



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

MONALISA MARTINS MONTALVÃO

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia splendens*
EM CÉLULAS TUMORAIS

SÃO CRISTÓVÃO — 2022

MONALISA MARTINS MONTALVÃO

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia splendens*
EM CÉLULAS TUMORAIS

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

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Scher

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Montalvão, Monalisa Martins
M763a Atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de *Myrcia splendens* em células tumorais / Monalisa Martins Montalvão ; orientadora Cristiane Bani Corrêa. – São Cristóvão, SE, 2021.
55 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Câncer. 2. Citotoxicidade mediada por célula. 3. Camu-
camu. 4. Essências e óleos essenciais. I. Corrêa, Cristiane Bani,
orient. II. Título.

CDU 616-006:615.277.3

Folha de aprovação

MONALISA MARTINS MONTALVÃO

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia splendens*
EM CÉLULAS TUMORAIS

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

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Scher

1º Examinador: Profa. Dra. Eugênia Terra Granado Pina

2º Examinador: Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes

Dedico esta dissertação às minhas mães, Rita e Josete, e ao meu pai, Aurélio, por todo o amor, dedicação, paciência e suporte em todas as fases da minha vida. Eu devo tudo o que tenho e sou a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e sabedoria para lidar com as adversidades que surgiram ao longo de todos esses anos e concluir mais uma etapa tão importante;

Às minhas mães, Rita e Josete, e ao meu pai, Aurélio, as pessoas mais importantes da minha vida, que sempre se dedicaram para garantir o meu futuro e que me ensinaram a sempre buscar a minha independência e me guiar por meus valores;

À minha orientadora, profa. Cristiane Bani, minha mãe científica, por todos os ensinamentos, apoio, dedicação e paciência ao longo de todos esses anos. Suas palavras de incentivo ficarão para sempre em minha memória;

Ao meu coorientador, prof. Ricardo Scher, por todo o conhecimento compartilhado, pela parceira e paciência;

A todos os meus colegas do LaBICeL, Mariana, Willian, Lorrany, Jileno, Marcos, Rauã, Amanda, Bryanne, Cristiane, João, Ayane e Yrna, por todo o apoio, pelos inúmeros momentos de conversas, desabafos e conselhos, por todo o carinho e tanta experiência incrível compartilhada nos seminários, experimentos, confraternizações. Sou extremamente grata por fazer parte dessa família científica!

Ao meu amigo e irmão científico Bruno, pela parceria incrível e por toda a ajuda, durante todo o mestrado. Muito obrigada!

Às minhas amigas Jéssica e Yanna, pela amizade, suporte e apoio incondicionais. Amo vocês demais!

Ao meu namorado Anderson, por tanta dedicação, amor e carinho. Você foi essencial nessa etapa da minha vida e eu sou extremamente grata por tudo o que você fez por mim;

A todos os meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Minha eterna gratidão!

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS) pela oportunidade.

Se consegui enxergar mais longe, foi por estar apoiado
sobre o ombro de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia splendens* EM CÉLULAS TUMORAIS, Monalisa Martins Montalvão, São Cristóvão, 2021.

O câncer é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, ficando atrás em números apenas para as doenças cardiovasculares e tornando-se um grave problema de saúde pública. A principal forma de tratamento dos pacientes com câncer é a quimioterapia, com o uso de fármacos antineoplásicos. No entanto, apesar de efetivos, os antineoplásicos convencionais desencadeiam inúmeros efeitos adversos nos pacientes, uma vez que não apresentam seletividade para as células tumorais. Nesse contexto, diante das limitações dos tratamentos quimioterápicos convencionais, pacientes com câncer, em todo o mundo, têm recorrido a terapias complementares, como o uso de produtos naturais derivados de plantas. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química e avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial das folhas da espécie *Myrcia splendens* (OEMS), em diferentes linhagens tumorais. Para isso, foram realizadas a hidrodestilação das folhas e a análise do OEMS por CG-EM, que identificou como constituintes majoritários o biciclogermacreno, o e-cariofileno e o germacreno D, todos sesquiterpenos. A citotoxicidade *in vitro* do OEMS foi avaliada em três linhagens de células tumorais: adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10) e leucemia monocítica aguda (THP-1), através do ensaio de MTT. O OEMS apresentou citotoxicidade em todas as linhagens testadas, com IC₅₀ variando entre 5,37 e 20,14 µg/mL. Diante desse resultado, utilizou-se a linhagem de câncer de pulmão A549, devido às altas taxas de incidência e mortalidade desse câncer, para dar continuidade aos ensaios de avaliação da atividade antitumoral do OEMS. Foi avaliada a capacidade do OEMS de inibir a formação de clones da linhagem de células A549 por meio do ensaio clonogênico. Os resultados mostraram que o OEMS foi capaz de inibir significativamente a formação de clones em todas as concentrações testadas (10, 20 e 40 µg/mL). Além disso, no ensaio com DAPI e Faloidina/FITC, utilizado para verificar alterações morfológicas nas células, foi possível observar que o OEMS induziu morte celular por apoptose nas células A549 nas concentrações testadas (10, 20 e 40 µg/mL), evidenciada pelas características de redução do volume citoplasmático e fragmentação de DNA. Ademais, foi observado o encolhimento celular na concentração de 40 µg/mL do OEMS. O OEMS também foi capaz de reduzir significativamente a capacidade migratória das células A549 na concentração de 40 µg/mL. Diante dos resultados, sugere-se que o OEMS possui atividade antitumoral *in vitro*, mostrando-se promissor para futuros tratamentos contra o câncer.

Palavras-chave: Câncer. Citotoxicidade. Atividade antitumoral. Óleos essenciais. *Myrcia*.

ABSTRACT

CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE LEAVES OF *Myrcia splendens* IN TUMOR CELLS, Monalisa Martins Montalvão, São Cristóvão, 2021.

Cancer is the second most fatal disease in the world, followed only to cardiovascular diseases and becoming a serious public health problem. The main form of treatment for cancer patients is chemotherapy, with the use of anticancer drugs. However, despite being effective, conventional antineoplastics causes adverse effects in patients, since they do not have selectivity for tumor cells. In this context, given the limitations of conventional chemotherapy treatments, cancer patients all over the world have looking for complementary therapies, such as the use of natural products derived from plants. The objective of this work was to carry out the chemistry characterization and evaluate the in vitro antitumor effect of the essential oil from the leaves of the species *Myrcia splendens* (OEMS), in different tumor lines. For this, the hydrodistillation of the leaves and the analysis of the OEMS by GC-MS were performed, and identified the bicyclogermacrene, the e-caryophyllene and the germacrene D, all sesquiterpenes, as major constituents. The in vitro cytotoxicity of OEMS was evaluated in three tumor cell lines: lung adenocarcinoma (A549), melanoma (B16-F10) and acute monocytic leukemia (THP-1), using the MTT assay. OEMS showed cytotoxicity in all strains tested, with IC₅₀ ranging between 5.37 and 20.14 µg / mL. In view of this result, the A549 lung cancer strain was used, due to the high incidence and mortality rates of this cancer, to continue the trials to evaluate the antitumor activity of the OEMS. The ability of OEMS to inhibit the formation of clones of the A549 cell line was evaluated by clonogenic assay. The results available show that OEMS was able to significantly inhibit the formation of clones at all concentrations tested (10, 20 and 40 µg / mL). In addition, in assay with DAPI and Phalloidin / FITC, used to verify morphological changes in cells, it was possible to observe that OEMS induced cell death by apoptosis in A549 cells in the tested concentrations (10, 20 and 40 µg / mL), evidenced by the characteristics of reduced cytoplasmic volume and DNA fragmentation. Furthermore, cell shrinkage was observed at the concentration of 40 µg / mL of the OEMS. OEMS was also able to reduce the migratory capacity of A549 cells at a concentration of 40 µg/mL. Given the results, it is suggested that OEMS has antitumor activity in vitro, showing promise for future cancer treatments.

Key words: Cancer. Cytotoxicity. Anti-tumor activity. Essencial oils. *Myrcia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*	11
Figura 2 - Características habilitadoras do câncer	13
Figura 3 - Efeito inibitório do OEMS na formação de colônias de células A549	31
Figura 4 - Efeito do OEMS na morfologia do citoesqueleto e núcleo das células A549	32
Figura 5 - Efeito do tratamento com o OEMS sobre a migração das células A549	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 Linhagem de Células Epiteliais de Carcinoma Pulmonar Humano

B16-F10 Linhagem Celular de Melanoma

CDK Quinases Dependentes de Ciclina

CG-EM Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectometria de Massa

IC₅₀ Concentração inibitória para 50% das células

DAPI Dicloridrato de 6-diamidina-2-fenilindol

DMSO Dimetilsulfóxido

DOXO Doxorrubicina

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FALOIDINA/FITC Isotiocianato de Fluoresceína

INCA Instituto Nacional do Câncer José Alencar da Silva

MCF-7 Linhagem Celular de Adenocarcinoma

OEMS Óleo Essencial de *Myrcia splendens*

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Tampão Fosfato Salina

SFB Soro Fetal Bovino

THP-1 Linhagem Celular de Leucemia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	10
2.2	BIOLOGIA DO CÂNCER	11
2.3	MORTE CELULAR	14
2.4	CÂNCER DE PULMÃO	16
2.5	PRINCIPAIS TRATAMENTOS DO CÂNCER	18
2.6	PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER	19
2.7	ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.8	FAMÍLIA MYRTACEAE	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia splendens</i> (OEMS)	23
4.2	ANÁLISE QUÍMICA DO OEMS	23
4.3	MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS <i>IN VITRO</i>	24
4.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT	25
4.5	ENSAIO CLONOGÊNICO	25
4.6	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	26
4.7	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – ENSAIO DE DAPI E FALOIDINA/FITC	27
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS	28
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO OEMS	28
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i>	29
5.3	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	30
5.4	ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – ENSAIO DE DAPI E FALOIDINA/FITC	31
5.1	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	33
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo geral utilizado para denominar um conjunto de mais de 100 tipos de doenças causadas pela proliferação desordenada de células mutadas, que resulta no surgimento de massa tumoral, podendo afetar todas as partes do corpo (INCA, 2020). É a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, ficando atrás em números apenas para as doenças cardiovasculares e constituindo um grave problema de saúde pública (INCA, 2018).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022 é que ocorram 625.000 novos casos de câncer por ano, um pequeno aumento quando comparado aos anos anteriores, no qual a estimativa era de 600.000 casos por ano no país (INCA, 2020). Dentre todos os tipos de câncer (com exclusão do câncer de pele não melanoma), o câncer de pulmão ocupa a primeira posição em mortalidade e segunda em incidência no mundo, com uma estimativa de 2,2 milhões de casos novos e 1,8 milhões de mortes (SUNG, 2021). No Brasil, o câncer de pulmão tornou-se o terceiro mais comum e foi responsável por 29.354 mortes em 2019 (INCA, 2020).

A estratégia de tratamento mais utilizada para o câncer de pulmão é a quimioterapia, uma vez que, na maioria dos casos, o paciente é diagnosticado em estágio avançado da doença. No entanto, existem algumas limitações nos tratamentos quimioterápicos, como a quimiorresistência de tumores sólidos aos fármacos antineoplásicos convencionais, devido à incapacidade de os mesmos agirem em células hipóxicas, geralmente presentes no centro desses tumores. Além disso, muitos agentes antineoplásicos não apresentam seletividade para as células tumorais, atingindo também as células saudáveis, o que desencadeia inúmeros efeitos adversos e agrava a recuperação dos pacientes (INCA, 2020; SADHASIVAM; SUGUMARAN, 2020; XIONG et al., 2020). Essa quimiorresistência, somada aos dados estatísticos existentes hoje em relação ao câncer, bem como a heterogeneidade da doença e a dificuldade do tratamento, evidenciam a necessidade do desenvolvimento de terapias anticâncer mais seletivas e alternativas às terapias já existentes. Diversas pesquisas têm investigado a ação de produtos naturais, como plantas, por exemplo, relatando que são uma importante fonte de moléculas com atividade biologicamente ativa, e que podem ser usadas no tratamento do câncer, devido ao seu alto potencial citotóxico sobre as células tumorais (NEWMAN E CRAGG, 2016).

Inserindo-se neste contexto, surgem as pesquisas com plantas da família Myrtaceae, uma das famílias mais complexas taxonomicamente, tanto pela diversidade de espécies como pela escassez de estudos taxonômicos. A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros

e aproximadamente 4.600 espécies, divididas em duas subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae (GOVAERTS et al., 2015). No Brasil, a família Myrtaceae apresenta 1034 espécies distribuídas em 23 gêneros (FLORA DO BRASIL, 2020).

