual é requerida para a formação do anel que divide o citoplasma durante a citocinese. Desse modo, as células podem ser identificadas por suas aparências binucleadas (FENECH, 2007).

Os danos induzidos por agentes químicos e/ou físicos podem, dependendo do agente, causar a formação de micronúcleos, brotos nucleares e/ou pontes nucleoplasmáticas, além de poder induzir ou inibir necroses e ou apoptose (Figura 7). A indução de necrose pode resultar na liberação de enzimas degradativas, que podem causar a digestão parcial de DNA. Nesta perspectiva, o ensaio de micronúcleo é, amplamente, usado como um ensaio *in vivo* bastante viável para avaliar a ocorrência de alterações cromossômicas, que é um dos principais pontos finais da mutagenicidade. O teste é utilizado não só para identificação de mutações, mas para a avaliação de riscos a qual o organismo esteja susceptível (HAYASHI, 2016).

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

Figura 7: Vários parâmetros que podem ser analisados através do ensaio de CBMN.



Fonte: Fenech, 2007.

2. 6.4 Ensaio de avaliação da viabilidade celular e determinação de apoptose/necrose em linhagens celulares

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

O método DNA laddering ou teste de fragmentação de DNA em gel é utilizado para verificar a fragmentação internucleosomal do DNA das células tumorais, para confirmar a apoptose induzida pelos compostos. A fragmentação do DNA tem sido o principal critério bioquímico usado para distinguir os motivos da morte celular. São formados oligonucleossomos de aproximadamente 180 pares de bases, bem como fragmentos de DNA de alto peso molecular (aproximadamente 300 Kb) que constitui um padrão em forma de arraste no gel de eletroforese. O DNA característico de uma

fragmentação induzida por apoptose apresenta ambas as quebras de fita simples e dupla (SINGH, 2000; BORGES, 2008; VOLTARELLI et al., 2008).

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

Outra emergente técnica para avaliação da morte celular é a citometria de fluxo, que utiliza combinação de dispersão de luz e fluorescência emitida para detectar células tendo vários estados estruturais, fisiológicos e genéticos (CRONIN; WILKINSON, 2010). Diferentes técnicas de citometria de fluxo têm sido desenvolvidas para caracterização e quantificação de vários eventos celulares durante a apoptose, sendo o protocolo de apoptose Anexina-V / 7-AAD um dos mais utilizados (DONG et al., 2009; NIGJEN, et al., 2018). A anexina-V liga-se com elevada afinidade a fosfatidilserina, presente na membrana celular, para formar um conjugado. Uma vez a Anexina-V marcada com fluorocromos, é possível detectar a apoptose por análises de citometria de fluxo (TAIT et al., 1989; ANDREE et al., 1990). Utilizando anexina-V conjugada em combinação com um corante de DNA impermeável a membrana tal como iodeto de propídeo ou 7-aminoactinomicina D (7-AAD), pode-se discriminar entre células viáveis, apoptóticas e necróticas (VERMES et al., 1995; VAN ENGELAND et al., 1998; SCHMID et al., 2007; MARTIN et al., 1995; RINOM et al., 1997; HASPER et al. 2000).

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

Dentre as técnicas de quantificação de células apoptóticas e necróticas, o método de coloração dupla por laranja de acridina e iodeto de propídeo é uma técnica

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

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

2.6.5 Linhagem de células cancerígenas de Sarcoma 180

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

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

A identificação da progressão tumoral está possibilitando o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas tendo como alvo células presentes no microambiente

tumoral, enfatizando a importância da elaboração de novas estratégias com o restabelecimento do controle do ciclo celular por meio de agentes, que atuem nos pontos de checagem, disponibilizando de estratégias viáveis na terapia anticâncer. Neste sentido, o modelo Sarcoma 180 pode ser utilizado para avaliar a ação de componentes físicos, biológicos e químicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, cinética e terapia de células tumorais (ATKINS, 2006; FISCHER et al., 2007).

Os modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer. Eles são distinguidos por aberrações moleculares tais como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012). O Sarcoma 180 (S180) é bastante utilizado em estudos experimentais (FACCHINI et al., 2014; JANA et al., 2015; YANG et al., 2018) com taxa de disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente tóxicas. O transplante de suas células é realizado, em animais, via inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, com crescimento em até 100% dos casos, no qual pode ocorrer regressão natural em 8 a 10% (WAL et al., 2003). Quanto estar consolidado apresenta um rápido crescimento chegando uma média de 18x14x10 mm por volta de sete dias do transplante. Depois de quatro semanas de evolução, a metástase começa a surgir nos pulmões (SILVA, 2014).

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

REFERÊNCIAS

- AKINBORO, A.; MOHAMMED, K.; RATHNASAMY, S.; MUNIANDY, V.R. Genotoxicity assessment of water samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, using the *Allium cepa* test. **Tropical life sciences research**, v. 22, n. 2, p. 23, 2011.
- ALTMANN, Karl-Heinz; GERTSCH, Jürg. Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Natural product reports**, v. 24, n. 2, p. 327-357, 2007.
- AMARAL, A.M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia** 20, n.1 e 2, 2007.
- ANDREE, H. A. et al. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 9, p. 4923-4928, 1990.
- APU, A. S. et al. Antimicrobial activity and brine shrimp lethality bioassay of the leaves extract of *Dillenia indica* Linn. **Journal of young pharmacists: JYP**, v. 2, n. 1, p. 50, 2010.
- ARÁUJO, Éverton José Ferreira de et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 3, p. 361, 2015.
- ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- ARCHANA, M. et al. Various methods available for detection of apoptotic cells-A review. **Indian journal of cancer**, v. 50, n. 3, p. 274, 2013.
- ARDALAN, Mohammad R. et al. Doenças do rim na Pérsia medieval - o Hidayat de Al-Akawayni. **Nefrologia Diálise Transplante**, v. 22, n. 12, p. 3413-3421, 2007.
- ARNOUS, Amir Hussein; SANTOS, Antonio Sousa; BEINNER, Rosana Passos Cambraia. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- ASATRYAN, A.D.; KOMAROVA, N.L. Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. **Journal of theoretical biology**. v.396, p. 1-12, mai, 2016.
- ASIF, Mohammad. A brief study of toxic effects of some medicinal herbs on kidney. **Advanced biomedical research**, v. 1, 2012.

- ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013.
- ATKINS, Michael B. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 7, p. 2353s-2358s, 2006.
- BALBINO, Evelin E.; DIAS, Murilo F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.
- BAPTISTELLA, Lúcia Helena Brito et al. Preparação do (+)- \pm -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, 2009.
- BARRETO, Benilson Beloti; VIEIRA, Rita de Cássia Padula Alves. Percepção dos profissionais de saúde sobre a inserção da fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de APS**, v. 18, n. 2, 2015.
- BELLOC, F. et al. Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 40, n. 2, p. 151-160, 2000.
- BERGAMI-SANTOS, Patrícia C.; MARIANO, Mário; BARBUTO, José Alexandre M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.
- BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.
- BERRIDGE, Michael V.; TAN, An S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BETTEGA, P.V.C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v.7, n.1, p.89-97, 2011.
- BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011.
- BHALLA, Yashika; GUPTA, Vinay Kumar; JAITAK, Vikas. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.
- BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-terpineol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S280-S285, 2008.

BOTHA, C. J.; PENRITH, M.-L. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 549-558, 2008.

BORGES, F. V., Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de compostos de coordenação de ferro. Dissertação (Mestrado em Biociência e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.

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

BRASILEIRO, Beatriz Gonçalves et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no " Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

BRITTO, A.C.S; et al. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v.78, n.5, p.409-414, 2012.

BRUNING, M.C.R. et al. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n.10, p.2675-85, 2012.

BUENO, Ariele Cardoso; PIOVEZAN, Marcel. Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. **Instituto Federal de Santa Catarina**, 2015.

CANDRASARI, Damiana Sapti; MUBARIKA, Sofia; WAHYUNINGSIH, Mae Sri Hartati. The effect of α -terpineol on cell cycle, apoptosis and Bcl-2 family protein expression of breast cancer cell line MCF-7. **Journal of the Medical Sciences (Berkala ilmu Kedokteran)**, v. 47, n. 2, 2016.

CARVALHO, Camilo et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers–Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, 2009.

GUILHON DE CASTRO, Henrique et al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, 2010.

CHOI, You-Jin et al. α -Terpineol induces fatty liver in mice mediated by the AMP-activated kinase and sterol response element binding protein pathway. **Food and chemical toxicology**, v. 55, p. 129-136, 2013.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, 1981.

CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. The potential of flow cytometry in the study of *Bacillus cereus*. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-16, 2010.

CROWELL, Pamela L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 3, p. 775S-778S, 1999.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, 26(3), p.249, 2004.

CORREA, A. J. C.; LIMA, C. E.; COSTA, M. C. C. D. *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 113-119, 2010.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Insecticidal activities of plants and applications: a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

CORREDOR, Z.; et al. Levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients undergoing standard hemodialysis vs on-line hemodiafiltration: A comet assay investigation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v.808, p.1-7, set, 2016.

DA COSTA, Gilmar; DA SILVA, Patrícia Sanches. Tratamento bioenergético: estudo etnofarmacológico de plantas medicinais da Pastoral da Saúde Alternativa de Cotriguaçu, MT. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, 2014.

DA CRUZ MONTEIRO, Siomara; BRANDELLI, Clara LiCosta. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.

DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, Rita et al. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1227-1254, 2013.

DE SOUZA ELLER, Sarah Carobini Werner et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

DEWICK, Paul M. A biossíntese de compostos terpenóides C 5-C 25. **Relatórios de produtos naturais**, v. 19, n. 2, p. 181-222, 2002.

DEV, Sukh; MISRA, Renuka. **Manual CRC de terpenóides - Diterpenóides**. CRC, 1986.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol.** ;v.25, n.1, p.5-32, fev., 2009.

DIEMER, Andréa Wolf. **Ação antimicrobiana de Rosmarinus officinalis e Zingiber officinale frente a Escherichia coli e Staphylococcus aureus em carne mecanicamente separada de frango**. 2016. Dissertação de Mestrado.

DO AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (Montrichardia linifera). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DONG, Hiep Phuc et al. Methods for simultaneous measurement of apoptosis and cell surface phenotype of epithelial cells in effusions by flow cytometry. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 955, 2008.

DONG, Hiep Phuc et al. Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7-AAD assay: clinical relevance and comparison with other apoptosis parameters. **American journal of clinical pathology**, v. 132, n. 5, p. 756-762, 2009.

ELDIN, Sue; DUNFORD, Andrew. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. Editora Manole Ltda, 2001.

ELISABETSKY, Elaine. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, Set. 2003.

EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, 26(1), p.101-106, 2011.

ESPINA, Laura et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

ERNST, Edzard. The efficacy of herbal medicine—an overview. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 405-409, 2005.

FACCHINI, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M.; SILVEIRA, M. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Antitumor activity of Pleurotus ostreatus polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma180, **International Journal of Biological Macromolecules**. v.68, p.72-77, 2014.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de Baccharis trimera (Less.) A. P. de Candolle e Baccharis articulata (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de Allium cepa. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181, p. 411-416, 2002.

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

FINKLER, Aliza; ASHERY-PADAN, Ruth; FROMM, Hillel. CAMTAs: ativadores de transcrição de ligação de calmodulina de plantas para humanos. **Letras FEBS**, v. 581, n. 21, p. 3893-3898, 2007.

FITZMAURICE, Christina et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.

GASPARETTO, João C. et al. Mikania glomerata Spreng. e M. laevigata Sch. Bip. ex

- Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.
- GAUTAM, Nandini; MANTHA, Anil K .; MITTAL, Sunil. Óleos essenciais e seus constituintes como agentes anticancerígenos: uma visão mecanicista. **BioMed research international** , v. 2014, 2014.
- GERON, Chris et al. A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 11, p. 1761-1781, 2000.
- GOMES, Geovany Amorim et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, 2012.
- GOMES JÚNIOR, A.L., et al. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, p.1-11. 2015.
- GONZALEZ-BURGOS, E .; GOMEZ-SERRANILLOS, MP Compostos de terpeno na natureza: uma revisão de sua potencial atividade antioxidante. **Química medicinal atual** , v. 19, n. 31, p. 5319-5341, 2012.
- GUIMARÃES, Adriana G .; QUINTANS, Jullyana SS; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J. Monoterpenos com atividade analgésica - uma revisão sistemática. **Phytotherapy Research** , v. 27, n. 1, p. 1-15 de 2013.
- GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01, 2015.
- GORCZYCA, Wojciech; GONG, Jianping; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer research**, v. 53, n. 8, p. 1945-1951, 1993.
- HABTEMARIAM, Solomon. Antidiabetic potential of monoterpenes: A case of small molecules punching above their weight. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 4, 2017.
- HAJREZAIE, Maryam et al. Apoptotic effect of novel schiff based CdCl₂ (C₁₄ H₂₁ N₃ O₂) complex is mediated via activation of the mitochondrial pathway in colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9097, 2015.
- HASPER, H. J. et al. A new four-color flow cytometric assay to detect apoptosis in lymphocyte subsets of cultured peripheral blood cells. **Cytometry**, v. 40, n. 2, p. 167-171, 2000.
- HASSAN, Saadia Bashir et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts

through suppressing NF- κ B signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.

HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, 38(1), p.18, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KASSIE, F.; LAKY, B.; NOBIS, E.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic

effects of methyl isothiocyanate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, n. 1, p. 1-9, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.
- MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACRAE, Thomas H. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 1, p. 9-18, 2016.
- MADYASTHA, K. Madhava; SRIVATSAN, V. Biotransformations of α -terpineol in the rat: its effects on the liver microsomal cytochrome P-450 system. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 41, n. 1, p. 17-25, 1988.
- MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. **Biomonitoração do dano genético em humanos**. Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, organizadores. Genética toxicológica. 1a ed. Porto Alegre (RS): Alcance, 2003.
- MARTIN, Seamus J et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1545-1556, 1995.
- MARTINS, E.R; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D.C; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2000.
- MATSUZAKI, Patrícia et al. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life sciences**, v. 74, n. 5, p. 573-579, 2003.
- MCGARVEY, Douglas J .; CROTEAU, Rodney. Metabolismo terpenoide. **The Plant Cell** , v. 7, n. 7, p. 1015, 1995.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.
- MELLO, M.L.S.; JUNQUEIRA, A.C.; MARIA, C.C.J.; RIBEIRO, D.M.; FERREIRA, R.C.; VERÍSSIMO, R.V.; SCHILDKNECHT, P.H.P.A.; MONTEIRO, G.; COLTRI, P.P.; OGUSUCU, R.; FARIA, V.G.; SANTOS, A.B.; BORGES, I.G.; SILVA, E.A. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermógenes Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso de Meio Ambiente Paulínia e Região Metropolitana de Campinas, 2004, Paulínia. Anais - CD-Rom. Campinas: UNICAMP, 2004. p. 1-8.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- MIRZAYANS, Razmik et al. Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain viability and replicate their genome. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 360, (2017a)

- MIRZAYANS, Razmik; ANDRAIS, Bonnie; MURRAY, David. Impact of premature senescence on radiosensitivity measured by high throughput cell-based assays. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1460, (2017b)
- MIRZAYANS, Razmik; ANDRAIS, Bonnie; MURRAY, David. Do multiwell plate high throughput assays measure loss of cell viability following exposure to genotoxic agents?. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, p. 1679, (2017c)
- MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; MURRAY, D. Viability Assessment Following Anticancer Treatment Requires Single-Cell Visualization. **Cancers**, v. 10, n. 8, 2018.
- MONGALO, NI et al. Etnobotânica, fitoquímica, toxicologia e propriedades farmacológicas da Terminalia sericea Burch. ex DC (Combretaceae) - Uma revisão. **Journal of ethnopharmacology** , v. 194, p. 789-802, 2016.
- MORAIS, Selene Maia de et al. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MOUW, K. W.; GOLDBERG, M. S.; KONSTANTINOPOULOS, P. A.; D'ANDREA, A. D. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. **Cancer discovery**, 2017.
- MÜLLER, Susann; NEBE-VON-CARON, Gerhard. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 4, p. 554-587, 2010.
- NASCIMENTO, Jeferson C. do et al. Ocorrência, atividades biológicas e dados de ¹³C RMN das amidas de Piper (Piperaceae). **Química Nova** , v. 35, n. 11, p. 2288-2311, 2012.
- NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-MEINTIÈRES, S.; TALAHARI, I.; NKILI-MBOUI, E.N.; MARZIN, D. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**.;630:28-41, 2007.
- NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MISIK, M.; WULTSCH, G.; HARTMANN, M.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 762, pp.37-51, 2014.
- NERY, L. H. R. **Eficácia da dexametasona e da doxorrubicina no tumor de ehrlich transplantado em camundongos balb/c**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.
- NG, Kuan-Beng et al. Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin a isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 41, 2013.
- NIGJEH, Siyamak Ebrahimi et al. Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid

- cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 56, 2018.
- NUNES, L. C. C., GALINDO, A. B., DEUS, A. D. S. O. D., RUFINO, D. A., RANDAU, K. P., XAVIER, H. S., CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.
- OLEJNICZAK, Klaus; GÜNZEL, Peter; BAIXO, Rolf. Estratégias de teste pré-clínico. **Drug Information Journal** , v. 35, n. 2, p. 321-336, 2001.
- OLIVEIRA, George Laylson et al. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L.(Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.
- OLIVEIRA JUNIOR, F. J. M.; CESSÉ, E. A. P. Morbimortalidade do câncer na cidade do Recife na década de 90. **Rev Bras Cancerol**, v. 51, n. 3, p. 201-08, 2005.
- OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; POAP, C. V.; NEAGOE, A. D.; *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 516-521, 2014.
- ORMEROD, M. G. et al. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 21, n. 3, p. 300-304, 1995.
- PAZ, Rafaela F.; GUIMARÃES, Elsie F.; RAMOS, Clécio S. The occurrence of phenylpropanoids in the saps of six *Piper* species (Piperaceae) from Brazil. **Gayana Botanica**, v. 74, n. 1, 2017.
- PINTO, Angelo C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química nova*, p. 45-61, 2002.
- PORFÍRIO, Zenaldo et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Rev bras farmacogn**, v. 19, p. 785-789, 2009.
- PRAKASH, OM; KUMAR, Amit; KUMAR, P. Potencial anticancerígeno de plantas e produtos naturais. **Am J Pharmacol Sci** , v. 1, p. 104-115, 2013.
- QI, L.; XU, Z., *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 16(16), pp.4243-4245, 2006.
- QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, 2012.
- RANK, J.; NIELSEN, Mette Hviid. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.
- REGUEIRAS, Ana et al. Differential Toxicity of Cyanobacteria Isolated from Marine Sponges towards Echinoderms and Crustaceans. **Toxins**, v. 10, n. 7, 2018.

- RIBEIRO, Thaís Pôrto et al. Mecanismos de sinalização endotelial envolvidos na atividade cardiovascular do α -terpineol. 2012.
- RIMON, Galia et al. O aumento da fosfatidilserina na superfície é um marcador precoce da apoptose neuronal. **Journal of Neuroscience Research** , v. 48, n. 6, p. 563-570, 1997.
- RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 2000.
- RODEIRO, I. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1707-1713, 2006.
- RUFFA, M. J. et al. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 335-339, 2002.
- RUOKUN, Y.I.; et al. Anti-tumor activities of bamboo salt on sarcoma 180 tumor-bearing BALB/c mice. **Biomedical Research**. v.28, 2017.
- SAHPAZ, S.; BORIES, CH.; LOISEAU, PM.; CORTÈS, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, n. 06, p. 538-540, 1994.
- SANTOS, Alberdan S. et al. Sesquiterpenes of amazonian Piper species. **Acta Amazonica**, v. 28, n. 2, p. 127-127, 1998.
- SANTOS, Márcio RV et al. Efeitos cardiovasculares dos monoterpenos: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.
- SCHMID, Ingrid; UITTENBOGAART, Christel; JAMIESON, Beth D. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. **Nature protocols**, v. 2, n. 1, p. 187, 2007.
- SFARA, V.; ZERBA, E. N.; ALZOGARAY, Raúl A. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 3, p. 511-515, 2009.
- SHARWAN, Gotmi et al. Toxicity profile of traditional herbal medicine. **Journal of Ayurvedic and Herbal medicine**, v. 1, n. 3, p. 81-90, 2015.
- SILVA, T. D. S.; Atividade antitumoral *in vitro e in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen). 2014. 82 f. **Dissertação** (Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- SILVEIRA, PF da; BANDEIRA, Mary Anne Medeiros; ARRAIS, Paulo Sérgio Dourado. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMAN G, et al. Org. **Farmacognosia: da planta**

ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre: Ed UFSC; UFRGS; 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

SUNG, J.E; et al. Comparison of therapeutic responses to an anticancer drug in three stocks of ICR mice derived from three different sources. **Lab Anim Res.**, v.33, p. 187-194, 2007.

TAIT, J. F.; GIBSON, Donald; FUJIKAWA, K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 14, p. 7944-7949, 1989.

TAKASAWA, H.; TAKASHIMA, R.; NARUMI, K.; KAWASAKO, K.; HATTORI, A.; KAWABATA, M. et al. Results of the International Validation of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: Individual data for 1,2-dibromoethane, p-anisidine, and o-anthranilic acid in the 2nd step of the 4th phase

Validation Study under the JaCVAM initiative. **Mutat Res.**, v.786–788, p. 144-150, 2015.

TARIQ, A. et al. Etnofarmacologia e toxicologia de plantas medicinais paquistanesas utilizadas no tratamento de queixas ginecológicas e infecções sexualmente transmissíveis. **Jornal Sul Africano de Botânica** , v. 114, p. 132-149, 2018.

THOLL, Dorothea. Biossíntese e funções biológicas dos terpenóides nas plantas. Em: **Biotecnologia de isoprenóides**. Springer, Cham, 2015. p. 63-106.

TICE R. Editorial Preface. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 1, p. 786–788, 2015.

TOMASETTI, Cristian; LI, Lu; VOGELSTEIN, Bert. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, 2017.

TROIANO, Leonarda et al. Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 11, p. 2719, 2007.

ULLAH, M. Obayed et al. Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.

VALENTE, Daniel et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Rev Bras Saude Ocup**, v. 42, 2017.

VALERIO, E.; VILARES, A.; CAMPOS, A.; PEREIRA, P.; VASCONCELOS, V.
Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicon*, v. 90, p. 191-198, 2014.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutat Res.**;681:93-109, 2009.

VAN ENGELAND, Manon et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

VARANDA, Eliana Aparecida et al. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 257-264, 2002.

VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VERMEULEN, Louis et al. Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 995-998, 2013.

- VIEGAS JR, Claudio et al. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 117-127, 2009.
- VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.
- VILLELA, I.V. ; LAU, A. ; SILVEIRA, J. ; PRA, D. ; ROLLA, H.C. ; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (Orgs.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. p.145-163, 2003.
- VOLTARELLI, Fabrício Azevedo; DE MELLO, Maria Alice Rostom; DUARTE, José Alberto Ramos. Apoptosis and physical exercise: effects on skeletal muscle. **Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance**, v. 10, n. 1, p. 100-105, 2008.
- WAL, R.; SATO, D.; OLIVEIRA, C.C.; LOPES, L.; OLIVEIRA, S.M; DIBERNARDI, R.P; GEHRKE, S.; PALAURO, F.R.; BUCHI, D.F. Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. **Cell and Molecular Biology of Cancer**, p. 34, 2003.
- WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.
- WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. Ann Nutr Metab, v.47, p. 95–106, 2003.**
- WATERS, Michael D.; STACK, H. Frank; JACKSON, Marcus A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 437, n. 1, p. 21-49, 1999.
- WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, p. 43–47, 2016.
- YANG, Y.; LEI, Z.; HUANG, L.; YANG, F.; ZHANG, N.; YUAN, J.; LI, K.; CHEN, J.; ZHANG, J. Antitumor Ability of Berberine Accompanied by Modulation of Gut Microbiome in Sarcoma-180 Tumor-bearing Mice. **International Journal of Pharmacology**, 14(4), pp.460-470, 2018.
- ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 1995.
- ZAPATA, L.M.; BOCK, B.C.; OROZCO, L.Y.; PALACIO, J.A. Application of the Micronucleus Test and Comet Assay in *Trachemys callirostris* Erythrocytes as a Model for in Situ Genotoxic Monitoring. **Ecotoxicol Environ Saf.**;127:108-16, 2016.
- ZHOU, Y.; FU, X.; HE, D.; ZOU, X.; WU, C.; GUO, W, et al. Evaluation of urinary metal concentrations and sperm DNA damage in infertile men from an infertility clinic. **Environ Toxicol Pharmacol**;45:68–73, 2016.

