

SCREENING DE PLANTAS NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL QUANTO AO SEU POTENCIAL CITOTÓXICO NA LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA KB

Lucas Umpierre Conter¹

Naiana Silvia Soares Correa²

Érica Ballestreri³

Alexandre de Barros Falcão Ferraz⁴

Ivana Grivicich⁵

RESUMO

A busca por novas opções terapêuticas no câncer oral, como o uso de agentes derivados de plantas, tem ganhado destaque nas pesquisas clínicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica, pelo ensaio da Sulforodamina B, e antioxidante, pelo ensaio de DPPH, de seis extratos etanólicos derivados de plantas nativas do Rio Grande do Sul na linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca KB. Quatro desses extratos apresentaram atividade citotóxica em concentrações variando de 45,0 a 63,0 µg/mL, sendo que *V. immarginata* também demonstrou significativa atividade antioxidante. Nossos achados sugerem que o efeito citotóxico e antioxidante observado podem estar associados com a presença de flavonoides e compostos fenólicos.

Palavras-chave: Câncer oral, citotoxicidade, flavonoides, antioxidante.

ABSTRACT

The search for new therapeutic options in oral cancer, such as treatment with natural agents, has gained prominence in clinical research. Therefore, the aim of this study was evaluated the cytotoxicity, using the sulforhodamine B assay, and antioxidant activity, using DDPH method, of six ethanol extracts of native plants from Rio Grande do Sul in KB oral squamous carcinoma cell line. Four of these extracts showed cytotoxic activity cytotoxicity at concentration between 40 and 60 µg/mL and *Viguiera immarginata* also showed antioxidant capacity in this cell line. Our findings suggest that the observed effects could be related to the presence of flavonoids and phenolic compounds in the extract.

Keywords: Oral cancer; cytotoxicity, flavonoids, antioxidant.

¹ Acadêmico do curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/Fapergs

² Acadêmica do curso de Biomedicina/ULBRA

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

⁴ Professor dos Cursos de Farmácia e Biomedicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

⁵ Professora-Orientadora dos Cursos de Medicina e Biomedicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (grivicich@terra.com.br)

INTRODUÇÃO

O câncer de cavidade oral é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. O Brasil corresponde ao terceiro país com maior número de casos no mundo, com mais de 14 mil notificações por ano e uma taxa de mortalidade nos últimos 30 anos, correspondendo a 5%, sendo o oitavo tipo de câncer mais comum (MONTENEGRO; VELOSO; CUNHA, 2014; OMAR, 2015). A última estimativa para o Brasil, no ano de 2014, apontou cerca de 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

O perfil dos indivíduos mais acometidos pelo câncer de boca é caracterizado por homens, brancos, na faixa etária entre 50 e 70 anos de idade, trabalhadores expostos ao sol, usuários crônicos de tabaco, álcool ou a associação destes (DOMINGOS; PASSALACQUA; OLIVEIRA, 2014). Embora existam outros tipos que apresentam menor incidência, o carcinoma de células escamosas, também denominado, espinocelular, epidermoide ou escamocelular, é o tipo histológico neoplásico mais comum, totalizando mais de 90% dos tumores malignos que acometem os tecidos bucais, geralmente precedido por displasia e apresentando lesões epiteliais brancas na mucosa oral (INCA, 2015; OMAR, 2015).

O tratamento desse tipo de tumor depende, de um modo geral, da localização, do grau histológico, do estadiamento e das condições físicas do paciente, sendo as principais modalidades a cirurgia, radioterapia e quimioterapia associadas ou não (BRENER et al., 2007). Entretanto, tais procedimentos podem ter um efeito devastador sobre a respiração, deglutição, fala e, em consequência, impacto negativo sobre a qualidade da vida do paciente. Além disso, apesar de todos os avanços no diagnóstico e na terapêutica, alguns pacientes não respondem a nenhum tipo de tratamento (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014). Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo realizados na busca de novas opções terapêuticas, como a identificação de novas moléculas com potencial antineoplásico, derivadas de fontes vegetais (DA ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001; OZI et al., 2011; OVADIE et al, 2015).

A busca por esses compostos com atividade antitumoral vem crescendo nos últimos anos. Mais de 50% dos medicamentos anticâncer são derivados de fontes naturais. Porém, a identificação de mecanismos de ação desses novos compostos não foi totalmente explorada. Associado ao potencial antitumoral, alguns desses agentes apresentam capacidade de inibição de radicais livres e redução do dano oxidativo (FRANÇA et al., 2012; SILVA, 2013; OVADJE et al, 2015).