De acordo com Cerqueira e colaboradores (2009), a família Myrtaceae é particularmente rica em espécies produtoras de óleos essenciais, sendo o gênero *Myrcia* um dos mais numerosos da família, com cerca de 393 espécies distribuídas pelo Brasil, onde 304 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020). Suas espécies apresentam óleos essenciais com grande potencial terapêutico, pois possuem inúmeras propriedades biológicas, como atividade antibacteriana, antioxidante, inseticida e antitumoral (BRUN; MOSSI, 2010; OGUNWAND et al., 2005; CHAIEB et al., 2007). Os estudos químicos e biológicos da espécie *Myrcia splendens* ainda são escassos. Diante disso, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial das folhas de *Myrcia splendens* em células tumorais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é considerado um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças caracterizadas por expansão descontrolada e disseminação de um clone celular somático (ICGC et al., 2020). De acordo com as estimativas mais recentes da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer e da Organização Mundial da Saúde, ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e um total de 9,6 milhões de óbitos (BRAY et al., 2018). Entre todos os tipos de câncer, o câncer de pulmão ainda é o mais incidente no mundo (2,1 milhões), seguido do câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão), e próstata (1,3 milhão). Há uma maior incidência em homens (9,5 milhões), representando 53% dos casos novos, em relação às mulheres (8,6 milhões), que representam 47% dos novos casos. Entre os homens, os tipos de câncer mais frequentes foram o câncer de pulmão (14,5%), seguido do câncer de próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). As maiores incidências entre as mulheres foram de câncer de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (BRAY et al., 2018).

No Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022 é de que ocorram cerca de 625 mil novos casos de câncer por ano. Com exceção do câncer de pele não melanoma (cerca de 175 mil casos novos), ocorrerão aproximadamente 450 mil novos casos da doença (INCA, 2020). A estimativa para o Brasil revela ainda que os tipos de câncer com maior incidência serão o câncer de pele não melanoma (177 mil), mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Com exceção do câncer de pele não melanoma, entre os homens, os tipos de câncer mais frequentes serão os de próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5%). Já entre as mulheres, serão os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,5%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) (Figura 1) (INCA, 2020).

Dentre os diversos tipos de câncer, o de pulmão se destaca por ser um dos cânceres que se desenvolve com maior frequência e mortalidade em todo o mundo (GLOBOCAN, 2018; INCA, 2019), estando entre as neoplasias com menor taxa de cura, devido à dificuldade para o estabelecimento do diagnóstico precoce e a resistência à terapêutica (INCA, 2019).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	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	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2020.

2.2 BIOLOGIA DO CÂNCER

O mecanismo de formação do câncer é chamado de carcinogênese e apresenta múltiplas etapas, que ocorrem normalmente de forma lenta, podendo levar anos para que uma massa tumoral seja detectada. Este processo é composto por três etapas: iniciação, promoção e progressão (ALMEIDA, 2005).

A iniciação, primeira etapa da carcinogênese, ocorre quando um agente carcinógeno, denominado oncoiniciador, incide sobre células normais, em quantidade suficiente para desencadear alterações na molécula de DNA, ou seja, mutações genéticas. O material genético alterado pode não ser detectado pelos pontos de checagem durante o processo de intérfase, e as células entram em mitose, gerando células geneticamente alteradas, as chamadas células iniciadas, de forma irreversível. No entanto, nesta etapa as células se encontram apenas alteradas geneticamente, não sendo possível que haja detecção de um tumor na clínica (ALMEIDA, 2005; ESSERS; VERMEULEN; HOUTSMULLER, 2006; YOU; JONES, 2012).

Na segunda etapa, a promoção, as células iniciadas sofrem o efeito de oncopromotores, agentes carcinógenos que as tornam malignas, alterando a expressão dos seus genes, por meio de contato lento e gradual. Caso haja suspensão precoce do contato com o carcinógeno, a carcinogênese pode ser interrompida (ALMEIDA, 2005; ESSERS; VERMEULEN; HOUTSMULLER, 2006; YOU; JONES, 2012). A última etapa, a progressão, é caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversível das células, além de sucessivas mutações, em decorrência do acúmulo de alterações celulares ocorridas durante as etapas de iniciação e promoção (ALMEIDA, 2005).

Durante o desenvolvimento do câncer, as células tumorais adquirem habilidades cruciais para a garantia de sua sobrevivência e proliferação. Entre elas, estão: a manutenção da proliferação celular; evasão de moléculas supressoras de crescimento, indução de processo inflamatório pelo tumor; evasão do sistema imune; ativação de metástase e invasão; indução da angiogênese; instabilidade e mutação genômica; desregulação do metabolismo energético; ativação da imortalidade replicativa e resistência à morte celular (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

A manutenção da proliferação das células tumorais é um processo que ocorre principalmente devido ao aumento da sensibilidade a fatores de crescimento. Já a evasão de moléculas supressoras de crescimento se dá por meio da inativação de genes supressores de tumor (MORRIS; CHAN, 2015). Um outro processo de evasão, o do sistema imune, possibilita a sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea, e facilita a geração de metástases (VINAY et al., 2015). Essas metástases são ativadas para permitir que as células escapem do tumor primário e formem colônias em outras regiões do corpo, onde fatores como nutrientes e espaço não são limitantes à proliferação celular, inicialmente (HANAHAAN; WEINBERG, 2000). A indução de angiogênese promove a irrigação da massa tumoral com oxigênio e nutrientes. Já a característica habilitadora de instabilidade e mutação genômica faz com que o tumor apresente uma diversidade de tipos celulares, processo que dificulta o tratamento (SUZUKI; TAKAHASHI, 2013). A desregulação do metabolismo energético mantém como principal fonte de energia a respiração anaeróbica e a ativação da imortalidade replicativa, o que faz com que as células tumorais percam ou diminuam a capacidade de entrar em apoptose, adquirindo resistência à morte celular programada (NGO et al., 2015; MOHAMMAD et al., 2015). Desse modo, o processo pelo qual uma célula normal torna-se neoplásica é caracterizado por um acúmulo de modificações como as citadas acima (Figura 2) (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 – Características habilitadoras do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Todas essas características habilitadoras são adquiridas por meio de sucessivas alterações (mutações) no genoma celular. Uma vez que o funcionamento dos processos de crescimento, desenvolvimento, diferenciação e morte das células do corpo humano é regulado por genes, alterações cromossômicas que promovam modificações na arquitetura destes, podem resultar no surgimento do câncer (JORDE et al., 1999). Essas alterações desencadeiam múltiplas mutações em genes envolvidos no processo de diferenciação celular normal e proliferação: os proto-oncogenes. Estes, por sua vez, são ativados, tornando-se genes promotores de tumor, os oncogenes, que passam a impulsionar a multiplicação das células, uma vez que promovem a desregulação do ciclo celular, assumindo um papel fundamental no processo de patogênese do câncer (JAN & CHAUDHRY, 2019; ABEL & DIGIOVANNI, 2011).

O ciclo celular é um mecanismo completamente regulado para coordenar o processo de divisão em células normais. Entre cada uma dessas fases, mais especificamente entre G1 e S (G1/S) e G2 e M (G2/M), existem alguns obstáculos, os chamados pontos de checagem, que são responsáveis pela continuidade do ciclo celular e são regulados por uma série de proteínas quinases como as CDKs (quinases dependentes de ciclina) (FISHER, 2013; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2007; HEMAISWARYA & DOBLE, 2006).

Os genes supressores de tumor apresentam um papel importante nesse processo, uma vez que fazem parte dessa rede de checagem que evita o crescimento descontrolado das células. Um exemplo de gene supressor de tumor muito estudado nos mais variados tipos de câncer é o gene p53, que produz uma proteína supressora de tumor com o mesmo nome, e que atua como ponto de checagem no processo de divisão celular (KORGAONKAR; YADAV, 2019; MULLER; VOUSDEN, 2014). A ativação do gene p53 em um processo de dano celular, pode originar duas respostas, sendo elas: a ativação da proteína p21, um inibidor de CDK que leva à interrupção do ciclo celular e processo de reparo do DNA, ou a indução de apoptose, por ativação de genes pró-apoptóticos (KANAPAHIPILLAI, 2018).

2.3 MORTE CELULAR

O mecanismo de morte celular, durante muito tempo, foi caracterizado por uma sucessão de eventos, que podem ser resultantes de lesões ocasionadas por agentes nocivos, como processos infecciosos, isquemia e presença de toxinas no organismo. Esses agentes nocivos agem sobre as células, causando danos que podem ser reversíveis ou irreversíveis, sendo difícil estabelecer qual fator causa essa irreversibilidade. A produção desses danos depende da natureza do agente indutor, da duração e da intensidade da lesão (FILHO, 2006). Entretanto, descobriu-se que organismos multicelulares possuem a capacidade de induzir morte celular, como forma de resposta a estímulos intracelulares e extracelulares, não somente em situações de lesão celular (GRIVICICH, 2007).

Geralmente, a morte celular em mamíferos é classificada em dois tipos: necróticos e não necróticos. Na necrose ocorre perda de integridade de membrana celular, com extravasamento do conteúdo intracelular, desencadeando um processo inflamatório. Na morte celular não necrótica o conteúdo intracelular é dividido em pequenas vesículas chamadas de corpos apoptóticos, estruturas que impedem o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular, para não ocorrer uma resposta inflamatória (HOFMANN, 2020). Entre os diversos tipos de morte celular descritos, a apoptose e a necrose são os mais investigados, no que diz respeito às alterações morfológicas que desencadeiam e em todo o processo de sinalização celular envolvido (SATO et al., 2020).

A apoptose é uma morte celular programada associada à regulação da homeostase tecidual, que promove um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Além disso, participa do processo de destruição de células que possam ser deletérias para o organismo, como por

exemplo, as células que sofreram lesões no seu material genético (ARAVINDARAM et al., 2010). Esse processo desencadeia mudanças morfológicas com padrões característicos, como protusões na membrana plasmática, condensação da cromatina, diminuição do volume citoplasmático e fragmentação do DNA (LY; GRUBB e LAWEN, 2003). O processo de apoptose envolve a ativação de diferentes tipos de caspases, sendo elas iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3 e 7). As caspases iniciadoras são responsáveis por recrutar e ativar pró-caspases e as efetoras têm o papel de clivar proteínas (MOHAMED et al., 2017). Existem duas vias de ativação das caspases: a via intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca ocorre com a participação da mitocôndria, e culmina na liberação do citocromo c, que forma um complexo com a APAF-1 (Fator de Ativação de Protease Associado à Apoptose 1) e a pró-caspase 9, liberando a caspase 9 em sua forma ativada. A ativação da caspase 9 culmina na ativação da caspase 3 e outras caspases efetoras, dando início à apoptose. Já a via extrínseca é desencadeada pela ligação a receptores de morte, capaz de ativar uma cascata de caspases (TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2007; KOFF, RAMACHANDIRAN, MIZRACHI, 2015).

Durante o processo de carcinogênese, mutações ou deleções podem afetar genes que regulam o processo de apoptose, impedindo que este mecanismo atue na proteção celular (PIERCE, 2004). Defeitos nesse processo, por sua vez, contribuem para a progressão tumoral e expressão do fenótipo de malignidade por permitir a sobrevivência das células mutadas, levando ao acúmulo de mutações e à instabilidade genética (IBUKI e GOTO, 2004).

A necrose é caracterizada pelo aumento do volume de organelas celulares, como o retículo endoplasmático e mitocôndrias, além de perda de integridade de membrana (ruptura), lise celular, com núcleo praticamente intacto, ao contrário da apoptose. Geralmente, a morte celular por necrose é seguida de processos inflamatórios (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). A necrose pode ocorrer em cânceres quando o número de células tumorais supera a formação de vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição da massa tumoral, culminando em um quadro de hipóxia celular (YU et al., 2020).

2.4 CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão é um grave problema de saúde mundial, sendo o primeiro em todo o mundo em mortalidade e segundo em incidência. No Brasil, é o segundo mais comum em homens e mulheres (com exceção do câncer de pele não melanoma), representando cerca de 13% de todos os novos casos de câncer (SUNG, 2021; INCA, 2020). Usualmente, a

denominação *câncer de pulmão* é utilizada para se referir a tumores decorrentes do epitélio respiratório, o que inclui os brônquios, bronquíolos e alvéolos (ROSKOSKI, 2017).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão é, sem dúvida, o tabagismo, visto que a exposição contínua aos carcinógenos presentes no tabaco promove a indução de uma alta taxa de mutação nas células pulmonares (SEMENOVA et al., 2015).

