



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

JESICA BATISTA DE SOUZA

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS FOLHAS DA *Eplingiella fruticosa***

**SÃO CRISTÓVÃO, SE
2023**

<p>JESICA BATIST DE SOUSA ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA <i>Eplingiella fruticosa</i> 2023</p>	
--	--

JESICA BATISTA DE SOUZA

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS FOLHAS DA *Eplingiella fruticosa***

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

Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

**SÃO CRISTÓVÃO, SE
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central Universidade Federal de Sergipe

S729e	Souza, Jesica Batista de Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> / Jesica Batista de Souza; orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam —São Cristovão, 2023. 102f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. 1. Câncer 2. Plantas medicinais 3. Sarcoma 180. 4. <i>Eplingiella fruticosa</i> 5.Toxicidade Título
	CDU 616-006:615.322

JESICA BATISTA DE SOUZA

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS FOLHAS DA *Eplingiella fruticosa***

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

Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

1º Examinador: Prof. Dr. Alexandre Luna Cândido

2º Examinador: Prof. Dra. Andrea Yu Kwan Villar Shan

3º Examinador: Prof. Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos

4º Examinador: Prof. Dr. Rafael Donizete Dutra Sandes

Dedico esta tese às mulheres que chegaram a desacreditar de suas potencialidades, todavia, ao final ergueram-se, reconheceram-se capazes e merecedoras de seus títulos. Também o dedico, a minha mãe, Maria Leci, e as minhas irmãs, Mara, Néia, One e Dilma.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo! Por minha vida e pela vida da minha família;

À Universidade Federal de Sergipe;

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia pela presteza nos serviços;

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS);

Ao programa de acompanhamento sistemático do aluno (PROASA);

À Banca de qualificação;

À professora Cláudia O. Pessoa e a sua equipe do laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará;

Ao laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse oxidativo / UFS. Especialmente, ao professor Dr. Ricardo Guimarães Amaral;

Ao laboratório BIOLAB e ao seu proprietário Me. Robério Oliveira Menezes Filho;

Ao laboratório de Farmacologia da Inflamação e dor/UFS e a professora Sara Maria Thomazzi;

Ao professor Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana e sua equipe do Laboratório de Pesquisa em Química e Recursos Naturais (LPqRN) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

À equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica (LQPNB) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) da qual faço parte;

Ao meu orientador Dr. Charles dos Santos Estevam, por toda a trajetória desde o mestrado. Pela orientação e esforço que conduziu ao andamento desta pesquisa, incluindo a disponibilização de materiais, equipamentos e parcerias necessárias.

À professora, Dr^a. Andrea, pessoa que vibra energias positivas, sou grata por sua atenção e simplicidade. Muito obrigada, pelas orientações, paciência e por muitas vezes ter parado o seu trabalho para me ajudar.

À minha amiga Cirlane Alves Araujo de Lima, por toda a caminhada que trilhamos de mãos dadas, desde as disciplinas do doutorado e trabalhos relacionados, sua participação nos experimentos, palavras de fé, carinho e apoio.

Ao meu amigo Ariel de Souza Graça, por toda a caminhada que juntos fizemos desde o mestrado, pelo direcionamento e participação ativa nesse trabalho, e por toda a trajetória de amizade.

Ao meu futuro esposo Alexandre por todo o companheirismo, cuidado e amor e por ter embarcado comigo em dias difíceis e cansativos de experimentos.

O processo não é fácil. A gente busca, Deus provê, ao final tudo dará certo. Confie Nele

RESUMO

Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Eplingiella fruticosa*, Jesica Batista de Souza, São Cristóvão, 2023.

Introdução: O câncer é uma doença que apresenta altos índices de incidência e de mortalidade mundialmente. Apesar de grandes esforços para desenvolver novas abordagens de intervenção terapêutica, a taxa de insucesso permanece alta. As plantas medicinais são uma das mais importantes fontes de medicamentos para a indústria farmacêutica. Nesse contexto, a *Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) ou alecrim do tabuleiro merece destaque na investigação antitumoral, especialmente porque muitas das espécies da família tem apresentado efeitos antitumorais relevantes. **Objetivo:** Sendo assim, pela primeira vez, investigou-se o potencial antitumoral do óleo essencial das folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF) *in vitro* e *in vivo*, bem como avaliou-se possíveis efeitos toxicológicos causados. **Métodos:** o OEEF foi obtido por meio de hidrodestilação, e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-MS) foi utilizada para caracterizar sua composição química. A atividade citotóxica do OEEF foi investigada usando o ensaio de MTT. O modelo de tumor murino Sarcoma 180 foi usado para avaliar a atividade antitumoral *in vivo* e a toxicidade do OEEF (25, 50 e 100 mg/kg) após sete dias de tratamento por via intraperitoneal. O estudo de toxicidade do OEEF consistiu na avaliação de possíveis alterações na massa corporal e visceral, além disso, realizou-se a contagem de leucócitos e de eritrócitos presentes no sangue coletado de camundongos. Ainda a análise bioquímica do soro sanguíneo e histologia tumoral e visceral de camundongos foi realizada. **Resultados:** foram identificados 80 compostos no OEEF, sendo 21 considerados majoritários merecendo destaque 1,8-cineol (17,07%), Cânfora (9,36%), β -Cariofileno (8,96%) e α -pineno (6,97%). No teste de citotoxicidade contra linhagens de células tumorais humanas, o OEEF apresentou um percentual de inibição do crescimento (% IPC) variando de 89,3 a 94,8%. A concentração inibitória (CI₅₀) foi na faixa de 0,002, 0,260 e 0,218 μ g/mL para o Carcinoma de cólon (HCT-116), Glioblastoma (SNB-19) e Carcinoma de próstata (PC-3), respectivamente. As taxas de inibição do crescimento tumoral foram de 91,2%, 87,7% e 13% para o tratamento com OEEF nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. O 5-FU (25 mg/kg/dia) apresentou uma inibição de 93,4% em relação ao grupo controle e os grupos do OEEF25 e OEEF50 foram semelhantes a ele na estatística. O tratamento com o OEEF25 foi incapaz de causar alterações na massa corporal e visceral, entretanto, houve uma diminuição na massa cardíaca nos grupos OEEF50 e OEEF100 e na massa corporal nos grupos OEEF100 e 5-FU. Além disso, identificou-se trombocitopenia (OEEF50, OEEF100 e 5-FU); linfocitose (OEEF50 e OEEF100) e leucopenia (5-FU). Os resultados histológicos dos tumores dos grupos OEEF100 e CTRL foram indistinguíveis. Nos grupos OEEF25 e OEEF50, observou-se menores índices de necrose e de atividade mitótica. A avaliação histológica do baço foi compatível com redução da polpa branca no grupo 5-FU, enquanto a análise do coração e do fígado foram compatíveis com citologia tecidual normal nos grupos. **Conclusão:** Verificou-se que o tratamento com as menores doses do OEEF apresentou potencial antitumoral significativo sem evidências de toxicidade nos parâmetros avaliados, com relação ao OEEF25.