ARTIGO

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

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Journal of Cellular Biochemistry a qual será submetida:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10974644/homepage/forauthors.html>.

Fator de impacto: 2.9; Qualis A2 para F armacia e Biotecnologia.

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

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

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

² Laboratório de Pesquisa 1 (LP1). Campus Senador Helvídio Nunes de Barros-Picos-PI. Universidade Federal do Piauí.

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

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

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

RESUMO

O alfa-terpineol é um monoterpeneo com diversas atividades farmacológicas e com perspectivas para atividade antitumoral. Assim, o estudo avaliou o potencial antitumoral do alfa-terpineol utilizando os seguintes bioensaios *in vitro*: Viabilidade por azul de tripan, teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN), Ensaio Cometa, Fragmentação do DNA em gel, citometria de fluxo e viabilidade celular por fluorescência. Utilizou-se a linhagem de sarcoma 180 (S180) obtido pelo modelo animal (*Mus musculus*). As concentrações do monoterpeneo utilizadas foram: 100, 250 e 500 µg/mL. A Doxorubicina (DOX) e a Cisplatina (quimioterápicos utilizados para tratamento de sarcomas) foram utilizados como controle positivo (CP). Os resultados mostraram o efeito citotóxico do α -terpineol em células de S180, reduzindo a viabilidade celular de 100% do controle negativo (CN) para 50,9; 38,53; 30,82% ($p < 0,05$), quando incubado em concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, respectivamente. O alfa-terpineol, nos teste de cometa e CBMN, apresentou genotoxicidade e mutagenicidade pelos elevados índices e frequências de danos e efeitos clastogênicos (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares). No teste de fragmentação de DNA, marcação por fluorescência e citometria de fluxo, o alfa-terpineol mostrou capacidade de causar apoptoses iniciais, tardias e necroses, caracterizando-o como citotóxico e antitumoral por mecanismos citogenéticos associados com instabilidade genética e morte celular.

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

ABSTRACT

Alpha-terpineol is a monoterpene with various pharmacological activities and prospects for antitumor activity. Thus, the study evaluated the antitumor potential of alpha-terpineol using the following *in vitro* bioassays: Tripán blue viability, micronucleus test with blockade of cytokinesis (CBMN), Comet Assay, Gel DNA Fragmentation, flow cytometry and viability by fluorescence. The sarcoma strain 180 (S180) obtained by the animal model (*Mus musculus*) was used. The concentrations of monoterpene used were: 100, 250 and 500 µg / ml. Doxorubicin (Dox) and Cisplatin (chemotherapy used to treat sarcomas) was used as a positive control (CP). The results showed the cytotoxic effect of α -terpineol on S180 cells, reducing cell viability from 100% of the negative control (CN) to 50.9; 38.53; 30.82% ($p < 0.05$), when incubated in concentrations of 100, 250 and 500 µg / mL, respectively. Alpha-terpineol, in the comet and CBMN tests, showed genotoxicity and mutagenicity due to the high indexes and frequencies of clastogenic effects and damages (micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds). In DNA fragmentation, fluorescence labeling and flow cytometry, alpha-terpineol showed ability to cause early, late and necrotic apoptosis, characterizing it as cytotoxic and antitumor by cytogenetic mechanisms associated with genetic instability and cell death.

Key words: Natural products. Monoterpenes. Genotoxicity. Cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma das maiores causas de mortalidade no mundo e tem etiologia complexa, com envolvimento de diversos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares (Ferlay et al., 2015). Os sarcomas são neoplasias malignas heterogêneas, de origem mesenquimal, que podem ocorrer em vários tecidos, tais como osteossarcomas, rabdomiossarcomas e lipossarcomas. O estudo dos mecanismos moleculares e citogenéticos envolvidos na doença, investigados em diferentes modelos, contribui para o avanço das terapias dessas neoplasias (Post, 2012). Assim, pesquisas de novos fármacos naturais candidatos à antitumorais são necessárias para elucidar danos citogenéticos nesse tipo de neoplasias (Husain & Verma, 2011; Taylor et al., 2013).

A maioria dos fármacos antineoplásicos utilizados clinicamente são isolados de espécies de plantas ou são fundamentados em tais substâncias (Kuzma et al., 2016). Estudos como os de (Suhail et al., 2011; Manjamalai & Grace, 2012; Girola et al., 2015; Fitsiou, Xavier, Lima & Sousa 2016) relatam sobre a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de vários óleos essenciais obtidos de plantas. Os óleos essenciais são produtos naturais com grande potencial farmacológico contra diversos tipos de tumores (Sobral et al., 2014). Essa atividade antitumoral desses óleos essenciais de diferentes espécies

vegetais, tem sido associadas à existência de monoterpenos em sua composição (Maggi et al., 2013). O alfa terpineol, é um componente monoterpeneo importante presente em óleos essenciais e tem demonstrado atividade antitumoral (Hassan, Gali-Muhtasib, Goransson & Larsson 2010).

O alfa-terpineol é um álcool monoterpênico oxigenado volátil que possui fórmula $C_{10}H_{18}O$ e peso molecular 154.24. É amplamente utilizado na fabricação de perfumes, cosméticos, sabonetes e agentes antissépticos. Estudos sobre esse composto revelam excelente atividade neuroprotetora (Parvardeh, Moghimi, Eslami & Masoudi, 2016), antibacteriana (Li et al., 2014), efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes (Moghimi, Parvardeh, Zanjani & Ghafghazi, 2016) atividade antifúngica (Hammer, Carson & Riley, 2003), antibacteriana (Zengin, Çolak & Kiliç, 2014) e atividade nematicida (Echeverrigaray, Zacaria & Beltrão, 2010).

Diversos estudos com fitoquímicos apontam para atividades antitumorais de produtos naturais, por indução de apoptoses e inibição de proliferação celular (Beevi, Mangamoori, Subathra, & Edula, 2010; Wu, Blackburn, Amburgey, Jaworska, & Federle, 2017). Ademais, a instabilidade cromossômica e os danos ao DNA estão bem associados a diversas doenças, especialmente o câncer. Portanto, as anormalidades citogenéticas são importantes para o entendimento dos mecanismos da tumorigênese. As alterações citogenéticas envolvem aneuploidia, deleções, inserções, quebras e perdas de cromossomos (Giam & Rancati, 2015). Diversas metodologias toxicogenéticas são utilizadas para avaliação *in vitro* desses tipos de mutações bem como a avaliação da capacidade de induzir morte celular.

Dentre os testes, o bioensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) pode determinar níveis de danos citogenéticos de vários agentes citotóxicos, com perspectivas para atividade antitumoral, em células binucleadas (Fenech, 2006; Fenech et al., 2011; Nakamura et al., 2015). Em outras abordagens, o ensaio cometa versão alcalina e a teste fragmentação de DNA podem detectar baixos níveis de danos ao DNA, a exemplo de quebras de fitas simples e duplas (Kawaguchi et al., 2010). Ademais, bioensaios mais refinados como citometria de fluxo e marcação por fluorescência são importantes testes biológicos para detecção de morte celular provocados pela substância teste avaliada (Davison, 2016).

Portanto, sabendo-se da importância da busca por novos compostos naturais com potencial terapêutico na quimioterapia, o estudo teve por objetivo a avaliação dos possíveis efeitos antitumorais do monoterpeneo alfa-terpineol, por mecanismos

citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em cultura primária de Sarcoma 180 (S-180), por meio da aplicação de bioensaios toxicogenéticos *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes químicos utilizados no estudo

O monoterpeno alfa-terpineol foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura RPMI 1640, penicilina e estreptomicina foram obtidos da GIBCO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A doxorubicina (Dox) e Cisplatina foram obtidos da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil). Alfa-terpineol foi solubilizado em três diferentes concentrações (100, 250 e 500 µg/ml), utilizando o solvente DMSO 1%. A Dox e Cisplatina foram utilizadas em uma única concentração (2 µg/mL e 50 µg/mL, solubilizada em dH₂O, respectivamente).

2.2 Cultura primária de Sarcoma 180

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

2.3 Viabilidade celular por azul de Tripán em cultura primária de S180

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

microscopia óptica com o aumento de 400X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

2.4 Ensaio cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit & Rothfuss (2012). Alíquotas de 10 μL de suspensão celular de S180 ($0,5 \times 10^6$ células/mL) após o tratamento de 24h foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90 μL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos; e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID), frequência de danos (FD) e % de apoptoses de 100 células em triplicata. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$.

2.5 Fragmentação de DNA revelada por eletroforese em gel

$0,5 \times 10^6$ de células de sarcoma 180 foram plaqueados em meio RPMI 1640, sendo tratados nas concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h a 37 °C sob uma atmosfera com 5% de CO_2 . Após o período de tratamento, o DNA celular foi extraído utilizando o protocolo de salting out, utilizando 100 μL de PBS, 200 μL de tampão de lise e 20 μL de proteinase K. Após a extração, a quantificação foi feita com 2 μL da amostra para 198 μL de quantfluor one ds DNA bye. Para a produção do gel de eletroforese foi utilizado gel de agarose a 0,8%. Após, foi adicionado 4 μL de corante Diamond Dye não diluído no gel. Em três microtubos para cada concentração testada, foi misturado 3 μL de Loading Dye mais 6 μL de amostra de DNA correspondente a cada concentração testada e logo em seguida foram adicionados aos poços do gel de eletroforese. Para corrida de eletroforese foi padronizado a voltagem de 80 e

amperagem de 60 por 1 h. O DNA marcador foi o DNA ladder 1 kb plus. Utilizou-se como controle positivo a cisplatina a 50 ug/ml.

2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] foram adicionados 20 µL de suspensão celular de S180 (0,5 x 10⁶ células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas as soluções teste e controles. As células foram incubadas por 44 h a 37° ± 1°C. Após este período, foram adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado, para nova centrifugação após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético, 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas, previamente codificadas, foram analisadas em teste cego, com auxílio de microscópio óptico (1000X), considerando os danos citogenéticos (micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas) presentes em 1000 células por lâmina em triplicata.

2.6.1 IDN e IDNC dos grupos testados no teste de CBMN

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

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

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

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

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

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

2.8 Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo

Para determinar a porcentagem de células tumorais S180 vivas, em apoptose e em necrose após exposição ao alfa-terpineol por 24h, $0,5 \times 10^6$ células foram adicionadas a cada um dos cinco tubos, o tubo não marcado, tubo controle positivo e os 3 tubos com células expostas às concentrações 100, 250 e 500 $\mu g/mL$. Os tubos foram centrifugados para a retirada do meio e foram adicionados 100 μL de solução salina 0,9% e homogeneizados em vortex. Em seguida, 2 μL de Annexin V PE e 2 μL de 7-

AAD do kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I *BD Pharmingen*® foram adicionados aos tubos e incubados em ambiente escuro por 30 minutos. Após esse período, 300 μ L de solução salina foram adicionados e 30.000 eventos foram adquiridos e gravados em citômetro de fluxo FACSCanto II®.

2.9 Análise estatística

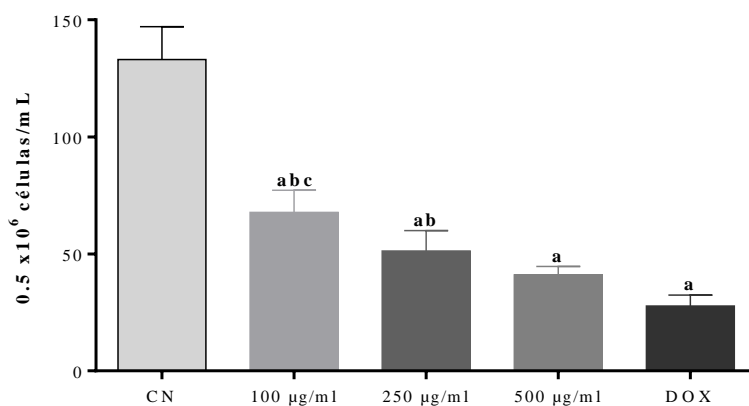
A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média \pm desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Tukey (considerando valores de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$ como significantes), por meio do programa *Graphpad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

3. RESULTADOS

3.1 Viabilidade por azul de Tripán

O alfa-terpineol, nas concentrações testadas, assim como a Dox (2 μ g/mL) interferiram, significativamente, na viabilidade celular da cultura primária de S180 (Figura 1), indicando efeitos citotóxicos. Observou-se diferenças estatísticas entre a menor e maior concentração do monoterpeneo, bem como em relação as 02 menores concentrações em comparação à Dox.

