

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE
*GUATTERIA OLIVACEA***

ALEXANDRE FRANCISCO CERQUEIRA GALVÃO

Salvador – Bahia

2022

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE
*GUATTERIA OLIVACEA***

ALEXANDRE FRANCISCO CERQUEIRA GALVÃO

Dissertação apresentada ao Curso Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Salvador – Bahia

2022

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

G182p Galvão, Alexandre Francisco Cerqueira

Potencial antineoplásico do óleo essencial das folhas de *guatteria olivacea*/ Alexandre Francisco Cerqueira Galvão. _ Salvador, 2022.

63 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. *Guatteria olivacea*. 2. citotoxicidade. 3. apoptose. 4. HepG2. I. Título.

CDU 665.52:616-006.6

ALEXANDRE FRANCISCO CERQUEIRA GALVÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 28 de junho de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Professor Associado II
UFPI

Dra. Ana Jérsia Araújo

Dra. Ana Jérsia Araújo
Professora
UFDpar

Karine Araújo Damasceno

Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Antonia Cerqueira e pai Jucelino Emanuel Galvão Ribeiro, pelo amor, dedicação, apoio incondicional em todas as circunstâncias da vida e pela confiança nos meus objetivos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório do grupo de pesquisa do IGM, Carol, Val, Luciano, Sara, Ingrid, Suellen, Larissa, Matheus, Felipe e Sheila pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimento e companhia.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, pela confiança e oportunidade, paciência, dedicação e suporte científico para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Rosane Borges Dias, pelo incentivo e suporte. Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelo apoio acadêmico.

A FIOCRUZ Bahia IGM, pelo apoio, estrutura e suporte necessários para a construção desta dissertação. Meu agradecimento ao CNPq e Capes, órgãos financiadores deste projeto. A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho minha gratidão.

GALVÃO, Alexandre Francisco Cerqueira. **Potencial antineoplásico do óleo essencial das folhas de *Guatteria olivacea*, Brasil**. 2022. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer é uma doença multifatorial causada pela proliferação descontrolada de células, que pode causar metástases. O uso de fármacos antineoplásicos constitui uma das mais relevantes modalidades terapêuticas empregadas na clínica oncológica. No entanto, por ser uma categoria de tratamento sistêmico, a maioria dos fármacos não é seletivo contra as células neoplásicas e atingem também células normais, especialmente aquelas com grande capacidade de renovação. Por isso, uma série de efeitos colaterais está associada a essa modalidade terapêutica, a exemplo de alopecia, náuseas, diarreias e mielossupressão. Desta forma, pesquisas por novos fármacos mais seletivos pra células cancerosas são necessárias. **OBJETIVO:** Esse trabalho visa avaliar o potencial antineoplásico *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial das folhas de *Guatteria olivacea* (OEGO) em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. **METODOLOGIA:** O OEGO foi obtido por hidrodestilação e sua composição química foi determinada por CG-DIC e CG-EM. Foram realizados ensaio de citotoxicidade pelo método do Alamar blue e determinação do ciclo celular e fragmentação do DNA, morte celular apoptótica e necrótica e quantificação das espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo. O estudo *in vivo* foi realizado em modelo de xenoinxerto em camundongos CB.17 SCID inoculados com células HepG2. **RESULTADOS:** Germacreno D, 1-epi-cubenol, óxido de cariofileno e espatulenol foram identificados como os constituintes químicos majoritários do OEGO. O OEGO apresentou valores de CI_{50} que variam de 4,46 a 45,98 $\mu\text{g/mL}$ para as células neoplásicas SCC4 e K562, respectivamente. Foram encontrados valores de CI_{50} de 44,62, >50 e >50 $\mu\text{g/mL}$ para as células não neoplásicas MRC-5, PBMC e BJ respectivamente. Foi observado aumento do DNA fragmentado e morte celular apoptótica em células HepG2 tratadas com OEGO. No modelo *in vivo*, a inibição da massa tumoral foi 57,9 e 32,8% nos animais tratados com as doses de 40 e 20 mg/kg de OEGO. **CONCLUSÕES:** O OEGO demonstrou potencial anticâncer *in vitro* e *in vivo*, destacando esse óleo essencial como um candidato para o desenvolvimento de um novo fitoterápico antineoplásico.

Palavras-chave: *Guatteria olivacea*, citotoxicidade, apoptose, HepG2.

GALVÃO, Alexandre Francisco Cerqueira. **Antineoplastic potential of essential oil from *Guatteria olivacea* leaves , Brasil**. 2022. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is a multifactorial disease caused by the uncontrolled proliferation of cells, which can cause metastases. The use of antineoplastic drugs is one of the most relevant therapeutic modalities used in the oncology clinic. However, as it is a systemic treatment category, most drugs are not selective against neoplastic cells and also affect normal cells, especially those with a high capacity for renewal. Therefore, a series of side effects are associated with this therapeutic modality, such as alopecia, nausea, diarrhea, and myelosuppression. Thus, research for new drugs more selective for cancer cells is necessary. **OBJECTIVE:** This work aims to evaluate the in vitro and in vivo antineoplastic potential of essential oil from *Guatteria olivacea* leaves (OEGO) in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **METHODOLOGY:** OEGO was obtained by hydrodistillation and its chemical composition was determined by GC-DIC and GC-MS. Alamar blue cytotoxicity assay and determination of cell cycle and DNA fragmentation, apoptotic and necrotic cell death and quantification of reactive oxygen species were performed. The in vivo study was performed in a xenograft model in CB.17 SCID mice inoculated with HepG2 cells. **RESULTS:** Germacrene D, 1-epi-cubenol, caryophyllene oxide and spathulenol were identified as the major chemical constituents of OEGO. The OEGO presented IC₅₀ values ranging from 4.46 to 45.98 µg/mL for neoplastic cells SCC4 and K562, respectively. IC₅₀ values of 44.62, >50 and >50 µg/mL were found for non-neoplastic MRC-5, PBMC and BJ cells. Increased fragmented DNA and apoptotic cell death were observed in HepG2 cells treated with OEGO. In the in vivo model, inhibition of tumor mass was 57.9 and 32.8% in animals treated with doses of 40 and 20 mg/kg of OEGO. **CONCLUSIONS:** OEGO demonstrated anticancer potential in vitro and in vivo, highlighting this essential oil as a candidate for the development of a new anticancer herbal medicine.

Palavras-chave: *Guatteria olivacea*, cytotoxicity , apoptosis, HepG2.

SUMÁRIO

	1
RESUMO	7
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 CÂNCER	13
2.2 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTICÂNCER	18
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.7 FAMÍLIA ANNONACEAE	20
2.8 GÊNERO GUATTERIA	21
2.6 GUATTERIA OLIVACEA	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 ESPECIFICO	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	25
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	25
4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO	25
4.5 CÉLULAS	26
4.6 DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS VERSUS CÉLULAS NÃO CANCEROSAS	28
4.7 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO MECANISMO DE AÇÃO DO OEGO EM CÉLULAS HEPG2	28
4.7.1 Determinação do ciclo celular e fragmentação de DNA	29
4.7.2 Avaliação do perfil de morte celular	29
4.7.3 Quantificação das espécies reativas de oxigênio	30
4.7.4 Estudo da atividade antitumoral em modelo xenográfico	30
4.7.5 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>G. OLIVACEA</i>	32
5.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO OEGO	34
5.3 DETERMINAÇÃO DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA	35
5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE CELULAR	37
5.5 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.	40
5.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO XENOGRÁFICO	40
6 DISCUSSÃO	48

7 CONCLUSÕES

54

REFERÊNCIAS

55

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é considerado a segunda principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, estimando-se uma carga global de 27 milhões de novos casos de câncer até o ano de 2030 (SUNG et al., 2020). No Brasil, o número de casos novos de câncer cresce a cada ano e para o biênio 2021/2022, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é de cerca de 625 mil casos para cada ano (INCA, 2020). Nesse contexto, a busca de tratamentos para essa doença é de extrema importância para saúde pública (INCA, 2020).

Os tratamentos para o câncer atualmente são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, imunoterapia, terapia -alvo entre outras técnicas. É importante ressaltar que apesar dos tratamentos serem realizados de maneira individualizada, se opta sempre que possível para o uso da chamada terapia combinada, em que várias modalidades terapêuticas são utilizadas em associação, visando à obtenção de melhores resultados (YASIR et al., 2019; INCA, 2020).

Todavia, devido a maioria dos dos tratamentos enfrentarem problemas por atingir células proliferativas de diversos tecidos e não apenas no tumor. Nessa perspectiva novas técnicas de tratamento a exemplo da terapia-alvo e imunoterapia estão conseguindo contornar essa situação. Elas têm como foco combater as moléculas específicas do tumor, direcionando a ação de medicamentos, exclusivamente ou quase exclusivamente, às células cancerígenas, reduzindo assim, suas atividades sobre as células saudáveis e os efeitos colaterais. Logo, utilizar a medicação que foi especificamente “desenhada” para aquele tipo de câncer, ao menos em tese, eleva a precisão do tratamento com melhores resultados e menos efeitos colaterais (TANG et al., 2021).

Os efeitos colaterais, a exemplo de alopecia, náuseas, diarreias e mielossupressão, estão entre as principais causas da não continuidade do tratamento oncológico (SCHEIN et al., 2016; INCA, 2020). Assim, a descoberta e desenvolvimento de novas classes de quimioterápicos e terapias se fazem necessários. Como a natureza é uma fonte abundante de quimiotipos biologicamente ativos e diversificados, a busca por novos fármacos antitumorais tem sido objetivo de muitas pesquisas.

Estudos anteriores demonstram que a composição química do óleo essencial das folhas de *G. olivacea*, contém óxido de cariofileno (12,2%) e espatulenol (13,8%) como constituintes

majoritários (ALCANTARA, 2015). Com base nisso, esse trabalho visa avaliar o potencial citotóxico e as propriedades antitumorais *in vivo* do óleo essencial das folhas de *G. olivacea*. Esses compostos químicos já são descritos na literatura por ter ação citotóxica (RODRIGUES et al., 2015), entre outras diversas atividades biológicas, como antileishmania (COSTA et al., 2009), antimicrobiana e anti-inflamatória (SOUSA et al., 2012; ARAGÃO et al., 2020).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer pode ser caracterizado pelo crescimento descontrolado das células, podendo ocorrer nos mais diversos tecidos do corpo, podendo invadir outros órgãos, ocasionando metástases. Essa proliferação descontrolada é causada por mutações em genes chaves para processos de controle de proliferação, reparo de DNA, metabolismo celular entre outros fatores genéticos e epigenéticos (SENGA et al., 2021). As células cancerígenas precisam desenvolver uma série de características para continuar seu processo proliferativo, que incluem a sustentação da sinalização proliferativa, com isso evitando os sinais de supressão de divisão celular, resistência aos mecanismos de morte celular, indução da angiogênese e a capacidade de invasão e metástase, além da capacidade de escape do sistema imune e formação de um microambiente tumoral, que contribui para o suporte biológico e crescimento tumoral (HANAHAN et al., 2022).

O processo de formação do câncer, conhecido como carcinogênese em geral, se dá lentamente, em um processo complexo que pode durar anos até o surgimento dos primeiros sinais clínicos da doença. Podendo ser dividido em três estágios. O primeiro, também conhecido como estágio de iniciação, as células sofrem o efeito dos agentes carcinógenos, podendo ser tanto químico, físico ou biológico que vão promover alterações no material genético. O segundo estágio é o de promoção, em que após a alteração genética vai a atuar nos agentes carcinogênicos oncopromotores, para então começar a transição de uma célula normal para uma célula cancerosa, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. Por último, dá-se o estágio de progressão, que é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, evoluindo até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (ALMEIDA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

Os agentes carcinógenos são variados, podendo ser internos ou externos ao organismo, estando ambos em constante interação. Sendo assim, diversos fatores terão papel no desenvolvimento de células cancerosas, como a ação de agentes químicos presentes na alimentação ou no ambiente, agentes biológicos como vírus ou mutações aleatórias em genes

chave ou herdada geneticamente, agentes físicos a exemplo da radiação. Logo a interação de um ou mais agentes carcinógenos, acaba levando a um acúmulo de mutações no DNA em decorrência de alterações de sequências, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos, de modo a aumentar a probabilidade de uma transformação de células normais em malignas, pois podem afetar direta ou indiretamente nas funções dos proto-oncogenes, levando a ativação dos mesmos, como também nas funções dos genes supressores e reparadores do DNA, inativando-os (LUO, SOLMINI, ELLEDGE, 2009).

Os proto-oncogenes são conjunto de genes que codificam proteínas responsáveis pela homeostase do ciclo celular, estando envolvido em diversos processos a fim de promover uma proliferação celular ordenada e controlada. Sendo assim, alterações no DNA adquiridas e/ou herdadas que levam à transformação de proto-oncogenes em oncogenes, que quando presentes e/ou superexpressos podem predispor ao desenvolvimento de câncer, promovendo a proliferação celular excessiva, que é a principal característica do câncer (VERMEULEN et al., 2003).

Os oncogenes podem ser classificados em cinco classes baseadas em produtos proteicos formados por mutação ou desregulação de proto-oncogenes. As proteínas codificadas pelos oncogenes podem atuar como fatores de crescimento ou como seus receptores, como transdutores de sinais, como fatores de transcrição ou como componentes do ciclo celular (IMRAM et al., 2017).