Dentre as espécies de plantas medicinais que vem sendo apontadas por apresentarem tais propriedades estão o *Piper amalago*, conhecido como falso-jaborandi, utilizado no tratamento de queimaduras, problemas digestivos e cardíacos, além de possuir propriedades antioxidantes; *Piper mikanianum*, popularmente conhecido como jaguarandi, utilizado para tratamento de amenorreias e distúrbios estomacais; *Eupatorium laevigatum*, conhecido como eupatório, erva-formigueiro, cambará, ou cambarazinho, é empregado na medicina popular no tratamento de inflamações e dor, além de ação antitumoral; *Gordonia fruticosa*, conhecida

como pinho-de-campo e Santa-Rita, tem demonstrado potencial no tratamento de câncer, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares; *Artemisia verlotorum*, conhecida como losna, possui propriedades cicatrizantes e antiparasitárias, além de ter demonstrado efeito citotóxico *in vitro*; e *Viguiera immarginata*, que assim com a *A. verlotorum*, pertence a família Asteraceae, apresenta flavonoides e terpenoides, além da produção de lactonas sesquiterpênicas com atividade anti-inflamatória (PEDRALI; IRGANG, 1982; KILLEEN; GARCIA; BECK, 1993; TAN; ZHENG; TANG, 1998; SCHILLING et al., 2000; MUSCHIETTI et al., 2001; SANTOS et al., 2009; MOMESSO; MOURA; CONSTANTINO, 2009; BOONE, 2011; TOKARNIA et al., 2012; ZHANG et al., 2014; SANTOS et al., 2015). Diante dessas propriedades, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citotóxica e antioxidante, além do perfil fitoquímico dos extratos etanólicos obtidos das folhas de seis plantas nativas do Rio Grande do Sul na linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca KB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Escolha do Material Vegetal

Foram utilizados, extratos etanólicos obtidos das folhas de *Viguiera immarginata*, *Piper amalago*, *Piper mikanianum*, *Eupatorium laevigatum*, *Gordonia fruticosa*, *Artemisia verlotorum*, plantas nativas do Rio Grande do Sul, que se encontravam armazenadas no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Preparo dos extratos

As folhas das plantas foram secas à temperatura ambiente em local arejado e sem exposição direta de luz. Uma exsiccata de cada espécie, identificada pelo Dr. S. Bordignon (Unilasalle, Canoas, RS, Brasil), está depositada no herbário da Universidade Luterana do Brasil (HERULBRA), Canoas, RS, Brasil.

Para obtenção dos extratos brutos etanólicos, as folhas secas de cada espécie foram trituradas em moinho de facas e, posteriormente, submetidas a extração com etanol em soxhlet (5 x 48 h). Após este período, o extrato bruto de cada uma das seis espécies estudadas foi filtrado e concentrado a secura em aparelho de evaporação rotatória sob temperatura inferior a 50 °C.

Manutenção da Linhagem Celular

A linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca KB foi obtida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e mantidas a temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de 95%.

Avaliação da Atividade Citotóxica

A avaliação do efeito citotóxico dos extratos vegetais foi realizada pelo ensaio colorimétrico da sulforodamina B (SRB) (SKEHAN et al., 1990). Para isso, as células

foram inoculadas em microplacas de 96 poços em uma densidade de 3×10^4 células/poço/100 μL . Após estabilização por 24 horas, as culturas foram tratadas com concentrações seriadas (0-100 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólicos obtidos das folhas durante 72 horas. A seguir, as células foram fixadas *in situ* com ácido tricloroacético (TCA, 50%) por 2 h, e após a remoção do TCA as placas foram secas e coradas com solução de SRB (0,4%). O excesso de SRB foi removido com ácido acético (1%) e o SRB ligado às proteínas foi solubilizado com base Trizma (10 mM). O SRB ligado é proporcional à densidade celular e foi determinado através das absorvâncias, medidas em leitor de microplacas em comprimento de onda de 540 nm. A partir deste ensaio determinamos os valores de IC_{50} (quantidade de extrato necessária para inibir 50% do crescimento celular). Foi utilizado como controle positivo o antineoplásico etoposídeo. Os valores da atividade citotóxica foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$).