Figura 1. Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao alfa-terpineol (100, 250 e 500 μ g/mL).



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

3.2 Teste Cometa versão alcalina

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

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

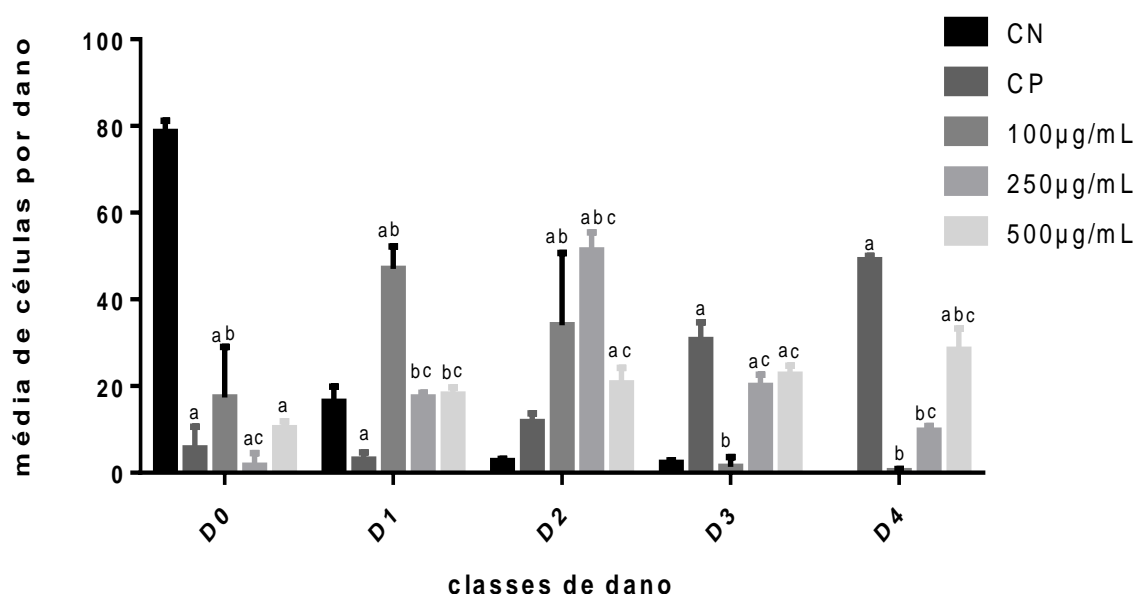
	<i>Concentração</i>	<i>Índice de dano</i>	<i>Frequência de dano</i>	<i>Apoptose (%)</i>
Controle negativo	-	27,6 \pm 2,5	21,3 \pm 2,5	6,0 \pm 2,0
Controle positivo	2 $\mu\text{g/MI}$	314,3 \pm 15,6 ^a	94,3 \pm 4,9	79,3 \pm 3,0 ^a
alfa-terpineol	100 $\mu\text{g/MI}$	122,6 \pm 30,0 ^{ab}	82,6 \pm 11,6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

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

O teste cometa também possibilitou a avaliação por classes de danos. Em D0, os tratamentos foram significativamente menores que o controle negativo que mostrou uma média de 78,6 \pm 2,5. No entanto, não houve diferença estatística em comparação com o controle positivo, exceto para a menor concentração. Para D1, apenas a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se estatisticamente aumentado em relação ao controle negativo (16,3 \pm 3,5). Em comparação com controle positivo, todos os tratamentos apontaram um aumento significativo. Em D2 e D3, todos os tratamentos foram estatisticamente maiores que o controle negativo (2,6 \pm 0,5; 2,3 \pm 0,5, respectivamente), exceto para a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ da classe de dano

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

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

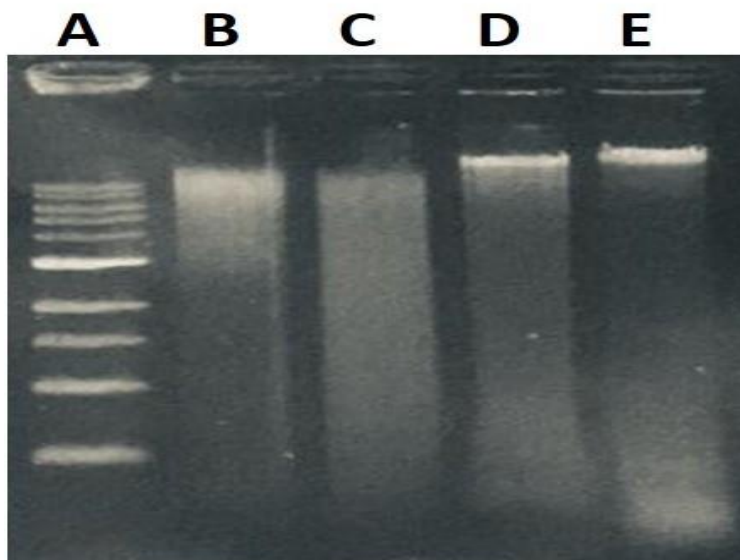


ANOVA one-way com pós teste de Tukey. (a) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN; (b) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao CP; (c) - Estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a menor concentração (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.3 Avaliação da apoptose por fragmentação de DNA em gel

Na fragmentação de DNA determinada por eletroforese em gel de agarose, foi observado um arraste (SMEAR) nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o que indica que o alfa-terpineol possui capacidade de fragmentar o DNA, caracterizando a presença de apoptoses das células tumorais nessas concentrações. Ademais, na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o alfa-terpineol mostrou praticamente uma ausência de banda genômica e, por conseguinte, um padrão de arraste mais destacado do que o quimioterápico utilizado (Figura 3).

Figura 3: Fragmentação de DNA de S180 avaliada por eletroforese em gel de agarose tratados com alfa terpineol nas concentrações de 100 e 500 µg/mL por 24h.



A - DNA ladder 1 kb plus; B - alfa-terpineol na concentração de 100 µg/mL; C - alfa-terpineol na concentração de 500 µg/mL; D - Cisplatina 50 µg/mL; E - Controle negativo.

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

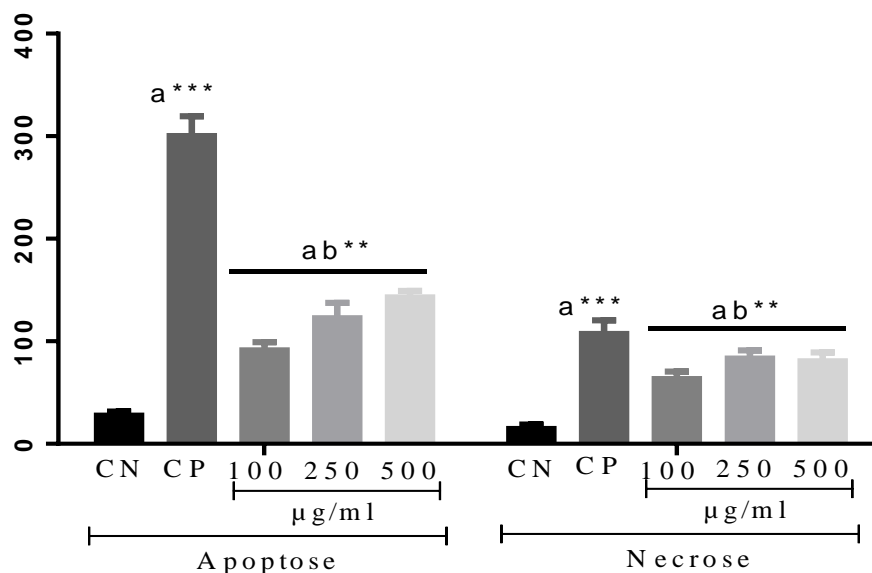
O alfa-terpineol apresentou efeitos mutagênicos por indução de micronúcleos em S180, como também por aumento significativo no número de pontes e brotos nucleares, para as três concentrações testadas (100, 250 e 500 µg/mL), quando comparado ao CN. Também foi observado citotoxicidade pelos índices de divisão celular (IDN) e pelo índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) também pelas três concentrações avaliadas. Esses dados apontam que o alfa-terpineol causa danos fixos (mutações) ao DNA pela indução de micronúcleos e mostrou-se antitumoral por indução de citotoxicidade (IDN e IDNC estatisticamente significantes). Provavelmente, esse efeito está relacionado com as alterações citogenéticas observadas (Tabela 2) (Figura 5). Além disso, o composto em questão induziu significativamente o aumento de apoptoses ($93 \pm 6,0$; $124,6 \pm 12,8$; $144 \pm 8,5$) e necroses ($65 \pm 5,5$; $85 \pm 6,2$; $82 \pm 6,4$) para as 03 concentrações avaliadas em comparação com o CN (figura 4).

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

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

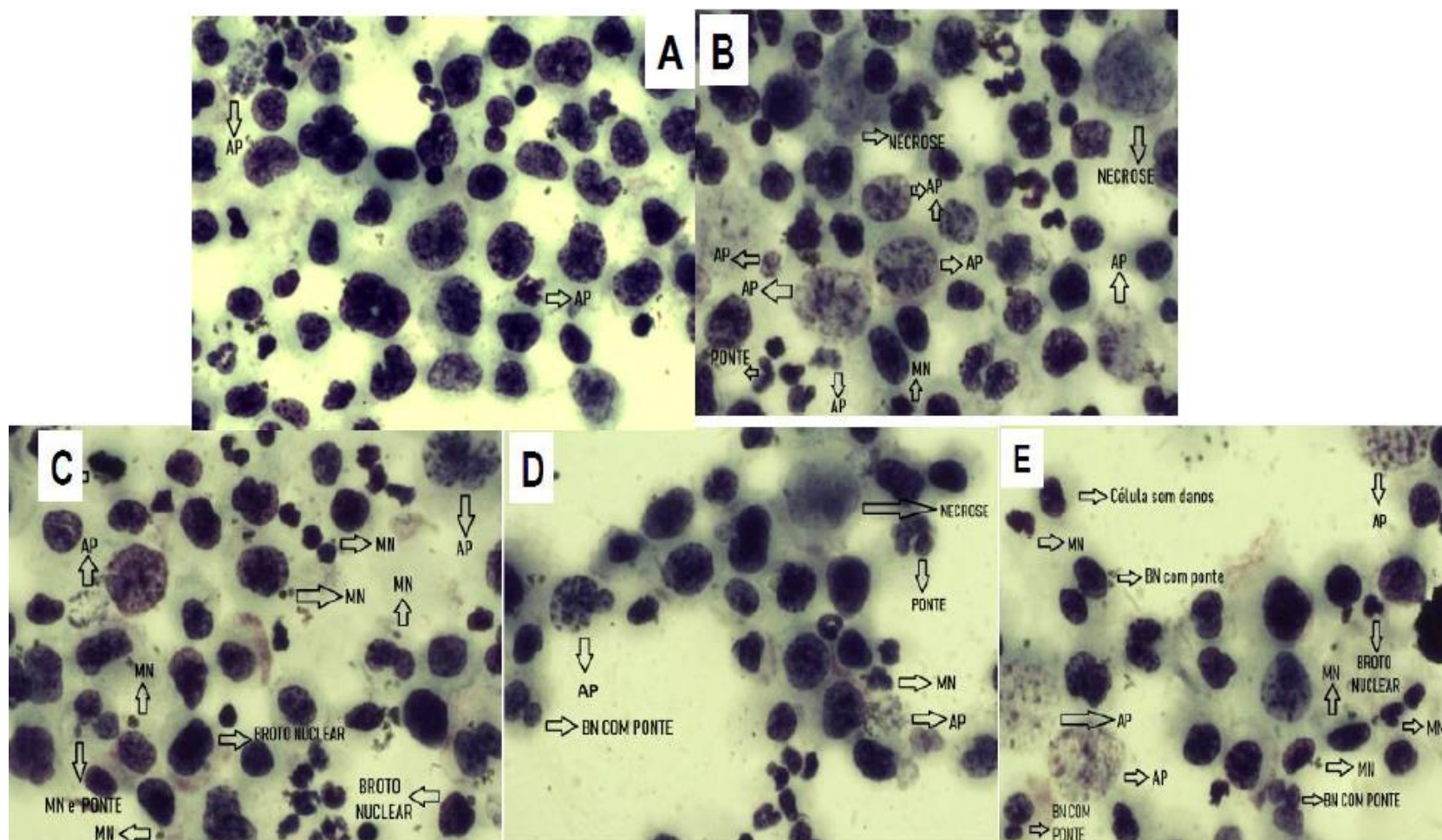
Valores representam a média ± desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 µg/mL. IDN: índice de divisão nuclear. IDNC: índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN. ^b p<0,05 comparado à Dox.