Um grande problema no diagnóstico do câncer de pulmão está relacionado com a sua detecção, pois carcinomas de pulmão geralmente são detectados no estágio IV, em sua forma metastática. Essa metástase pode ocorrer via vasos linfáticos ou vasos sanguíneos. A invasão vascular pode ser também observada em tumores de baixo estágio, um problema que pode acarretar o aumento da recorrência, assim como na redução da sobrevida dos pacientes (POPPER, 2016). No que diz respeito à sua forma metastática, os carcinomas pulmonares possuem predileções por alguns órgãos, como os ossos, cérebro e glândulas adrenais. Nos últimos anos, por exemplo, estão cada vez mais sendo vistas metástases cerebrais derivadas de adenocarcinomas pulmonares, com mutações nos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (SHIN et al., 2014; TAMURA et al., 2015; HENDRIKS et al., 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 90% dos cânceres de pulmão podem ser classificados histologicamente em dois grupos: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP, do inglês *small cell lung cancer* - SCLC), que corresponde a 15% dos tumores, e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP, do inglês *non small cell lung cancer* - NSCLC), com maior incidência, correspondendo a 85% dos casos de câncer de pulmão (INAMURA, 2017). Alguns aspectos são considerados para essa classificação histológica, como as diferenças na localização anatômica, na ocorrência de metástases, na eficácia terapêutica e nas manifestações clínicas (TRAVIS, 2011).

Os CPCNPs podem ser classificados em três grupos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes. O adenocarcinoma representa 40% dos casos e normalmente é diagnosticado em pacientes fumantes, além de, curiosamente, ser prevalente em pacientes fumantes passivos. O carcinoma de células escamosas corresponde a cerca de 30% dos casos de câncer de pulmão, relaciona-se com a região brônquica, sendo também diagnosticado em fumantes. Um dado importante sobre o carcinoma de células escamosas é que um prognóstico ruim pode estabelecer uma baixa expectativa de vida para pacientes recém-diagnosticados, de apenas 5 anos (SANTARELLI et al., 2018). O carcinoma de células grandes (15 a 20% dos diagnósticos) é o subtipo que possui tendência a gerar metástases de maneira precoce, dificultando o tratamento dos pacientes (CHEN et al., 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; RELI et al., 2019).

De maneira geral, os CPCNPs manifestam-se como massas pulmonares periféricas ou nódulos pequenos, geralmente associados ao acometimento pleural (ou derrame pleural). Em contrapartida, os CPCPs aparecem como massas centrais com crescimento nos brônquios (TRAVIS, 2011; INAMURA, 2017). Para entender melhor a biologia das CPCNPs, Giard e colaboradores (1973) desenvolveram um conjunto de linhagens celulares derivadas de tumores sólidos humanos, entre elas a linhagem A549, que foi coletada durante a ressecção cirúrgica de um paciente do sexo masculino, com 58 anos de idade. Após o seu estabelecimento, percebeu-se que essa linhagem apresenta boas características de cultura, tornando-se um atrativo modelo de pesquisa para o estudo dos diferentes mecanismos de substâncias anti-CPCNP (GAO et al., 2016).

2.5 PRINCIPAIS TRATAMENTOS DO CÂNCER

As ferramentas terapêuticas utilizadas nos tratamentos contra os mais variados tipos de câncer podem ser realizadas de forma local (ressecção cirúrgica, radioterapia e fototerapia) ou sistêmica (quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia e terapia alvo). A depender da gravidade da doença é escolhido o tratamento mais apropriado (PALUMBO et al., 2013; RAMAKRISHNAN; GABRILOVICH, 2013).

Dentre os citados, os principais tratamentos utilizados para o câncer são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia consiste na retirada do tumor que está em desenvolvimento no paciente oncológico. Ela não é indicada para todos os tipos de câncer, havendo a necessidade, por exemplo, de combiná-la a uma terapia adjuvante com quimioterápicos, após a intervenção cirúrgica, visando eliminar células tumorais remanescentes e combater micrometástases (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; MCLEOD, 2013).

A radioterapia, por sua vez, quando utilizada no tratamento do câncer, é realizada através do uso de radiações ionizantes que danificam o material genético das células, tornando-as incapazes de se proliferar. Esse tipo de tratamento pode ser realizado de forma única ou em associação com a quimioterapia (SAWANDA; DIAS; ZAGO, 2006).

A quimioterapia é realizada através do uso de medicamentos quimioterápicos, também conhecidos como antineoplásicos. Esses medicamentos agem sobre as células tumorais e também sobre as células normais do organismo, o que acaba por ocasionar efeitos colaterais adversos, causando transtornos aos pacientes (ARANHA, 2014).

Os efeitos colaterais dos quimioterápicos compreendem: perda funcional, transtornos hormonais, alopecia, náusea e vômito, que se dá principalmente pelo mecanismo de ação dos antineoplásicos e incapacidade de diferenciar células tumorais de células normais (FERREIRA; FRANCO, 2017). Essas duas últimas formas de tratamento (radioterapia e quimioterapia) também afetam células imunes e células inflamatórias, o que compromete a resposta imune contra a doença (GRIVENNIKOV et al., 2010).

Uma das estratégias de tratamento utilizadas nos estágios avançados do câncer de pulmão geralmente consiste em 4 ciclos de quimioterapia, normalmente baseada no uso de cisplatina, com adição de um agente citotóxico ou citostático de terceira geração, como o anti-EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) e anti-VEGFR (do inglês, *Vascular Endotelial Growth Factor Receptor*) (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2018). No entanto, a falta de seletividade se tornou um dos maiores problemas associados aos antineoplásicos utilizados no tratamento quimioterápico convencional do câncer de pulmão, uma vez que desencadeiam uma série de efeitos adversos nos pacientes (FATHI KARKAN et al., 2017; SADHASIVAM; SUGUMARAN, 2020; XIONG et al., 2020). Dessa forma, assim como para outros tipos de câncer, percebe-se a cada dia a necessidade da implementação de novas alternativas no combate às lesões causadas pelo câncer de pulmão (ALBERTS, 2003). A utilização de substâncias derivadas de produtos naturais vem representando a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos usados na terapia anticâncer (BEZERRA et al., 2008).

Diante disso, faz-se necessária a busca por terapias alternativas mais potentes, seletivas e com menos efeitos adversos do que as terapias já existentes, visando a qualidade de vida do paciente (EGGERMONT; ROBERT, 2012).

2.6 PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Dentre as fontes de produtos naturais existentes, mineral, vegetal e animal, os derivados vegetais, devido à grande diversidade vegetal existente, são a mais rica fonte de moléculas com potencial atividade biológica (ARANHA, 2014).

O Brasil possui 20% de toda a diversidade vegetal do mundo, com um grande número de espécies endêmicas (OLIVEIRA, 2016). Essa rica diversidade é um impulsionador socioeconômico para o país, além de ser uma ampla fonte de potenciais fármacos utilizados no tratamento de enfermidades (NEWMAN E CRAGG, 2016). O semiárido nordestino possui uma

vegetação característica do seu bioma, a Caatinga, de onde são retiradas inúmeras espécies com propriedades medicinais, muito utilizadas na formulação de produtos fitoterápicos. No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam as propriedades químicas e biológicas das espécies vegetais dessa região, diante da grande diversidade apresentada (SANTOS et al., 2018).

Além do uso direto das plantas medicinais como medicamentos, é possível ainda, através de estudos sobre a composição química destas plantas, obter diversas moléculas com potencial atividade biológica. Metabólitos secundários produzidos por plantas foram a base para o isolamento de diversos princípios ativos hoje muito utilizados na prática medicinal.

Os produtos naturais são intensivamente estudados e utilizados em terapias anticâncer, uma vez que são capazes de melhorar a eficácia do tratamento quimioterápico, além de promover a redução da resistência dos tumores ao tratamento e dos efeitos adversos, ocasionando um aumento na qualidade de vida dos pacientes (ANDRADE et al., 2019). A primeira droga anticâncer desenvolvida a partir de um produto natural foi a podofilotoxina, isolada em 1947 da espécie *Podophyllum peltatum*, o que possibilitou a descoberta de outras drogas derivadas de produtos naturais, como o etoposídeo (Etopophos®), paclitaxel (Taxol®), vimblastina (Velban®) e vincristina (Oncovin®) (COLEGATE et al., 2008). Drogas como a vimblastina e o paclitaxel atuam diretamente nos microtúbulos, interferindo em sua estrutura e função, agindo em vias apoptóticas, por meio de mecanismos que envolvem a expressão de proteínas da família BCL-2 (DOSTÁL e LIBUSOVÁ, 2014).

São observados diversos efeitos terapêuticos promovidos pelos produtos naturais, como antioxidantes, antiproliferativos e pró-apoptóticos, nos mais diversos tipos de câncer (próstata, mama, colorretal, cérebro, melanoma, pâncreas e leucemia (LIU et al., 2015). Cerca de 77% dos fármacos empregados na terapia do câncer são provenientes de produtos naturais e a busca por moléculas ativas com atividade citotóxica tem sido de grande importância para o tratamento dessa doença (NEWMAN E CRAGG, 2016).

2.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, que os sintetizam como mecanismo de comunicação e defesa. A síntese e o acúmulo dos óleos essenciais ocorrem devido à presença de estruturas secretoras, como os tricomas glandulares (Lamiaceae), cavidades secretoras (Myrtaceae e Rutaceae) e ductos de resina (Asteraceae e Apiaceae) (PAVELA; BENELLI, 2016).

Os óleos essenciais são compostos por uma mistura de substâncias voláteis, normalmente odoríferas e líquidas, lipofílicas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Podem ser incolores ou com coloração ligeiramente amarelada, apresentando densidade menor que a água. Quimicamente, são derivados de terpenos e fenilpropanoides (ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014). Os terpenos constituem a maior classe desses produtos naturais, são derivados do isopreno (C5) e classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2009). A biossíntese dos terpenos geralmente ocorre por duas rotas principais: a do ácido mevalônico e a do metileritritol fosfato (MEP). A rota do ácido mevalônico ocorre no citoplasma da célula vegetal, sendo este composto proveniente da união de unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA). A rota do MEP ocorre nos cloroplastos, sendo esse oriundo de unidades de piruvato e gliceraldeído-3P (DEWICK, 2009).

A composição química dos óleos essenciais geralmente compreende de 20 a 60 constituintes em concentrações distintas, caracterizados por dois ou três componentes majoritários, com concentrações elevadas, que variam de 20% a 70% (BAKKALI et al., 2008). Essa composição pode sofrer variações de acordo com a espécie, métodos de cultivo, idade da planta, características do solo, fatores climáticos, tempo de secagem e estocagem. Os estímulos ambientais podem redirecionar a rota metabólica de produção desses óleos, desencadeando a biossíntese de compostos distintos (MANOSROI et al., 2006; BLANK et al., 2010; GOBBONETO; LOPES, 2007). Desta forma, torna-se necessária a escolha do melhor momento e processo de extração, para a obtenção de substâncias específicas e de maior quantidade de óleo essencial (MATIAS et al., 2016).

Devido à sua volatilidade, os óleos essenciais podem ter sua composição química mais bem analisada, em comparação aos compostos não-voláteis, por meio de técnicas de cromatografia gasosa. Além disso, a combinação dos seus constituintes com baixo peso molecular e caráter apolar pode conferir aos óleos essenciais uma excelente biodisponibilidade (LESGARDS et al., 2014)

Os óleos essenciais constituem uma fonte importante de compostos com potencial anticâncer. Diversos estudos relatam os efeitos antitumorais dos óleos essenciais e seus constituintes, em modelos *in vitro* e *in vivo* (REN et al., 2018; KUBATKA et al., 2019; ANUNCIAÇÃO et al., 2020; JAMALI; KAVOOSI; ARDESTANI, 2020). Nesse contexto, pesquisas que avaliam o potencial anticâncer dos óleos essenciais e seus constituintes estão crescendo ao longo dos anos, com a finalidade de encontrar novas substâncias bioativas naturais, que possam ser utilizadas nas terapias anticâncer.

2.8 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 4600 espécies, distribuídas em 140 gêneros de arbustos lenhosos e árvores de porte alto, localizadas em regiões tropicais e subtropicais. Esta família possui centros de diversidade na América do Sul, sudeste da Ásia e Austrália. No Brasil, está entre as famílias com o maior número de espécies, compreendendo cerca de 1034, representada por 23 gêneros de ocorrência em todas as regiões do país. As espécies podem ser reconhecidas por características como folhas aromáticas com numerosas glândulas sebáceas, flores polistêmones com ovário epígeno, geralmente actinomorfas, partes de flores em múltiplos de quatro ou cinco, ovário meio inferior a inferior, floema interno e fossas nos vasos do xilema (GOVINDARAJAN e BENELLI, 2016; RAPOSO et al., 2018; MCCOOK-RUSSELL et al. 2012; AZEVEDO et al., 2016).