Determinação de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo total de compostos fenólicos no extrato bruto de *V. immarginata* foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu. Para a preparação da curva de calibração será utilizada 1 mL das soluções de ácido gálico em etanol nas concentrações de 0,015, 0,024, 0,075 e 0,105 mg/mL que serão misturadas com 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL de carbonato de sódio (75 g/L) (SINGLETON & ROSSI, 1965). A absorção será lida após 30 minutos no comprimento de onda de 765 nm. Para o teste, será utilizado 1 mL do extrato na concentração de 0,1 mg/mL. Será adicionado 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL de carbonato de sódio (75 g/L). Após 1 h, será lida a absorvância em 765 nm. O valor obtido através da substituição da absorvância do teste na curva foi convertido para expressar o resultado em compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico em mg/g de extrato (MILIAUSKAS et al., 2004).

Determinação de Flavonoides

A quantificação de flavonoides do extrato bruto de *V. immarginata* foi realizada através da metodologia descrita por WOISKY e SALATINO (1998), em que é utilizada a solução de cloreto de alumínio a 2,5%. A técnica baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides presentes na amostra. Iniciar o teste, pesando-se 0,05 g do extrato aquoso liofilizado e o diluindo em 25 mL de etanol. Transferindo-se 2 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 25 mL, adicionar 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% e completar o volume com etanol até a demarcação presente no balão. Para a preparação do branco, diluir 1 mL da solução de cloreto de alumínio com etanol em balão volumétrico de 25 mL. Aguardar por 30 minutos e proceder à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm. O teor de flavonoides deve ser calculado através da equação da reta obtida na curva de calibração de quercetina, onde se substituiu o y pela absorvância encontrada e obteve-se a relação de miligramas de flavonoides equivalentes de quercetina (EQ) por mililitro de extrato. A curva foi construída da mesma maneira que as amostras testadas, nas concentrações de 0,002 até 0,008 mg/mL. O valor obtido através da substituição da absorvância do teste na curva foi convertido para expressar o resultado em flavonoides equivalentes de quercetina em mg/g de extrato.

Determinação da Atividade Antioxidante Através do Método DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto de *V. immarginata*, utilizou-se o método *in vitro* com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O extrato bruto (10 mg) foi diluído em metanol (MeOH) para a obtenção das concentrações desejadas. Transferiu-se 2,5 mL de amostra para cubetas de 3,5 mL e adicionou-se 1 mL da solução de DPPH na concentração de 0,2 mg/mL. Para cada amostra, foi confeccionado um controle negativo, que consiste na amostra sem o DPPH, e o controle positivo, que consiste em apenas 1 mL de DPPH diluído em 2,5 mL de metanol. Como padrão foi utilizado a rutina. Após 30 minutos, foi verificada a absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de ondas de 517 nm (MENSOR et al., 2001). Foi estabelecida a faixa em que o extrato apresenta o início da atividade antioxidante e realizada às seguintes diluições para o teste: 2 µg/mL; 8 µg/mL; 16 µg/mL; 32 µg/mL e 40 µg/mL. A porcentagem de inibição de DPPH, que diz respeito à atividade antioxidante, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição de DPPH} = \frac{[(\text{Abs controle}(+) - \text{Abs amostra}) \times 100]}{\text{Abs controle}(+)}$$

Após a obtenção das porcentagens de inibição, esses dados foram utilizados para calcular a concentração inibitória para 50% de radicais livres (IC_{50}).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Teste *t* de Student, considerando valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (versão 5; GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

O efeito citotóxico dos seis extratos foi avaliado após 72 horas de exposição na linhagem celular KB. *V. immarginata* demonstrou maior efeito citotóxico (IC_{50} 45,9 µg/mL) seguido do extrato de *P. amalago*, *A. verlotorum* e *E. laevigatum* respectivamente (IC_{50} 53,6; 59,1 e 63,6 µg/mL), apesar de não demonstrarem diferença estatística. Os extratos de *P. mikanianum* e *G. fruticosa* não demonstraram atividade antiproliferativa nas doses testadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (Média ± Desvio Padrão) dos extratos etanólicos das folhas obtidas de plantas do Rio Grande do Sul e do antineoplásico etoposídeo (controle positivo) na linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca KB.

Tratamento	Valores de IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Viguiera immarginata</i>	45,9 ± 5,3**
<i>Piper amalago</i>	53,6 ± 5,6**
<i>Piper mikanianum</i>	ND*
<i>Eupatorium laevigatum</i>	63,6 ± 7,8**
<i>Gordonia fruticosa</i>	ND*
<i>Artemisia verlotorum</i>	59,1 ± 6,3**
<i>Etoposídeo</i>	8,3 ± 1,3

*ND – não detectado; **Estatisticamente diferente do controle positivo etoposídeo ($p < 0,05$; Teste *t* de Student).