Descritores: Câncer; Plantas medicinais; Sarcoma 180; *Eplingiella fruticosa*; Toxicidade

ABSTRACT

Study of the antitumor potential of the essential oil from the leaves of *Eplingiella fruticosa*, Jesica Batista de Souza, São Cristóvão, 2023.

Introduction: Cancer is a disease that has high rates of incidence and mortality worldwide. Despite significant efforts to develop new therapeutic intervention approaches, the rate of failure remains high. Medicinal plants are one of the most important sources of drugs for the pharmaceutical industry. In this context, *Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) or "alecrim do tabuleiro" deserves attention in antitumor research, especially because many species in the family have shown relevant antitumor effects. **Objective:** Therefore, for the first time, the antitumor potential of the essential oil from the leaves of *Eplingiella fruticosa* (OEEF) was investigated in vitro and in vivo, and possible toxicological effects were evaluated. **Methods:** OEEF was obtained through hydrodistillation, and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to characterize its chemical composition. The cytotoxic activity of OEEF was investigated using the MTT assay. The murine Sarcoma 180 tumor model was used to evaluate in vivo antitumor activity and the toxicity of OEEF (25, 50, and 100 mg/kg) after seven days of intraperitoneal treatment. The OEEF toxicity study included the evaluation of possible changes in body and visceral mass, as well as the counting of leukocytes and erythrocytes in blood collected from mice. Furthermore, biochemical analysis of blood serum and tumor and visceral histology in mice were performed. **Results:** 80 compounds were identified in OEEF, with 21 considered major, including 1,8-cineole (17.07%), Camphor (9.36%), β -caryophyllene (8.96%), and α -pinene (6.97%). In the cytotoxicity test against human tumor cell lines, OEEF exhibited a growth inhibition percentage (GIP) ranging from 89.3 to 94.8%. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was in the range of 0.002, 0.260, and 0.218 μ g/mL for Colon Carcinoma (HCT-116), Glioblastoma (SNB-19), and Prostate Carcinoma (PC-3), respectively. Tumor growth inhibition rates were 91.2%, 87.7%, and 13% for OEEF treatment at doses of 25, 50, and 100 mg/kg/day, respectively. 5-FU (25 mg/kg/day) showed a 93.4% inhibition compared to the control group, and the OEEF25 and OEEF50 groups were statistically similar to it. OEEF25 treatment did not cause changes in body and visceral mass; however, there was a decrease in heart mass in the OEEF50 and OEEF100 groups and in body mass in the OEEF100 and 5-FU groups. Thrombocytopenia (OEEF50, OEEF100, and 5-FU); lymphocytosis (OEEF50 and OEEF100), and leukopenia (5-FU) were identified. Histological results of the tumors in the OEEF100 and CTRL groups were indistinguishable. In the OEEF25 and OEEF50 groups, lower necrosis and mitotic activity indices were observed. Histological evaluation of the spleen was consistent with a reduction in white pulp in the 5-FU group, while heart and liver analysis was consistent with normal tissue cytology in the groups. **Conclusion:** Treatment with lower doses of OEEF showed significant antitumor potential without evidence of toxicity in the parameters evaluated, particularly with regard to OEEF25.

Keywords: Cancer; Medicinal plants; Sarcoma 180; *Eplingiella fruticosa*; Toxicity.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Eplingiella fruticosa*, Jesica Batista de Souza, São Cristóvão, 2023.