As espécies da família Myrtaceae são fontes ricas em metabólitos secundários, pois crescem sob condições ambientais adversas, em exposição a luz solar, chuva, seca, inundações. Geralmente, a produção destes metabólitos está envolvida no mecanismo de defesa das plantas (MORO, 2010; OLIVEIRA, 2016).

Dentre os gêneros encontrados na família Myrtaceae, destaca-se o gênero *Myrcia*, por ser um dos mais representativos da família, com aproximadamente 770 espécies (GOVAERTS et al., 2019; LUCAS et al., 2007, 2018). No Brasil, o gênero está representado por 393 espécies distribuídas em todos os estados e domínios fitogeográficos, sendo 304 espécies endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020). Uma grande parte das espécies de *Myrcia* possui inflorescência do tipo panícula, uma característica que as diferencia dos demais gêneros da família (BAROSSO et al., 1984). Algumas espécies são utilizadas na medicina popular, principalmente na forma de infusões. No tratamento da diabetes, por exemplo, são feitas infusões das folhas ou da planta inteira de espécies como *Myrcia* (M.) *punicifolia* (Kuhnt) DC., *M. speciosa* (Amsh.) Mc Vaugh, *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC., *M. salicifolia* DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC., *M. uniflora* DC. E *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (LE COINTE, 1934; COIMBRA, 1994; CRUZ, 1995; VAN DEN BERG, 2010; SILVA et al., 2015; JORGE; AGUIA; SILVA, 2000)

Diversos óleos essenciais e extratos de plantas do gênero *Myrcia* têm sido investigados nos últimos anos, devido aos seus potenciais antibactericidas, inseticidas, leishmanicidas, antioxidantes e anti-inflamatórios e citotóxicos (SANTANA et al., 2021; GOMES et al., 2020; CALAO, 2014; SANTOS et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial das folhas de *Myrcia splendens* em linhagens de adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10) e leucemia monocítica aguda (THP-1).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar quimicamente o óleo essencial das folhas da *Myrcia splendens*;
- 2) Avaliar a viabilidade celular nas linhagens A549, B16-F10 e THP-1 após tratamento com óleo essencial da *Myrcia splendens*;
- 3) Avaliar o efeito do tratamento com o óleo essencial da *Myrcia splendens* na formação de colônias na linhagem A549;
- 4) Analisar o efeito do tratamento com o óleo essencial da *Myrcia splendens* na migração da linhagem A549;
- 5) Avaliar as alterações morfológicas na linhagem A549 após tratamento com o óleo essencial da *Myrcia splendens*;

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia splendens* (OEMS)

Para a obtenção do óleo essencial de *Myrcia splendens* (ASE 33399), as folhas foram coletadas e processadas de acordo com os procedimentos usuais para a família e os materiais-testemunho foram depositados no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS). A coleta e identificação das espécies foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Adauto de Souza Ribeiro (Departamento de Biologia/UFS). O óleo essencial de *Myrcia splendens* (OEMS) foi obtido em colaboração com a Profa. Dr. Samísia Maria Fernandes Machado (Departamento de Química/UFS). A extração do OEMS foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado, durante 3 horas. Em seguida foi seco sobre sulfato de sódio anidro e mantido no escuro a 4°C antes do uso. O OEMS foi obtido com rendimento de 0,3% (m/m). Para cada ensaio de citotoxicidade foi feita uma solução estoque do óleo essencial a 0,02g diluída em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da solução estoque foram preparadas diluições seriadas (100 a 2,5 µg/mL) em meio RPMI (Sigma- Aldrich®), as quais foram utilizadas nos testes de *in vitro*.

4.2 ANÁLISE QUÍMICA DO OEMS

A composição do óleo foi avaliada por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS). A GC analítica foi realizada no cromatógrafo de gás Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com sistema de manipulação de dados HP GC ChemStation Rev. A.05.04, equipado com um único injetor e dois sistemas de detecção de ionização de chama (FID). O divisor Graphpack (Agilent Technologies, parte no. 5021-7148) foi usado para amostragem simultânea em duas colunas capilares de sílica fundidas Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com diferentes fases estacionárias: SPB-1 (polidimetilsiloxano 30 m × 0,20 mm id, espessura do filme 0,20 µm) e Supelcowax-10 (polietilenoglicol 30 m × 0,20 mm id, espessura do filme 0,20 µm). O programa de temperatura do forno foi 70–220 ° C (3 ° C.min – 1), 220 ° C (15 min), com temperatura do injetor: 250 ° C, gás portador: hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm.s⁻¹; razão de divisão 1:40; temperatura dos detectores: 250 ° C. A GC-MS foi realizada em um cromatógrafo de gás Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna de sílica fundida HP1 (polidimetilsiloxano 30 m × 0,25 mm id, espessura de filme de 0,25 µm) com interface com um

detector seletivo de massa Hewlett-Packard 5973 (Agilent Technologies), operado pelo software HP Enhanced ChemStation, versão A.03.00. Os parâmetros de GC são descritos acima, com temperatura de interface: 250 ° C, temperatura da fonte MS: 230 ° C, temperatura quadrupolo MS: 150 ° C, energia de ionização: 70 eV, corrente de ionização: 60 mA, faixa de varredura: 35–350 unidades, e scans.s – 1: 4.51.

Os componentes do óleo essencial foram identificados por seus índices de retenção nas colunas SPB-1 e Supelcowax-10 e de seus espectros de massa. Os índices de retenção, calculados por interpolação linear para tempos de retenção de C8-C23 de n-alcanos, foram comparados com os de amostras de referência incluídas na base de dados da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Os espectros de massa adquiridos foram comparados com os espectros de referência do banco de dados do laboratório e biblioteca Wiley/NIST. Quantidades relativas de componentes individuais foram calculadas com base nas áreas de dados brutos do GC sem correção do fator de resposta do FID.

4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS *IN VITRO*

Foram utilizadas as linhagens tumorais de adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10) e leucemia monocítica aguda (THP-1) para avaliar a citotoxicidade do OEMS. Todas as células foram obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich®) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. Após atingirem 80% de confluência, realizou-se a subcultura. Para o estabelecimento de subculturas, as células da linhagem THP-1 foram transferidas para um tubo cônico de 15mL e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. As linhagens A549 e B16-F10 por serem aderentes, foram soltas do fundo da garrafa de cultura por tratamento com solução de tripsina-EDTA, contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA em PBS, por três minutos, a 37°C. A suspensão de células foi transferida para um tubo cônico de 15mL contendo meio de cultura com 10% de SFB, para a inativação da tripsina e, em seguida, centrifugada a 1200 rpm, por 10 minutos a 4°C. Todas as linhagens tumorais tiveram seu precipitado de células ressuspensão em 5 mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich®) e a suspensão de células foi utilizada para a manutenção das linhagens em cultura e para as análises experimentais.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium – MTT (Sigma-Aldrich®). O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado por espectroscopia. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). As linhagens tumorais de adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10) e leucemia monocítica aguda (THP-1) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^4 células/poço) e cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich®), contendo NaHCO_3 (1,2 g/L), ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), e suplementado com SFB a 10%. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais (2,5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas, em incubadora a 37°C e 5% de CO_2 . A Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Uma solução de MTT a 0,025g diluída em 50mL de PBS foi colocada em contato com as células, que logo em seguida foram incubadas a 37°C por 3h. Após a retirada do MTT, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) aos poços e as placas foram incubadas durante 10 min para a solubilização dos cristais do sal tetrazólico. Em seguida foi realizada a leitura da densidade ótica (DO) em leitor de microplacas automatizado (Synergy™) a um comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em quadruplicata e em seguida normalizados de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Abs (células tratadas)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (controle)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

Este ensaio consiste em avaliar a viabilidade celular e capacidade de formação de colônias de células (FRANKEN et al., 2006). As células A549 foram semeadas em placa de 6

poços (300 células/poço) em meio RPMI contendo 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10.000 mg/mL). Após 24h de incubação em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, as células foram expostas a concentrações equivalentes a 0,5x IC₅₀, 1x IC₅₀ e 2x IC₅₀ do OEMS, por 24h, em estufa, sob as mesmas condições. Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 25µg/mL foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Após o tempo de tratamento, os meios foram retirados e meio DMEM completo foi adicionado aos poços, e as células incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 10 dias. Após 10 dias, as células foram fixadas com metanol + ácido acético (3:1) por 5 min e coradas com cristal violeta 0,5% em água por 30min. Ao final do experimento, o padrão de crescimento em número de colônias das células foi observado e contado, com auxílio do software Image J.

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Os efeitos do OEMS sobre a capacidade migratória das células tumorais de adenocarcinoma de pulmão A549 foram avaliados pelo ensaio de cicatrização de ferida (do inglês, *wound healing*). Neste ensaio, 4x10⁵ células foram semeadas em placa de 12 poços e incubadas por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após as 24h, os poços foram lavados com PBS 1X e um risco foi feito na porção central de cada poço, com o auxílio de uma ponteira amarela (20-200 µL). Os poços foram lavados com PBS 1X para remover as células soltas da região do risco. Em seguida, as células foram expostas a concentrações correspondentes a 0,5x IC₅₀, 1x IC₅₀ e 2x IC₅₀ do OEMS e incubadas por 24h em estufa. Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 25 µg/mL foram usados com controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Durante o período de incubação, a área do risco foi observada com auxílio de microscópio óptico invertido (Nikon, T5100) em aumento de 40X, de onde foram capturadas fotografias nos tempos 0, 24 e 48h de tratamento. A área de fechamento foi mensurada com auxílio do software Image J 1.46, e a porcentagem de fechamento foi calculada comparando os tempos com o tempo zero, utilizando a fórmula previamente descrita (YARROW et al., 2004):

$$\text{Porcentagem de fechamento (\%)} = (A_{t=0h} - A_{t=h}) / A_{t=0h} \times 100,$$

onde $A_{t=0h}$ é a área total no tempo zero (momento em que o risco foi feito) e $A_{t=h}$ é a área total do risco em cada um dos tempos subsequentes.

4.7 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – ENSAIO DE DAPI E FALOIDINA/FITC

Neste ensaio são avaliadas as alterações na morfologia do citoplasma e núcleo celular, que podem sugerir a indução do mecanismo de morte celular por apoptose ou necrose de um composto (GALLUZZI; VITALE; KROEMES, 2018). As células A549 foram semeadas na concentração de 1×10^4 em placas de 48 poços, em meio RPMI contendo 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10.000 mg/mL). Após 24h de incubação, as células foram expostas a concentrações de $0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$ do OEMS e incubadas por 24h em estufa. Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 25 μ g/mL foram usados com controle negativo e controle positivo, respectivamente. O meio de cultura de todos os poços da placa foi retirado e as células lavadas três vezes com PBS 1X. Após a lavagem, as células foram fixadas com formaldeído 4%, em temperatura ambiente, durante 15 min e, em seguida, lavadas novamente com PBS 1X. Foi realizada a permeabilização das células utilizando solução Triton X-100 a 0,2% diluída em PBS, por 15 min e, em seguida, utilizou-se a Albumina Sérica Bovina (BSA) a 1%, também diluída em PBS, por 30 min. Para a visualização do citoesqueleto, as células foram coradas com Faloidina/FITC (25 μ g/mL) por 30 min, na ausência de luz, seguida de 2 lavagens com PBS. O núcleo celular foi contra corado com DAPI (1 μ g/mL) por 10 min, na ausência de luz. As imagens foram capturadas em aumento de 200x e 400x em microscópio de fluorescência (Olympus, USA).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata de pelo menos três experimentos independentes. Para todos os experimentos, o intervalo de confiança de 95% foi utilizado e valores $p < 0,05$ foram considerados significantes estatisticamente. Análises e gráficos, assim como os valores de IC_{50} foram obtidos por meio da utilização do programa GraphPadPrism 6. O teste utilizado para comparação entre grupos foi o ANOVA, seguido de pós teste Dunnett ou pós teste Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *MYRCIA SPLENDENS*

A análise cromatográfica do OEMS resultou na identificação de 22 constituintes químicos, representando 88% do total da amostra. Os resultados da análise por CG-EM mostraram que o OEMS foi caracterizado por elevados percentuais de sesquiterpenos hidrocarbonetos (48,5%) e sesquiterpenos oxigenados (39,6%). As porcentagens dos constituintes e seus índices de retenção estão resumidos na Tabela 1.

Foram identificados três compostos majoritários: biciclogermacreno (15,4%), e-cariofileno (10,1%) e germacreno D (8,9%).

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *M. splendens* (OEMS) analisados por CG-EM.