Considerando que a *V. immarginata* apresentou um IC₅₀ mais próximo a 30 µg/mL, valor esse considerado pelo *National Cancer Institute* (EUA) como sendo de interesse para extratos brutos com potencial anticâncer (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990), os estudos seguintes foram realizados apenas com esse extrato.

A análise fitoquímica do extrato de *V. immarginata* demonstrou que o teor de compostos fenólicos foi de 167,19 ± 3,92 mg/g de extrato equivalentes ao ácido gálico e de flavonoides de 4,59 ± 0,29 mg/g de extrato equivalentes a quercetina. Na avaliação do potencial antioxidante do extrato de folhas de *V. immarginata* através do método *in vitro* com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) obtivemos o resultado de IC₅₀ 92,96 ± 3,41 µg/mL. Como padrão foi utilizado o flavonoide denominado rutina (IC₅₀ 22,62 ± 1,0).

DISCUSSÃO

A procura por novos agentes antineoplásicos mais efetivos e seletivos, com menor toxicidade e efeitos adversos, está cada vez mais em ascensão. Estudos demonstraram que o tratamento com agentes naturais possuem alta atividade antitumoral (FLOGIO et al., 2010; OZI et al., 2011). Neste sentido, avaliamos a atividade citotóxica de seis extratos etanólicos de plantas oriundas do estado do Rio Grande do Sul e observamos efeito citotóxico na linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca KB em quatro desses extratos (*P. amalago*, *A. verlotorum*, *E. laevigatum* e *V. immarginata*).

Apesar de vários estudos com o gênero *Piper*, não existem muitos resultados sobre a sua atividade citotóxica. Foglio et al. (2010) demonstraram em estudo com nove linhagens celulares expostas a *P. regnellii*, a presença de uma lignana que estaria associada com a atividade antitumoral observada. As espécies *P. guineense*, *P. nigrum*, *P. umbellatum* e *P. caninum* demonstraram propriedades antioxidantes e citotóxicas *in vitro* (AGBOR et al, 2006; TAN; YIN; CHAN, 2013). As raízes de *P. boehmerifolium* mostraram efeito citotóxico em células de câncer cervical humano com IC₅₀ 2,7 µg/mL (WANG et al., 2014).

Artemisia verlotorum possui como metabólitos secundários flavonoides, cumarinas, polifenóis e alcaloides, frequentemente associados com potencial citotóxico (LOPES et al., 2003). Em um estudo do nosso grupo, avaliando extrato orgânico das folhas da *A. verlotorum*, verificamos um efeito citotóxico em linhagem celular de câncer renal, estando esse efeito associado com aumento do dano oxidativo (MARX et al., 2010). Em outro estudo utilizando extrato orgânico das folhas dessa planta foi observado um efeito citotóxico nas linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão H460 e carcinoma de cólon HT-29 (LOPES et al., 2003). Outra espécie do gênero *Artemisia*, *A. capillaris*, demonstrou efeito citotóxico na mesma linhagem de nosso estudo (CHA et al., 2009).

Em relação a *E. laevigatum*, não existem relatos de potencial citotóxico. Porém, o extrato etanólico de outra espécie do gênero, *E. cannabinum*, demonstrou efeito citotóxico na linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29 (RIBEIRO-VARANDAS et al., 2014). Da mesma maneira, utilizando extratos orgânicos das folhas de *E. odoratum* foi demonstrado um efeito citotóxico na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7 (HARUN et al., 2012).

Existem poucos relatos sobre a ação farmacológica e constituição fitoquímica da espécie *V. immarginata*. Porém, as espécies pertencentes ao gênero *Viguiera*, pertence à família Asteraceae, tem como característica a presença de lactonas sesquiterpênicas e diterpenos (MOMESSO; MOURA; CONSTANTINO, 2009). Em um estudo com lactonas sesquiterpênicas isoladas de *V. sylvatica*, foi demonstrado um importante efeito citotóxico na linhagem celular derivada de câncer de pulmão A549 (TAYLOR et al., 2008). Em outro estudo, um macrolídeo isolado das partes aéreas de *V. hypargyrea* apresentou efeito citotóxico na linhagem celular de câncer de cérvix HeLa (ARELLANO-MARTÍNEZ; DELGADO, 2010). Na mesma linhagem celular de nosso estudo, carcinoma epidermoide de boca KB, foi relatado efeito citotóxico de outra planta da família Asteraceae, *Saussurea lappa* (MOON et al., 2013).