Introdução: O câncer é uma das doenças que mais acomete e causa óbito na população a nível mundial. Considerando que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento do câncer apresentam efeitos colaterais indesejáveis que levam a interrupção do tratamento, a pesquisa com plantas medicinais tem sido importante na busca de novos fármacos. Nesse contexto, a *Eplingiella fruticosa* ou Alecrim do Tabuleiro, uma planta medicinal utilizada pela população principalmente para o alívio da dor, merece destaque na investigação contra o câncer, especialmente porque muitas espécies da família têm apresentado efeitos consideráveis contra tumores malignos induzidos em animais de laboratório. **Objetivo:** Sendo assim, pela primeira vez, investigou-se o potencial anticancerígeno do óleo essencial obtido das folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), bem como avaliou-se possíveis efeitos colaterais causados. **Métodos:** Foi coletada as folhas da planta e no laboratório extraiu-se o óleo essencial. Além disso, os compostos químicos presentes no óleo foram identificados. O OEEF foi testado em quatro tipos de células tumorais isoladas e também, em camundongos injetados com um outro tipo de célula cancerígena (Sarcoma 180) que levou à formação de um tumor neles. O tratamento dos camundongos inoculados com o tumor Sarcoma 180 foi feito em três dosagens do OEEF (25, 50 e 100 mg/kg) por meio de aplicação de injeção nos camundongos durante sete dias. **Resultados:** foram identificados 80 compostos no OEEF, sendo 21 considerados majoritários merecendo destaque 1,8-cineol (17,07%), Cânfora (9,36%), β -Cariofileno (8,96%) e α -pineno (6,97%). No teste contra as células humanas isoladas verificou-se que o OEEF diminuiu a proliferação celular de todos os tipos de câncer avaliados, como câncer de cólon retal, cerebral, de próstata e de leucemia. Surpreendentemente, o OEEF nas menores dosagens apresentou um resultado excelente no tratamento dos camundongos doentes, pois reduziu em mais de 87% o tamanho dos tumores. Além disso, quando foi avaliada se o OEEF produzia efeitos prejudiciais nos animais, verificou-se que o mesmo na dosagem de 25 mg/kg foi incapaz de piorar a saúde dos camundongos com câncer. Muito pelo contrário, o OEEF normalizou algumas alterações ocasionadas pela presença da doença, isso foi identificado por meio de avaliação de possíveis alterações no peso corporal e de órgãos, além de análise clínica da composição do sangue desses animais. Dessa forma, verificou-se que o OEEF na dose de 25 mg/kg teve um resultado semelhante ao do medicamento 5-FU (25 mg/kg) quanto a redução do tumor e, por ora, efeitos mais satisfatórios em outros parâmetros. Por exemplo, verificou-se uma queda na imunidade e perda de peso nos camundongos tratados com o 5-FU, efeitos estes não observados para o tratamento com o OEEF25. Todavia, efeitos adversos foram identificados nas maiores doses do OEEF, além disso, na dose de 100 mg/kg não houve redução dos tumores. **Conclusão:** Conclui-se que o tratamento com as menores doses do OEEF apresentou potencial antitumoral significativo sem evidências de efeitos adversos nos parâmetros avaliados com relação ao OEEF25.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução clonal	10
Figura 2 - Microambiente tumoral e progressão do câncer	12
Figura 3 - O entendimento atual referente a toxicidade induzida por muitos quimioterápicos e resistência adquirida pelas células tumorais aos fármacos disponíveis. Fonte: adaptado de Dassari et al. (2022).....	16
Figura 4 - Espécime de <i>Eplingiella fruticosa</i> , um arbusto alto, de coloração verde-musgo, com flores azul-lilás. A) arbusto inteiro, B) folhas e flores distribuídas pelos ramos, C) folhas, D) flores. Fonte: Souza (2023).	25
Figura 5 - População natural de <i>Eplingiella fruticosa</i> localizada no município de São Cristóvão, Sergipe, 12°06'S; 41°58'O. Fonte: Souza (2023).....	29
Figura 6 - Média da massa (g) de tumores removidos de animais com Sarcoma 180 tratados com óleo essencial das folhas da <i>E. fruticosa</i> (OEEF), (doses em mg/kg/dia, i.p.).....	45
Figura 7 - Média da variação da massa (g) corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	48
Figura 8 - Média da massa (g) do baço por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	50
Figura 9 - Média da massa (g) do cérebro por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	53
Figura 10 - Média da massa (g) do coração por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p).....	54
Figura 11 - Média da massa (g) do estômago por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	55
Figura 12 - Média da massa (g) do fígado por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	56

Figura 13 - Média da massa (g) dos rins por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	57
Figura 14 - Leucócitos totais presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.).....	58
Figura 15 - Contagem de neutrófilos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)	60
Figura 16 - Contagem de eosinófilos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)	62
Figura 17 - Contagem de Monócitos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)	63
Figura 18 - Contagem de linfócitos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)	65
Figura 19 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos presentes no soro sanguíneo de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)	70
Figura 20 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque para a morfologia atípica celular neste.....	74
Figura 21 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque nos achados de necrose presentes neste grupo	75
Figura 22 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque nos achados de invasão tumoral no tecido adiposo, muscular, vasos linfáticos e fibras nervosas presentes neste grupo	76
Figura 23 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque nas fases de mitose com e sem atipia celular (40x, 100x e 400x, respectivamente para A, B e C)	77
Figura 24 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais tratados, coradas em HE, com destaque para margens e limites tumorais (40x, 100x e 400x).....	79

Figura 25 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais tratados com óleo essencial da <i>Eplingiella fruticosa</i> a 25 e 50 mg/kg, coradas em HE, com destaque para margens e limites tumorais (40x,100x e 400x)	80
Figura 26 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais submetidos a diferentes tratamentos, coradas em HE, com destaque para Infiltração tumoral nas bainhas dos nervos periféricos	81
Figura 27 - Secções histológicas de baços removidos de animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais, coradas em HE (100x)	83
Figura 28 - Secções histológicas de corações removidos de animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais, coradas em HE (400x)	84
Figura 29 - Secções histológicas de fígados removidos de animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais, coradas em HE (100x)	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de animais para avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	33
Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF) obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM-DIC)	38
Tabela 3 - Percentual de inibição do crescimento (% IPC) e desvio padrão (DP) do óleo essencial das folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> frente à quatro linhagens de células tumorais ...	41
Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% do óleo essencial das folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> frente a três linhagens de células tumorais	42
Tabela 5 - Efeito do óleo essencial de folhas da <i>Eplingiella fruticosa</i> (OEEF) sobre parâmetros eritrocitários do sangue periférico de camundongos inoculados com tumor Sarcoma 180 (S180)	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Incidência e mortalidade dos tipos de canceres, por sexo a nível mundial. Fonte: adaptado de GLOBOCAM (2020)	5
Quadro 2 - Incidência do câncer no Brasil nos anos de 2020-2022 para os sexos combinados e de forma isolada. Fonte: adaptado de INCA (2020).....	6
Quadro 3 - Estudos que descrevem efeitos biológicos de óleos essenciais de <i>Eplingiella fruticosa</i> e seus compostos majoritários.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% IT	Percentual de inibição de crescimento tumoral
% IPC	Percentual de inibição de proliferação celular
Δm	Variação da massa corporal
5-FU	5-Fluorouracil
A172	Linhagem celular de glioblastoma
A375	Linhagem celular de câncer de melanoma
A431	Linhagem celular de câncer de pele
A549	Linhagem celular de carcinoma pulmonar
AGS	linhagem celular de câncer gástrico
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AREO	Óleo essencial de <i>Agastache rugosa</i>
ASE	Acervo do herbário da Universidade Federal de Sergipe
AST	Aspartato-aminotransferase
B16	Linhagem celular de câncer de melanoma
B164A5	Linhagem celular de melanoma de camundongos
BCL2	Família de proteínas antiapoptótica
BCP	β -cariofileno
b-FGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BRAF	Oncoproteína BRAF
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CEs	Células endoteliais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
CG	Cromatografia gasosa
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
CG/DIC	Cromatograma de detector de ionização por chama
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média.
CI ₅₀	Concentração inibitória média de 50%
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência associada ao espectro de massas
CLAE/UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta

CNV	Células neoplásicas viáveis;
CTRL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ECM	Células endoteliais mesenquimais
EPM	Erro padrão da média
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FID	Detector de ionização de chama
FN	Fibra nervosa
FNP	Fibra nervosa periférica
GBM	Glioblastoma
GLOBOCAM	Observatório Global do Câncer
H4	Linhagem celular de neuroglioma
HB	Hemoglobinas
HCM	Média Corpuscular da Hemoglobina
HCT-116	Linhagem celular de câncer de cólon
HeLa	Linhagem celular de carcinoma cervical
HEM	Eritrócito
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular
HL-60	Linhagem celular de Leucemia promielocítica
HT	hematócrito
HT-29	Linhagem celular de câncer de cólon
I.p.	Via de administração intraperitoneal
IC	Intervalo de confiança
IFN γ	Interferon gama
IL-33	Interleucina 33
IL-5	Interleucina 35
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRa	Índice de retenção calculado
IRb	Índice de retenção da literatura
LOEO	Óleo essencial de de <i>Lavandula officinalis</i>

LAEO	Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNCap	Linhagem celular de câncer de próstata humano
LSEO	Óleo essencial de <i>Lavandula stoechas</i>
m ₀	Massa corporal inicial
MAT	Microambiente tumoral
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma de mama
ME	Tecido muscular estriado esquelético;
MEC	Matriz extracelular
mf	Massa corporal final
MG-63	Linhagem celular de osteossarcoma
MMP	Metaloprotease da matriz
mt	Massa do tumor
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio
MV3	Linhagem celular de melanoma
NAT	Neutrófilos associados a tumores
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
NK	Célula natural killer
OE	Óleo essencial
OEEF	Óleo essencial de <i>Eplingiella fruticosa</i>
OEEF100	Óleo essencial da <i>Eplingiella fruticosa</i> a 100 mg/kg
OEEF25	Óleo essencial da <i>Eplingiella fruticosa</i> a 25mg/kg
OEEF50	Óleo essencial da <i>Eplingiella fruticosa</i> a 50 mg/kg
OOEO	Óleo essencial de <i>Origanum onites</i>
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata
PCEO	Óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i>
PFEO	Óleo essencial de <i>Perilla frutescens</i>
PGDE	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
Rb	Proteína Retinoblastoma
ROEO	Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio

rpm	Rotações por minuto
RPMI-8226	Linhagem celular de mieloma múltiplo
S180	Sarcoma 180
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SJEO	Óleo essencial de <i>Salvia japonica Thunb.</i>
SNB-19	Linhagem celular de Glioblastoma
TA	Tecido adiposo;
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGF α	Fator transformador de crescimento ex
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tempo de retenção
U87	Linhagem celular de glioblastoma
UFS	Universidade Federal de Sergipe
UV	Ultravioleta
v.o	Via oral
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEI	Veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Câncer.....	4
2.1.1 Estatística.....	4
2.1.2 Fatores de risco.....	6
2.2 Câncer: uma doença genética	8
2.3 Terapêutica oncológica e suas limitações.....	15
2.3.1 A família Lamiaceae na terapêutica oncológica.....	20
2.4 <i>Eplingiella fruticosa</i>	22
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos.....	28
4 MÉTODO	29
4.1 Coleta e identificação da <i>E. fruticosa</i>	29
4.2 Extração do óleo essencial.....	29
4.3 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial.....	30
4.4 Estudo citotóxico da <i>E. fruticosa</i>	30
4.5 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	31
4.5.1 Animais.....	31
4.5.2 Obtenção e manutenção das células do tumor S180.....	32
4.5.3 Planejamento experimental.....	33
4.5.4 Determinação do efeito antitumoral	33
4.5.5 Avaliação dos parâmetros toxicológicos	34
4.5.5.1 Determinação da massa corporal	34
4.5.5.2 Determinação da massa do tumor e dos órgãos.....	35
4.5.5.3 Análises hematológicas	35
4.5.5.4 Análises bioquímicas	35
4.5.5.5 Análises histopatológicas	35
4.6 Análise estatística	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Extração do óleo essencial.....	37

5.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo	37
5.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais.....	41
5.4 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	44
5.4.1 Avaliação dos parâmetros toxicológicos	47
5.4.1.1 Determinação da massa corporal	47
5.4.1.2 Avaliação da massa dos órgãos	50
5.4.1.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos leucocitários	57
5.4.1.4 Avaliação dos parâmetros eritrocitários	67
5.4.1.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	69
5.4.1.6 Avaliação histopatológica.....	72
6 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma doença genética, heterogênea e multifatorial, em que uma sequência de alterações genômicas e moleculares provocam o crescimento e proliferação descontrolada das células, ocasionando um rápido aumento da massa tecidual nas partes afetadas do corpo (ANAND et al., 2022). Este se origina de uma única célula ancestral com apenas uma mutação, a partir da qual células descendentes intensamente anormais são geradas (KONTOMANOLIS et al., 2020).

Esta doença está entre as quatro primeiras causas globais de morte na população com idade inferior a 70 anos e, em 112 países, é a primeira ou segunda principal causa de morte na população idosa (SUNG et al., 2021).

A incidência do câncer é alta e estima-se que aumente à medida que a população mundial cresce e envelheça e, os fatores de risco associados à urbanização aumentem em prevalência (DEO; SHARMA; KUMARI, 2022). Em 2020, cerca de 19,3 milhões de pessoas desenvolveram câncer e quase 10 milhões vieram a óbito pela doença. Estima-se que esse número aumentará para mais de 28,4 milhões de casos em 2040 (SUNG et al., 2021).

A exposição diária a substâncias tóxicas perigosas pode alterar o mecanismo padrão do sistema celular, devido a danos genéticos ocasionados (TEIXEIRA; SOUSA, 2021). Além disso, uma parcela significativa no desenvolvimento de vários cânceres ocorre devido a fatores comportamentais dietéticos, dependência de drogas e falta de atividade física (CHHIKARA; PARANG, 2022; COPUR; MANAPURAM, 2019). Adicionalmente, as células cancerígenas podem espalhar-se rapidamente para outros órgãos e formar tumores secundários (BASTOS et al., 2018; BRITO et al., 2019; MOURA et al., 2016; SANTOS et al., 2023; TEIXEIRA; SOUSA, 2021).