RI ^a	RI ^b	Compostos*	Quantidade relativa na
			amostra (%)
			OEMS
1329	1467	δ -Elemeno	2.9
1342	1455	α -Cubebeno	0.5
1369	1487	α -Copaeno	2.2
1380	1536	β -Cubebeno	0.7
1376	1517	β -Bourboneno	1.7
1408	1590	<i>E</i> -Cariofileno	10.1
1422	2130	γ -Elemeno	0.5
1427	1600	Aromadendreno	0.3
1442	1662	α -Humuleno	2.4
1466	1699	Germacrene D	8.9
1470	1715	β -Selineno	0.2
1479	1726	Biciclogermacreno	15.4
1508	1751	δ -Cadineno	2.7
1526	2070	Elemol	7.5
1553	2113	Espatulanol	1.6
1557	1975	Óxido de cariofileno	0.6
1562	2063	Globulol	0.6
1576	2079	Guaiol	7.7

1607	2453	γ -Eudesmol	3.7
1622	2215	β -Eudesmol	5.0
1628	2208	α -Eudesmol	5.1
1639	2196	Bulnesol	7.8
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			48.5
Sesquiterpenos oxigenados			39.6
Total identificado			88.0

(*) – Compostos listados em ordem de eluição na coluna SPB-1.

RI^a - Índice de retenção determinado na coluna não polar SPB-1 em relação a uma série de n-alcanos (C₈-C₂₃).

RI^b - Índice de retenção determinado em uma coluna SupelcoWax-10 em relação a uma série de n-alcanos (C₈-C₂₃).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

A atividade citotóxica do OEMS foi avaliada em três linhagens de células tumorais: A549 (adenocarcinoma de pulmão), THP-1 (leucemia monocítica aguda) e B16-F10 (melanoma), por meio do método de MTT, após 24h de tratamento. Os valores de IC₅₀ e o intervalo de confiança foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade citotóxica do OEMS em linhagens de células tumorais.

Células	<i>Myrcia splendens</i>
	IC ₅₀ (µg/mL)
A549	20,14
	16,46 – 24,64
B16-F10	17,76
	9,48 – 33,26
THP-1	5,37
	2,17 – 13,30

Os dados são apresentados como valores de IC₅₀ em µg/mL e o intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, da atividade citotóxica avaliada por ensaio de MTT, após 24 h de incubação.

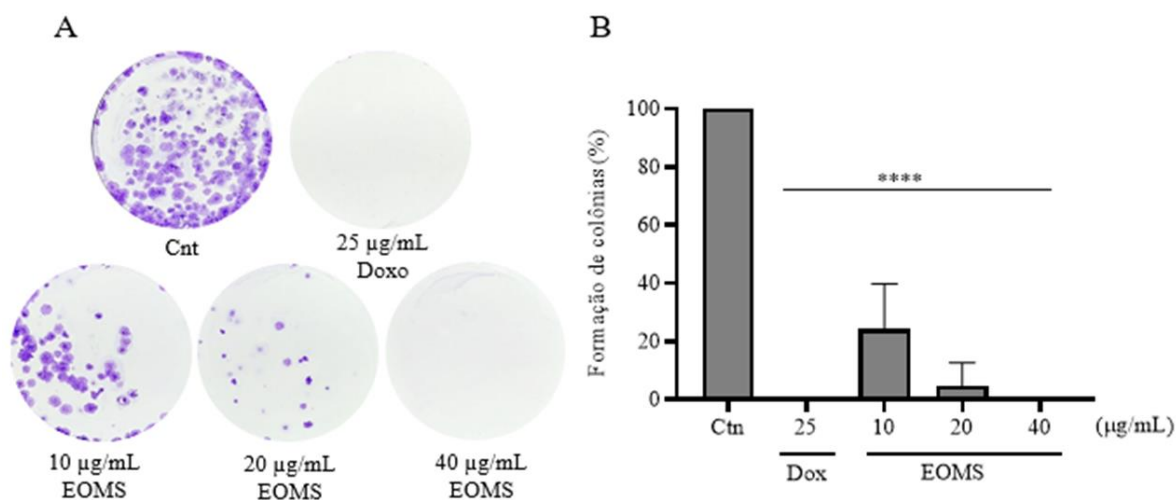
O OEMS foi citotóxico em todas as linhagens tumorais testadas, apresentando valores de IC₅₀ de 5,37 µg/mL (2,17 – 13,30) nas células THP-1, de 17,76 µg/mL (9,48 – 33,26) nas células B16-F10 e 20,14 µg/mL (16,46 – 24,64) na linhagem A549. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e apresentou um valor de IC₅₀ de 25,51 µg/mL em células A549. Considerando a relevância do câncer de pulmão, no que diz respeito às altas taxas de incidência e mortalidade, foi escolhida a linhagem A549 para dar continuidade aos experimentos.

5.3 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Para avaliar se o OEMS possui capacidade de inibição da formação de colônias de células A549, foi realizado o ensaio clonogênico. As células foram tratadas por 24h com o OEMS nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL, que correspondem aos valores de 0,5x IC₅₀, IC₅₀ e 2x IC₅₀, respectivamente. Após o tratamento, as células foram mantidas em crescimento por 10 dias, e em seguida foram realizadas as análises. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.

Observou-se redução significativa do número de colônias ($p < 0,05$) no tratamento com o OEMS em todas as concentrações testadas, em comparação ao controle negativo. O tratamento com a Doxorubicina (25 µg/mL) também causou redução significativa ($p < 0,05$), em comparação às células não tratadas. Os dados estão representados na Figura 3B.

Figura 3 - Efeito inibitório do OEMS na formação de colônias de células A549.



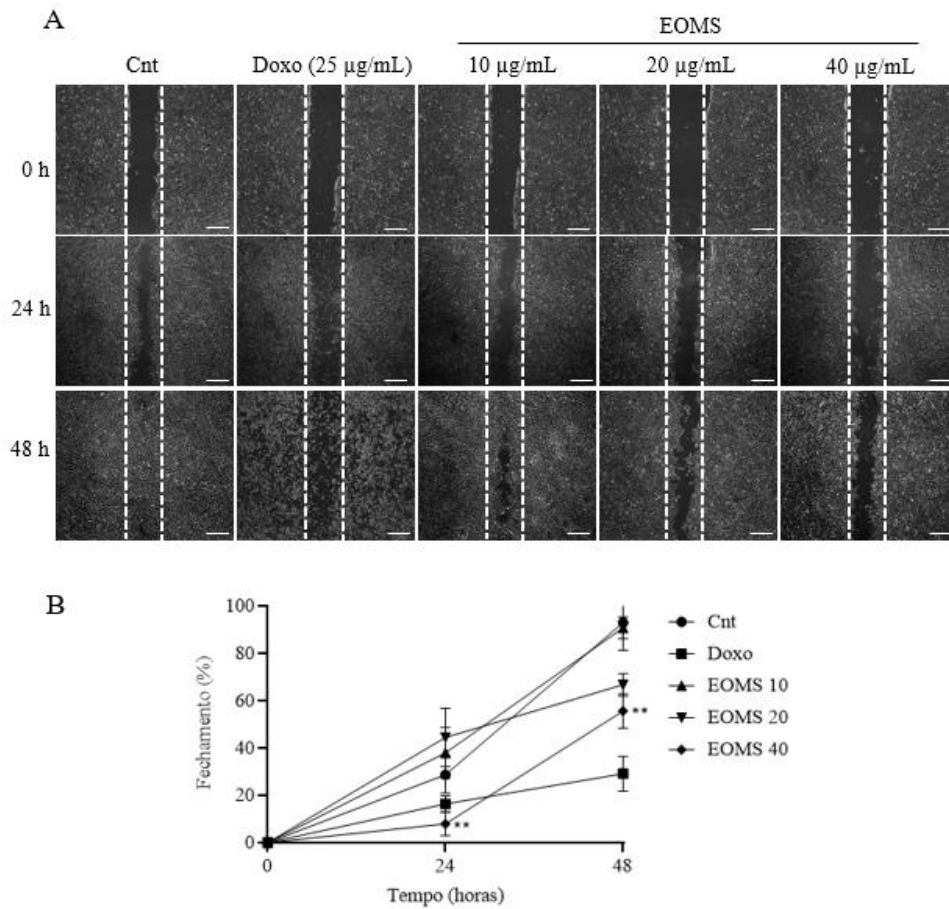
Fonte: Autoria própria.

A) Colônias formadas após 24h de tratamento com OEMS nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL, em 10 dias de crescimento. B) Quantificação das colônias relativa às células não tratadas. Doxorubicina 25 µg/mL foi usada como controle positivo. Média de 3 experimentos independentes, mostrando desvio padrão. A análise da diferença entre os tratamentos e controle foi realizada por teste Anova One Way com pós-teste de Dunnett (****) $p < 0,05$.

5.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração, por meio da técnica de cicatrização de feridas, foi realizado para verificar os efeitos do tratamento com o OEMS sobre a capacidade migratória das células A549. Foram utilizadas as concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL do OEMS, e as análises foram realizadas nos tempos 0h, 24h e 48h. A Figura 5 mostra o processo de fechamento da ferida na monocamada de células, com imagens representativas dos poços. De acordo com os dados obtidos, foi possível observar um efeito significativo na capacidade migratória (Figura 4) de células A549 na concentração de 40 µg/mL a partir de 24h de tratamento.

Figura 4 – Efeito do tratamento com o OEMS sobre a migração das células A549.



Fonte: Autoria própria.

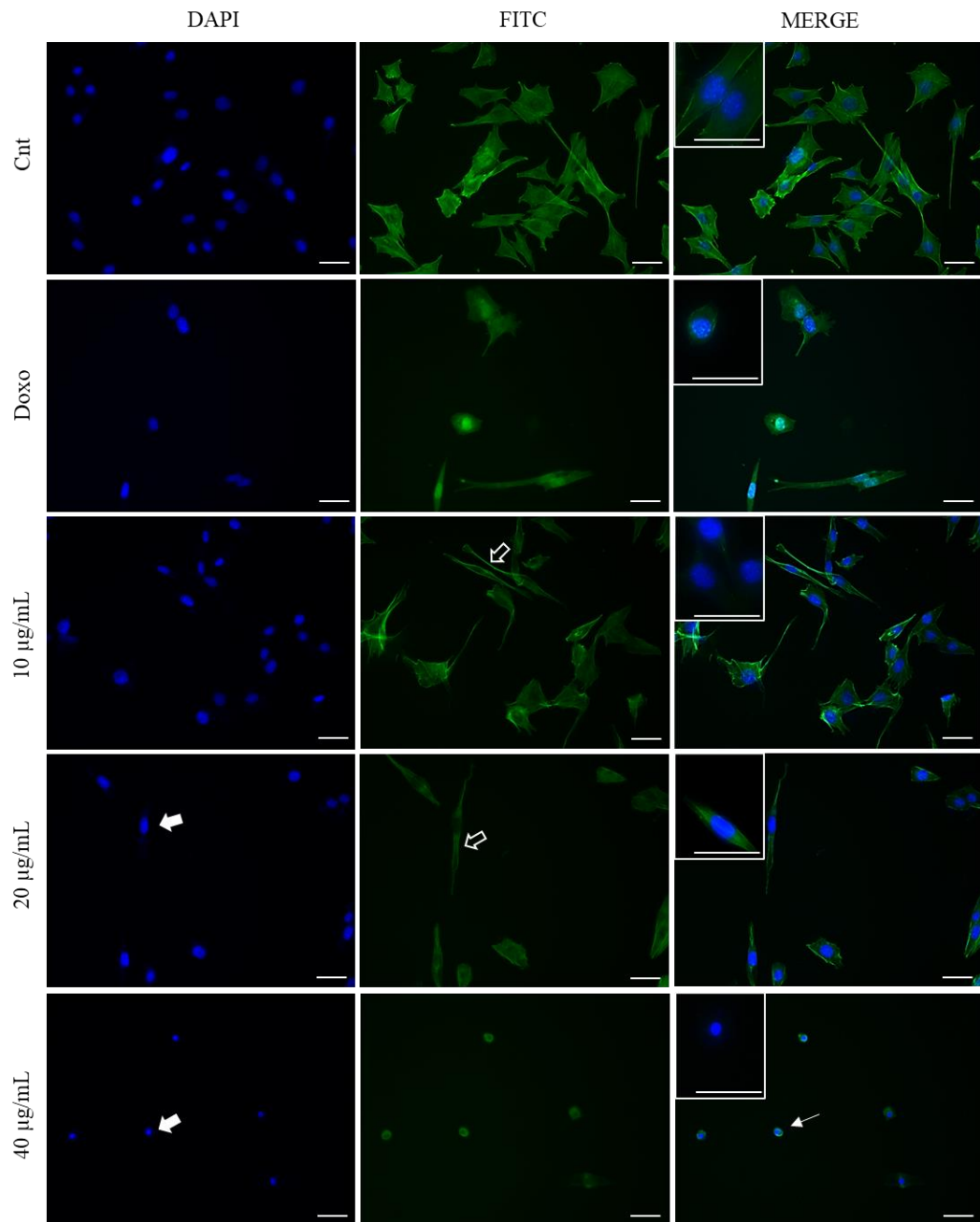
Efeito do tratamento com o OEMS sobre a migração de células A549. A) Fotomicrografias representativas do ensaio de cicatrização de feridas realizadas após 0h, 24h e 48h de tratamento com as concentrações 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, em aumento de 40x. B) Gráfico representando a porcentagem de fechamento da ferida, em que todos os tratamentos estão sendo comparados ao controle. Os dados representam a média $\pm$ DP de três ensaios independentes. A Doxorrubicina (25 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. A análise entre os grupos foi realizada com teste Anova Two Way, seguida de pós teste Bonferroni. Foram feitas comparações entre os tratamentos com o OEMS e o controle e entre os tempos de tratamento (**) $p < 0,05$.