Além disso, outra classe de genes importante na clínica oncológica são os genes supressores do tumor (GST) que regulam a divisão celular, reparando erros do DNA ou determinando quando as células devem iniciar o processo de morte celular em caso de algum problema nas fases do ciclo celular, nesse caso levando a um tipo de morte controlada a exemplo da apoptose. Quando os genes supressores do tumor não funcionam corretamente, as células podem se desenvolver fora de controle, o que pode levar ao câncer. Normalmente, em seu funcionamento normal os GST impedem que a célula se divida de maneira equivocada ou atuam na reparação do material genético. Sendo assim, a principal diferença entre oncogenes e genes supressores do tumor é que os oncogenes resultam da mutação de proto-oncogenes, enquanto que os genes supressores do tumor provocam câncer quando eles são inativados (VELEZ e HOWARD, 2015; ZHAO et al., 2015).

Outro aspecto do câncer que é importante ressaltar é sua capacidade de espalhar pelo

corpo a partir de um tumor primário, através da invasão de outras camadas celulares dos órgãos, e ganhar a corrente sanguínea ou linfática. Esses novos focos de doença são chamados de metástases (FARES et al., 2021). Esse processo é a principal causa de morbidade e mortalidade por câncer. Que envolve a interação complexa entre as propriedades intrínsecas das células cancerosas, bem como as interações entre as células cancerosas e vários microambientes (MAITRA, 2019). O resultado é o desenvolvimento de uma massa secundária descontínua próxima ou distante. Para se disseminar com sucesso, as células metastáticas adquirem propriedades adicionais às necessárias para se tornarem neoplásicas, como resistência a estresse oxidativo e a falta de glicose. A heterogeneidade nos mecanismos envolvidos, as rotas de disseminação, a redundância das vias entre outros fatores são ainda desafios a serem superados para tratar o câncer nessa fase da doença pela via cirúrgica (MASSAGUE et al., 2016; YASIR et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é considerado a segunda principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, estimando-se uma carga global de 27 milhões de novos casos de câncer até o ano de 2030. Globalmente, quase 1 em cada 6 mortes é devido ao câncer e cerca de 70% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda. De acordo com Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), em seu último estudo de 2020, uma a cada cinco mortes é causada por algum tipo de câncer, sendo diagnosticados 19 milhões de novos casos em 2020 e 10 milhões de obtidos provenientes dessa doença. Além disso, o mesmo estudo aponta que o câncer de mama feminino ultrapassou o câncer de pulmão como o câncer mais comumente diagnosticado, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido por pulmão (11,4%), color retal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). O câncer de pulmão permaneceu a principal causa de morte por câncer, com uma estimativa de 1,8 milhões de mortes (18%), seguido por câncer color retal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%) (SUNG et al., 2020).

No Brasil, embora tenha havido um incremento de 119% nos gastos com saúde, esse aumento é inferior à média mundial. Especificamente com câncer, o gasto do Sistema Único de Saúde (SUS) cresceu 9% ao ano entre 2010 e 2014, alcançando quase R\$ 2,5 bilhões em 2014, sendo cerca de 80% do valor com quimioterapia e radioterapia. Nesse cenário, vale ressaltar que a população brasileira vem adotando uma série de hábitos não saudáveis como o sedentarismo e má alimentação decorrente de uma vida urbana cada vez mais agitada, que estão

trazendo como consequências o aumento de doenças crônico-degenerativas. Segundo o INCA a ocorrência de cerca de 625 mil casos novos de câncer no Brasil para cada ano em 2021 e 2022 (DE REZENDE et al., 2019; INCA, 2020).

Sob essa ótica, a estimativa de casos novos de câncer pode ser analisada sob dois diferentes aspectos: por localização primária do tumor ou por região geográfica. Com pode ser observado na **figura 1**, os tipos de câncer mais incidentes (exceto pele não melanoma), por localização primária e gênero, esperados para 2021 e 2022, por ano, no Brasil, são: Em homens: câncer de próstata (29,2%), câncer de cólon e reto (intestino) (9,1%), câncer de pulmão (7,9%), câncer de estômago (5,9%) e câncer da cavidade oral (boca) (5,0%). Em mulheres: câncer de mama (29,7%), câncer de cólon e reto (intestino) (9,2%), câncer do colo do útero (7,4%), câncer de pulmão (5,6%) e câncer de tireoide (5,4%).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
			Mulheres				

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1 - Taxas de incidência por localizações primárias de câncer, exceto pele não melanoma, por sexo, estimadas para 2020, no Brasil.

Fonte: INCA, 2019

Além disso, o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, que estão relacionados a maior incidência de diagnóstico do câncer juntamente com a melhoria da qualidade e do registro da informação (INCA, 2020).

Os principais tipos de tratamento para o câncer atualmente são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (SONG et al., 2013) e mais recentemente o uso terapia de fotorradiação (KUSUZAKI et al., 2007) a imunoterapia e terapia-alvo (HERR; MORALES, 2008; TANG et

al., 2021) também vem sendo adotado como tratamento. É importante ressaltar que apesar dos esquemas terapêuticos individualizados, na maior parte dos casos tem-se prevaído o uso da chamada terapia combinada, em que várias modalidades terapêuticas são utilizadas em associação, visando à obtenção de melhores resultados. Dentre os objetivos da terapia anticâncer estão: proporcionar a cura, prolongar a vida ativa e melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores da doença (IARC, 2020).

A técnica cirúrgica tem uma boa eficácia com tumores sólidos e que não tenham se espalhado no corpo (metástase), conseguindo geralmente a remoção destes. A radioterapia é um tratamento localizado, que usa radiação ionizante, produzida por aparelhos ou emitida por radioisótopos naturais. É, na sua grande maioria, feita em regime ambulatorial, usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma abordagem antineoplásica muito usada; entretanto, mesmo que sejam usados os sensibilizadores (que diminuem os efeitos colaterais), o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações visto que os pacientes tratados com a radioterapia podem experimentar diversos efeitos colaterais como dor, fadiga, alterações cutâneas, perda da autoestima e confiança, mudanças na mobilidade, choque emocional, confusão, ansiedade, angústia, medo, sentimentos de isolamento, mudanças na rotina, entre outros (ZHIWEI et al., 2020; STEFANIE et al., 2019).

A terapia alvo é capaz de bloquear as vias de sinalização e alvos moleculares específicos do câncer. O tratamento direcionado tem múltiplos mecanismos de ação: inibição da proliferação, indução de apoptose, supressão de metástases, regulação da função imune e reversão da multirresistência. Além disso, é bem conhecido que a terapia-alvo pode influenciar especificamente o sistema imunológico, criando um novo cenário no qual a terapia-alvo está fortemente ligada à imunoterapia (Wu et al., 2006).

A quimioterapia é um dos principais modos de tratamento para o câncer, contudo sua eficácia é limitada pela resistência aos medicamentos. Ademais, por ser um categoria de tratamento sistêmico, os fármacos não são seletivos contra as células neoplásicas e agredem também células normais, especialmente aquelas com grande capacidade de renovação, como as da medula óssea, pelos e mucosa gastrointestinal. O surgimento de resistência aos medicamentos no tumor geralmente leva à ineficácia do tratamento. Os dados estatísticos

indicam que a resistência ao fármaco é responsável por mais de 90% das mortalidades e morbidades em pacientes com câncer (SI et al., 2019).

A resistência à quimioterapia pode ser dividida em duas grandes categorias: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca indica que antes de receber quimioterapia, fatores mediadores de resistência preexistem nas células cancerosas que tornam a terapia ineficaz, já a resistência adquirida aos medicamentos pode desenvolver-se durante o tratamento de tumores que eram inicialmente sensíveis e pode ser causado por mutações que surgem durante o tratamento, bem como por várias outras respostas adaptativas, como expressão aumentada do alvo terapêutico e ativação de vias alternativas de sinalização compensatória. Além disso, é cada vez mais reconhecido que os tumores contêm um alto grau de heterogeneidade molecular, portanto a resistência aos medicamentos pode surgir através da seleção induzida por terapia de uma subpopulação menor resistente de células que foi presente no tumor original, sendo assim a busca por alternativas terapêuticas e se faz necessário (SI et al., 2019; HOLOHAN et al., 2013; DIAS et al., 2015).

2.2 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTICÂNCER

Plantas medicinais têm sido utilizado como fonte de agentes terapêuticos há milênios, sendo base de muitos fármacos comercializados atualmente, só na área de oncologia, no período de 1981 até 2020, os números equivalentes para os compostos naturais inalterados das 185 pequenas utilizadas moléculas utilizadas na clínica oncológica são 62, ou 33,5%, embora para estes podem ser adicionados os 58 de moléculas sintéticas que mimetiza moléculas naturais, elevando o valor para 64,9% (NEWMAN et al., 2020).

No Brasil, o número de espécies catalogados da flora brasileira atualmente são 46663 espécies sendo 4755 algas, 33237 angiospermas, 1568 briófitas, 5719 fungos, 29 gimnospermas e 1355 samambaias e licófitas (Flora do Brasil, 2020). Os quais são encontrados nos seguintes seis biomas: Amazônia (floresta amazônica no norte e centro-oeste do Brasil); cerrado (savana central do Brasil); mata atlântica (a floresta atlântica variando do nível do mar até as terras altas do leste do Brasil); caatinga (uma floresta xerofilia espinhosa encontrada no nordeste do Brasil), pampa (as pastagens no sul do Brasil); e pantanal (pastagens periodicamente inundadas pelos rios Paraná e Paraguai no centro-oeste do Brasil). Assim, o Brasil é uma das nações com maior

biodiversidade no mundo (MELO et al., 2011; FORZZA et al., 2012; Flora do Brasil, 2020). O potencial citotóxico de algumas plantas medicinais brasileiras foi previamente investigado (FERREIRA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2012); no entanto, devido à grande biodiversidade do país, as potencialidades terapêuticas da maioria das espécies permanecem desconhecidas.

Particularmente no contexto da descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais, uma grande vantagem são as informações etnofarmacológicas bem documentadas sobre o uso tradicional da planta, o que pode fornecer dicas para compostos terapeuticamente eficazes em humanos (JOSHUA et al., 2020; SNEŽANA et al., 2018; KINGHORN et al., 2011; ATANASOV et al., 2015). Em consonância com essa noção, a análise de 122 compostos derivados de plantas identificados como sendo mundialmente usados como fármacos revelou que 80% deles provêm de plantas que possuem uso etnomédico idêntico ou relacionado às indicações para as quais os respectivos compostos puros são prescritos ((NEWMAN et al., 2020; ATANASOV et al., 2015).

Ademais, foi demonstrado que os produtos naturais utilizados para o desenvolvimento de medicamentos têm alta probabilidade de serem usados tradicionalmente, mesmo que isso não fosse conhecido no estágio de desenvolvimento de medicamentos (por exemplo, a descoberta do agente anticancerígeno taxol de *Taxus brevifolia* foi feita com uma abordagem de triagem aleatória, mas mais tarde veio à tona que a planta foi usada pelas culturas indianas ocidentais como um medicamento, (ILYASS, 2021). É importante ressaltar que o conhecimento sobre medicamentos tradicionalmente usados está desaparecendo ainda mais rapidamente do que a biodiversidade de espécies de plantas e com o ritmo atual da globalização, muita informação valiosa está no risco de se perder para sempre (SOLOMON et al., 2020).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Ao final da segunda década do século XX começou a produção de óleos essenciais, tendo como base o extrativismo de plantas com foco na exportação, de modo a atender as demandas do mercado externo. Os óleos essenciais despertam grande interesse no mercado devido às substâncias aromáticas que deles podem ser extraídas, às suas propriedades terapêuticas, bem como a presença de compostos orgânicos bioativos, conhecimentos estes muitas vezes provenientes da medicina tradicional praticada por povos que vivem na região há

muitos séculos (CAVALEIRO et al., 2007).

Consideram-se óleos essenciais substâncias lipossolúveis, voláteis, extraídas de plantas aromáticas que integram o metabolismo secundário das plantas. Tais óleos são produzidos estruturas glandulares, canais oleíferos e células parenquimáticas diferenciadas, presentes no vegetal. Trata-se de compostos orgânicos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanóides, metabólitos que conferem suas características organolépticas. O perfil terpênico apresenta normalmente monotremos (C10) e sesquiterpenos (C15) (ALCANTARA, 2015b; GONÇALVES et al., 2018). Ultimamente, os óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados como fontes potencial de substâncias biologicamente ativas, apresentando propriedades antimicrobiana (SOUSA et al., 2012), citotóxica (MORGANA et al, 2020), antitumoral (RODRIGES et al., 2016), anti-inflamatória (SOUSA et al., 2012), antimutagênica (CARDIA et al,2021), antifúngica (KUMAR et al., 2019), antioxidante, entre outras atividades (MIRANDA et al., 2017).

Nesse sentido, o óleo essencial de uma variedade de espécies vegetais vem sendo comumente estudados visando o desenvolvimento de novos fármacos a fim de alcançar o controle e tratamento de diversas enfermidades (SIMAS et al., 2004). Diante do exposto, devido às atividades biológicas dos óleos essenciais descritas acima, principalmente as associadas à citotoxicidade e atividade antitumoral, estes compostos vegetais podem apresentar importante potencial terapêutico, servindo assim como uma fonte promissora no desenvolvimento de fármacos, além de aprimorar o avanço da ciência, principalmente em um país com uma grande biodiversidade como o Brasil.

2.7 FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae, descrita por Antoine Laurent de Jussieu, é constituída por aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies, distribuídas principalmente na região pantropical, sendo a América do Sul um dos principais centros da diversidade desse grupo, ao lado da América Central, Ásia e África. Trata-se de uma família bastante diversificada, com árvores, arbustos, subarbustos e lianas, com casca fibrosa dentre outras características (LÚCIO, 2011).