Os avanços terapêuticos foram alcançados, principalmente, considerando os tipos de câncer mais comuns (mama, próstata, cólon e pulmão); no entanto, tumores raros, como os sarcomas, progridem ainda mais rapidamente (LIMA et al., 2020; POTTER; JONES; BARROTT, 2018). Menos de 1% de todas as neoplasias existentes nos centros de tratamento correspondem aos sarcomas, o que, não raro, resulta num atraso no seu diagnóstico (LIMA et al., 2020; THOENEN; CURL; IWAKUMA, 2019);

Os sarcomas são tumores de origem mesenquimal que ocorrem em tecidos moles e ósseos (SANNINO et al., 2017). Apresentam mais de 70 subtipos, ocorrendo em cartilagem, músculos, vasos sanguíneos, nervos e gordura (LIMA et al., 2020b). O Sarcoma 180 (S180), o

mais utilizado em estudos experimentais por apresentar altas taxas de disseminação e proliferação, tem representado um importante aliado para avaliação da atividade de substâncias naturais no câncer (LIMA et al., 2020b; XAVIER et al., 2015).

O desenvolvimento de terapias antitumorais, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia citotóxica e métodos de tratamento seletivo, aumentou consideravelmente a sobrevivência ao câncer (ANAND et al., 2022; DEHELEAN et al., 2021; KHALIFA et al., 2019). Entretanto, estes tratamentos ainda apresentam importantes limitações a serem superadas (KHALIFA et al., 2019).

A quimioterapia e a radioterapia são pouco seletivas, apresentando graves efeitos colaterais (AIELLO et al., 2018). A terapia baseada em alvos e a imunoterapia, embora altamente específicas no direcionamento do câncer, apresentam restrições de uso em pacientes e são muito caras; ainda, vários tipos de câncer tendem a recidivar e adquirir resistência após os tratamentos (MANDRICH; CAPUTO, 2020). Por isso, estão a ser feitos esforços significativos para procurar medicamentos cada vez mais eficazes, com efeitos secundários reduzidos, provenientes de novas fontes (KHALIFA et al., 2019; MANDRICH; CAPUTO, 2020).

O valor terapêutico das plantas é amplamente conhecido pela população mundial desde a antiguidade devido sua utilização na medicina tradicional para tratar várias doenças, incluindo o câncer (MARQUES et al., 2023). As propriedades terapêuticas associadas às plantas fundamentam-se especialmente nos metabólitos secundários que elas produzem. No processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, e particularmente para o tratamento do câncer, as plantas medicinais representam uma importante fonte de moléculas bioativas (CATANZARO et al., 2018; DEHELEAN et al., 2021; TEIXEIRA; SOUSA, 2021).

Mais de 60% dos medicamentos anticâncer usados na clínica são derivados diretamente de plantas ou inspirados em seus novos fitoquímicos (MANDRICH; CAPUTO, 2020). Alguns produtos bioativos naturalmente anticancerígenos clinicamente testados incluem Vinblastina, Vincristina, Podofilotoxina, Paclitaxel (taxol) e Camptotecina (TEIXEIRA; SOUSA, 2021). Os Alcalóides da Vinca, Vincristina e Vinblastina foram os primeiros medicamentos anticancerígenos derivados de plantas a entrar em uso clínico (DEHELEAN et al., 2021).

Os óleos essenciais (OE) obtidos de espécies vegetais com propriedades aromáticas, são exemplos de misturas complexas de metabólitos secundários voláteis com enorme potencial terapêutico (MARQUES et al., 2023). São ricos em fitoquímicos oxigenados e hidrocarbonetos de pequeno peso molecular, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, os quais são bem

conhecidos por seu valor terapêutico, incluindo atividade antitumoral (MACHADO et al., 2022; MELO et al., 2020; SILVA, D. et al., 2019).

Várias substâncias bioativas presentes em OEs de plantas da família Lamiaceae foram identificadas, caracterizadas e isoladas, destacando que as mesmas abrem caminho para a descoberta de novos compostos terapêuticos para o tratamento do câncer (BILTEKIN et al., 2023; BOUKHATEM et al., 2020; FAHMY et al., 2022; MOHAMMED et al., 2021; SPYRIDOPOULOU et al., 2019; SUN et al., 2022). Particularmente, OEs e extratos de diferentes partes da "*Eplingiella fruticosa*" (Lamiaceae) têm despertado o interesse científico.

A *Eplingiella fruticosa* Salzm. ex. Benth é uma planta rica em óleos voláteis cujas folhas são utilizadas pela população principalmente para o alívio da dor. Ela é encontrada no Brasil, principalmente na região nordeste, cujo óleo é rico em 1-8 cineol, um fitoquímico altamente bioativo (BESERRA-FILHO et al., 2019; HARLEY, 2014; SILVA, D. et al., 2019).

O óleo essencial extraído de *E. fruticosa* tem estimulado o interesse científico, pois demonstrou exercer uma ampla gama de atividades biológicas, como atividade formicida (SILVA et al., 2019); larvicida (SILVA et al., 2008), analgésica (SILVA et al., 2006), efeito anti-hiperalgésico (MELO et al., 2020), tripanocida e imunomoduladora (SOUZA, 2017); neuroprotetora (BESERRA-FILHO et al., 2019), antinociceptiva (FRANCO et al., 2011a; MENEZES et al., 2007) e antimicrobiana (SANTOS, 2016).

Além disso, um estudo demonstrou que a fração clorofórmica das folhas da planta possui propriedades antitumorais *in vivo* contra células de tumor S180 em um modelo murino (LIMA et al., 2020a). Todavia, ainda não há registro na literatura de atividade anticancerígena de seu óleo essencial.

Nesta razão, a *E. fruticosa* merece ser investigada quanto ao seu potencial biológico ainda escasso na literatura. Por isso, a importância desse trabalho, pioneiro na investigação dos efeitos antitumorais do OE de suas folhas, frente a quatro linhagens de células tumorais (estudos *in vitro*) e também, sobre o tumor S180 implantado em camundongos (estudos *in vivo*), bem como efeitos toxicológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

2.1.1 Estatística

O câncer é uma das doenças com altos índices de incidência e de mortalidade que afetam os seres humanos desde os tempos mais antigos. A primeira descrição desta doença ocorreu no Egito, antes mesmo da palavra câncer ser usada e remonta a cerca de 3000 aC. Foi Hipócrates, o então Médico grego considerado "Pai da medicina", que originou o termo "câncer". Até então, haviam registros detalhados e consequências da doença sem indicação de seu nome (XIANG, 2017).