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



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

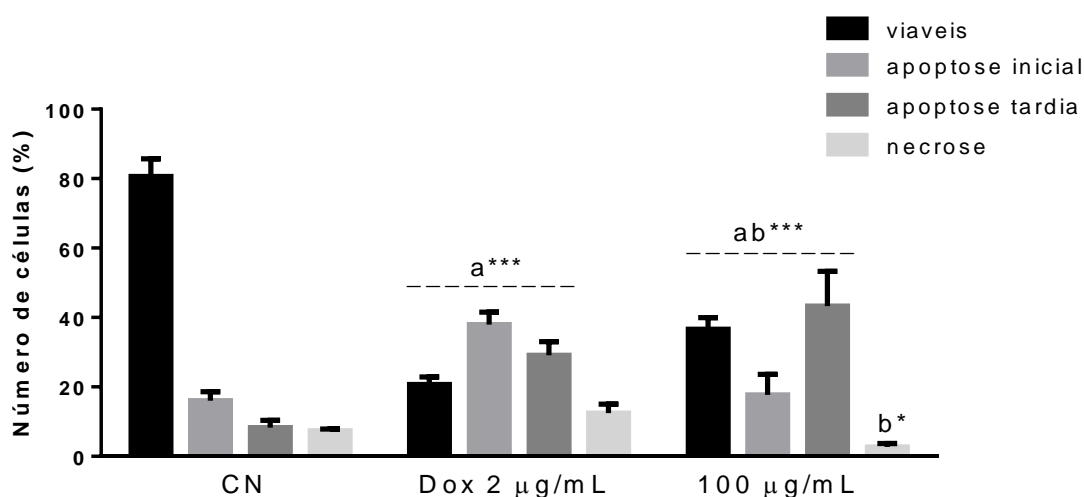
Figura 5. Perfil fotomicrográfico da linhagem de Sarcoma 180 tratados com alfa-terpineol (100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) analisadas por meio do teste de CBMN. Coloração com Giemsa a 10% e aumento de 1000X ao microscópio óptico. BN: células binucleadas. MN: micronúcleos. AP: apoptose.



3.5 Quantificação de apoptose e necroses usando Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF)

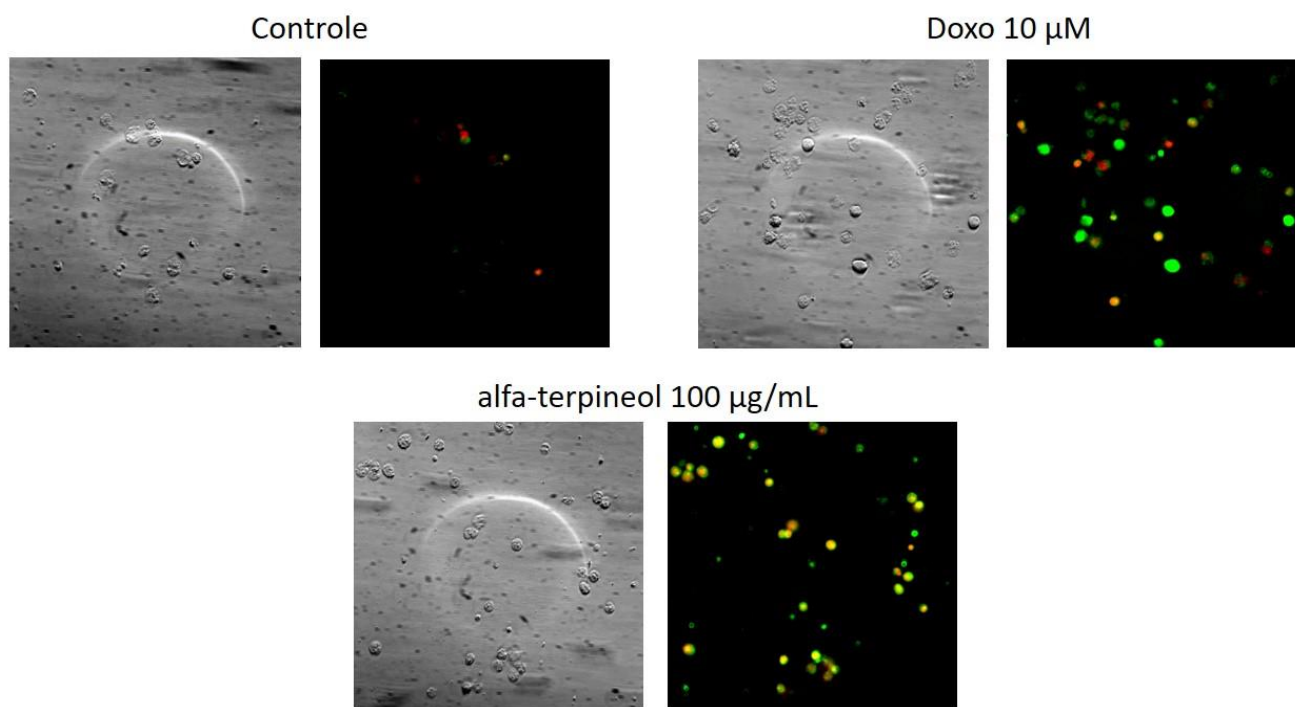
A capacidade citotóxica na avaliação de morte celular no tempo de exposição de 24h mostrou efeitos esperados do quimioterápico de forma estatisticamente significativa quando comparado com o controle negativo. O tratamento com alfa-terpineol na concentração de 100 µg/mL também apresentou efeito citotóxico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

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



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

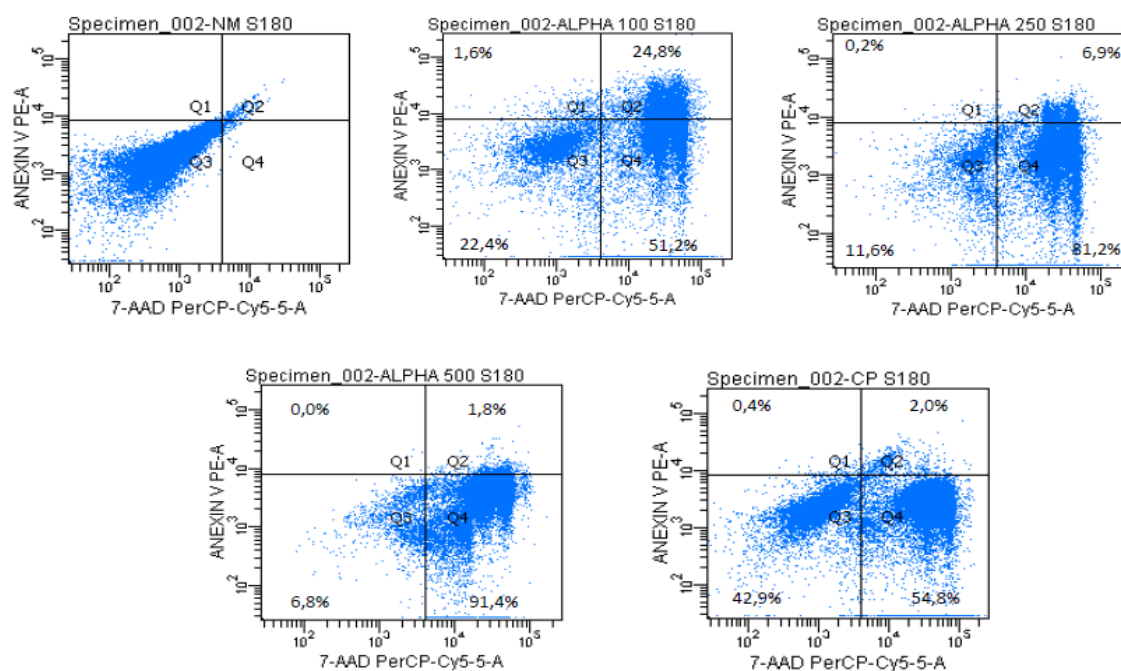
Figura 7. Citotoxicidade do alfa-terpineol (100 µg/mL) em linhagem de Sarcoma 180 analisadas por meio de Microscopia Confocal de Fluorescência (MCF) dupla coloração por iodeto de propídeo e laranja de acridina.



3.6 Viabilidade celular por citometria de fluxo

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

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



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

4. DISCUSSÃO

Nestes últimos anos, tem-se observado a eficiência dos óleos essenciais e seus compostos químicos como fonte de novos produtos naturais bioativos. Conhecer e explorar produtos vegetais naturais como uma alternativa para encontrar novas substâncias químicas como agentes anticancerígenos é uma das áreas de pesquisa que mais crescem (Gautam, Mantha & Mittalk, 2014). Levando em conta que os monoterpenos são comuns em muitas espécies de plantas e são empregados em preparações cosméticas e farmacêuticas, bem como na indústria de alimentos, é importante analisar o potencial farmacológico dos monoterpenos com atividade anticancerígena (Sobral et al., 2014).

A avaliação desses compostos bioativos anticancerígenos é medido pela capacidade de detectar células cancerígenas e promover seletivamente sua apoptose

(Liu, Liu, Liu & Wu, 2015). Dentre estes compostos, o alfa-terpineol é um constituinte majoritário de diversas espécies de plantas em uso da medicina popular, e por isso, torna-se relevante seu estudo para investigar seus efeitos citotóxicos com foco na supressão do crescimento de células cancerígenas ou para aumentar a morte de células cancerígenas contra a quimiorresistência causada pela quimioterapia Wang & Yi, 2010; Kumar, Sulapaka, Babu & Padwad, 2015; Khaleel, Tabanca & Buchbauer, 2018).

A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada pelo ensaio de citotoxicidade utilizando o corante azul de tripan. Esse teste determina o número de células viáveis com membrana plasmática intacta, capaz de excluir o corante (Pita et al., 2012). O alfa-terpineol nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL para o bioensaio mostrou efeito citotóxico sobre células de Sarcoma 180 nas concentrações citadas. Taherkhani (2016) avaliando a toxicologia do óleo essencial de *Artemisia ciniformis*, constituído de alfa-terpineol e alguns de seus isômeros, observou uma citotoxicidade desse óleo pelo teste de MTT em células do câncer cervical (HeLa). Este estudo demonstrou que nas concentrações de 19,64 µg/mL e 28 µg/mL, o óleo inviabilizou as células HeLa em 50% e 66,87%, respectivamente. Isso mostra que óleos essenciais contendo alfa-terpineol podem ter efeitos citotóxicos contra linhagens celulares tumorais.

Os efeitos citotóxicos do monoterpeno podem estar relacionados com o seu potencial genotóxico observado nas células tumorais de S180 através dos testes de cometa e CBMN. O ensaio cometa permite avaliar os danos ao DNA causados pela substância teste bem como a capacidade de induzir apoptose nas células tumorais com base no padrão de fragmentação do DNA DNA (Bednarek, Sypniewski, Klama-Baryła, Galka & Machnik, 2006). Com isso, o teste de genotoxicidade mostrou a capacidade do alfa-terpineol de induzir quebras no DNA total de células de S180 nas três concentrações testadas, além de ser capaz de causar um aumento da porcentagem de apoptose. Em consonância com esse resultado, um estudo com o carvacrol, um monoterpeno estruturalmente semelhante ao alfa-terpineol, através do ensaio cometa modificado por FPG (DNA formamidopirimidina glicosilase) em células de carcinoma de cólon humano (Caco-2), mostrou que na concentração de 69 µg/mL causou quebras nas fitas de DNA indicando danos às bases purinas (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014).