5.5 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – ENSAIO DE DAPI E FALOIDINA/FITC

As alterações morfológicas do núcleo e citoplasma de células A549 após 24h de tratamento com o OEMS foram avaliadas utilizando-se os corantes DAPI e Faloidina/FITC. A Figura 5 mostra as alterações morfológicas ocasionadas pelas crescentes concentrações de OEMS. De acordo com os dados apresentados, observou-se uma redução do volume citoplasmático em células A549 na concentração de 10 µg/mL do OEMS. Na concentração de 20 µg/mL, além da redução do volume citoplasmático, também foram observadas células com maior acúmulo de DAPI no núcleo, indicando fragmentação de DNA e condensação de cromatina. Nas células tratadas na concentração de 40 µg/mL, observou-se um arredondamento e encolhimento citoplasmático e nuclear, além de condensação de cromatina e fragmentação de DNA. O tratamento com a Doxorrubicina provocou importantes alterações celulares como redução do volume citoplasmático, condensação de cromatina e fragmentação de DNA.

No geral, as alterações mais observadas após o tratamento com as concentrações de OEMS foram: diminuição do número de células, arredondamento e encolhimento celular e redução do volume citoplasmático, características de indução de morte celular programada. Para o mesmo tempo de tratamento, as alterações observadas foram mais intensas à medida que se aumentou a concentração do OEMS.

Figura 5 – Efeito do OEMS na morfologia do citoesqueleto e núcleo das células A549.



Alterações morfológicas do citoesqueleto e núcleo de células A549, observadas com coloração por DAPI e Faloidina/FITC, após tratamento por 24h com o OEMS nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL. As setas cheias representam a condensação de cromatina e fragmentação de DNA; as setas vazadas representam redução do volume citoplasmático e as setas finas o arredondamento e encolhimento celular. Aumento de 200x. Barra de escala de 20 µm. A Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

6 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é um grave problema de saúde pública, estando em primeiro lugar em termos de mortalidade e segundo lugar em incidência em todo o mundo (SUNG et al., 2021). A estratégia de tratamento mais utilizada em pacientes com câncer de pulmão é a quimioterapia, geralmente aplicada em estágios mais graves da doença. Os agentes antineoplásicos utilizados no tratamento quimioterápico do câncer de pulmão podem apresentar alguns problemas, como a falta de seletividade para as células tumorais, podendo atingir as células não tumorais dos pacientes e desencadear uma série de efeitos colaterais. (FATHI KARKAN et al., 2017; SADHASIVAM; SUGUMARAN, 2020; XIONG et al., 2020). Dessa forma, percebe-se a cada dia a necessidade da implementação de novas alternativas no combate aos efeitos causados pelo câncer de pulmão (ALBERTS, 2003).

A utilização de substâncias derivadas de produtos naturais vem representando a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos usados na terapia anticâncer (RANI; GARG; DUTT, 2021). Nessa perspectiva, os óleos essenciais de plantas e seus componentes ativos surgem como alternativas ou adições às terapias anticâncer atuais (KUMAR et al., 2015; BRITTO et al., 2012; BHALLA; GUPTA e JAITAK, 2013). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização do óleo essencial das folhas da espécie *Myrcia splendens* (OEMS) e avaliar o seu potencial antitumoral frente à linhagem de células de adenocarcinoma de pulmão.

Inicialmente, realizou-se a análise do OEMS por CG-EM, em que foram identificados 22 constituintes químicos, sendo os majoritários o biciclogermacreno (15,4%), E-cariofileno (10,1%) e germacreno D (8,9%). O OEMS exibiu uma composição diferente, em comparação ao estudo de Scalvenzi et al. (2017), que, na mesma espécie, coletada no Equador Amazônico, identificou como compostos majoritários o *trans*-nerolidol (67,81%), α -bisabolol (17,51%) e β -cariofileno (4,21%). Isto pode ocorrer, pois as variações na composição e quantidade de constituintes dos óleos essenciais podem ser atribuídas à presença de diversos fatores como local de coleta, sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, horário da coleta, micro e macro nutrientes, genótipo, idade da planta, época de colheita e densidade do plantio. Todos esses fatores podem alterar ou coordenar a formação dos metabólitos secundários oriundos da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MORAIS, 2009; MAROTTI et al., 1994).

Apesar dos constituintes majoritários do OEMS do nosso trabalho terem sido diferentes dos constituintes encontrados no trabalho de Scalvenzi et al. (2017), a composição química do

OEMS avaliado em ambos os estudos é compatível no que diz respeito ao predomínio de sesquiterpenos. Estudos anteriores demonstraram que a composição dos óleos essenciais de outras espécies de *Myrcia* também apresentou predomínio destes (SILVA et al., 2013; PEREIRA; ZOGHBI; BASTOS, 2010). O composto majoritário encontrado no óleo essencial de *Myrcia splendens* o biciclogermacreno, por exemplo, foi o principal constituinte químico observado no óleo essencial de outras espécies como *Myrcia pubpetala* (25,2%) e *Myrcia tomentosa* (14,71%) (LIMBERGER et al., 2004; SÁ et al., 2012). Ferreira et al. (2020), analisando a composição química do óleo essencial de *Myrcia eximia* DC, encontraram o E-cariofileno como um dos compostos majoritários, ao avaliar os constituintes químicos presentes no óleo após coleta das folhas em período seco (15,71%) e chuvoso (20,3%) (FERREIRA et al., 2020). Ainda em relação à composição química, resultados que corroboram com nossos achados foram observados por Franco et al. (2021), que constataram a presença dos compostos germacreno D (20,03%), biciclogermacreno (11,82%) e E-cariofileno (11,04%) como majoritários no óleo essencial das folhas de *Eugenia patrisii* Vahl, espécie também pertencente à família Myrtaceae. Uma vez identificados os constituintes químicos do OEMS, foram realizados os ensaios *in vitro* baseados na redução do MTT, para avaliar a citotoxicidade do OEMS em linhagens de células tumorais.

Segundo Suffness e Pezzuto (1990), para que um óleo essencial seja considerado um poderoso agente quimiopreventivo, seus valores de IC_{50} devem ser inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com nossos resultados, o OEMS pode ser considerado um bom agente antitumoral, uma vez que os valores de IC_{50} do OEMS variaram de 5,37 $\mu\text{g/mL}$ a 20,14 nas três linhagens avaliadas. Confrontando os nossos resultados, Scalvenzi et al., (2017) relataram que o OEMS não apresentou atividade citotóxica contra a linhagem A549, mas para as linhagens MCF-7 e HaCaT. No entanto, seu composto majoritário α -bisabolol foi citotóxico para as três linhagens, com valores de IC_{50} de $27,63 \pm 2,01$ para A549, $1,24 \pm 0,03$ para MCF-7 e $10,15 \pm 0,35$ para HaCaT.

Um estudo de Mohamed et al., (2018) relatou atividade citotóxica em células A549 tratadas com óleo essencial de *Pistacia lentiscus* L., que continha germacreno D como um dos principais compostos. Outro estudo relatou que o germacreno D e o biciclogermacreno, em sinergismo, foram responsáveis pela alta atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de *Porcelia macrocarpa* contra células leucêmicas (HL-60) (DA SILVA et al., 2013). Além disso, o biciclogermacreno demonstrou atividade citotóxica potente contra B16F10-Nex2 (melanoma murino), U87 (glioblastoma humano), HeLa (carcinoma cervical humano), HCT (carcinoma do cólon humano), MCF-7 (câncer de mama), Siha (célula tumoral cervical humana) e HFF (célula

humana não tumorigênica), com valores de IC_{50} variando de $3,1 \pm 0,2$ a 21 ± 6 $\mu\text{g/mL}$, menor que o valor de IC_{50} encontrado para cisplatina (20 ± 1 a 53 ± 4 $\mu\text{g/mL}$), usado como controle positivo (GRECCO et al., 2015). Em pesquisa realizada por The et al., (2021), avaliou-se o potencial citotóxico do óleo essencial das folhas de *Polyalthia suberosa*, que apresentou como constituintes majoritários o biciclogermacreno (26,26%), E-cariofileno (7,79%) e o β -pineno (12,71%). Os resultados obtidos evidenciaram atividade citotóxica contra as linhagens tumorais de carcinoma hepatocelular (HepG2), câncer de mama (MCF-7) e adenocarcinoma de pulmão (A549). Esses estudos demonstram que os sesquiterpenos biciclogermacreno, E-cariofileno e germacreno D são compostos que possuem ação antitumoral e por serem os constituintes majoritários encontrados no OEMS, sugere-se que possam ser os principais componentes responsáveis pela ação antitumoral. No entanto, são necessários estudos que investiguem a ação desses compostos isolados, para uma definição da sua atividade antitumoral.

Um ponto muito importante nesse trabalho foi que o tratamento com o OEMS teve atividade citotóxica em todos os tipos celulares testados e, devido a estes possuírem características biológicas totalmente distintas, isso torna o OEMS um promissor agente antitumoral. A partir desses resultados, uma vez que as três linhagens foram sensíveis ao tratamento com o OEMS, estabeleceu-se um critério de escolha, que foi a taxa de incidência e mortalidade do câncer, além da sua alta capacidade de formar metástases. Então, linhagem A549 foi escolhida para dar continuidade à investigação do mecanismo de ação antitumoral do OEMS, visto que atende a esses critérios.

Dentre os ensaios realizados para avaliar o mecanismo de ação de drogas, está o ensaio clonogênico, que determina a capacidade de uma célula sobreviver e se proliferar, formando uma grande colônia de células. Este ensaio é amplamente utilizado para examinar efeitos de drogas com potencial aplicação na clínica (MUNSHI; HOBBS e MEYN, 2005). Visto que uma das características da tumorigênese é a colonização de células tumorais, avaliamos se o OEMS teria a capacidade de inibir a formação de colônias de células A549. De acordo com os nossos resultados, foi possível observar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual de colônias de células A549, em todas as concentrações de OEMS avaliadas. Nossos resultados foram semelhantes aos obtidos no estudo de Dahham et al. (2015), que avaliaram a atividade anticlonogênica do sesquiterpeno β -cariofileno em células de carcinoma de cólon (HCT 116).

Um estudo de Toyang et al., (2013) relatou a atividade anticlonogênica de dois sesquiterpenos isolados das folhas de *Vernonia guineensis*, a Vernopicrina e Vernomelitsina, que reduziram o número de colônias na linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (PC-3), durante o período de exposição de nove dias, em período semelhante ao utilizado no presente

trabalho. Guan e Guan (2020), ao investigarem as propriedades anticâncer do sesquiterpeno artemisinina, observaram uma diminuição significativa do número de colônias de células de câncer de mama altamente agressivo (MDA-MB-123), de maneira concentração-dependente. Os dados encontrados nesses trabalhos, quando correlacionados ao resultado obtido para o OEMS, geram expectativas quanto ao efeito antitumoral promissor dos sesquiterpenos, visto que foram a classe de constituintes químicos identificados em maior abundância no OEMS.

Sabe-se que os óleos essenciais, por serem lipofílicos, podem passar pela membrana citoplasmática das células, levando-as à apoptose (SIKKEMA; BONT e POOLMAN, 1994), o que poderia explicar a capacidade dos óleos de agirem como compostos citotóxicos. Diante disso, muitos estudos buscam identificar os mecanismos de ação relacionados à atividade antitumoral dos óleos essenciais, apresentando resultados que indicam a participação de vias apoptóticas no efeito citotóxico dos óleos frente às células tumorais (PATHANIA et al., 2013; DUYMUS et al., 2014; DA ANUNCIAÇÃO et al., 2020; JAMALI; KAVOOSI e ARDESTANI, 2020; NIU et al., 2020).