Essa família é caracterizada pela presença de terpenóides (principalmente diterpenos),

alcalóides (um grande número de derivados do núcleo isoquinolínico), os óleos essenciais possuem, como principais constituintes, o óxido de cariofileno, β -cariofileno, espatulenol, germacreno D e biciclogermacreno. Também pode ser encontrado lipídeos, carboidratos, aminoácidos, proteínas, polifenóis, compostos aromáticos e acetogeninas, destacando-se ainda o óxido cariofileno, o β -eudesmol, γ -eudesmol e o α -eudesmol, os quais apresentam atividades farmacológicas conhecidas (COSTA et al., 2008).

A complexidade química dessa família viabiliza a utilização da mesma para diversas finalidades, entre elas as medicinais, alimentícias, perfumaria, cosméticos, dentre outras. Tendo inclusive diversas espécies demonstrado citotoxicidade contra linhagens de células tumorais humanas (DAS CHAGAS LIMA, et al., 2022). Logo, a família Annonaceae se destaca pela sua reconhecida importância econômica além de seu uso na medicina natural devido a suas propriedades farmacológicas.

2.8 GÊNERO GUATTERIA

O gênero *Guatteria* pertence à família Annonaceae, sendo monofilético e predominando nas regiões neotropicais e constituindo cerca de 307 espécies distribuídas desde o sudeste do México até o sul brasileiro. Ainda são descritas no Brasil espécies encontradas nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste, tendo uma grande diversidade na região da Amazônia. É facilmente reconhecido pela nervura primária impressa na face adaxial, pedicelo com articulação suprabasal, sépalas valvares, pétalas imbricadas e carpelos numerosos, com um óvulo basal. Sendo representado por arbustos e pequenas árvores, é considerado o terceiro maior gênero de árvores neotropicais após *Inga* (Fabaceae) e *Ocotea* (Lauraceae). Contudo devido a sua diversidade de características vegetativas interespecies a identificação de cada espécie se torna complexa. (LOBÃO; SILVA; FORZZA, 2012; MAAS; LOBÃO; RAINER, 2016).

Essa diversidade adaptações ao gênero a diferentes nichos ecológicos o que possibilita uma grande distribuição ecológica, sendo encontrado em, em florestas tropicais, florestas inundadas e matas ciliares e florestas semidecíduas (ERKENS et al., 2007; FONTES, 2014).

Diversas espécies desse gênero são conhecidas por apresentarem características organolépticas e propriedades medicinais. Trabalhos realizados com óleo essencial de *Guatteria megalophylla* demonstraram atividade antitumoral contra células leucêmicas. Além

disso, *Guatteria friesiana*, *Guatteria pogonopus*, *Guatteria blepharophylla* demonstraram potentes atividades tripanocidas, antimaláricas e antimicrobiana. Também é relatado na literatura óleos essenciais de plantas deste gênero com atividade antioxidante e antimicrobiana, além de importante atividade antitumoral contra células cancerígenas de mama e próstata (MEIRA et al., 2017; RAJCA FERREIRA et al., 2018; Rafaela et al., 2019).

2.6 GUATTERIA OLIVACEA

Guatteria olivacea é uma espécie da floresta amazônica popularmente conhecida como ‘envira-bobó’ e ‘envira-fofa’, particularmente encontrada nos estados do Amazonas, Acre e Pará. Essa espécie é facilmente reconhecida por suas folhas, que são pretas a marrom-escuras quando secas, e por sua base de folha longa pertencente à família Annonaceae (MORGANA et al., 2020).

O Brasil abriga cerca de 386 espécies de anonáceas e o bioma Amazônia possui três quartos de toda diversidade de Annonaceae, com 27 gêneros e cerca de 280 espécies. O bioma Mata Atlântica abriga 15 gêneros e 91 espécies, dentre os quais, dois gêneros e 40 espécies são endêmicas (LOPES et al., 2014).

Guatteria olivacea se destaca por ser uma árvore de grande porte, com até 30 metros de altura, casca grossa e esverdeada; suas flores são de coloração ferrugem. Madeira de boa qualidade sendo usada na confecção de mobiliário e laminados (MORGANA, 2020). O óleo essencial das folhas de *G. olivacea*, contém óxido de cariofileno (31,2%) e espatulenol (13,8%) como constituintes majoritários (ALCANTARA, 2015). Ambos compostos químicos que já são descritos na literatura ter ação anticancerígenas, entre outras diversas atividades biológicas, como antileishmania (COSTA et al., 2009), antimicrobiana, anti-inflamatória (SOUSA et al., 2012; MORGANA et al., 2020).



Figura 2 - Características botânicas de *G. Olivácea*
Fonte: (ARAUJO, 2019)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico, os mecanismos de ação envolvidos na morte das células cancerosas *in vitro*, e a propriedades antitumorais *in vivo* do óleo essencial das folhas de *Guatteria olivacea* (OEGO).

3.2 ESPECIFICO

- Determinar a composição química do OEGO;
- Avaliar o potencial citotóxico do OEGO frente a diferentes linhagens de células cancerosas e não cancerosas;
- Estudar o efeito do OEGO sobre o ciclo celular e morte celular;
- Estudar o efeito do OEGO sobre a sua capacidade em induzir estresse oxidativo;
- Avaliar o efeito antitumoral do OEGO em modelo de xenotransplante.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *G. olivacea* foram coletadas no dia 27 de maio de 2017 na Reserva Florestal Adolpho Ducke sob as coordenadas 2°54'47'' S e 59°58'48'' W, próxima à cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. A espécie passou pela identificação com o professor Dr. Antônio Carlos Webber do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. Para caráter de consulta, uma exsicata da espécie foi depositada no herbário (HUAM) do Departamento de Biologia da própria UFAM sob o número 11423. O acesso (espécime) foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número de registro A70EDCD.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As folhas de *G. olivacea* foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C por 24h e submetidas a hidrodestilação por 4h usando um aparelho do tipo Clevenger. O óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro e a porcentagem do seu conteúdo foi calculada com base no peso do material vegetal seco. A hidrodestilação foi realizada em triplicata.

4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO

A análise da composição química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa que se trata de uma técnica que combina as vantagens da cromatografia e da espectrometria de massa, explorando a sua alta seletividade e eficiência de separação bem como a possibilidade de informação estrutural e aumento adicional na seletividade. Para a análise por CG-DIC foi utilizado um sistema Shimadzu GC-2010 Plus (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com um autoinjeter, AOC-20i (Shimadzu). A separação foi realizada em uma coluna de sílica fundida Rtx®-5MS (5%- difenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de filme. O gás de arraste usado na análise foi o Hélio (99,999%) com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura programada foi inicialmente 40°C/4 min., seguido

por uma taxa de 4°C/min. até 240° C, depois uma taxa de 10°C/min. até 280°C, e posteriormente mantida em 280°C/2 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250° C e 280°C, respectivamente. As amostras (10 mg/mL dissolvidas em diclorometano-CH₂Cl₂) foram injetadas com uma relação de separação 1:50 (split). Os índices de retenção foram gerados com uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20). As áreas dos picos e os tempos de retenção foram medidos de modo eletrônico com um integrador. As quantidades relativas dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos por CG sem um FID como correção do fator de resposta.

As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo-Scientific) acoplado com um espectrômetro de massas ISQ com amostrador automático modelo Tri Plus RSH. Um J & W Scientific DB-5MS (revestido com 5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano) como fase estacionária foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25mm x 0,25µm de espessura do filme). Os Espectros de Massas foram alcançados a 70 eV com intervalos de varredura de 0,5s e fragmentos de 40-550 Da. As demais condições foram semelhantes às utilizadas para análise por CG-EM.

Para calcular o índice de retenção IR foi utilizada a equação de Van Den Doll & Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C8-C20) e fez se a identificação através da comparação com outros espectros de massas da literatura (ADAMS, 2007). A percentagem de cada componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura.

4.5 CÉLULAS

As linhagens cancerosas utilizadas foram obtidas da American Type Culture Collection - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.). Estas, estão listadas no **Quadro 1** de acordo com o histotipo e origem.

Quadro 1 - Células utilizadas nos ensaios *in vitro*.

LINHAGENS	HISTOTIPO	ORIGEM
B16-F10	Melanoma	Murino
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Humana
KG-1a	Leucemia mieloide aguda	Humana
HCT116	Carcinoma de cólon	Humana
SCC4	Carcinoma oral de células escamosas	Humana
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas	Humana
CAL27	Carcinoma oral de células escamosas	Humana
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana
HSC3	Carcinoma oral de células escamosas	Humana
MRC5	Fibroblasto de pulmão	Humana
BJ	Fibroblasto de prepúcio	Humana
Jurkat	Leucemia de células T aguda	Humana
THP-1	Leucemia monocítica aguda	Humana
K562	Leucemia mielóide crônica	Humana
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana
NB4	Leucemia promielocítica	Humana
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (obtidos de cultura primária de doadores saudáveis)	Humana

Fonte: Elaboração do autor

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), em meio de cultura DMEM (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA), suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e acompanhadas

diariamente. Todos os experimentos foram conduzidos com células em fase exponencial de crescimento e as linhagens foram testadas para micoplasma usando o kit de detecção de micoplasma por microscopia (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), sendo que todas as células estavam livres de contaminação.

4.6 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS VERSUS CÉLULAS NÃO CANCEROSAS

Para avaliar a citotoxicidade do OEGO sob a viabilidade de células cancerosas e não cancerosas, o ensaio do alamar blue foi realizado. Este método consiste na capacidade de células viáveis incorporarem e reduzirem a resazurina, reagente não permeável de cor azul, em resorufina, composto de cor rosa fluorescente. A redução do alamar blue reflete a viabilidade celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED et al., 1994) e atualmente apresenta várias aplicações. A doxorrubicina (Laboratory IMA S.A.I.C.; Buenos Aires, Argentina) foi usada como controle positivo e as culturas não tratadas com as substâncias avaliadas receberam apenas o veículo utilizado para solubilizá-las (0,5% de DMSO, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

Inicialmente, células de linhagens aderentes foram adicionadas a placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL em 100 μ L/ poço) e incubadas por 24 h para aderência. Todas as culturas foram tratadas por um período de 72 h com OEGO e testado com concentrações variando de 0,39 a 50 μ g/mL. O controle negativo foi uma solução de DMSO a 0,5%. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar blue foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190 (AHMED et al., 1994).

4.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO MECANISMO DE AÇÃO DO OEGO EM CÉLULAS HEPG2

Para os ensaios que se seguem, células da linhagem HepG2 ($0,7 \times 10^5$ células/mL) foram tratadas por 48 h com concentrações do OEGO (12,5, 25 e 50 μ g/mL) previamente

estabelecidas com base no valor da CI_{50} . A doxorrubicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo recebeu apenas o veículo (DMSO 0,5%).

4.7.1 Determinação do ciclo celular e fragmentação de DNA

O ciclo de divisão celular tem como principal função replicar o DNA e segregar o DNA cromossômico duplicado igualmente para duas células-filhas. Para que esse processo ocorra, existem diversas moléculas reguladoras responsáveis, além de um cuidadoso controle que visa garantir que as fases do ciclo celular ocorram de forma correta. Para análise do ciclo celular, a técnica de citometria de fluxo em conjunto com iodeto de propídio (IP), um marcador colorimétrico nuclear e cromossômico fluorescente vermelho é comumente empregada nesse tipo de análise. Uma vez que possibilita quantificar o conteúdo de DNA celular e, deste modo, identificar os perfis do ciclo celular, associando-os com a ação exercida pelo óleo essencial.

Logo, a determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídio (IP) como agente fluorogênico (CIBAS, 1995). As células da linhagem HepG2 foram plaqueadas em placas 24 poços com 24 horas de antecedência do tratamento. Após 48h de incubação do OEGO nas concentrações 12,5 ; 25 ; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, então as células foram tripsinizadas e o sobrenadante foi coletado, os poços foram lavados com solução salina e as células foram centrifugadas juntamente com o sobrenadante por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 μL) contendo 0,1 % de triton X-100, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iodeto de propídeo em salina, na ausência de luz e a 37°C. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A análise estatística foi realizada pelo Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.7.2 Avaliação do perfil de morte celular

A avaliação do perfil de morte celular (apoptose/necrose) foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. As células da linhagem HepG2 foram plaqueadas em placas 24 poços com 24 horas de antecedência do tratamento. Após 48h de incubação com o OEGO nas concentrações

de 12,5 ; 25 ; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm e o sobrenadante foi coletado.

As células foram marcadas com YO-PRO e IP (CIBAS, 1995), de acordo com o protocolo do fabricante (BD Bioscience, Franklin Lakes, Nee Jersey, EUA). O ensaio possui como princípio a permeabilidade do Yo-Pro-1, que é um marcador nuclear que penetra na célula devido a um receptor P2X7 formador de canal/poro. A atividade do receptor P2X7 é dependente de uma exposição prolongada ao ATP que induz um segundo estado de permeabilidade, o que permite a captação de cátions maiores como Yo-Pro-1 e ligação do IP ao DNA das células que estão em processo final de apoptose ou estão em necrose. Após o tratamento com OEGO por 48 horas, as células foram lavadas com solução salina e em seguida ressuspensas numa solução do tampão de ligação (100 μL), 1 μL de Yo-Pro-1 e 5 μL de IP. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo, conforme descrito acima.