No teste de mutagenicidade de CBMN, o alfa terpineol nas três concentrações testadas mostrou-se citotóxico de forma dose dependente para a avaliação do IDN, bem como induziu a presença de micronúcleos, pontes e brotos nucleares. Um estudo com

linalol, um monoterpeneo estruturalmente semelhante e com mesmo peso molecular do alfa-terpineol, mostrou ter efeitos citotóxicos ao induzir células de câncer de mama humano (T-47D), hepatocarcinoma humano (HepG2) e carcinoma de pulmão humano (A549) a sofrerem apoptose e desencadear a morte celular (Chang & Shen, 2014). Sendo o linalol um análogo do alfa-terpineol, o mesmo em condições ácidas de metabolização pode se transformar em alfa-terpineol, assim, entende-se que ambos possuam perfis toxicogênicos semelhantes (Wu et al., 2010). Esses achados nos fornece evidências de que o alfa-terpineol, em condições experimentais, têm efeitos citotóxicos pela capacidade de causar apoptose, necrose (valores baixos e significantes de IDN e IDNC) e efeitos mutagênicos por agir como agente clastogênico em células de S180. Tanto o IDN como o IDNC avaliados no teste de CBMN, são variáveis respostas importantes relacionados com a capacidade de indução de parada de ciclo e morte celular.

Não há estudos do alfa-terpineol em relação aos efeitos genotóxicos e mutagênicos para sarcomas. Este estudo é o primeiro relato sobre a detecção do seu potencial clastogênico em linhagem de S180 usando teste de cometa e CBMN. Os biomarcadores citogenéticos aqui apresentados mostraram evidências de que o alfa-terpineol nas concentrações testadas causou lesões genômicas ou interferiram no reparo do DNA. Pesquisas com constituintes de óleos essenciais mostraram alguns efeitos prejudiciais no DNA que interferem na estabilidade genômica tais como a capacidade de quebrar ligações fosfodiéster do DNA. Ademais, ocorre a produção de bases oxidadas, como a 8-oxoguanina (8-oxoGua) que possui potencial mutagênico pela sua capacidade de emparelhar com adenina, além da formação de um indicador de estresse oxidativo, a 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) que também induz alterações no material genético (mutações), tais como, rearranjos cromossômicos, inserções, deleções e ampliações gênicas (Kocaman et al., 2011; Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014; Erdogan; Ozkan, 2013). Assim, os efeitos genotóxicos e mutagênicos podem intensificar os efeitos citotóxicos resultando em parada do ciclo celular e, eventualmente, apoptose através da ativação de genes pró-apoptóticos e supressão de genes antiapoptóticos (Peres & Cunha, 2013).

Vários métodos mais sensíveis de detecção da apoptose foram desenvolvidos para apontar alterações na morfologia celular, bem como interagir com marcadores de superfície associados à apoptose (Liu et al., 2015). Estudo adicionais para a

quantificação da apoptose, tais como testes de fragmentação de DNA em gel, citometria de fluxo e MCF com dupla marcação por laranja de acridina e iodeto de propídeo foram realizados no presente estudo. A integridade do DNA desempenha um papel fundamental na proliferação celular, logo a fragmentação do mesmo inviabiliza o desenvolvimento da célula, bem como é uma das características típicas da apoptose (Wong, 2011; Archana, Dutta, & Dutta, 2013). Um estudo com gama-terpineol, um isômero do alfa-terpineol, demonstrou que na concentração de 320 µg/mL, o isômero induziu a fragmentação do DNA de células de hepatoma BEL-7402, confirmando a apoptose em múltiplos de 180-200 pb após 12, 24, 36, 48 h (Wu et al., 2014). Corroborando com os achados de Wu et al. (2014), No nosso estudo, o teste de fragmentação de DNA em gel mostrou que o DNA foi fragmentado após o tratamento em células de S180 nas concentrações de 100 e 500 µg/mL, em um tempo de exposição de 24 h de forma dose dependente.

A análise por citometria de fluxo mostrou fortes indícios de que o alfa-terpineol apresenta atividade antitumoral contra células S180 de forma dose dependente para os eventos de apoptose tardia e necrose presente nos quadrantes Q2 e Q4, respectivamente. Foi observado que a medida que aumenta a concentração, a apoptose tardia diminui, porém, em contra partida aumenta a necrose. Além disso, a baixa porcentagem de células em apoptose inicial presente no quadrante Q1 é semelhante aos resultados adquiridos no teste MCF. Isso comprova seu potencial antitumoral, uma vez que a exposição da fosfatidilserina é transitória na apoptose inicial (Kenis et al., 2010). Em Q2, o número de células em apoptose tardia (duplo positivo) foi maior apenas na menor concentração (100 µg/mL). A marcação das células tumorais com Anexina-V e com intercalador de DNA impermeável à membrana, o 7-aminoactinomicina D (7-AAD) permite discriminar entre células viáveis, apoptóticas e necróticas secundárias (Dong et al., 2009).

As células podem, também, ser classificadas como duplamente positivas, pelo fato da membrana estar danificada a ponto de permitir a passagem de 7-AAD para o interior da célula, bem como permitir a ligação da Anexina-V em fosfatidilserina do lado interno da membrana. Porém, não é possível distinguir entre apoptose tardia e células necróticas nesta população dupla positiva (Q2) usando citometria de fluxo clássica (Pietkiewicz et al., 2015). Essas informações apontam que o alfa-terpineol pode matar células tumorais por apoptose e necrose, principalmente por necrose (Q4) quando

as concentrações forem superiores a 100 µg/mL, segundo o teste analisado. Esses achados colaboram com os resultados significantes de necroses encontrados no teste de CBMN no presente estudo.

A necrose é definida como um processo de morte celular controlada geneticamente. Ela eventualmente resulta em extravasamento do conteúdo intracelular, bem como é morfológicamente caracterizada por granulação e inchaço citoplasmático, assim como fragmentação de organelas e ruptura da membrana plasmática (Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhouet, Walczak & Vandenabeele, 2014). Dentre essas características, é importante enfatizar que a fragmentação do núcleo é geralmente considerada como um sinal de morte celular apoptótica, mas também pode ocorrer em menor extensão na necrose como observados pelo resultados do teste de citometria (Lorent, Lins, Domenech, Quetin-Leclercq, Brasseur, & Mingeot-Leclercq, 2014).

Devido à lipofilicidade dos monoterpênos como carvacrol e timol, moléculas estruturalmente semelhantes ao alfa-terpineol, podem penetrar na bicamada fosfolipídica, aumentando a permeabilidade da membrana celular, a dissipação da força protomotriz e o vazamento de íons inorgânicos, resultando em lise e morte celular (Souza, Oliveira, Stamford, Conceição, & Gomes Neto, 2013; Lambert, Skandamis, Coote & Nychas, Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. 2001). Um estudo com o isômero do alfa-terpineol, o terpinen-4-ol (0,04%), mostrou atividade antiproliferativa em células cancerígenas de pulmão de rato (AE17) através da morte celular por necrose na medida que aumentava o tempo de (Greay, Ireland, Kissick, Levy, Beilharz, Riley, & Carson, 2010). Portanto, segundo o teste de citometria de fluxo, entende-se que um dos mecanismos que justifica a atividade antitumoral do alfa-terpineol é a exposição da fosfatidilserina e perda da integridade da membrana plasmática, causando a morte da célula por apoptose tardia e necrose, respectivamente.

A dupla marcação por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) visualizada sob um microscópio fluorescente, pode ser usado para identificar alterações de membranas celulares associadas à apoptose durante o processo de morte celular e distinguir com precisão células em diferentes estágios de apoptose (Gherghi, Girousi, Voulgaropoulos, & Tzimou-Tsitouridou, 2003; Liu et al., 2015). O LA é um corante permeável que marca em verde o núcleo, enquanto o IP é absorvido pelas células cujas membranas celulares estão danificadas e a integridade da membrana é perdida (Pavithra, Mehta, & Verma, 2018).

Um estudo de indução da apoptose com óleo essencial de *Pamburus missis*, nas concentrações entre 50 e 100 µg/mL em linhagem de câncer de pele não melanoma (A431), utilizando o teste de dupla marcação LA/IP, demonstrou que tais células apresentaram condensação da cromatina, formação de esferas e formação de bolhas na membrana, caracterizando apoptose (Pavithra et al., 2018). No nosso estudo, as células de S180 tratadas com alfa-terpineol (100 µg/mL) foram induzidas à apoptose. Ademais, o estágio de apoptose que o monoterpeno mais induziu foi o de apoptose tardia. O alfa-terpineol, na menor concentração, parece ter melhor efeito na indução da apoptose. Porém, em concentrações elevadas, pode matar as células por necrose como mostrado no teste de citometria de fluxo.

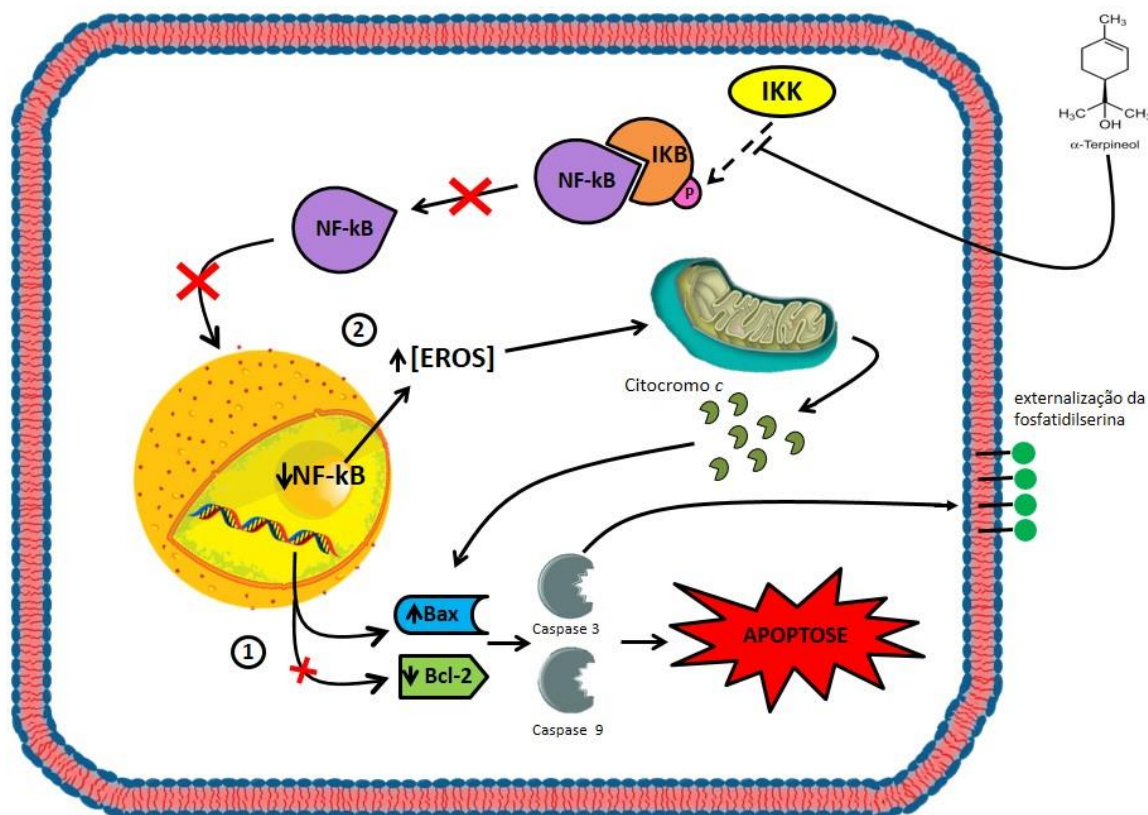
Mediante os testes realizados, um dos principais mecanismos moleculares que elucidada os resultados do presente estudo é a capacidade do alfa-terpineol de inibir a ação de AKT, JNK1, JNK2, como também na quinase do inibidor kappa B (IKK), o que, por consequência, irá impedir ou reduzir a translocação do NF-κB para o núcleo (figura 9). A regulação negativa da transcrição de NF-κB, em outras palavras, irá proporcionar o aumento da sensibilidade à ação de agentes antitumorais ou interromper a proliferação causada por células tumorais (Hassan et al., 2010; Blowman, Magalhães, Lemos, Cabral, & Pires, 2018; Khaleel, Tabanca, & Buchbauer, 2018).

A inibição de NF-κB aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, causando despolarização mitocondrial, abertura do poro de permeabilidade, liberação do fator apoptótico citocromo *c* e liberação de caspases 9 e 3 (Silva & Ferrari, 2011; Grivicich, Renger & Rocha, 2007). É importante enfatizar que caspase 3 está associada a indução da translocação da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana celular no processo de apoptose. Esse novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação (Mandal, Mazumder, Kundu & Basu, 2005; Parolin & Reason, 2001).