Com o objetivo de evidenciar qual o processo de morte celular poderia estar envolvido na citotoxicidade induzida pelo OEMS, foi realizado um ensaio de análise morfológica, utilizando os corantes DAPI e Faloidina/FITC, por meio da visualização de alterações no núcleo e citoplasma das células tumorais tratadas. Nossos dados mostram que o tratamento com o OEMS promove alterações no núcleo e citoplasma das células A549 características de uma indução de morte celular por apoptose (ZHANG et al., 2018). Todas as concentrações promoveram redução do volume citoplasmático, enquanto que fragmentação de DNA e condensação de cromatina, evidenciadas por meio do acúmulo de DAPI presente no núcleo das células, só foram observadas a partir da concentração de 20 µg/mL. Esse efeito apoptótico também foi observado no estudo de Pereira et al. (2017), ao avaliarem o óleo essencial de *Baccharis milleflora* (Less.) DC. frente a células de linfoma não-Hodgkin (Raji). Além disso, foram identificados nesse óleo essencial os constituintes majoritários biciclogermacreno (12,16%), germacreno D (11,18%), E-cariofileno (9,28%) e α -humuleno (8,05%), sendo os três primeiros os mesmos constituintes majoritários encontrados no OEMS do nosso trabalho. Os resultados do ensaio com DAPI/Faloidina/FITC para avaliar o mecanismo de morte celular induzido pelo OEMS estão condizentes com os resultados do ensaio clonogênico.

Entre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e estabelecimento do câncer, está o processo de migração das células tumorais. Durante esse processo, as células tumorais migram do local primário para um órgão secundário, sendo um processo crítico de invasão, que permite a adaptação dos tumores primários para a metástase (WOO et al., 2011; HE et al.,

2014). Essa capacidade migratória das células tumorais é comumente estudada por meio do ensaio de migração celular utilizado nesse estudo, em que é realizada a descontinuidade da monocamada de células, e o crescimento celular visando o preenchimento do espaço gerado ocorre por meio a uma combinação de eventos, como a proliferação e migração celular (LAMPUGNANI, 1999; YARROW et al., 2004). No entanto, as capacidades migratória e proliferativa podem ser diferenciadas em ensaio realizado com um prazo maior que 24h, uma vez que períodos menores que esse não se pode distinguir efeitos na proliferação da migração (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2005).

De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que o OEMS provocou redução significativa da capacidade de migração das células A549 na maior concentração (40 µg/mL), a partir de 24h de tratamento, em relação ao grupo controle. Estudos mostram que óleos essenciais possuem a capacidade de reduzir a migração de células tumorais (CHO et al., 2014; BHAGAT; KUMAR; SURAVAJHALA, 2020). No trabalho de Chen et al. (2018), por exemplo, o óleo essencial de *Eupatorium adenophorum* Spreng., constituído principalmente por sesquiterpenos, reduziu a migração de células de carcinoma hepatocelular (HepG2). Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que a inibição da migração *in vitro* de células A549 pelo OEMS indica seu potencial para controlar a propagação metastática do câncer de pulmão.

Assim, esses dados reforçam o fato de que o OEMS possui uma excelente atividade antitumoral, capaz de inibir a colonização de células A549, atuando por mecanismos apoptóticos e reduzindo a capacidade de migração dessas células.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que o OEMS possui um alto efeito citotóxico em células tumorais, provavelmente devido à ação dos sesquiterpenos, que apresentam atividade antitumoral bem descrita na literatura. Os achados desse trabalho indicam que o OEMS pode ser considerado um promissor agente antitumoral. Entretanto, estudos adicionais, como ensaios *in vivo*, são necessários para confirmar seu mecanismo de ação e comprovar sua eficácia.

REFERÊNCIAS

- ABEL, E.; DIGIOVANNI, J: Multistage carcinogenesis. In: Chemical Carcinogenesis. **Current Cancer Research**. Penning T. (ed.) Humana Press, pp. 27-51, 2011.
- ALBERTS, W. N. et al. Lung Cancer Guidelines. **Chest Journal**, v. 123, 2003 (Suplement).
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**, 169, 240-254, 2014.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is non-small cell lung cancer?** Atlanta, Georgia, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/nonsmall-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>. Acesso em: 10 Out 2021.
- AMORIM GOMES, G., MARTINS-CARDOSO, K., DOS SANTOS, F. R., FLORENCIO, M., ROSA, D., ARAUJO ZUMA, A., ... & FAMPA, P. Antileishmanial activity of the essential oils of *Myrcia ovata* Cambess. and *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch leads to parasite mitochondrial damage. **Natural Product Research**, 1-5, 2020.
- ANDRADE, L. N. CONTRIBUIÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TRATAMENTOS PARA O CÂNCER. **Caderno De Graduação - Ciências Biológicas E Da Saúde - UNIT - SERGIPE**, 5(2), 119, 2019.
- ARANHA, E. S. P. Avaliação do potencial anticâncer in vitro de óleos essenciais de plantas do gênero *Eugênia*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Bioanálise e desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
- AZEVEDO, L. F.; DA SILVA, S. M.; NAVARRO, L. B.; YAMAGUCHI, L. F.; NASCIMENTO, C. G. O.; SONCINI, R.; ISHIKAWA, T. Evidence of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Plinia edulis* leaf infusion. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 178-182, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BHAGAT, M., KUMAR, A., & SURAVAJHALA, R. Cedrus deodara (Bark) Essential Oil Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells by Inhibiting Nuclear Factor kappa B. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 20(22), 1981-1992, 2020.
- BHALLA Y, GUPTA VK, JAITAK V. Anticancer activity of essential oils: a review. **J Sci Food Agric**. Dec; 93(15):3643-53, 2013.
- BLANK, A. F. et al. Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjerição. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 3, p. 305- 310, jul./set. 2010.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

BRITTO AC, DE OLIVEIRA AC, HENRIQUES RM, CARDOSO GM, BOMFIM DS, 7-CARVALHO AA, MORAES MO, PESSOA C, PINHEIRO ML, COSTA EV, BEZERRA DP. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Med.** Mar;78(5), 2012.

BRUN, G. DA. R.; MOSSI, A. J. Caracterização química e atividades antimicrobiana dos óleos voláteis pitanga (*Eugenia Uniflora* L.). **Perspectiva**, v. 34, n.12, p. 135–142, 2010.

CALAO, V. Y. P. Caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) (Physical-chemical characterization, composition and antioxidant capacity of the essential oil of *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae)). **Master's Thesis**, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Brazil, April 2014.

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

CHAI EB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherap**, v. 506, p. 501–506, 2007.

CHEN, H., ZHOU, B., YANG, J., MA, X., DENG, S., HUANG, Y., ... & YANG, X. (2018). Essential oil derived from *eupatorium adenophorum* spreng. Mediates anticancer effect by inhibiting stat3 and akt activation to induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in pharmacology*, 9, 483, 2018.

CHEN, Z. et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535-546, 2014.

CHO, S. M., LEE, E. O., KIM, S. H., & LEE, H. J. Essential oil of *Pinus koraiensis* inhibits cell proliferation and migration via inhibition of p21-activated kinase 1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, 14(1), 1-9, 2014.

COIMBRA, R. Manual de Fitoterapia (Manual of Phytotherapy), 2nd ed.; Editora Cejup: Belém, Brazil, 1994; p. 219. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica acta**, Cruz, G.L. Dicionários de Plantas Úteis do Brasil (Dictionary of Useful Plants from Brazil), 5th ed.; Bertrand Brasil: Rio de Janeiro, Brazil, 1995; p. 498.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. 2nd Edition, **CRC Press Boca Raton**, v.13 p. 605. 2008.

DA ANUNCIAÇÃO, T. A., COSTA, R. G., DE LIMA, E. J., SILVA, V. R., SANTOS, L. D. S., SOARES, M. B., ... & BEZERRA, D. P. In vitro and in vivo inhibition of HCT116 cells by essential oils from bark and leaves of *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb.(Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 262, 113166, 2020.

DA SILVA, E. B. P., MATSUO, A. L., FIGUEIREDO, C. R., CHAVES, M. H., SARTORELLI, P., & LAGO, J. H. G. Chemical constituents and cytotoxic evaluation of essential oils from leaves of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, 8(2), 1934578X1300800237, 2013.

DAHAM, S. S., TABANA, Y. M., IQBAL, M. A., AHAMED, M. B., EZZAT, M. O., MAJID, A. S., & MAJID, A. M. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, 20(7), 11808-11829, 2015.

DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3 ed, Chichester: John Wiley & Sons, cap. 5, p. 187-306, 2009.

DOSTÁL, V.; LIBUSOVÁ, L. Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. **Protoplasma**, v. 251, n. 5, p. 991-1005, 2014.

DUYMUS, H. G. et al. The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 33–42, 2014.

EGGERMONT, A.; ROBERT, C. Melanoma in 2011: a new paradigm tumor for drug essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050-4063, 2009.

ESSERS, J.; VERMEULEN, W.; HOUTSMULLER, A. B. DNA damage repair: anytime anywhere? **Current opinion in cell biology**, v.18, p.240-246, 2006.

FATHI KARKAN, S. et al. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 1-5, 2 jan. 2017.

FERREIRA, O. O., DA CRUZ, J. N., FRANCO, C. D. J. P., SILVA, S. G., DA COSTA, W. A., DE OLIVEIRA, M. S., & ANDRADE, E. H. D. A. First report on yield and chemical composition of essential oil extracted from *Myrcia eximia* DC (Myrtaceae) from the Brazilian Amazon. **Molecules**, 25(4), 783, 2020.

FERREIRA, R. G. R.; FRANCO, R. F. L. Efeitos colaterais decorrentes do tratamento quimioterápico no câncer de mama: revisão bibliográfica. *Rev. da Universidade Vale do Rio Verde*, vol. 15, nº 2, pag. 633-638, 2017.

FRANCO, C. D. J. P., FERREIRA, O. O., ANTÔNIO BARBOSA DE MORAES, Â., VARELA, E. L. P., NASCIMENTO, L. D. D., PERCÁRIO, S., ... & ANDRADE, E. H. D. A. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Eugenia patrisii* Vahl, *E. punicifolia* (Kunth) DC., and *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC., Leaf of Family Myrtaceae. **Molecules**, 26(11), 3292, 2021.

GAO, T. et al. In vitro effects of nicotine on the non-small-cell lung cancer line A549. **Journal Of Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 4, Apr. 2016.

GLOBOCAN. **New Global Cancer Data**: Disponível em: [GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC](#). Acesso em 20 Out 2021.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar. 2007.

GOVINDARAJAN, M.; E BENELLI, G. α -Humulene and β -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 115.7, p. 2771-2778, 2016

GRECCO, S. D. S., MARTINS, E. G. A., GIROLA, N., DE FIGUEIREDO, C. R., MATSUO, A. L., SOARES, M. G., ... & LAGO, J. H. G. Chemical composition and in vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. **Pharmaceutical Biology**, 53(1), 133-137, 2015.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, 140:883-899, 2010.

GUAN, X., & GUAN, Y. Artemisinin induces selective and potent anticancer effects in drug resistant breast cancer cells by inducing cellular apoptosis and autophagy and G2/M cell cycle arrest. **JBUON**, 25, 1330-1336, 2020.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000.
HE, Z. et al. Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. **Phytomedicine**, 2014.

HENDRIKS, L. E., SMIT, E. F., VOSSE, B. A., MELLEMA, W. W., HEIDEMAN, D. A., BOOTSMA, G. P., WESTENEND, M., PITZ, C., DE VRIES, G. J., HOUBEN, R., GRUNBERG, K., BENDEK, M., SPEEL, E. J., & DINGEMANS, A. M. EGFR mutated non-small cell lung cancer patients: more prone to development of bone and brain metastases? **Lung Cancer**, 84, 86–91, 2014.

HOFMANN, K. The evolutionary origins of programmed cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 9, p. 1–16, 2020.

INAMURA, K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification, **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. 193, p. 1-7, 2017

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Tipos de Câncer: Câncer de Pulmão**. São Paulo, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-decancer/cancer-de-pulmao>. Acesso em 05 Set 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2020: **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

JAMALI, T., KAVOOSI, G., & ARDESTANI, S. K. In-vitro and in-vivo anti-breast cancer activity of OEO (*Oliveria decumbens* vent essential oil) through promoting the apoptosis and immunomodulatory effects. *Journal of ethnopharmacology*, 248, 112313, 2020.

JAN R AND CHAUDHRY G-S: Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Adv Pharm Bull** 9(2): 205-218, 2019.