4.7.3 Quantificação das espécies reativas de oxigênio

A quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) permite avaliar o papel de vias na indução da morte celular. Para isso, as células foram tratadas por diferentes tempos (1h - 3h) com o OEGO nas concentrações de 12,5 ; 25 ; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após esse período, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio fresco e 2 μL de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co.) (CIBAS,1995), que é convertido num produto fluorescente na presença de espécies reativas de oxigênio intracelular. Após 30 minutos de incubação a 37° C na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas, ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA).

4.7.4 Estudo da atividade antitumoral em modelo xenográfico

Foi avaliada a inibição tumoral induzida pelo óleo essencial em modelo *in vivo* em camundongos CB-17 SCID (20 – 30g) através da pesagem do tumor. Para isso, um total de 43 camundongos foram inoculados com células cancerosas humanas da linhagem HepG2 (2 x 10⁶ células/0,5 mL/camundongo) por via subcutânea. Os animais foram obtidos e mantidos nas

instalações de animais do Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brasil). Os animais foram alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo de claro/ escuro de 12:12h (luzes acesas às 6:00 da manhã). O protocolo experimental foi aprovado por um comitê de ética animal local (número #01/2021).

O óleo essencial foi dissolvido em 5% de DMSO e administrado aos camundongos via intraperitoneal uma vez por dia durante 21 dias consecutivos. O tratamento foi iniciado um dia após a inoculação das células. Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos: grupo 1 – animais tratados com o veículo (5% de DMSO) (n=17); Grupo 2 –animais tratados com doxorrubicina (0,8 mg/kg) (n=8); grupo 3 –animais tratados OEGO (40 mg/kg) (n=9); e grupo 4 – animais tratados OEGO (20 mg/kg) (n=9). Após os 21 dias de tratamento, amostras de sangue periférico dos camundongos foram coletadas para análises hematológicas. Posteriormente os animais foram eutanasiados por overdose anestésica e os tumores, fígado, coração, pulmão e rins foram excisados e pesados. O efeito do tratamento foi expresso como a porcentagem de inibição tumoral em relação ao grupo controle negativo. As análises histológicas de tumores e órgãos foram realizadas em microscopia óptica com coloração de hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff (fígado e rim) após fixação em formaldeído a 4%.

4.7.5 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%), obtidos por regressão não linear, a partir de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5.01 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *G. OLIVACEA*

O óleo essencial de *G. olivacea* apresentou uma coloração esverdeada e ao ser avaliado quanto sua composição química observou-se a presença de monoterpenos (2) equivalentes à 2,75% do óleo, enquanto que os sesquiterpenos (37) identificados corresponderam a 94,07%, totalizando 39 substâncias identificadas em 96,82% da composição do óleo essencial.

As principais substâncias identificadas foram o germacreno D com (17,65%), 1-*epi*-Cubenol (13,21%), óxido de cariofileno (12,03%), espatulenol (11,26%). Outros compostos identificados com concentração acima de 1,5% foram: biciclogermacreno (5,87%), δ -elemeno (4,95%), δ -cadineno (2,08%), β -pineno (1,83%) e α -copaeno (1,69%) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial das folhas de *G. olivacea*

N.	Composto	IR ^a	IR ^b	% Óleo essencial
1	α -pineno	930	932	0,92 \pm 0,25
2	β -pineno	972	974	1,83 \pm 0,38
3	δ -elemeno	1335	1335	4,95 \pm 0,33
4	α -cubeno	1347	1348	0,45 \pm 0,06
5	Ciclosativeno	1364	1369	0,25 \pm 0,03
6	α -yalangeno	1368	1373	0,32 \pm 0,04
7	α -copaeno	1372	1374	1,69 \pm 0,18
8	β -bourboneno	1381	1387	0,92 \pm 0,09
9	β -cubeneno	1387	1387	0,27 \pm 0,07
10	β -elemeno	1389	1389	1,48 \pm 0,14
11	Cipereno	1395	1398	0,53 \pm 0,06
12	α -gurjuneno	1406	1409	1,06 \pm 0,10
13	(<i>E</i>)-cariofileno	1415	1417	7,26 \pm 0,71
14	β -copaeno	1425	1430	0,37 \pm 0,10
15	γ -elemeno	1431	1434	0,47 \pm 0,07
16	α -guaiano	1435	1437	0,26 \pm 0,05
17	6,9-guaiadieno	1440	1442	0,23 \pm 0,09
18	α -humuleno	1450	1452	1,02 \pm 0,08
19	allo- aromadrendeno	1457	1458	0,83 \pm 0,06
20	γ -muuroloeno	1474	1478	0,88 \pm 0,12
21	Germacreno D	1478	1480	17,65 \pm 0,32
22	<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-dieno	1488	1493	0,46 \pm 0,07
23	Biciclogermacreno	1493	1500	5,87 \pm 0,39
24	α -muuroloeno	1497	1500	0,80 \pm 0,07
25	δ -amorfeneno	1504	1511	0,57 \pm 0,04
26	γ -cadineno	1511	1513	0,61 \pm 0,06
27	δ -cadineno	1521	1522	2,08 \pm 0,23
28	<i>trans</i> -cadineno-1(2),4-dieno	1529	1533	0,30 \pm 0,07
29	α - calacoreno	1540	1544	0,47 \pm 0,09

30	Elemol	1546	1548	0,96±0,26
31	Germacreno B	1553	1559	1,19±0,14
32	N.I	1563	-	1,16±0,08
33	Espatuleno	1574	1577	11,26±0,48
34	Óxido de cariofileno	1579	1582	12,03±0,95
35	N.I	1589	-	0,59±0,06
36	1- <i>epi</i> -Cubenol	1618	1627	13,21±0,57
37	Epóxido de humuleno II	1605	1608	0,69±0,18
38	Cubenol	1639	1645	0,64±0,08
39	α -cadinol	1651	1652	0,80±0,12
40	N.I	1655	-	0,36±0,11
41	Bulnesol	1664	1670	0,40±0,12
42	N.I	1761	932	0,41±0,21
Monoterpenos				2,75
Sesquiterpenos				94,10
Total identificados				96,85
Total não identificados (N.I.)				3,15

IR^a- Índice de retenção calculado; **IR^b**- Índice de retenção de acordo com a literatura (Adams, 2007); N.I. – Não identificado; **Nota:** Os valores representam a média de três repetições \pm desvio padrão.

Fonte: Elaboração do autor

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO OEGO

A **tabela 2** apresenta os valores de CI_{50} encontrados no ensaio de citotoxicidade com o OEGO e doxorrubicina sobre células cancerosas e não cancerosas. O OEGO apresentou valores de CI_{50} que variaram de 4,46 a 45,98 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens cancerosas SCC4 e K562, respectivamente. Ao analisar a atividade citotóxica sobre as linhagens não cancerosas, OEGO exibiu valores de CI_{50} de 41 $\mu\text{g/mL}$ para fibroblastos de pulmão (MRC-5) e $>50 \mu\text{g/mL}$ para fibroblasto de prepúcio (BJ) e células mononucleares (PBMC). Doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} que variaram de 0,01 a 1,45 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens cancerosas SCC-4 e MCF-7, respectivamente, e 0,91, 0,67 e 0,55 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens não cancerosas MRC-5, PBMC e BJ, respectivamente.

Tabela 2 - Atividade citotóxica sobre linhagens de células cancerosas e não cancerosas

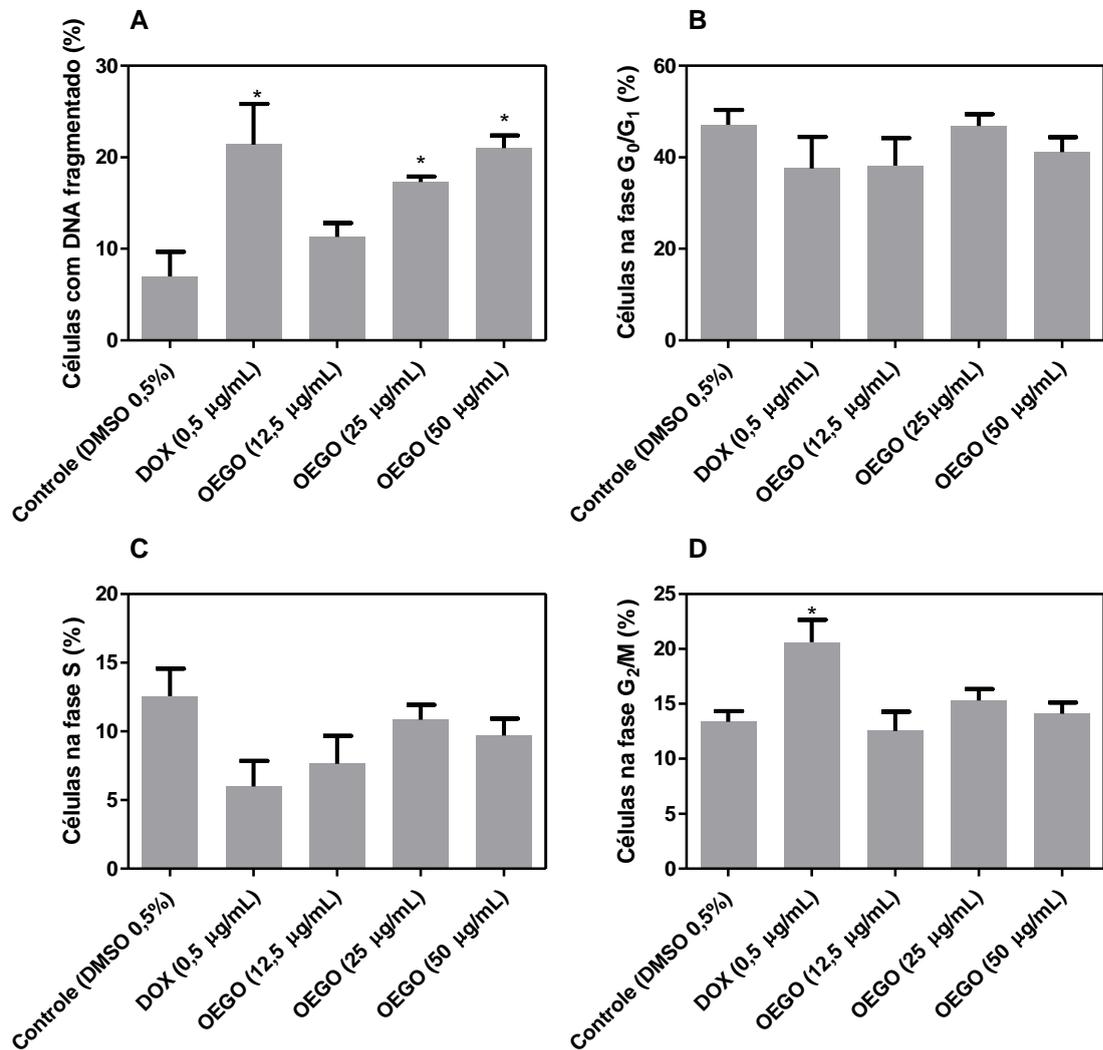
Células	CI ₅₀ (em µg/mL)	
	DOX	OEGO
Cancerosas		
HSC-3	0,66 0,49 – 0,87	30,06 22,00 – 41,07
MCF-7	1,45 1,00 – 2,11	22,03 14,17 – 34,26
CAL27	0,65 0,26 – 1,65	32,23 19,75 – 52,59
SCC4	0,01 0,002 – 0,04	4,46 4,03 – 4,95
B16-F10	0,28 0,23 – 0,35	28,30 20,93 – 38,26
HCT116	0,06 0,03 – 0,12	24,11 19,75 – 29,44
HepG2	0,09 0,06 – 0,12	30,82 20,57 – 46,18
Jurkat	0,03 0,02 – 0,05	26,44 24,12 – 28,98
KG-1a	0,01 0,01 – 0,11	26,75 23,34 – 30,67
K562	0,70 0,36 – 1,36	45,98 38,74 – 54,57
HL-60	0,05 0,03 – 0,10	23,46 12,88 – 42,73
THP-1	0,08 0,05 – 0,12	36,93 29,93 – 45,57
NB4	0,05 0,03 – 0,07	33,65 31,51 – 35,92
Não cancerosas		
BJ	0,55 0,22 – 1,37	>50
MRC5	0,91 0,30 – 2,73	47,77 35,76 – 63,81
PBMC	0,67 0,48 – 0,94	>50

Fonte: Elaboração do autor

5.3 DETERMINAÇÃO DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A análise do ciclo celular de células HepG2 tratadas com OEGO nas concentrações de

12,5, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram avaliadas por citometria de fluxo após 48 h de incubação. A **Figura 3** apresenta o ciclo celular e o conteúdo de DNA internucleosomal fragmentado das células HepG2. Após análise fica evidente que o OEGO nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi capaz de induzir aumento da fragmentação do DNA internucleossomal (sub- G_0/G_1) após 48 horas de incubação nas porcentagens de 17,28 % e 21,02 % respectivamente quando comparado com o controle negativo 6,9 % (DMSO 0,5%) . A doxorubicina utilizada como controle positivo, também apresentou fragmentação do DNA celular 21,38 %, após 48h de incubação.



Dados apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorubicina (DOX 0,5 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Figura 3 - Análise do ciclo celular de células HepG2 após 48h de incubação com OEGO.