Sabe-se que flavonoides e outros compostos fenólicos presentes em plantas superiores são conhecidos por apresentarem potencial efeito antioxidante (OH et al., 2001; ZHENG; WANG, 2001). Assim, considerando a presença de fenóis e flavonoides no extrato das folhas de *V. immarginata*, avaliamos seu potencial antioxidante. Nossos resultados demonstraram um valor de IC_{50} $92,96 \pm 3,41$ $\mu\text{g/mL}$, indicando uma menor atividade antioxidante que o padrão utilizado, a rutina (IC_{50} $22,62 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$). Apesar da menor capacidade antioxidante em relação a rutina, o extrato de *V. immarginata*, tem atividade semelhante a outras espécies da família Asteraceae como *Acanthospermum australe* e *Ageratum conyzoides* (FABRI et al., 2011; FIDRIANNY; NADIA; RUSLAN, 2015). De acordo com Blois (2000), compostos com IC_{50} menor 50 $\mu\text{g/mL}$ são considerados com elevada atividade antioxidante, compostos com IC_{50} entre 50-100 $\mu\text{g/mL}$ possuem forte capacidade antioxidante, compostos com IC_{50} variando entre 101-150 $\mu\text{g/mL}$ apresentam média atividade antioxidante, e compostos com IC_{50} acima de 150 $\mu\text{g/mL}$ devem ser considerados fracos antioxidantes. Nesse sentido, podemos considerar que o extrato etanólico das folhas de *V. immarginata* apresenta um forte poder antioxidante e que, possivelmente, esse efeito antioxidante esteja associado com a presença de flavonoides e compostos fenólicos (MOMESSO; MOURA; CONSTANTINO, 2009).

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais avaliadas, verificou-se que quatro dos seis extratos obtidos de folhas de espécies nativas do Rio Grande do Sul apresentaram atividade citotóxica quando testados em células de carcinoma epidermoide de boca KB. Além disso, observou-se que o extrato de *V. immarginata* apresentou significativa capacidade antioxidante, possivelmente associada com a presença de flavonoides. Este é o primeiro estudo realizado avaliando o potencial citotóxico e antioxidante do extrato de folhas de *Viguiera immarginata*.

REFERÊNCIAS

AGBOR, G. et al. Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. **Nutrition Research**, v. 26, p. 659–663, 2006.

ARELLANO-MARTÍNEZA, R.; DELGADO, G. Hypargyirin A, a Hemiacetalic Germacrolide from *Viguiera hypargyrea* (Asteraceae). Biogenetic Implications and Biological Evaluation. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 54, p. 117-121, 2010.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of stable free radicals. **Nature**, v. 181, p. 1199-2000, 1958.

BOONE, C. V. **Estudo químico do óleo essencial das raízes de *Piper amalago***. 2011. 13f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2011.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 63-69, 2007.

CHA, J.D. et al. Essential oil of *Artemisia capillaris* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation mediated by MAPK-stimulated signaling pathway. **Journal of Food Science**, v. 74, p. T75-T81, 2009.

DA ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364-936, 2001.

DOMINGOS, P. A. D. S.; PASSALACQUA, M. L. D. C.; OLIVEIRA, A. L. B. M. Câncer bucal: um problema de saúde pública. **Revista de Odontologia da Universidade da Cidade de São Paulo**, v. 26, p. 46-52, 2014.

FABRI, R. L. et al. Antioxidant and antimicrobial potential of Asteraceae species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 183-189, 2011.

FAIZAH, B. T. et al. Autophagic Cell Death Is Induced by Acetone and Ethyl Acetate Extracts from *Eupatorium odoratum* In Vitro: Effects on MCF-7 and Vero Cell Lines. **The Scientific World Journal**, p. 439479, 2012.

FIDRIANNY, I.; NADIA, E.; RUSLAN W. K. In vitro antioxidant activities, total flavonoid, phenolic and carotenoid content from various extracts of four species asteraceae herb. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 192-197, 2015.

FOGLIO, M. A. et al. Identificação da neolignana Eupomatenóide-5 isolada da *Piper regnellii*(Miq.) C. DC. Var regnellii com atividade anticâncer *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33. 2010, ÁGUAS DE LINDÓIA. **Resumos**. Águas de Lindóia, SP, 2010.