Além de coordenar respostas imunológicas, o NF-κB está relacionado a mecanismos de sobrevivência celular. Uma vez sendo inibido, produzirá na maioria dos casos, a redução da expressão de genes alvos que pertencem à maquinaria antiapoptótica da célula, isto é, membros da família Bcl-2 e IAP (Nogueira, Ruiz-Ontañón, Vazquez-Barquero, Moris, & Fernandez-Luna, 2011), confirma tais mecanismos, mostrando que o alfa-terpineol tem potencial atividade anticancerígena

contra a linhagem de células cancerígenas MCF-7 por meio da estimulação da apoptose através da diminuição da expressão de Bcl-2, como o aumento das expressões de Bax (Figura 9).

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



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O alfa-terpineol causou citotoxicidade em células de Sarcoma 180 pelos elevados e significantes índices de morte celular tanto por apoptose como necrose nos diferentes bioensaios avaliados. Em adição, induziu genotoxicidade de forma dose dependente observados pelos índice e frequência de danos, bem como mutagenicidade visualizada nas alterações citogenéticas como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares em Sarcoma 180. A avaliação dos efeitos antitumorais do alfa-terpineol em nessas células tumorais, no presente estudo, mostrou indícios de sua capacidade em promover morte celular por apoptose, em menores concentrações, como também por

necrose em maiores concentrações. Entende-se que um dos mecanismos que justifica a atividade antitumoral do alfa-terpineol é a exposição da fosfatidilserina e perda da integridade da membrana plasmática. Estudos adicionais de avaliação molecular e nanotecnologia, com menores concentrações, devem ser encorajados como perspectivas para formulações farmacêuticas antitumorais para o alfa-terpineol.

6 REFERÊNCIAS

Archana, D., Dutta, J., & Dutta, P. K. (2013). Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. *International journal of biological macromolecules*, 57, 193-203.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.002>

Beatriz, P. M., & Reason, I. J. M. (2001). Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*, 38(2), 138-144.

Beevi, SS, Mangamoori, LN, Subathra, M., e Edula, JR (2010). O extrato de hexano das raízes de *Raphanus sativus* L. inibe a proliferação celular e induz a apoptose em células cancerígenas humanas por meio da modulação de genes relacionados à via apoptótica. *Alimentos vegetais para nutrição humana*.

Bednarek, I., Sypniewski, D., Klama-Baryła, A., Gałka, S., & Machnik, G. (2006). Single-cell gel electrophoresis (comet assay) as a tool for apoptosis determination in tumor cell lines HL-60 and Jurkat cultures treated with anisomycin. *Ann. Acad. Med*, 60, 278-284.

Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 135.

Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., & Pires, I. M. (2018). Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/3149362>

Chang, M. Y., & Shen, Y. L. (2014). Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. *Molecules*, 19(5), 6694-6706.

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules19056694>

Davison, S. A., Den Haan, R., & van Zyl, W. H. (2016). Heterologous expression of cellulase genes in natural *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(18), 8241-8254.

Doi: 10.1007 / s00253-016-7735-x

Dong, H. P., Holth, A., Kleinberg, L., Ruud, M. G., Elstrand, M. B., Tropé, C. G., ... & Risberg, B. (2009). Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in

ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7-AAD assay: clinical relevance and comparison with other apoptosis parameters. *American journal of clinical pathology*, 132(5), 756-762.

<https://doi.org/10.1309/AJCPAVFA8J3KHPRS>

Echeverrigaray, S., Zacaria, J., & Beltrão, R. (2010). Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 100(2), 199-203.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0199>

Erdogan, A., & Ozkan, A. (2013). A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA damaging effects of *Origanum majorana*'s essential oil and its oxygenated monoterpene component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. *Biologia*, 68(4), 754-761.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.

<https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

Fenech, M. (2006). O ensaio de micronúcleos em bloco de citocinese evolui para um ensaio "cytome" de instabilidade cromossômica, disfunção mitótica e morte celular. *Pesquisa de Mutação / Mecanismos Fundamentais e Moleculares da Mutagênese*, 600 (1), 58-66.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028>

Fenech, M. (2007). Ensaio de citometria de micronúcleo em bloco de citocinese. *Protocolos da natureza*, 2 (5), 1084.

10.1038/nprot.2007.77

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A., Surralles, J., Crott, JW, Parry, J., ... e Thomas, P. (2011). Mecanismos moleculares do micronúcleo, ponte nucleoplasmática e formação de gemas nucleares em células de mamíferos e humanas. *Mutagênese*, 26 (1), 125-132.

<https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>

Fitsiou, E., Anastopoulos, I., Chlichlia, K., Galanis, A., Kourkoutas, I., Panayiotidis, M. I., & Pappa, A. (2016). Antioxidant and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their Major Constituents. *Anticancer research*, 36(11), 5757-5763.

Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed research international*, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/154106>

Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A. N., & Tzimou-Tsitouridou, R. (2003). Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta*, 61(2), 103-112.

[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00238-8)

Giam, M., & Rancati, G. (2015). Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell division*, 10(1), 3.
<https://doi.org/10.1186/s13008-015-0009-7>

Girola, N., Figueiredo, C. R., Farias, C. F., Azevedo, R. A., Ferreira, A. K., Teixeira, S. F., ... & Lago, J. H. (2015). Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(4), 928-934.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.041>

Greay, S. J., Ireland, D. J., Kissick, H. T., Levy, A., Beilharz, M. W., Riley, T. V., & Carson, C. F. (2010). Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(5), 877-888.
<https://doi.org/10.1007/s00280-009-1093-7>

Grivicich, I., Regner, A., & Rocha, A. B. D. (2007). Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia*, 53(3), 335-343.

Hammer, K. 1., Carson, CF e Riley, TV (2003). Atividade antifúngica dos componentes do óleo de *Melaleuca alternifolia* (tea tree). *Journal of Applied Microbiology*, 95 (4), 853-860.

Hassan, SB, Gali-Muhtasib, H., Göransson, H., & Larsson, R. (2010). Alfa terpineol: um potencial agente anticancerígeno que age através da supressão da sinalização de NF- κ B. *Anticancer Research*, 30 (6), 1911-1919.
<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>

Husain, N., & Verma, N. (2011). Conceitos curiosos em patologia do sarcoma de tecidos moles. *Jornal indiano de oncologia cirúrgica*, 2 (4), 302-308.

Kawaguchi, S., Nakamura, T., Yamamoto, A., Honda, G., & Sasaki, Y. F. (2010). Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?. *Journal of nucleic acids*, 2010; 2010: 541050. doi:10.4061/2010/541050

Kenis, H., Zandbergen, H. R., Hofstra, L., Petrov, A. D., Dumont, E. A., Blankenberg, F. D., ... & Narula, N. (2010). Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging. *Journal of nuclear medicine*, 51(2), 259.
10.2967/jnumed.109.068429

Khaleel, C., Tabanca, N., & Buchbauer, G. (2018). α -Terpineol, a natural monoterpene: a review of its biological properties. *Open Chemistry*, 16 (1), 349-361.
<https://doi.org/10.1515/chem-2018-0040>

Kocaman, AY, Rencüzoğulları, E., Topaktaş, M., Istifli, ES, e Büyükleyla, M. (2011). Os efeitos do 4-thujanol sobre as aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e micronúcleos em linfócitos humanos de sangue

periférico. *Cytotechnology* , 63 (5), 493.
<https://doi.org/10.1007/s10616-011-9372-7>

Kumar, D., Sukapaka, [M.](#), Kiran Babu, GD & Padwad, Y. (2015) . Chemical composition and in vitro cytotoxicity of essential oils from leaves and flowers of *Callistemon citrinus* from western Himalayas. *Plos one*, 10 (8).
10.1371 / journal.pone.0133823

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

LLana-Ruiz-Cabello, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2014). Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III-and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food and chemical toxicology*, 72, 122-128.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.013>

Lorent, J., Lins, L., Domenech, O., Quetin-Leclercq, J., Brasseur, R., & Mingeot-Leclercq, M. P. (2014). Domain formation and permeabilization induced by the saponin α -hederin and its aglycone hederagenin in a cholesterol-containing bilayer. *Langmuir*, 30(16), 4556-4569.

Maggi, F., Fortuné Randriana, R., Rasoanaivo, P., Nicoletti, M., Quassinti, L., Bramucci, M., ... & Vittori, S. (2013). Chemical composition and in vitro biological activities of the essential oil of *Vepris macrophylla* (Baker) I. *Química e biodiversidade* , 10 (3), 356-366.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201200253>

Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., & Basu, J. (2005). Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39460-39467.
10.1074 / jbc.M506928200

Manjamalai, A., & Grace, V. M. (2012). Antioxidant activity of essential oils from *Wedelia chinensis* (Osbeck) in vitro and in vivo lung cancer bearing C57BL/6 mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(7), 3065-3071.
0.7314 / APJCP.2012.13.7.3065

Moghimi, M., Parvardeh, S., Zanjani, TM e Ghafghazi, S. (2016). Efeito protetor do α -terpineol contra o comprometimento da plasticidade sináptica hipocampal e da memória espacial após isquemia cerebral transitória em ratos. *Jornal iraniano de ciências médicas básicas* , 19 (9), 960.

Nakamura, H., Yasui, Y., Saito, N., Tachibana, A., Komatsu, K., & Ishizaki, K. (2006). DNA repair defect in AT cells and their hypersensitivity to low-dose-rate

radiation. *Radiation research*, 165(3), 277-282. <https://doi.org/10.1667/RR3519.1>

Nogueira, L., Ruiz-Ontañón, P., Vazquez-Barquero, A., Moris, F., & Fernandez-Luna, J. L. (2011). The NFκB pathway: a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget*, 2(8), 646.

<https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.322>

Parvardeh, S., Moghimi, M., Eslami, P., & Masoudi, A. (2016). A-Terpineol attenuates morphine-induced dependence and physical tolerance in mice: the role of nitric oxide. *Jornal iraniano de ciências médicas básicas*, 19 (2), 201.

Pavithra, P. S., Mehta, A., & Verma, R. S. (2018). Induction of apoptosis by essential oil from *P. missionis* in skin epidermoid cancer cells. *Phytomedicine*, 50, 184-195. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.004>

Peres, L. A. B., & Cunha Júnior, A. D. D. (2013). Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 35(4), 332-340. <http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20130052>

Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., & Lavrik, I. N. (2015). Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of immunological methods*, 423, 99-103.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.025>

Pita, JCLR, Xavier, Sousa, TKGD, Manguiera, VM, Tavares, JF, Júnior, RJDO, e Ávila, VDMR (2012). Efeito antitumoral in vitro e in vivo do trachylobane-360, um diterpeno da *Xylopia langsdorffiana*. *Moléculas*, 17 (8), 9573-9589.

Post, S. M. (2012). Mouse models of sarcomas: critical tools in our understanding of the pathobiology. *Clinical sarcoma research*, 2(1), 20.

<https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-20>

Silva, W. J. M. D., & Ferrari, C. K. B. (2011). Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, 441-451. <http://dx.doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005>

Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C., & de Sousa, D. P. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014.

Souza, E. L., Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Conceição, M. L., & Gomes Neto, N. J. (2013). Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 29-36.

Speit, G., & Rothfuss, A. (2012). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In *DNA Repair Protocols* (pp. 79-90). Humana Press, Totowa, NJ.

Strober, W. (2015). Teste de exclusão de azul tripano da viabilidade celular. *Protocolos*

atuais em imunologia , 111(1), A3-B.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

Suhail, M. M., Wu, W., Cao, A., Mondalek, F. G., Fung, K. M., Shih, P. T., ... & Lin, H. K. (2011). Boswellia sacra essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1), 129.

Swartz, M. A., & Lund, A. W. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nature Reviews Cancer*, 12(3), 210.10.1038/nrc3186.

Taherkhani, M. (2016). Chemical Constituents, Antimicrobial, Cytotoxicity, Mutagenic and Antimutagenic Effects of Artemisia ciniformis. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 15(3), 471.

Taylor, BJ, Nik-Zainal, S., Wu, YL, Stebbings, LA, Raine, K., Campbell, PJ, & Neuberger, MS (2013). As desaminases de ADN induzem chuveiros de mutao associados a ruptura com implantação de APOBEC3B e 3A em kataegis de cancro da mama. *Elife* , 2 , e00534.
<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00534>

Wang, Z. e Sun, Y. (2010). Alvejando p53 para a terapia anticancerosa nova. *Oncologia translacional* , 3 (1), 1-12.