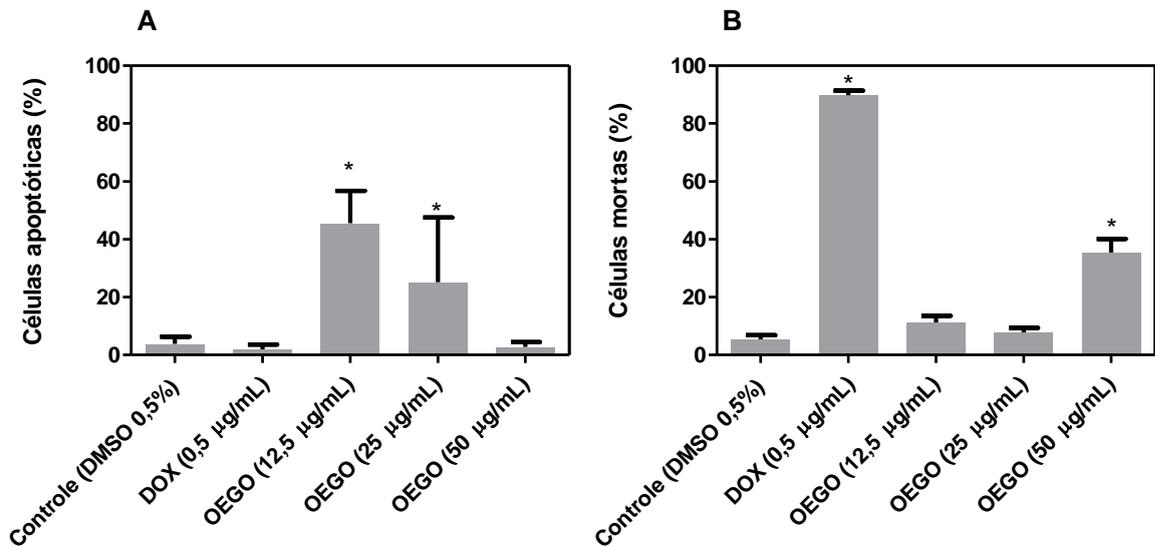
Fonte: Elaboração do autor

5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE CELULAR

A morte celular apoptótica foi quantificada usando células HepG2 marcadas com YO-PRO-1/PI após tratamento com OEGO nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μ g/mL por 48 h. YO-

PRO-1 é um marcador nuclear que se liga ao DNA de células morrendo e emite uma fluorescência verde. Seu grande tamanho (630 Da) impede que penetre na membrana plasmática intacta das células vivas. No entanto, processos apoptóticos viabilizam a entrada desse marcador na membrana plasmática, permitindo que YO-PRO-1 entre nas células, indicando que este corante é um marcador precoce de morte celular apoptótica. Seu mecanismo envolve a ativação de receptores P2X7 (XIE et al., 2019), enquanto o PI é um marcador nuclear que se liga ao DNA apenas em células mortas ou danificadas e emite uma fluorescência vermelha. Como resultado, quando utilizamos a combinação desses dois corantes, células apoptóticas apresentam fluorescência verde, células mortas (células mortas sem identificar o tipo de morte celular) apresentam fluorescência vermelha e verde, e células viáveis apresentam pouca ou nenhuma fluorescência.

Os resultados obtidos demonstram uma marcação significativa de YO-PRO e IP em células HepG2 (**Figura 4**). Tendo aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células em apoptose em células HepG2 tratadas com EOGO nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL após 48 h de tratamento, enquanto o aumento de células mortas foi observado em um concentração de 50 µg/mL. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, também induziu a necrose, de modo significativo com 48h de tratamento quando comparado ao grupo controle negativo (DMSO 0,2%) ($P < 0,05$).

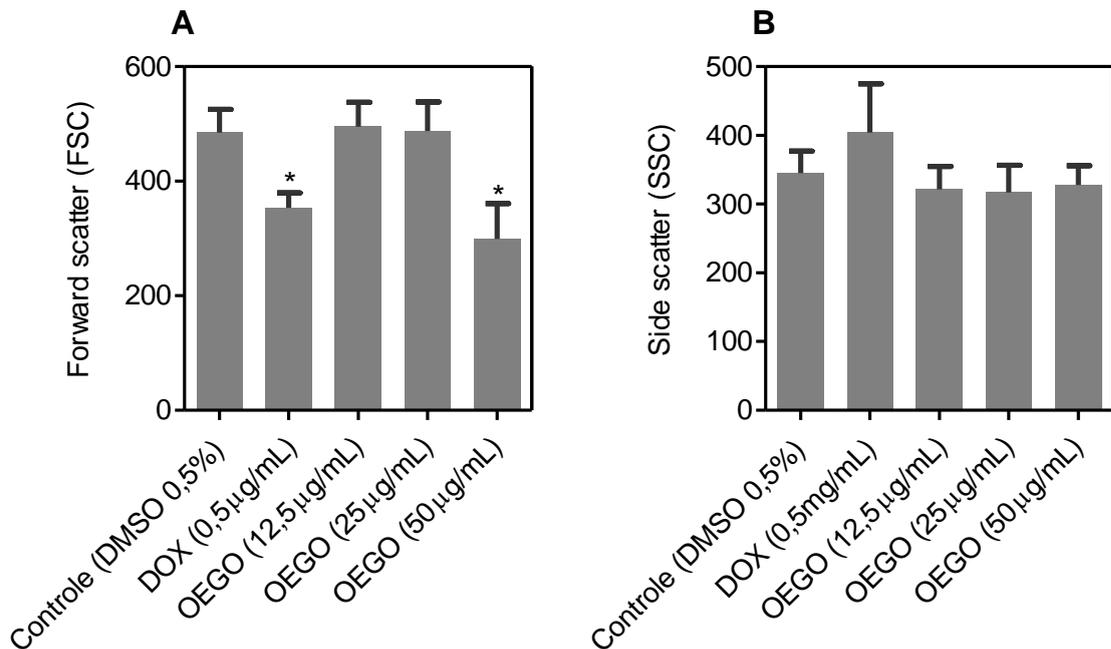


Dados apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorubicina (DOX 0,5µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Figura 4 - Análise do perfil de morte celular de células HepG2 tratadas por 48 h com o OEGO.

Fonte: Elaboração do autor

Além disso, o OEGO causou encolhimento celular, medido por uma diminuição na dispersão de luz direta, uma mudança morfológica observada em células apoptóticas (**Figura 5**).



Dados apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorubicina (DOX 0,5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Figura 5 - Efeito do OEGO na morfologia das células HepG2, conforme determinado pelas características de espalhamento de luz detectadas por citometria de fluxo após 48 h de tratamento

Fonte: Elaboração do autor

5.5 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.

A quantificação dos níveis intracelular de ERO em células HepG2 foi realizada com fluorômetro Fluoroskan™ Microplate Fluorometer da Thermo Scientific™ utilizando o fluorógeno DCF-DA. Entretanto, não foi possível observar aumento significativo nos níveis de ERO quando comparado com o controle negativo após uma e três horas de incubação com o OEGO nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL.

5.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO XENOGRÁFICO

A atividade antitumoral *in vivo* do OEGO foi investigada em

camundongos da linhagem CB-17 SCID inoculados com células HepG2. Os animais foram tratados com doses de 40 e 20 mg/kg por via intraperitoneal, uma vez por dia durante 21 dias consecutivos (**Figura 6**). Ao final do tratamento, observou-se a média do peso dos tumores dos animais do controle negativo de $0,90 \pm 0,07$ g. Nos animais tratados com OEGO, a média dos pesos dos tumores foi de $0,38 \pm 0,14$ e $0,61 \pm 0,10$ nas doses de 40 e 20 mg/kg. Sendo que a inibição da massa tumoral foi de 57,9% e 32,8%, respectivamente. Não foi observado alteração significativa no peso relativo dos órgãos de nenhum dos grupos avaliados ($P > 0,05$) (**Tabela 3**). Os tumores corados com hematoxilina e eosina mostraram uma coleção de células malignas hipercromáticas proliferativas exibindo anisocitose. Eventos mitóticos foram frequentes em ambos os grupos, alguns atípicos. No animal tratado com OEGO na dose de 40 mg/kg, os nódulos tumorais eram menores e exibiam um tecido conjuntivo circundante mais denso quando comparados ao controle negativo. Áreas necróticas foram observadas em todos os grupos, especialmente em camundongos tratados com doxorrubicina (**Figura 7**).

Também foram realizadas análises histopatológicas de fígado, rim, pulmão e coração. Os fígados de todos os grupos experimentais apresentaram arquitetura portal preservada. Em geral, algumas alterações morfológicas foram observadas, como congestão vascular variando de leve a moderada, degeneração hidrópica leve e necrose de coagulação em áreas focais do órgão. Células inflamatórias isoladas foram observadas ao redor do sistema porta, predominantemente polimorfonucleares. É importante ressaltar que apenas os animais tratados com OEGO na dose de 40 mg/kg apresentaram esteatose microgoticular moderada (**Figura 8**). A arquitetura renal foi preservada em todos os animais do presente estudo. No entanto, algumas alterações histopatológicas foram observadas, como congestão vascular variando de moderada a intensa e diminuição do espaço urinário (espaço de Bowman) pela hialinização glomerular. A arquitetura do parênquima pulmonar variou de preservada a parcialmente preservada neste estudo. As alterações histopatológicas observadas foram congestão vascular, edema e espessamento dos septos interalveolares com diminuição do lúmen alveolar, variando de leve a intenso. Além disso, áreas focais de hemorragia, fibrose e células inflamatórias, predominantemente polimorfonucleares, foram observadas em todos os grupos experimentais (**Figura 9**). Áreas focais de necrose de coagulação nos túbulos do córtex renal foram observadas nos grupos tratados com doxorrubicina e OEGO (**Figura 10**). Para os corações, não observamos alterações arquitetônicas e morfológicas dignas de nota para este órgão.

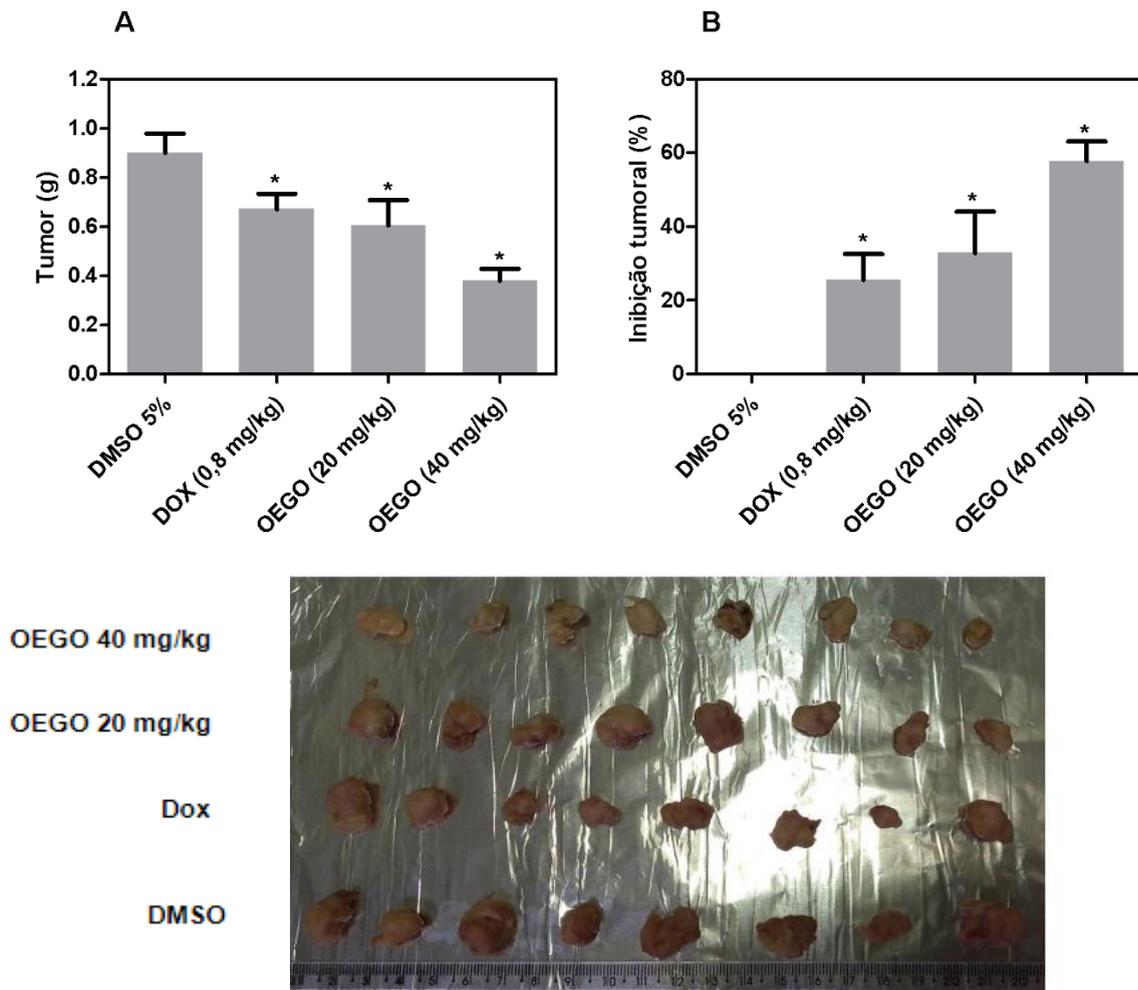
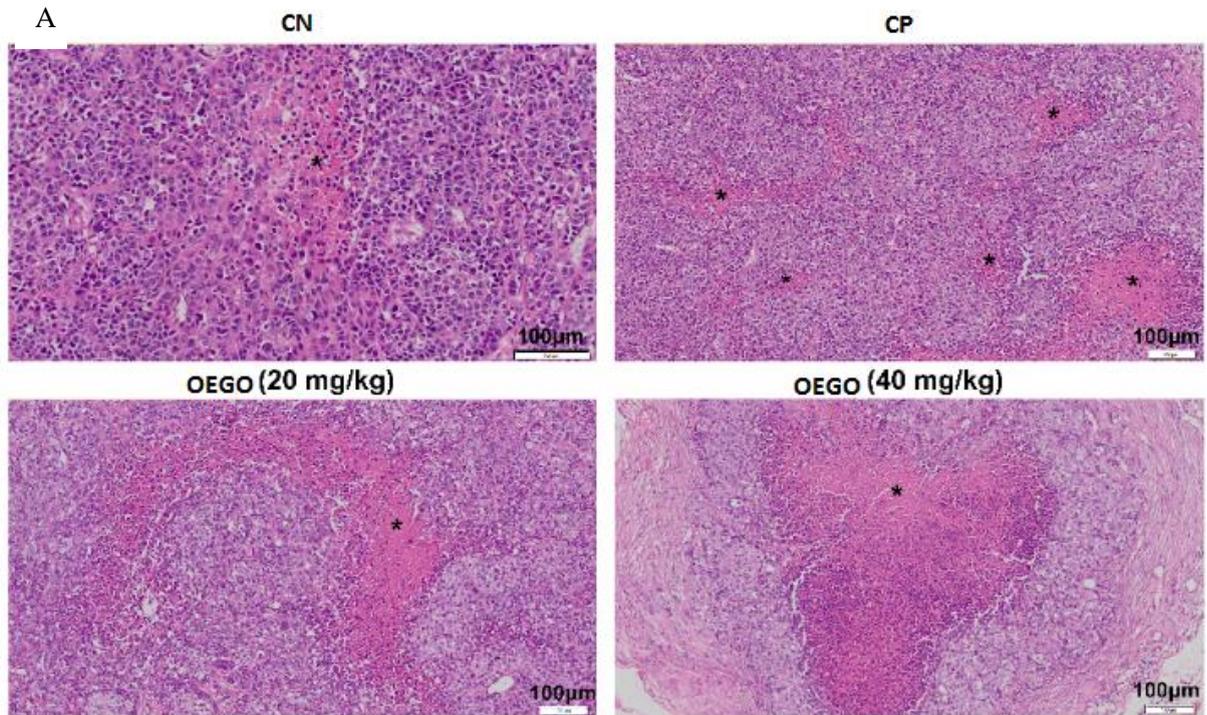