JORDE, B. L., CAREY, C. J., BAMSHAD, J. M., WHITE, L. R. *Genética Médica*. Segunda edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1999. JORDE, B. L., CAREY, C. J., BAMSHAD, J. M., WHITE, L. R. **Genética Médica**. Segunda edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1999.

JORGE, L.I.F.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA, M.L.P. Anatomia foliar de pedra-ume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia*—Myrtaceae) (Leaf anatomy of pedra-ume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia*—Myrtaceae)]. **Acta Amazon**. 30, 49–57, 2000.

KANAPATHIPILLAI, M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer. **Cancers**, 10(6):154, 2018.

KOFF, L. J., RAMACHANDIRAN, S., MIZRACHI, B. L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **International Journal Molecular Sciences**, 16, 2942-2955, 2015.

KORGAONKAR, N.; YADAV, K. S. Understanding the biology and advent of physics of cancer with perspicacity in current treatment therapy. **Life Sciences**, v. 239, p. 117060, dez. 2019.

KUBATKA, P., URAMOVA, S., KELLO, M., KAJO, K., SAMEC, M., JASEK, K., ... & BÜSSELBERG, D. Anticancer activities of *Thymus vulgaris* L. in experimental breast carcinoma in vivo and in vitro. **International journal of molecular sciences**, 20(7), 1749, 2019.

KUMAR, D; SUKAPAKA, M; BABU, GDK; PADWAD, Y; Chemical Composition and in vitro Cytotoxicity of Essential Oils from Leaves and Flower of *Callistemon citrinus* from Western Himalayas. **Plos One**, v: 10, 2015.

LAMPUGNANI, M.G. Cell migration into a wounded area in vitro. **Methods in Molecular Biology**, v. 96, p. 177-182, 1999.

LE COINTE, P. A Amazônia Brasileira III: Árvores e Plantas Úteis (Indígenas e Aclimatadas) (Brazilian Amazon III: Useful Trees and Plants (Natives and Acclimatized)); **Livraria Clássica**: Belém, Brazil, 1934; p. 366.

LESGARDS, J. F., BALDOVINI, N., VIDAL, N., & PIETRI, S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1423-1446, 2014.

LIMBERGER, R. P., SOBRAL, M. E. G., Henriques, A. T., Menut, C., & Bessi re, J. M. (2004).  leos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química nova**. São Paulo. Vol. 27, n. 6 (2004), p. 916-919.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer letters**, v. 235, n. 1, p. 114-120, 2006.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E.; DEANS, S.G.; EAGLESHAM, E.; Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v.9, p.125-129, 1994.

MATIAS, E. F.; ALVES, E. F.; SILVA, M. K.; CARVALHO, V. R.; FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, J. V.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, J. M. F. L.; FILHO, J. R.; COSTA, J. G. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.

MCCOOK-RUSSELL, K. P.; NAIR, M. G.; FACEY, P. C.; BOWEN-FORBES, C. S. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1069-1073, 2012.

MCLEOD, H.L. Cancer pharmacogenomics: Early promise, but concerted effort needed. **Science**, v.339, p.1563-1566, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do câncer. Abordagens básicas para o controle do câncer**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 6ª ed. rev. atual. Rio de Janeiro, 2020.

MOHAMED, K., ZINE, K., FAHIMA, K., ABDELFAHATTAH, E., SHARIFUDIN, S. M., & DUDUKU, K. NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of *Pistacia lentiscus* essential oil. **Toxicology reports**, 5, 480-488, 2018.

MOHAMED, M. S., BISHR, M. K., ALMUTAIRIN, F. M., ALI, A. G. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. **Apoptosis**, 22(12):1487-1509, 2017.

MOHAMMAD, R. M., MUQBIL, I., LOWE, L., YEDJOU, C., HSU, H. Y., LIN, L. T., ... & AZMI, A. S. (2015, December). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. In **Seminars in cancer biology** (Vol. 35, pp. S78-S103). Academic Press, 2015.

MORAIS, L. A. S. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In *Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP, 2009.

MORO, G. V.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; ABDALLA, A. L.; REGINATTO, F. H.; PEÇANHA, M. R.; COSTA, G. M. Aspectos químicos do gênero *Lotus* L. com ênfase em metabólitos secundários. **ARS Veterinaria, Jaboticabal**, v. 26, p 113-119, 2010.

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 304-317, mar. 2014.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R.E. Clonogenic cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21-8, 2005.

NGO, D. C., VERVERIS, K., TORTORELLA, S. M., & KARAGIANNIS, T. C. (2015). Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. **Molecular biology reports**, 42(4), 819-823.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica acta**, v.1833, p.3488-3459, 2013.

NIU, Q. L., SUN, H., LIU, C., LI, J., LIANG, C. X., ZHANG, R. R., ... & LIU, W. Croton tiglium essential oil compounds have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in A549 lung cancer cell lines. **PloS one**, 15(5), e0231437, 2020.

OGUNWAND, E. I. A. et al. Studies on the essential oils composition de *Eugenia uniflora*, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147–152, 2005.

OLIVEIRA, V. C.; SANTOS, A. R.; SOUZA, G. S.; LIMA, G. R. F.; ALVES, P. B.; SANTOS, H. V. Metabólitos secundários e características anatômicas de folhas de orégano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) cultivado sob malhas coloridas. **Rev. de Ciências Agrárias**, v.39, p.1, 2016.

PALUMBO, M.O.; KAVAN, P.; MILLER, W.H.; PANASCI, L.; ASSOULINE, S.; JOHNSON, N.; COHEN, V.; PATENAUDE, F.; POLLAK, M.; JAGOE, R.T.; BATIST, G. Systemic câncer therapy: achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in phamacology**, v.4, p.1-9, 2013.

PATHANIA, A.S. et al. Disruption of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade and induction of apoptosis in HL-60 cells by an essential oil from *Monarda citriodora*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 246–254, 2013.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in plant science**, v. 21, n. 12, p. 1000-1007, 2016.

PERDIGÃO, J.; TAVARES, A. Ciclo celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Pereira, C. B., Kanunfre, C. C., Farago, P. V., Borsato, D. M., Budel, J. M., de Noronha Sales, B. H. L., ... & Miguel, O. G. Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, 42, 214-221, 2017.

PEREIRA, Raimunda A.; ZOGHBI, Maria das Graças B.; BASTOS, Maria de Nazaré do C. Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the sandbank of the Resex Maracanã, State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 4, p. 440-450, 2010.

RAMAKRISHNAN, R.; GABRILOVICH, D. I. Novel mechanism of synergistic effects of conventional chemotherapy and immune therapy of cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v.62, p.405-410, 2013.

RANI, D.; GARG, V.; DUTT, R. Anticancer Potential of Azole Containing Marine Natural Products: Current and Future Perspectives. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 2021.

RAPOSO, J. D. A.; FIGUEIREDO, P. L. B.; SANTANA, R. L.; DA SILVA JUNIOR, A. Q.; SUEMITSU, C.; DA SILVA, R.; E MAIA, J. G. S. Seasonal and circadian study of the essential oil of *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC., a valuable aromatic species occurring in the Lower Amazon River region. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 79, p. 21-29, 2018.

RELLI, V. et al. Abandoning the notion of non-small cell lung cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n.7, 2019.

REN, P., REN, X., CHENG, L., & XU, L. Frankincense, pine needle and geranium essential oils suppress tumor progression through the regulation of the AMPK/mTOR pathway in breast cancer. **Oncology reports**, 39(1), 129-137, 2018.

RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. Wound-healing assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 294, p. 23–29, 2005.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Á; *et al.* Residential radon and small cell lung cancer. A systematic review. **Cancer Letters**, v. 426, p. 57– 62, 2018.

ROSKOSKI, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 343–356, 2017.

SÁ, F. A., BORGES, L. L., PAULA, J. A., SAMPAIO, B. L., FERRI, P. H., & PAULA, J. R. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22(6), 1233-1240, 2012.

SADHASIVAM, J.; SUGUMARAN, A. Magnetic nanocarriers: Emerging tool for the effective targeted treatment of lung cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101493, fev. 2020.

SANTANA, C. B., SOUZA, J. G. L., TOLEDO, A. G., ALVES, L. F. A., ALVES, D. S., CORRÊA, J. M., & PINTO, F. G. S. Antimicrobial and insecticidal effects of essential oil and plant extracts of *Myrcia oblongata* DC in pathogenic bacteria and *Alphitobius diaperinus*. **Brazilian Journal of Biology**, 82, 2021.

SANTARELLI, A., MASCITTI, M., LO RUSSO, L., SARTINI, D., TROIANO G., EMANUELLI, M., LO MUZIO, L. Survivin-Based treatment strategies for squamous cell carcinoma. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 19, ed. 4, 971, 2018.

SANTOS, G.C.M.; GOMES, G.A.; GONÇALVES, G.M.; SOUSA, L.M.; SANTIAGO, G.M.P.; CARVALHO, M.G.; MARINHO, B.G. Essential oil from *Myrcia ovata*: Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice. **Planta Med.** 80, 1588–1596, 2014.

SANTOS, M. O.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACÊDO, M. J. F.; MACEDO, J. G. F.; LACERDA, M. N. S.; MACÊDO, M. S.; SOUZA, M. M. A.. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90(3), p. 2767-2779, 2018.

SATO, A. et al. Intracellular microRNA expression patterns influence cell death fates for both necrosis and apoptosis. **FEBS Open Bio**, v. 10, n. 11, p. 2417–2426, 2020.

SAWANDA, O. N.; DIAS, M. A.; ZAGO, F. M. M. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52(4): 323-329, 2006.

SCALVENZI L, GRANDINI A, SPAGNOLETTI A, TACCHINI M, NEILL D, BALLESTEROS JL, SACCHETTI G, GUERRINI A. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (Myrtaceae) essential oil from Amazonian Ecuador: A chemical characterization and bioactivity profile. **Molecules** 2017; 22: 1–12.

SEMENOVA, E.A. et al. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. **Genes & Development**, v. 29, p. 1447–1462, 2015.

SHIN, D. Y., NA, I. I., KIM, C. H., PARK, S., BAEK, H., & YANG, S. H. EGFR mutation and brain metastasis in pulmonary adenocarcinomas. **Journal of Thoracic Oncology**, 9, 195–199, 2014.

SIKKEMA J, BONT JAM, POOLMAN B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **J Biol Chem** 269:8022–8, 1994.

SILVA, A. N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESE, A. M. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). **Natural product communications**, v. 8, n. 2, p., 2013.

SILVA, F.K.S.; ROSÁRIO, A.S.; SECCO, R.S.; ZOGHBI, M.G.B. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil (Survey of the species known as pedra-ume-caá (Myrtaceae), with emphasis of those commercialized in the city of Belém, Pará, Brazil). **Biota Amazônia**. 5, 7–15, 2015.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 th ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p. strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185-S198, 2015.

SUFFNESS, M., & PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In K. Hostettmann (Ed.), *Methods in plant biochemistry: Assays for bioactivity* (pp. 71–133). London: Academic Press, 1990.

SUNG H. 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. 0, n. 0, 2021.

SUZUKI, M.; TAKAHASHI, T. Aberrant DNA replication in cancer. **Mutation** Tamura, T., Kurishima, K., Nakazawa, K., Kagohashi, K., Ishikawa, H., Satoh, H., & Hizawa, N. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, 3, 217–221, 2015.

THE, S. N., TUAN, A. L., THU, T. D. T., DINH, L. N., & THI, T. T. Essential Oils of *Polyalthia suberosa* Leaf and Twig and Their Cytotoxic and Antimicrobial Activities. **Chemistry & Biodiversity**, 2021.

TOYANG, N.J. et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 552 –556, 2013.

TRAVIS, W. D. Pathology of Lung Cancer, **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 4, p.669-692, 2011. v.1833, p.3488-3459, 2013.

VAN DEN BERG, M.E. Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático (Medicinal Plants in the Amazon: Contribution to Its Systematic Knowledge), 3rd ed.; Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke: Belém, Brazil, 2010; p. 220.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic Warburg effect. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 4, p. 819-823, 2015.

WOO, C.C. et al. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR-g pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 464–475, 2011.

XIONG, W. et al. Adverse effects of chemoradiotherapy on invasion and metastasis of tumor cells. **Genes & Diseases**, p. S2352304220300568, 2020.

YARROW, J.C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 1-9, 2004.

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

YU, J. et al. Induction of programmed necrosis: A novel anti-cancer strategy for natural compounds. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 214, p. 107593, 2020

YUAN, M. et al. The emerging treatment landscape of targeted therapy in nonsmall-cell lung cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 61, 2019.

ZHANG Y., CHEN X., GUEYDAN C., HAN J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell Res** 28, 9–21 (2018).