Wong, RS (2011). Apoptose no câncer: da patogênese ao tratamento. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* , 30 (1), 87..

Wu, S., Blackburn, K., Amburgey, J., Jaworska, J., & Federle, T. (2010). A framework for using structural, reactivity, metabolic and physicochemical similarity to evaluate the suitability of analogs for SAR-based toxicological assessments. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56(1), 67-81. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/953451>

Zengin, A. C. A., Çolak, S. M., Zengin, G., & Kiliç, E. (2014). Eco-friendly soaking process using tannic acid as an alternative bactericide. *Archives of Environmental Protection*, 40(1), 3-12. <https://doi.org/10.2478/aep-2014-0003>.

Anexo A – Normas da Revista

Author Guidelines

TABLE OF CONTENTS

1. [Submission](#)
2. [Aims and Scope](#)
3. [Manuscript Categories and Requirements](#)
4. [Preparing the Submission](#)
5. [Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
6. [Author Licensing](#)
7. [Publication Process After Acceptance](#)
8. [Post-Publication](#)
9. [Contact Details](#)

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission of a paper will be held to imply that it is unpublished work which is not being considered for publication elsewhere. If accepted, it is expected that the paper will not be published in another journal or book in either the same or another format or language.

Once the submission has been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online via ScholarOne at mc.manuscriptcentral.com/jcb-wiley. Click [here](#) for more details on how to use ScholarOne.

The submission system will prompt the author to use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish their work from that of other researchers. [Click here](#) to find out more.

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

For help with submissions, authors should contact the Editorial Office: jillian.holland@med.uvm.edu.

Preprints

The *Journal of Cellular Biochemistry* will consider submissions that have previously been made available online, either on a preprint server like arXiv, bioRxiv, or PeerJ PrePrints, or on the authors' own website. However, any such submissions must not have been published in a scientific journal, book or other venue that could be considered formal publication. Authors must inform the editorial office at submission if their paper has been made available as a preprint.

- Authors of accepted papers that were made available as preprints must be able to assign copyright to The *Journal of Cellular Biochemistry*, or agree to the terms of the Wiley Open Access agreement and pay the associated fee.
- Given that the measurable impact of the article is diminished when citations are split between the preprint and the published article, authors are required to:
 - Update the entry on the preprint server so that it links to and cites the DOI for the published version
 - Cite only the published article themselves

[Return to the Table of Contents](#)

2. AIMS AND SCOPE

The *Journal of Cellular Biochemistry* publishes descriptions of original research in which complex cellular, pathogenic, clinical, or animal model systems are studied by biochemical, molecular, genetic or quantitative ultrastructural approaches. Submission of papers reporting genomic and proteomic approaches to identify and characterize parameters of biological control in a cellular context are encouraged. The areas covered include, but are not restricted to, conditions, agents, regulatory processes, or differentiation states that influence structure, cell cycle & growth control, structure-function relationships, or assembly mechanisms in cells, viruses, or supramolecular constructs, and signaling mechanisms mediating transcription. This scope extends to cell structure and function; organelle assembly; regulation of cell organization, reproduction or differentiation; stem cell biology, non-coding RNAs, the architectural organization and compartmentalization of nucleic acids and regulatory proteins within the nucleus and cytoplasm; the dynamics of intranuclear trafficking, placement and assembly of regulatory machinery for genetic and epigenetic control of gene expression; and to the development, organization or remodeling of tissues.

[Return to the Table of Contents](#)

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

The *Journal of Cellular Biochemistry* publishes the following contribution types:

- Research Articles
- View Points
- Letter to the Editor
- Prospects
- Benchmarks

[Return to the Table of Contents](#)

4. PREPARING THE SUBMISSION

Cover Letters

Submissions should include a cover letter. The cover letter must state that the manuscript has not been submitted or published at any other journal, the researchers' compliance with local, state and national regulations for use of animal or human subjects, and anything else the author wishes for the editor to know. This could be specific questions the author wishes for reviewers to address, or suggestions for reviewers.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#));
- A short running title of less than 40 characters;
- The full names of the authors;
- The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- Acknowledgments;
- Abstract and keywords;
- Main text;
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);
- Figure legends;
- Appendices (if relevant)

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Authorship

Please refer to The *Journal of Cellular Biochemistry*'s Authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

The Abstract should be clearly written in 300 words or less and should succinctly state the objectives of the study, experimental design, major observations and conclusions, and their major significance. The abstract should be intelligible to neuroscientists in general and should thus be free of specialized jargon and abbreviations. References should generally not be cited in the abstract, but if they are, the complete citation should be given. Please provide main keywords.

Keywords

Please provide up to 5-7 keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh.

Main Text

- The *Journal of Cellular Biochemistry* uses British/US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

References

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. References should be limited to 50. (A maximum of 25 table and figure footnotes is allowed if necessary).

Examples of APA references are listed below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486.

<http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483>

Book

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Internet Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from www.youtube.com/watch?v=Vja83KLOXZs

Endnotes

Endnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep endnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper.

Footnotes

Footnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep footnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive—the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. Click [here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

No more than 8 figures may be presented, approximately equivalent to 3 pages-worth total.

Color Figures

Figures submitted in color may be reproduced in color online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If an author would prefer to have figures printed in color in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Click [here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the [Bureau International des Poids et Mesures \(BIPM\)](#) website for more information about SI units.
- **Numbers:** Numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

Resource Identification Initiative

The *Journal of Cellular Biochemistry* supports the [Resource Identification Initiative](#), which aims to promote research resource identification, discovery, and reuse. This initiative, led by the [Neuroscience Information Framework](#) and the [Oregon Health & Science University Library](#), provides unique identifiers for antibodies, model organisms, cell lines, and tools including software and databases. These IDs, called Research Resource Identifiers (RRIDs), are machine-readable and can be used to search for all papers where a particular resource was used and to increase access to critical data to help researchers identify suitable reagents and tools.

Authors are asked to use RRIDs to cite the resources used in their research where applicable in the text, similar to a regular citation or Genbank Accession number. For antibodies, authors should include in the citation the vendor, catalogue number, and RRID both in the text upon first mention in the Methods section. For software tools and databases, please provide the name of the resource followed by the resource website, if available, and the RRID. For model organisms, the RRID alone is sufficient.

Additionally, authors must include the RRIDs in the list of keywords associated with the manuscript.

To Obtain Research Resource Identifiers (RRIDs):

1. Use the [Resource Identification Portal](#), created by the Resource Identification Initiative Working Group.
2. Search for the research resource (please see the section titled “Search Features and Tips” for more information).
3. Click on the “Cite This” button to obtain the citation and insert the citation into the manuscript text.

If there is a resource that is not found within the Portal, authors are asked to register the resource with the appropriate resource authority. Information on how to do this is provided in the “Resource Citation Guidelines” section of the Portal.

If any difficulties in obtaining identifiers arise, please contact rii-help@scicrunch.org for assistance.

Example Citations:

Antibodies: "Wnt3 was localized using a rabbit polyclonal antibody C64F2 against Wnt3 (Cell Signaling Technology, Cat# 2721S, RRID: AB_2215411)"

Model Organisms: "Experiments were conducted in *c. elegans* strain SP304 (RRID:CGC_SP304)"

Cell lines: "Experiments were conducted in PC12 CLS cells (CLS Cat# 500311/p701_PC-12, RRID:CVCL_0481)"

Tools, Software, and Databases: "Image analysis was conducted with CellProfiler Image Analysis Software, V2.0 (<http://www.cellprofiler.org>, RRID:nif-0000-00280)"

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, we encourage authors to consult Wiley’s best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

Editing, Translation, and Formatting Support: [Wiley Editing Services](#) can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English

language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

Video Abstracts

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in *The Journal of Cellular Biochemistry*. You can learn more about it by clicking [here](#). If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available [here](#).

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used). Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form](#) available for use.

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the [ARRIVE guidelines](#) for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the [US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), the [US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#), and [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).

- UK authors should conform to UK legislation under the [Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986 Amendment Regulations \(SI 2012/3039\)](#).
- European authors outside the UK should conform to [Directive 2010/63/EU](#).

Clinical Trial Registration

The *Journal of Cellular Biochemistry* requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognized research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- Randomised trials: [CONSORT](#)
- Observational studies: [STROBE](#)
- Systematic reviews: [PRISMA](#)
- Case reports: [CARE](#)
- Qualitative research: [SRQR](#)
- Diagnostic / prognostic studies: [STARD](#)
- Quality improvement studies: [SQUIRE](#)
- Economic evaluations: [CHEERS](#)
- Animal pre-clinical studies: [ARRIVE](#)
- Study protocols: [SPIRIT](#)
- Clinical practice guidelines: [AGREE](#)

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- [Future of Research Communications and e-Scholarship \(FORCE11\)](#)
- [National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines](#)
- [The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues](#)
- [Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities \(MIBBI\) website](#)
- [FAIRsharing website](#)

Species Names

Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; examples of acceptable nomenclature are provided here: varnomen.hgvs.org.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: ‘*These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number #####*’. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): www.ddbj.nig.ac.jp
- EMBL Nucleotide Archive: www.ebi.ac.uk/ena
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: www.expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflict of Interest

The *Journal of Cellular Biochemistry* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; and
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and

3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. ‘X and Y should be considered joint first author’ or ‘X and Y should be considered joint senior author.’

Data Sharing and Data Accessibility

The *Journal of Cellular Biochemistry* encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Publication Ethics

The *Journal of Cellular Biochemistry* is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note The *Journal of Cellular Biochemistry* uses iThenticate’s CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley’s Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley’s Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

ORCID

As part of The *Journal of Cellular Biochemistry*’s commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more information [here](#).

6. AUTHOR LICENSING

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal’s standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please click [here](#). (Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used; to check this please click [here](#).)

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal’s standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific

conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: Authors who choose to publish using OnlineOpen will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted Article Received in Production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). They will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The *Journal of Cellular Biochemistry* offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts accepted for publication. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final version article (the Version of Record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Accepted Articles are indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Proofs

Once the paper has been typeset, the author will receive an email notification of the URL from where to download the typeset page proofs of the article in PDF format; associated forms and full instructions on how to correct and return the file are also provided.

Authors are responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process and thus the proofs must be checked carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt.

Publication Charges

There are no mandatory charges to authors publishing in the *Journal of Cellular Biochemistry*.

Authors may choose to publish in an open access format through OnlineOpen, which carries a fee (see the section on Author Licensing).

Color figures may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in color in print. If the author supplies color figures at Early View publication, they will be invited to complete a color charge agreement in RightsLink for Author Services. The author will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or they can request an invoice. If the author chooses not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

Cover Image Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow [these general guidelines](#).

Early View

The *Journal of Cellular Biochemistry* offers rapid publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) articles (first online Version of Record) are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue of the *Journal of Cellular Biochemistry*. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as the proofs are carefully reviewed. Once the article is published in Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable using the Digital Object Identifier (DOI) and carries an online publication date.

[Return to the Table of Contents](#)

8. POST PUBLICATION

Access and Sharing

When an article is published online:

- The author will receive an email alert (if requested).
- Authors can share a link to their published article through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- For non-open access articles, the corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting an Article

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in the *Journal of Cellular Biochemistry*. You can learn more about it [here](#). If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

For ideas and guidance on how to self-promote a research article, authors should visit www.wileyauthors.com/maximize.

Measuring the Impact of an Article

Wiley helps authors to measure the impact of their research through specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

[Return to the Table of Contents](#)

9. CONTACT DETAILS

A complete list of contacts for the *Journal of Cellular Biochemistry* is available on the journal's [Contacts page](#).

Author Guidelines updated June 5, 2018

[Return to the Table of Contents](#)

ANEXO B- Carta de aceite para manutenção do Sarcoma 180 e realização do projeto.



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

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Avaliação toxicogenética e antitumoral do α -terpineol em estudos in vitro e pré-clínico*", registrada nº 416/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JOÃO MARCELO DE CASTRO E SOUSA do Departamento de Biologia do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/06/2018**.

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

Teresina, 15 de Junho de 2018.


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(X) Monografia
() Artigo

Eu, *Kariely Gonçalves de Moura*, autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação **Efeitos antitumorais do monoterpeno alfa-terpineol em modelo animal de Sarcoma 180** de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI, 19 de dezembro de 2018.

Kariely Gonçalves de Moura
Assinatura

Assinatura