Figura 6 - Atividade antitumoral do OEGO em camundongos da linhagem CB-17 SCID inoculados com células HepG2.

Fonte: Elaboração do autor

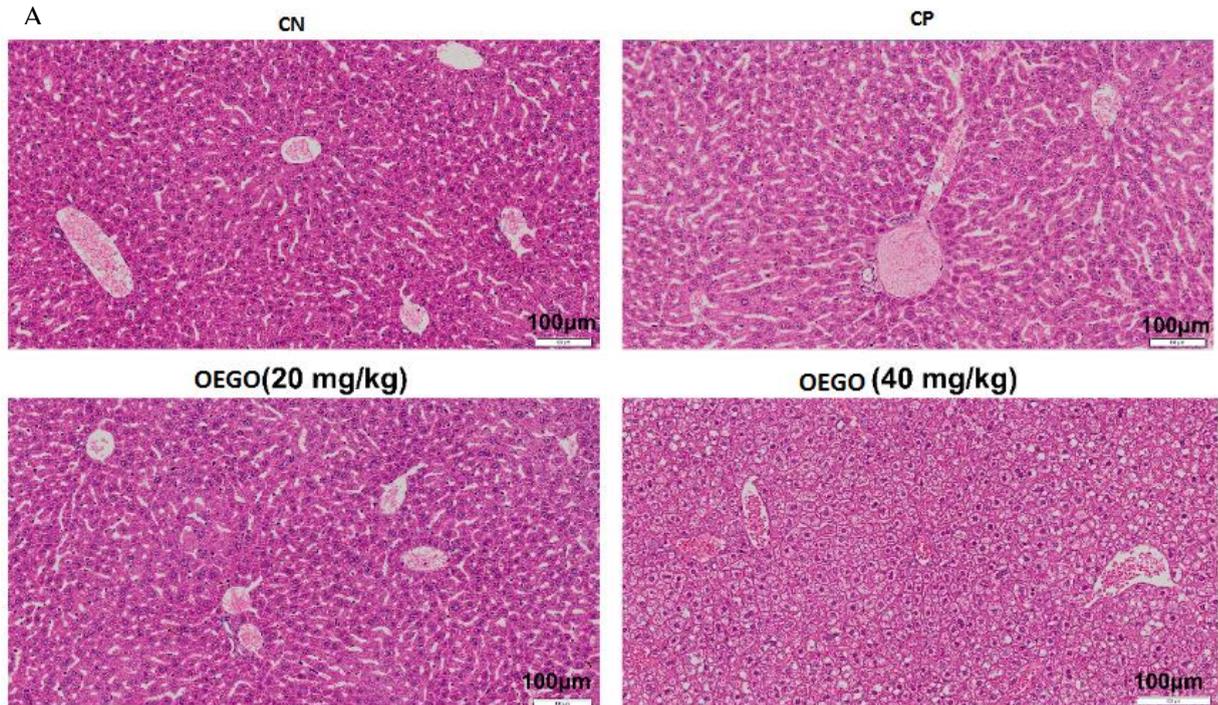
(A e B) Atividade antitumoral *in vivo* do OEGO em camundongos C.B-17 SCID com células HepG2 após o tratamento. O controle negativo (NC) foi tratado com veículo (5% DMSO) usado para diluir o OEGO e a doxorubicina (0,8 mg/kg) foi usada como controle positivo (CP)* $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste dStudent-Newman-Keuls.



(A) Fotomicrografias representativas de tumores HepG2, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de luz. Os asteriscos representam áreas de necrose tecidual. O controle negativo (NC) foi tratado com veículo (5% DMSO) usado para diluir o OEGO e a doxorubicina (0,8 mg/kg) foi usada como controle positivo (CP)* $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste dStudent-Newman-Keuls.

Figura 7 - Fotomicrografias representativas de tumores HepG2, coradas com hematoxilina e eosina.

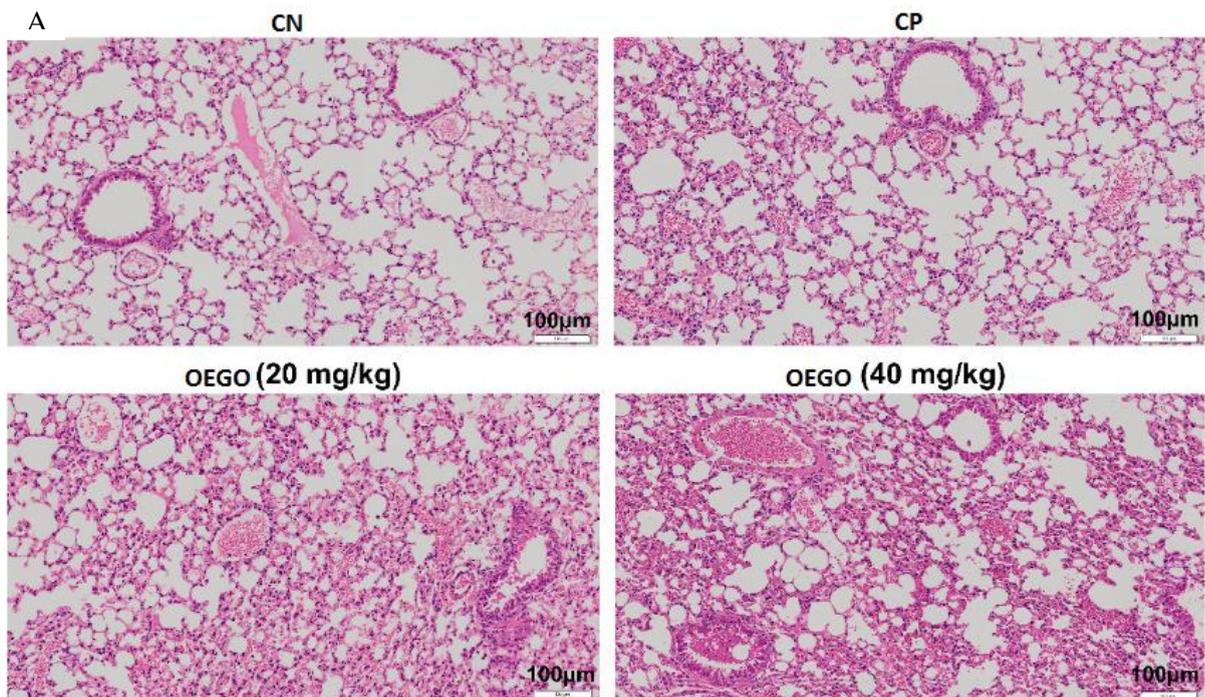
Fonte: Elaboração do autor



(A) Fotomicrografias representativas dos fígados dos camundongos C.B-17 SCID com xenoinxertos de células HepG2 tratados com OEGO de folha de *G. olivacea*. O controle negativo (NC) foi tratado com veículo (5% DMSO) usado para diluir o OEGO e a doxorubicina (0,8 mg/kg) foi usada como controle positivo (CP)* $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste dStudent-Newman-Keuls.

Figura 8 - Fotomicrografias representativas dos fígados dos camundongos C.B-17 SCID.

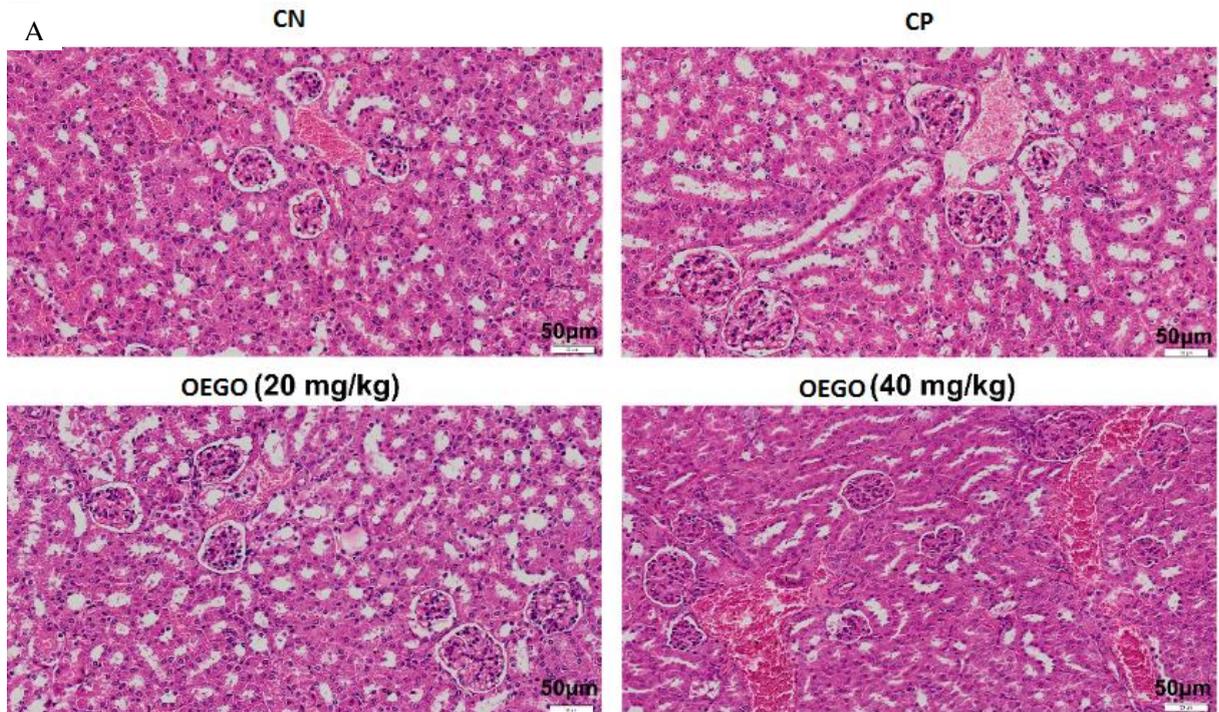
Fonte: Elaboração do autor



(A) Fotomicrografias representativas dos pulmões dos camundongos C.B-17 SCID com xenoinxertos de células HepG2 tratados com OEGO de folha de *G. Olivacea*. O controle negativo (NC) foi tratado com veículo (5% DMSO) usado para diluir o OEGO e a doxorubicina (0,8 mg/kg) foi usada como controle positivo (CP)* $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste dStudent-Newman-Keuls.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos pulmões dos camundongos C.B-17 SCI.

Fonte: Elaboração do autor



(A) Fotomicrografias representativas dos rins dos camundongos C.B-17 SCID com xenoinxertos de células HepG2 tratados com OEGO de folha de *G. Olivacea*. O controle negativo (NC) foi tratado com veículo (5% DMSO) usado para diluir o OEGO e a doxorubicina (0,8 mg/kg) foi usada como controle positivo (CP) * $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste dStudent-Newman-Keuls.

Figura 10 - Fotomicrografias representativas dos rins dos camundongos C.B-17 SCID.