Essa doença está entre as quatro primeiras causas globais de morte na população com idade inferior a 70 anos. Em 112 países, é a primeira ou segunda principal causa de morte na população idosa. As taxas de mortalidade por acidente vascular cerebral e doença cardíaca coronária em muitos países diminuíram, em parte, devido ao aumento de mortes pelo câncer (SUNG et al., 2021).

Em 2020, cerca de 19,3 milhões de pessoas desenvolveram câncer e quase 10 milhões vieram a óbito pela doença. Estima-se que esse número aumentará para mais de 28,4 milhões de casos em 2040, um aumento de 47% em relação a 2020 (SUNG et al., 2021).

Em 2018, o câncer de pulmão era o mais comumente diagnosticado (11,6% do total de casos) e a principal causa de morte por câncer (18,4% do total de mortes por câncer) no mundo, segundo estimativas do observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) (BRAY. et al., 2018). Pesquisas mais recentes demonstram que o câncer de mama feminino ultrapassou o câncer de pulmão. Todavia, esse continuou sendo a principal causa de morte.

As estatísticas de incidência e de mortalidade por câncer a nível mundial, baseada em pesquisas de organizações mundialmente reconhecidas mostram que, em termos de incidência para ambos os sexos combinados, o câncer de mama feminino é o câncer mais comumente diagnosticado (11,7% do total de casos), seguido de pouca diferença pelos cânceres de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). Para além do câncer de fígado (4,7%), esôfago (3,1%), colo do útero (3,1%), tireoide (3%), bexiga (3%), entre outros (SUNG et al., 2021).

Com relação a mortalidade por câncer, o câncer de pulmão é causa primária de óbito (18% do total de mortes por câncer), seguido por câncer colorretal (9,4%), fígado (8,3%),

estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%). Para além do câncer de esôfago (5,5%), pâncreas (4,7%), próstata (3,8%), colo do útero (3,4%), Leucemia (3,1%), entre outros.

O câncer de pulmão configura-se entre os principais em incidência, ocupando a primeira posição entre os homens e a terceira posição entre as mulheres a nível mundial. Nas mulheres, os cânceres mais comumente diagnosticados são o câncer de mama (sendo este o câncer que mais causa óbito nas mulheres) seguido pelo câncer colorretal e pulmonar. Nos homens, os cânceres mais comumente diagnosticados são o câncer de pulmão (sendo este o câncer que mais causa óbito nos homens), seguido pelo câncer de próstata e colorretal (BRAY. et al., 2018; CHHIKARA; PARANG, 2022; SUNG et al., 2021) (Quadro 1).

Quadro 1 - Incidência e mortalidade dos tipos de canceres, por sexo a nível mundial. Fonte: adaptado de GLOBOCAM (2020)

Sexo	Posição	Incidência	Mortalidade
Mulheres	1º	Câncer de mama (24,5%)	Câncer de mama (15,5%)
	2º	Câncer colorretal (9,4%)	Câncer de pulmão (13,7%)
	3º	Câncer de pulmão (8,4%)	Câncer colorretal (9,5%)
Homens	1º	Câncer de pulmão (14,3%)	Câncer de pulmão (21,5%)
	2º	Câncer de próstata (14,1%)	Câncer de fígado (10,5%)
	3º	Colorretal (10,6%)	Colorretal (9,3%)

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2020, previu 450 mil casos novos anuais até 2022, somando-se a cada ano, 177 mil casos de câncer de pele não melanoma, o qual a previsão foi a de maior incidência. Em sequência, avistou-se os cânceres de mama e de próstata, cólon e reto, pulmão e estômago.

Entre os sexos, os cinco tipos de câncer mais comuns previstos para o Brasil foram para os homens: câncer de próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral. Para as mulheres, figuraram entre os principais: o câncer de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide. Esses percentuais desconsideram os casos de câncer de pele não melanoma, de maior ocorrência para ambos (INCA, 2020) (Quadro 2).

Quadro 2 - Incidência do câncer no Brasil nos anos de 2020-2022 para os sexos combinados e de forma isolada. Fonte: adaptado de INCA (2020)

Posição	Combinados	Mulheres	Homens
1º	Câncer de mama (66 mil)	Câncer de mama (29,7%)	Câncer de próstata (29,2%),
2º	Câncer de Próstata (66 mil)	Câncer de cólon e reto (9,2%)	Câncer de cólon e reto (9,1%),
3º	Câncer de Cólon e reto (41 mil)	Câncer de colo do útero (7,4%)	Câncer de pulmão (7,9%)
4º	Câncer de Pulmão (30 mil)	Câncer de pulmão (5,6%)	Câncer de estômago (5,9%)
5º	Câncer de estômago (21 mil)	Câncer de tireoide (5,4%)	Câncer de cavidade oral (5,0%)

Considerou-se a incidência dos sexos combinados por 100 mil habitantes.

2.1.2 Fatores de risco

A incidência e mortalidade por câncer aumenta rapidamente em todo o mundo. As razões são complexas e os fatores de risco para o desenvolvimento dos diversos tipos de câncer são considerados em duas modalidades, os riscos intrínsecos e não intrínsecos. Os intrínsecos referem-se a erros aleatórios resultantes da replicação do DNA e, portanto, não modificáveis enquanto os não intrínsecos, referem-se a fatores de risco endógenos e exógenos, modificáveis ao menos parcialmente (WU et al., 2018).

Os riscos exógenos incluem, por exemplo, agentes cancerígenos: vírus e bactérias, xenobióticos; e fatores de estilo de vida: tabagismo, terapia hormonal, ingestão de nutrientes e falta de atividade física (WU et al., 2018; YIN et al., 2021). Os riscos endógenos relacionam-se a características particulares de cada pessoa, tais como sistema imune, metabolismo, níveis hormonais e danos ao DNA os quais são considerados parcialmente modificáveis, pois podem ser prevenidos ou controlados, ainda que parcialmente (WU et al., 2018).