GUIMARÃES, D. O. et al. Biological activities from extracts of endophyticfungi isolated from *Viguieraarenaria* and *Tithoniadiversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 134-144, 2008.

HUBER, M. A.; TANTIWONGKOSI, B. Oral and oropharyngeal cancer. **Medical Clinics of North America**, v. 98, p. 1299-1321, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. [Estimativa]. Brasília: INCA, 2014. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: maio 2015.

KILLEEN, T. J.; GARCIA, E. E.; BECK, S. G. Guia de arboles de Bolívia. **La Paz: Herbario Nacional de Bolívia**, n. 958, 1993.

LOPES, R. M. et al. Avaliação do efeito citotóxico de *Artemisia verlotorum* em linhagens de tumores humanos. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 16., 2003, PORTO ALEGRE. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 24-28.

MARX, C. et al. Efeito Citotóxico e dano oxidativo do extrato orgânico da *Artemisia verlotorum* em linhagens celulares de câncer humano. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, p. 1062-1066, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MOMESSO, L. S.; MOURA, R. M. X. DE; CONSTANTINO, D. H. J. Atividade antitumoral do *Ageratumconyzoides* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 19, p. 660-663, 2009.

MONTENEGRO, L. A. S.; VELOSO, H. H. P.; CUNHA, P. A. S. M. A. Papiloma vírus humano como fator carcinogênico e co-carcinogênico do câncer oral e da orofaringe. **Revista Odontológica do Brasil-Central**, v. 23, p. 1-9, 2014.

MOON, S. M. et al. Anticancer activity of *Saussurealappa* extract by apoptotic pathway in KB human oral cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 1372-1377, 2013.

MUSCHIETTI, L. et al. Phenolic Compounds with Anti-Inflammatory Activity from *Eupatorium buniifolium*. **Planta Medica**, v. 67, p. 743-744, 2001.

OH, T. Y. et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis implication of antioxidants in its treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 905-915, 2001.

OMAR, E. Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma – a systematic review. **Head & Face Medicine**, v. 11, p. 1-27, 2015.

OVADJE, P. et al. Advances in the research and development of natural health products as main stream cancer therapeutics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 751348, 2015.

OZI, J. M. et al. *In vitro* cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Brazilian Oral Research**, v. 25, p. 519-525, 2011.

PEDRALLI, G.; IRGANG, B. E. Estudos sobre a composição florística das formações vegetais da borda da Serra Geral: I - Município de Bento Gonçalves, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Roessléria**, v. 4, p. 136-144, 1982.

RIBEIRO-VARANDAS, E. et al. Cytotoxicity of *Eupatorium cannabinum* L. ethanolic extract against colon cancer cells and interactions with Bisphenol A and Doxorubicin. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 264, 2014.

SANTOS, M. S. dos. et al. Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amalago*, *P. mikanianum* e *p. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 8, p. 65-71, 2009.

SANTOS, V. L. P. et al. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 25, p. 1-7, 2015.

SCHILLING, E. E. et al. Brazilian species of *Viguiera* (Asteraceae) exhibit low levels of ITS sequence variation. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 3, p. 323-332, 2000.

SILVA, M. B. **Avaliação *in vivo* do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato obtido das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl. Através do teste de micronúcleo em camundongos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

SINGLETON V. L.; ROSSI Jr J. A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays Related to Cancer Drug Discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. London: Acad. Press, 1990. p. 71-133.

- TAN, L. Y.; YIN, W. F.; CHAN, K. G. *Piper nigrum*, *Piper betel* and Gnetum-natural food sources with anti-quorum sensing properties. **Sensors** (Basel), v. 13, p. 3975-3985, 2013.
- TAN, R. X.; ZHENG, W. F.; TANG, H. Q. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. **Planta Medica**, v. 64, p. 295-302, 1998.
- TAYLOR, P. G. et al. Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguierasylvatica* and *Decachaetathieleana*. **Fitoterapia**, v. 79, p. 428-432, 2008.
- TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas Tóxicas do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012.
- WANG, Y. H. et al. Anticancer Principles from Medicinal *Piper* (Hú Jiāo) Plants. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, p. 8-16, 2014.
- WOISKY, R. G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo: USP, 1996.
- ZHANG, W. et al. Molecular phylogeny of tribe Theeae (*Theaceae*s.s.) and its implications for generic delimitation. **Plos One**, v. 9, p. e98133, 2014.
- ZHENG, E.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5175, 2001.