Fonte: Elaboração do autor

Tabela 3 - Efeito do tratamento com OEGO no peso corporal e relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2

Parâmetros	CTL	DOX	OEGO	OEGO
Dose (mg/kg)	-	0,5	20	40
Sobrevida	17/17	8/8	8/8	9/9
Peso corporal inicial (g)	22,22 ± 0,4	20,5 ± 1,0	20,61 ± 1,2	19,52 ± 0,6
Peso corporal final (g)	21,35 ± 0,4	22,5 ± 1,0	22,59 ± 1	19,0 ± 0,5
Fígado (g/100g de peso corporal)	1,22 ± 0,8	1,06 ± 0,8	1,2 ± 0,09	1,11 ± 0,04
Rim (g/100g de peso corporal)	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,33 ± 0,02
Coração (g/100g de peso corporal)	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,007	0,11 ± 0,01
Pulmão (g/100g de peso corporal)	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,007	0,16 ± 0,01

O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) utilizado para diluir o óleo. * P < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Fonte: Elaboração do autor

6 DISCUSSÃO

No tratamento do câncer, os compostos oriundos de plantas sempre desempenharam um papel fundamental na clínica oncológica, sendo considerados fontes preciosas de compostos com ação antineoplásica (KINGHORN et al., 2011). Neste trabalho, a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial da *Guatteria olivacea* foi demonstrada pela primeira vez. Embora o gênero *Guatteria* tenha relevância etnofarmacológica para o tratamento de muitas doenças, com inúmeros trabalhos publicados, não foi encontrado nenhum trabalho que investigue o potencial da espécie *G. olivacea* no tratamento do câncer analisando suas atividade antitumoral em modelo *in vivo*.

Na análise química, observou-se que OEGO contém principalmente germacreno D, 1-*epi*-Cubenol, óxido de cariofileno e espatulenol. Em um trabalho prévio realizado em ALCANTARA (2015), foi encontrado óxido de cariofileno e espatulenol como constituintes majoritários do OEGO. Ao analisar a composição química de outras espécies do gênero *Guatteria* (*G. diospyroides*, *G. costaricensis* e *G. oliviformis*) Palazzo e colaboradores, observaram diferenças significativas na composição química de cada espécie. Para o óleo essencial das folhas de de *G. oliviformis*, os componentes predominantes foram germacreno D (73,3%), juntamente com α - e β -pineno (3,4% e 4,4%, respectivamente) e biciclogermacreno (4,5%), enquanto que na *G. diospyroides* foram germacreno D (46,4%), (Z)- β -ocimeno (17,4%), (E)-(β)-ocimeno (12,0%) e (E)-cariofileno (10,3%) e na *G. costaricensis* foi observado que sua composição era constituída principalmente por α - e β -pineno (36,3% e 48,2%, respectivamente) e (E)-cariofileno (5,4%). Além disso, no trabalho de Costa e colaboradores 2020, ao analisar o óleo essencial das folhas de *G. megalophylla* foi encontrado majoritariamente o espatulenol (27,76%; 1), juntamente com γ -muuroleno (14,34%; 2), biciclogermacreno (10,47%; 3), β -elemeno (7,48%; 4) e δ -elemeno (5,15%; 5), resultados estes que se assemelham ao trabalho de Ferreira de colaboradores 2018, que fizeram identificaram no oleo essencial de *G. elliptica* componentes majoritários o espatulenol (53,9 %) e o óxido de cariofileno (6,8%) .

É importante salientar que a composição química pode variar para diferentes espécies dentro de um mesmo gênero e ainda, sofrer alteração devido a ação dos fatores ambientais, como a temperatura, pluviosidade, nutrição e horário de coleta (MORAIS, 2009). As variações

significativas na composição química dos constituintes majoritários, assim como também nos outros compostos encontrados nas espécies de *Guatteria* também podem ser observadas na espécie estudada, podendo variar do local que foram coletadas. Por outro lado, a presença de (E)-cariofileno, óxido de cariofileno, espatulenol observados na composição do óleo essencial de *G. olivacea* e nas diferentes espécies de *Guatteria* relatadas acima reforçam que a espécie em estudo é quimicamente típica da família *Annonacea* (FERREIRA et al., 2017).

O conhecimento da constituição química do óleo essencial permite um melhor estudo do seu potencial citotóxico com base na revisão da literatura. Nesse sentido o espatulenol e óxido de cariofileno já são descritos por ter ação antitumoral, em um estudo realizado com óleo essencial das folhas de *Annona vepretorum*, que exibe como constituintes principais o espatulenol (18,89%) apresentou atividade antitumoral promissora, chegando a inibir o crescimento e proliferação tumoral *in vitro* em cerca de 34,46%, sendo que o espatulenol foi testado de forma isolada e apresentou valores de CI₅₀ referente a 3.79 µg/mL para células Leucemicas k-562 (BOMFIM et al., 2016). Outro estudo realizado por Pavithra e colaboradores 2018 demonstrou que o óxido de cariofileno pode agir de maneira sinérgica em combinação com doxorubicina, um quimioterápico largamente utilizado na clínica oncológica, aumentando o efeito antiproliferativo na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, em outro trabalho o óxido de cariofileno em sinergia com com óxido de aromadendrene-2 e fitol apresentou potenciais terapêuticos para o tratamento de em linhagens de câncer de pele (PAVITHRA et al 2018).

Nessa perspectiva, a citotoxicidade de alguns óleos essenciais de espécies do gênero *Guatteria* tem sido amplamente estudada. Em estudo realizado com *G. megalophylla* a citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em cinco linhagens HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF-7 (carcinoma de mama), CAL27 (carcinoma escamocelular de língua), HSC-3 (carcinoma de língua), HepG2 (carcinoma hepatocelular), HCT116 (carcinoma de cólon) e na linhagem celular não cancerígena, MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), em que os valores de CI₅₀ variaram de 7,58 a 35,45 µg/mL para CAL27 e MCF-7, e para HepG2 foi de 21,62, o que são valores considerados valores promissores baseando-se nos critérios pré-estabelecidos pelo Instituto Nacional do Câncer. Nesse programa de triagem de novas substâncias com potencial citotóxico, consideramos que óleos essenciais com valores de CI₅₀ abaixo de 30 µg/mL são considerados promissores (SUFFNESS et al 1991).

Em outro estudo sobre a *G. pogonopus*, a citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em três linhagens diferentes de células cancerosas OVCAR-8 (adenocarcinoma de ovário), NCI-H358M (carcinoma bronquioalveolar) e PC-3M (adenocarcinoma de próstata), onde foi encontrado atividade citotóxica e antitumoral (FONTES et al., 2013). No trabalho de Ferreira e colaboradores 2018 os autores demonstraram que frações do óleo essencial de, *G. elliptica* apresentaram valor de CI50 promissores frente a duas linhagens de câncer de mama e próstata (MCF-7 e PC-3M), com CI 50 = $7,01 \pm 0,23$ e $5,32 \pm 0,35$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Ademais, é descrito na literatura que outras espécies do gênero *Gutteria* vem ganhando destaque devido a sua citotoxicidade frente a células cancerosas. Dados publicados relatam ainda que o óleo essencial das folhas de *G. friesiana* apresentou efeitos antitumorais em testes *in vitro* e *in vivo* em células HepG2. Enquanto que as espécies *G. blepharophylla* e *G. hispida* exibiram citotoxicidade para outras linhagens de carcinoma hepatocelular humano (FONTES, 2014; FERRAZ et al., 2014).

O estudo do potencial citotóxico de espécies ainda não estudadas é de suma importância para o desenvolvimento de novos agentes com propriedades antineoplásicas. Nessa perspectiva, nossos resultados demonstraram que o OEGO apresentou citotoxicidade promissora para diferentes linhagens cancerosas testadas, é provável que a atividade citotóxica do óleo essencial possa ser atribuída à mistura dos seus componentes majoritários e minoritários. Zoubiri & Baaliouamer (2011), ressaltam que os efeitos biológicos dos óleos essenciais podem resultar da atividade dos seus compostos principais, ou ser um efeito sinérgico, resultante da mistura de todas as moléculas componentes.

As fases do ciclo celular em células neoplásicas são de fundamental importância para compreender o funcionamento de um composto teste bem como entender o seu mecanismo ação no processo de morte celular, logo ao fazer uma análise desse ciclo é possível observar se existe parado no ciclo celular ou fragmentação de DNA. Tendo em vista que a fragmentação internucleossômica do DNA genômico uma marca bioquímica da apoptose, sendo observada em diversos trabalhos com compostos obtidos de vegetais (FERRAZ et al., 2014 ;ICARD et al., 2019).

A transição da quiescência (G_0) é regida pelo ciclo celular, que vai dá prosseguimento para a proliferação, garantindo a fidelidade e integridade do material genético. As fases associadas à síntese de DNA (fase S) e mitose (fase M) são separadas pelos pontos de checagem

G₁ e G₂ (WYLLIE, 1980; DICKSON e SCHWARTZ, 2009), e, diversos estudos confirmam que o ciclo celular é alvo de diversos medicamentos originados a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2019).

Estudos prévios demonstraram que óleos essenciais das espécies *G. blepharophylla* e *G. hispida* causam aumento significativo na fragmentação do DNA internucleossomal (FERRAZ et al., 2014). Em trabalho semelhante onde avaliou-se os efeitos dos tratamentos com os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) e *Mentha villosa* (Lamiaceae) sobre uma linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano também foi observado aumento do percentual de células em SubG₁, indicando fragmentação de DNA (OLIVEIRA et al., 2015).

Esses resultados estão de acordo com os achados deste trabalho, indicando que esta fragmentação nuclear induzida pelo óleo pode estar relacionada com a morte celular apoptótica. Isto porque a fragmentação do DNA reflete a quantidade de células em processo apoptótico em virtude da clivagem entre nucleossomos.

No trabalho realizado com extratos brutos e frações de *Annona vepretorum* (Annonaceae) foi encontrado perfil de fragmentação internucleossomal do DNA, características sugestivas de apoptose após tratamento com o extrato em células de sarcoma 180 (SILVA, 2017). Na análise de ciclo celular do óleo essencial de *G. megalophylla* foi observado aumento significativo no percentual de conteúdo de DNA na fração sub-G₀/G₁ nas células tratadas com esse óleo após 48 h de incubação, as células tratadas demonstraram aumento da fragmentação do DNA internucleossomal (7,19% do controle negativo DMSO contra 31,53% no tratamento a 10 µg/mL, 54,65% 20 µg/mL e 22% 40 µg/mL (COSTA et al., 2020). Outro trabalho demonstrou que extrato de *Annona glabra*, da família da *Annonaceae*, causaram uma parada de fase G₀/G₁ e indução do sub-G₀/G₁ (COCHRANE et al., 2008).

No presente trabalho, também foi observado o aumento do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ nas células HepG2 tratadas com o OEGO, sugerindo fragmentação internucleossomal do DNA, e, portanto, um claro indicador de morte celular. Sendo assim, este é o primeiro trabalho a relatar indução de fragmentação do DNA após tratamento de células cancerosas da linhagem HepG2 com o óleo essencial da *G. olivacea*.

A morte celular é um processo desencadeado por diversos fatores e apresenta diferenças morfológicas de acordo com os tipos de morte celular, como apoptose, necrose, autofagia, entre outros (BERTHELOOT et al., 2021). Todavia, no contexto do desenvolvimento de

antineoplásicos, tão importante quanto causar a morte de células tumorais é entender como determinada substância conduz às células a este desfecho. Uma vez que o conhecimento dos mecanismos envolvidos na atuação de uma substâncias tornam a sua utilização mais segura, ao passo que permitem o entendimento dos seus alvos celulares, o que viabilizar a escolha de esquemas terapêuticos mais eficazes, utilizando diversas vias de morte celular ao mesmo tempo, além disso permitir o desenho de novas drogas com efeitos similares, ou ainda a combinação com outras substâncias que atuem em mecanismos adjacentes e complementares (EHRENSTEIN; MAURI, 2007; RATAIN; PLUNKETT, 2003).

Nesse contexto, a maioria dos fármacos antineoplásicos levam à morte celular por apoptose, sendo esta via de morte celular alvo de muitas estratégias para o tratamento do câncer, principalmente por ser uma via de morte celular programada o que tem como consequência uma menor resposta inflamatória (CHEN et al., 2018). Dentro desta perspectiva, o desenvolvimento de medicamentos que exerçam alto potencial apoptótico é de grande importância. O trabalho com óleo essencial de *A. squamosa* que tem como componente majoritário o espatulenol demonstrou atividade antineoplásica contra a linhagem celular de câncer de fígado SMMC-7721, levando a apoptose, fragmentação do DNA e parada do ciclo celular (CHEN et al., 2017).

No estudo realizado por María e colaboradores em (2012), o extrato da árvore tropical *A. Muricata*, comumente conhecida como graviola, foram avaliados quanto à citotoxicidade, metabolismo celular, expressão de proteínas/genes associadas ao câncer, tumorigenicidade e as propriedades metastáticas de células câncer de pâncreas nas linhagens FG/COLO357 e CD18/HPAF, que após o tratamento levou a necrose induzida por inibição do metabolismo celular.

Tais dados estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho quanto à capacidade que o OEGO possui em induzir morte celular por apoptose, especialmente após o tratamento por 48 horas. A partir desses resultados e amparado pela revisão de literatura, fica evidente que devido aos constituintes antitumorais presente no óleo essenciais dessa espécie que atuam por múltiplas vias e mecanismos envolvendo, parada do ciclo celular, apoptose, necrose, dentre outros mecanismos que acabam levando a uma atividade antitumoral (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014).