Os riscos não intrínsecos e intrínsecos ou mutacionais estão intimamente relacionados, uma vez que, por exemplo, microrganismos infecciosos causadores de câncer, são agentes mutagênicos; os vírus e, em particular, aqueles com genoma de DNA, normalmente se ligam ao DNA nuclear do hospedeiro, integrando-se a uma sequência cromossômica ou mesmo são capazes de modular o funcionamento da célula a seu favor (ALBERTS et al., 2017). As bactérias intracelulares podem absorver os DNAs do hospedeiro e então se desenvolver em

células cancerígenas hibridizando os DNAs adquiridos com os seus próprios e expressando os genomas híbridos (YIN et al., 2021).

Esses agentes invasores exógenos são capazes de interferir no metabolismo e na imunidade de seus hospedeiros, influenciando suas respostas na prevenção e no combate ao câncer. São capazes de acionar respostas imunes do hospedeiro e modular seu sistema de defesa por toda a vida, por meio de memória imunológica, promovendo respostas imunes adaptativas que são eficientemente acionadas em um segundo contato com o mesmo agente, ou mesmo tais agentes podem comprometer a imunidade facilitando a carcinogênese (BRAUMÜLLER et al., 2022; YIN et al., 2021).

Além disso, podem comprometer o metabolismo celular, o qual está atrelado às condições de integridade genômica, uma vez que muitas enzimas necessárias à catálise ou síntese de biomoléculas podem não ser expressas corretamente ou terem suas funções comprometidas em razão de mutações genômicas ocasionada por invasores. Assim, uma pessoa pode adquirir obesidade, gordura hepática e predisposição para o câncer (JUANOLA et al., 2021; ZHANG et al., 2021) ou mesmo um paciente ter dificuldades em metabolizar fármacos quimioterápicos durante o tratamento.

Nesse sentido, apesar de haver erros aleatórios de gênese pessoal, presume-se que o estilo de vida incluindo fatores, como: alimentação, atividade física, exposição a microrganismos, pode influenciar fatores mais internos relacionados à imunidade, metabolismo bem como respostas celulares no combate ao câncer (RINGEL et al., 2020).

De acordo com Wu et al. (2018), todos os seres humanos têm as mesmas taxas de mutação intrínseca e os erros de replicação do DNA são constantes. Assim, por exemplo, alguém que nunca fumou pode ter um risco de contrair câncer de pulmão de 0,2 a 1%. No entanto, os fatores exógenos, endógenos e intrínsecos atuam em cooperação e não isolados.

A este respeito, WU et al. (2016) forneceram evidências de que riscos intrínsecos (inevitáveis) contribuem apenas modestamente (menos de 10 a 30%) para o desenvolvimento de muitos cânceres. Em contraste, riscos não intrínsecos (evitáveis) tem uma contribuição substancial (60 a 90%) para o acionamento do câncer.

Os motivos para a incidência e a mortalidade por câncer são complexos, suscitam tanto o envelhecimento e o crescimento populacional, assim como mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para o câncer, muitos dos quais associados ao desenvolvimento socioeconômico (GLOBOCAM, 2018).

2.2 Câncer: uma doença genética

As células tumorais compartilham uma ou mais anormalidades detectáveis em suas sequências de DNA que as distinguem das células normais vizinhas ao tumor (DIETLEIN et al., 2022). Essas anormalidades constituem-se de mutações somáticas, sendo assim chamadas, pois ocorrem nas células do corpo e não na linhagem germinativa (BASU, 2018).

Os cânceres também surgem por mudanças epigenéticas, as quais são herdáveis e ocasionam modificações na estrutura da cromatina sem nenhuma alteração na sequência de DNA da célula (TAN et al., 2022). Entretanto, os eventos mutacionais são fundamentais e estão universalmente presentes nas células cancerígenas (CHALMERS et al., 2017; PRIESTLEY et al., 2019).

Nesse sentido, o câncer é considerado uma doença genética, heterogênea e multifatorial, em que uma sequência de alterações genômicas e moleculares provocam o crescimento e proliferação descontrolada das células, ocasionando um rápido aumento da massa tecidual nas partes afetadas do corpo (ANAND et al., 2022).

Os diversos tipos de células cancerígenas compartilham algumas características comuns que as diferenciam das células normais. Elas crescem e entram em divisão celular inadvertidamente, formam metástase (ANDERSON, 2020), são menos propensas à morte por apoptose (ALIMBETOV et al., 2018), são genética e epigeneticamente instáveis (TAN et al., 2022) e, além disso, escapam da senescência celular replicativa (DHANASEKARAN et al., 2022). Seus genomas mutados permitem que cresçam e se dividam na ausência de sinais que normalmente mantêm a proliferação celular sob um rígido controle (BASU, 2018; KONTOMANOLIS et al., 2020).

Diversos fatores podem desencadear mutagênese, que pode estar relacionada ao desenvolvimento do câncer. Essa relação é unânime no caso de agentes externos como: carcinógenos químicos e radiação, como os raios X ou luz ultravioleta (UV), os quais de maneiras particulares causam alterações nas bases do DNA, seja por uma mutação simples, quebras cromossômicas ou translocações (BASU, 2018; RAIMONDI; SUPPA; GANDINI, 2020; SAGINALA et al., 2021).

Todavia, mutações espontâneas independentes de agentes mutagênicos podem ocorrer devido às limitações intrínsecas da fidelidade da replicação e do reparo ao DNA (CHALMERS et al., 2017). Porém, é cientificamente reconhecido que tais erros contribuem pouco para o desenvolvimento do câncer ou carcinogênese (WU et al., 2016).

No caso dos cânceres que têm uma causa externa identificada, a doença em geral é latente durante um longo período de tempo da exposição ao agente causal, como ocorre, por exemplo, com o câncer de pulmão (HUH et al., 2022). Até a doença se tornar aparente, as células cancerosas sofrem uma sucessão de mudanças e o mesmo se aplica a cânceres nos quais a lesão genética inicial não tem uma correlação direta com alguma causa externa (KONTOMANOLIS et al., 2020).