Ademais, nossos resultados demonstraram que o OEGO exibiu efeito antitumoral *in vivo* em camundongos da linhagem CB-17 SCID em modelo de xenoenxerto de células HepG2 com

inibição tumoral de 57,9% na concentração de 40 mg/kg . Similarmente, o óleo essencial das folhas de *G. megalophylla* demonstrou que nos animais tratados nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg tiveram inibição da massa tumoral de 16,63% e 48,79% respectivamente, não tendo alteração significativa no peso relativo dos órgãos de nenhum dos grupos avaliados (COSTA et al., 2020). Tais dados assemelham-se aos achados deste trabalho, além disso diversos estudos realizados com outras espécies da família *Annonaceae* também mostraram potente atividade antitumoral, com efeitos colaterais reduzidos em modelos de xenoenxerto de camundongos (AKATSUKA et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

O presente estudo revelou que o OEGO apresentou citotoxicidade promissora em células neoplásicas humanas, exibindo composição química semelhante às demais espécies do gênero *Guatteria*, incluindo germacreno D, 1-*epi*-Cubenol, óxido de cariofileno e espatulenol. Além disso, o OEGO causou um aumento na fragmentação do DNA internucleossomal e morte celular por apoptose e necrose em células HepG2. Ademais, o modelo *in vivo* demonstrou que o OEGO exibiu atividade antitumoral em modelo de xenoenxerto com células HepG2. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a atividade promissora desse óleo essencial que pode ser visto como um candidato para o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

- ABC do câncer:** abordagens básicas para o controle do **câncer** / **ABC of cancer:** basic approaches to the **cancer** control. Fonte: Rio de Janeiro; INCA; 2020.
- AKATSUKA, A. et al. A novel thiophene-3-carboxamide analog of annonaceousacetogenin exhibits antitumor activity via inhibition of mitochondrial complex i. **Pharmacology research & perspectives**. 2016, v. 4, n. 4.
- ALCÂNTARA, Joelma Moreira et al. Composição química e potencial biológico dos óleos essenciais de annonaceae dos campi INPA e UFAM. 2015.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Química Nova** v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- APPENDINO, Giovanni; FONTANA, Gabriele; POLLASTRO, F. 3.08—Natural products drug discovery. **Comprehensive Natural Products II**. Elsevier, Oxford, v. 205, 2010.
- ARAUJO, Morgana de Souza. **Constituintes químicos e investigação do potencial citotóxico das cascas e folhas de guatteria olivacea (Annonaceae)**. 172 f.: il. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/7438/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o_MorganaSouzaAraujo_PPGQ>.
- ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- BERTHELOOT, Damien; LATZ, Eicke; FRANKLIN, Bernardo S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106-1121, 2021.
- BOMFIM, L. M. et al. Antitumour activity of the microencapsulation of annona vepretorum essential oil. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 118, n. 3, p. 208-213, 2016.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91-3, 2019.
- CARDIA, Gabriel Fernando Esteves et al. Pharmacological, medicinal, and toxicological properties of lavender essential oil: A review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e23310514933-e23310514933, 2021.
- CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**, 3rd edn. Lisbon, Portugal, 2007.

CHEN, Lichan; ZENG, Yanyun; ZHOU, Shu-Feng. Role of apoptosis in cancer resistance to chemotherapy. **Current understanding of apoptosis-programmed cell death**, 2018.

CHEN, Ya-Yun et al. Studies on chemical constituents and anti-hepatoma effects of essential oil from *Annona squamosa* L. pericarps. **Natural product research**, v. 31, n. 11, p. 1305-1308, 2017.

CHEN, Zhiwei et al. Surgical stress and cancer progression: the twisted tango. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2019.

CIBAS, E.S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn. Cytopathol.**, v.13, p. 166–171, 1995.

COCHRANE, Curtis Bruce et al. Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. **Anticancer research**, v. 28, n. 2A, p. 965-971, 2008.

CORRADINI, Stefanie et al. Preoperative radiotherapy: a paradigm shift in the treatment of breast cancer? A review of literature. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 141, p. 102-111, 2019.

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatterriopsis blepharophylla*, *Guatterriopsis friesiana* e *Guatterriopsis hispida* (Annonaceae) – Tese (Doutorado) – Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciências, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 380 p., 2009a.

COSTA, Rafaela GA et al. In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 122, p. 109713, 2020.

D.J. Newman, G.M. Cragg, **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010** *J. Nat. Prod.*, 75 (2012), pp. 311-335.

DANCSOK, Amanda R. et al. Acetogenins from Annonaceae plants: potent antitumor and neurotoxic compounds. **PharmaNutrition**, p. 100295, 2022.

DANCSOK, Amanda R; ASLEH-ABURAYA, Karama; NIELSEN, Torsten O. Advances in sarcoma diagnostics and treatment. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 7068-7093, 2017.

DIAS, R. B. et al. Principles of cancer pathogenesis and therapies: A brief overview. In: (ed.). **Bioactive essential oils and cancer**. Springer, 2015. cap., p. 1-17

EHRENSTEIN, M. R.; MAURI, C. If the treatment works, ¿do we need to know why?: the promise of immunotherapy for experimental medicine. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 10, p. 2249-2252, 2007.

ERKENS, R. H. et al. A rapid diversification of rainforest trees (guatteria; annonaceae) following dispersal from central into south america. **Mol Phylogenet Evol.** 2007v. 44, n. 1, p. 399-411.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FARES, Jawad et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2020.

FERRAZ, R. P. C. et al. Cytotoxic properties of the leaf essential oils of guatteria blepharophylla and guatteria hispida (annonaceae). **Flavour and fragrance journal.** 2014, v. 29, n. 4, p. 228-232.

FERREIRA, Agnieszka Katarzyna Rajca et al. Chemical composition and biological activities of Guatteria elliptica R. E. Fries (Annonaceae) essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, [S.l.], v. 30 n. 1, p. 69-76, 2017.

FONTES, J. E. D. N. et al. Antitumor effect of the essential oil from leaves of guatteria pogonopus (annonaceae). **Chem Biodivers.** 2013, v. 10, n. 4, p. 722-729.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. **Biomed Res Int.** 2014.

GONÇALVES, J. Q. et al. Estudo químico de óleos essenciais. **Mostra Científica da Farmácia.** 2018, v. 4, n. 1.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: **the next generation.** **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANUŠOVÁ, Veronika et al. The effects of β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 828-836, 2017.

HEINRICH, Michael. Ethnopharmacology in the 21st century-grand challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 1, p. 8, 2010.

HENRICH, Curtis J.; BEUTLER, John A. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. **Natural product reports**, v. 30, n. 10, p. 1284-1298, 2013.

HERR, H.W.; MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **Journal of Urology**, v.179, p.53 – 56, 2008.

HOLOHAN, Caitriona et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 10, p. 714-726, 2013.

ICARD, Philippe et al. Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer. **Trends in biochemical sciences**, v. 44, n. 6, p. 490-501, 2019.

IMRAN, A. *et al.* Role of molecular biology in cancer treatment: a review article. **Iranian Journal of Public Health**, v. 46, n. 11, p. 1475, 2017.

KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 9th edn., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.1088, 2003.

KINGHORN, A. Douglas et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KUMAR, S.; KUMARI, R. Cinnamomum: Review article of essential oil compounds, ethnobotany, antifungal and antibacterial effects. **Open Access J. Sci**, v. 3, p. 13-16, 2019.

KUSUZAKI, Katsuyuki et al. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. **in vivo**, v. 21, n. 2, p. 205-214, 2007.

LOBÃO, A. Q.; SILVA, R. D. M.; FORZZA, R. C. Guatteria (annonaceae) da floresta atlântica brasileira. **Rodriguésia**. 2012, v. 63, n. 4, p. 1039-1064.

LOPES, Jenifer de Carvalho; MELLO-SILVA, Renato. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 125-131, 2014.

LÚCIO, A. S. S. C. Alcalóides azafenantrenos isolados de anaxagorea dolichocarpa sprague & sandwith (annonaceae). **Centro de Ciências da Saúde(CCS)** 2011.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p.823-837, 2009.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in lista de espécies da flora do brasil. **Jardim botânico do rio de janeiro**. 2016.

MASSAGUE, J. & OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature** 529, 298–306 (2016).

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. *In*: BETTIOL, W.; MORANDI, M. **Biocontrole de doenças de plantas, uso e perspectivas**, p. 139-152, 2009.

Morgana de Souza Araújo, Felipe Moura Araújo da Silva, Hector Henrique Ferreira Koolen, Emmanoel Vilaça Costa. Isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Guatteria olivacea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 2020.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, P. F. D. *et al.* Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2015 v. 25, n. 2, p. 183-188.

PALAZZO, M. C.; WRIGHT, H. L.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; MORIARITY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical Compositions and Biological Activities of Leaf Essential Oils of Six Species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. **Records Natural Products**, vol. 3, p. 153-160, 2009.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, Alka; VERMA, Rama S. Synergistic interaction of β -caryophyllene with aromadendrene oxide 2 and phytol induces apoptosis on skin epidermoid cancer cells. **Phytomedicine**, v. 47, p. 121-134, 2018.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, Alka; VERMA, Rama S. Synergistic interaction of β -caryophyllene with aromadendrene oxide 2 and phytol induces apoptosis on skin epidermoid cancer cells. **Phytomedicine**, v. 47, p. 121-134, 2018.

RAJCA FERREIRA, A. K. *et al.* Chemical composition and biological activities of guatteria elliptica re fries (annonaceae) essential oils. **Journal of Essential Oil Research**. 2018, v. 30, n. 1, p. 69-76.

RATAIN, M. J.; PLUNKETT, W. K. General Mechanisms of Drug Action. In: HOLLAND, J. F.; POLLOCK, R. E. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6 ed. Pmph Bc Decker Inc., 2003.cap 46.

REZENDE, Leandro Fórniás Machado de *et al.* Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. **Cancer epidemiology**, v. 59, p. 148-157, 2019.

RODRIGUES, Ana Carolina BC *et al.* Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta médica**, v. 81, n. 10, p. 798- 803, 2015.

RUSTHOVEN, Kyle E. *et al.* Effect of radiation techniques in treatment of oropharynx cancer. **The laryngoscope**, v. 118, n. 4, p. 635-639, 2008.

SALAMAT, M. Shahriar. Robbins and cotran: Pathologic basis of disease. 2010.

SCHEIN, Catia Fontinel *et al.* Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos

hospitalizados. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 7, n. 1, p. 101- 107, 2016.

SENGA, Sasi S.; GROSE, Richard P. Hallmarks of cancer—the new testament. **Open biology**, v. 11, n. 1, p. 200358, 2021.

SI, W. et al. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. **Clin Epigenetics**. V. 11, n. 25, 2019.

SONG, Wen-Guang et al. Therapeutic regimens and prognostic factors of brain metastatic cancers. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 2, p. 923-927, 2013.

SOREIDE, J. A. et al. Surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. **Tidsskr nor Laegeforen**, v.128, p.50 – 53, 2008.

SOUZA, A. V. M. **Atividade anti-inflamatória do extrato, de frações e do alcaloide dicentrinona, obtidos de duguetia furfuracea (St. Hil) em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, 2013.

SUFFNESS, M.; Pezzuto, J. M. 1991. Assays related to cancer drug discovery. In: *Methods in Plant Biochemistry: assays for bioactivity*, ed. Hostettmann, K. London: **Academic Press**.

SUHAIL, Yasir et al. Systems biology of cancer metastasis. **Cell systems**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUZUKI, K. Fujikura, T. Higashiyama, K. Takata, DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy, **J. Histochem. Cytochem.** 45 (1997) 49–53.

TANG, Tianyu et al. Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2021.

TESFAYE, Solomon et al. Ethiopian Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Cancer, Part 2: A Review on Cytotoxic, Antiproliferative, and Antitumor Phytochemicals, and Future Perspective. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 4032, 2020.

TORRES, María P. et al. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. **Cancer letters**, v. 323, n. 1, p. 29-40, 2012.

VELEZ, A. M. A.; HOWARD, M. S. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 176, 2015.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN, B. D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**. v. 36, p. 165-175, 2003.

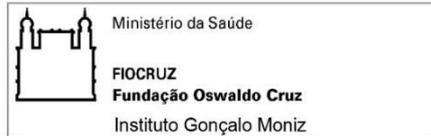
WU, Han-Chung; CHANG, De-Kuan; HUANG, Chia-Ting. Targeted therapy for cancer. **J Cancer Mol**, v. 2, n. 2, p. 57-66, 2006.

XIE, Chun Ying et al. B-cell lymphoma-2 over-expression protects δ -elemene-induced apoptosis in human lung carcinoma mucoepidermoid cells via a nuclear factor kappa B-related pathway. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1279-1286, 2011.

ZHAO, H. *et al.* Pristimerin triggers AIF-dependent programmed necrosis in glioma cells via activation of JNK. **Cancer Letters**, v. 374, n. 1, p. 136-148, 2016.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Jornal of Saudi Chemical Society** , 2011.

Anexo A – Comissão de ética no uso de animais



Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM / FIOCRUZ

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: **001/2021**

PROJETO: “Estudos de novos compostos com potencial antineoplásico”

COORDENADOR: Daniel Pereira Bezerra

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo isogênico CB17 SCID	180 M
Camundongo isogênico NSG	180 M

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IGM) em 06/04/2021 e tem validade até 06/04/2025.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the IGM-FIOCRUZ at 04/06/2021, being valid until 04/06/2025.

SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:

Vigência: 06/04/2021 a 06/04/2025

Relatório Parcial: 06/04/2023

Relatório Final: 06/04/2025

Salvador, 06 de abril de 2021.

Natália Machado Tavares
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

CEP- Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40.296-710, Brasil.
Tel: (55)-(71) 3176-2285 e-mail: ceua.igm@fiocruz.br