A carcinogênese compreende três fases diferentes: iniciação, promoção e progressão. A fase de iniciação do tumor é um processo rápido associado à exposição de carcinógenos às células e sua interação com o DNA, resultando em efeito genotóxico. A fase de promoção do câncer é prolongada e está associada à proliferação de células cancerígenas, enquanto a fase de progressão tumoral é caracterizada pelo crescimento tumoral, invasão das células circundantes e metástase (AMAWI; ASHBY; TIWARI, 2017; BASU, 2018; IQBAL et al., 2018, 2019).

A progressão tumoral envolvida na carcinogênese requer um acúmulo gradual de mutações em um número de genes diferentes, em que um distúrbio inicial pouco grave no comportamento celular evolui para um câncer com todas as suas consequências (KONTOMANOLIS et al., 2020; PRIESTLEY et al., 2019). A Leucemia Mieloide Crônica (LMC), por exemplo, começa com a superprodução não letal de leucócitos durante muito anos, até mudar para uma doença que progride mais rapidamente e, de modo geral, termina em óbito dentro de poucos meses (ALBERTS et al., 2017).

O câncer se origina de uma única célula ancestral com apenas uma mutação, a partir da qual células descendentes levemente anormais são geradas (KONTOMANOLIS et al., 2020). Estas então sofrem sucessivos ciclos de mutação e seleção natural, dando origem a proles que sofrem mais mutações e se tornam ainda mais bem-adaptadas e continuam a se dividir, por fim produzindo clones dominantes na lesão em desenvolvimento (GERSTUNG et al., 2020), como pode ser visto na Figura 1.

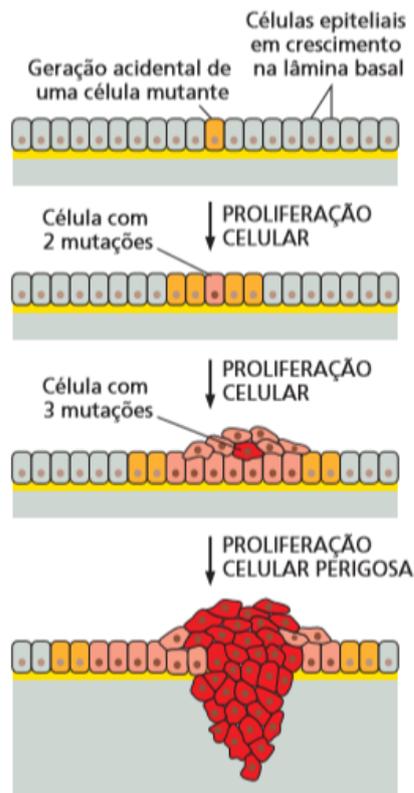


Figura 1 - Evolução clonal

Desenvolvimento tumoral a partir de ciclos repetitivos de mutação e proliferação, originando um clone de células cancerosas totalmente malignas, que em um estágio de múltiplas mutações consegue ultrapassar a membrana basal, etapa inicial da metástase. Fonte: Alberts et al. (2017).

Para sobreviver, as células cancerosas necessitam de mutações adicionais para evitar ou bloquear mecanismos de proteção contra o comportamento celular incorreto (DHANASEKARAN et al., 2022). A esse respeito, muitos tipos de células cancerosas conseguem evitar a apoptose, o que, em uma mesma situação, uma célula normal faria normalmente (ALIMBETOV et al., 2018).

Na tumorigênese, a multiplicação das células teciduais pode ser decorrente do aumento da divisão celular ou da inibição da apoptose, contribuindo para o crescimento da massa do tumor (ALIMBETOV et al., 2018). Contrariamente, nos tecidos saudáveis há um equilíbrio homeostático entre os níveis de apoptose e divisão celular (KONTOMANOLIS et al., 2020).

O microambiente tumoral (MAT) possui uma grande diversidade de moléculas e tipos celulares, incluindo células imunes, como neutrófilos, macrófagos, entre outras, participando da prevenção e promoção do desenvolvimento tumoral, tendo funções pró e antitumorais (HANUS et al., 2021).

As células do microambiente devem suportar e promover a tumorigênese por citocinas pró-inflamatórias (BRAUMÜLLER et al., 2022). A este respeito, os macrófagos e outras células imunes produzem citocinas que promovem o tumor e impulsionam a resposta inflamatória, fornecendo às células cancerosas fatores de crescimento adicionais e promovendo o crescimento de vasos sanguíneos, essencial para o crescimento do tumor (ANDERSON, 2020; BRAUMÜLLER et al., 2022).

O câncer pode ser ocasionado por processos inflamatórios associados à infecções (ANDERSON, 2020; BRAUMÜLLER et al., 2022), entretanto, o câncer também pode causar a inflamação, por meio do recrutamento de células imunes produtoras de citocinas inflamatórias.

A inflamação crônica leva à transição epitelial-mesenquimal, desdiferenciação, aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações epigenéticas no tumor e nas células do estroma (BRAUMÜLLER et al., 2022). O estresse oxidativo contínuo e a inflamação crônica se sustentam, levando à neoplasia e promovendo a progressão do tumor (NEGANOVA et al., 2021).

Além disso, muitos tumores, a fim de superar a hipóxia, produzem fatores de crescimento que estimulam a angiogênese ou induzem as células adjacentes normais a sintetizá-los. Tais fatores incluem, o fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF), o fator transformador de crescimento ex (TGF α) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os novos vasos sanguíneos nutrem o tumor em crescimento, permitindo seu aumento de tamanho e o aumento da ocorrência de mutações mais prejudiciais (ANDERSON, 2020).

Durante a progressão do tumor, as células endoteliais (CEs) sofrem transição endotelial-mesenquimal para se tornarem fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (ANDERSON, 2020). A transformação de uma célula cancerosa de um fenótipo de célula epitelial para um tipo de célula mesenquimal permite que a célula invada e migre (YIN et al., 2021) (Figura 2).

Adicionalmente, as células cancerígenas crescem usando o oxigênio e os suplementos do corpo, privando outras células de suplementos regulares e fatores de crescimento (ANAND et al., 2022). Podem suprimir a resposta imune antitumoral, competindo e esgotando nutrientes essenciais, ou reduzir a aptidão metabólica das células imunes que se infiltram no tumor (XIA et al., 2021). Além disso, os clones resistentes conseguem reduzir sua imunogenicidade, permitindo o desenvolvimento de tumores e manifestações clínicas (HANUS et al., 2021).

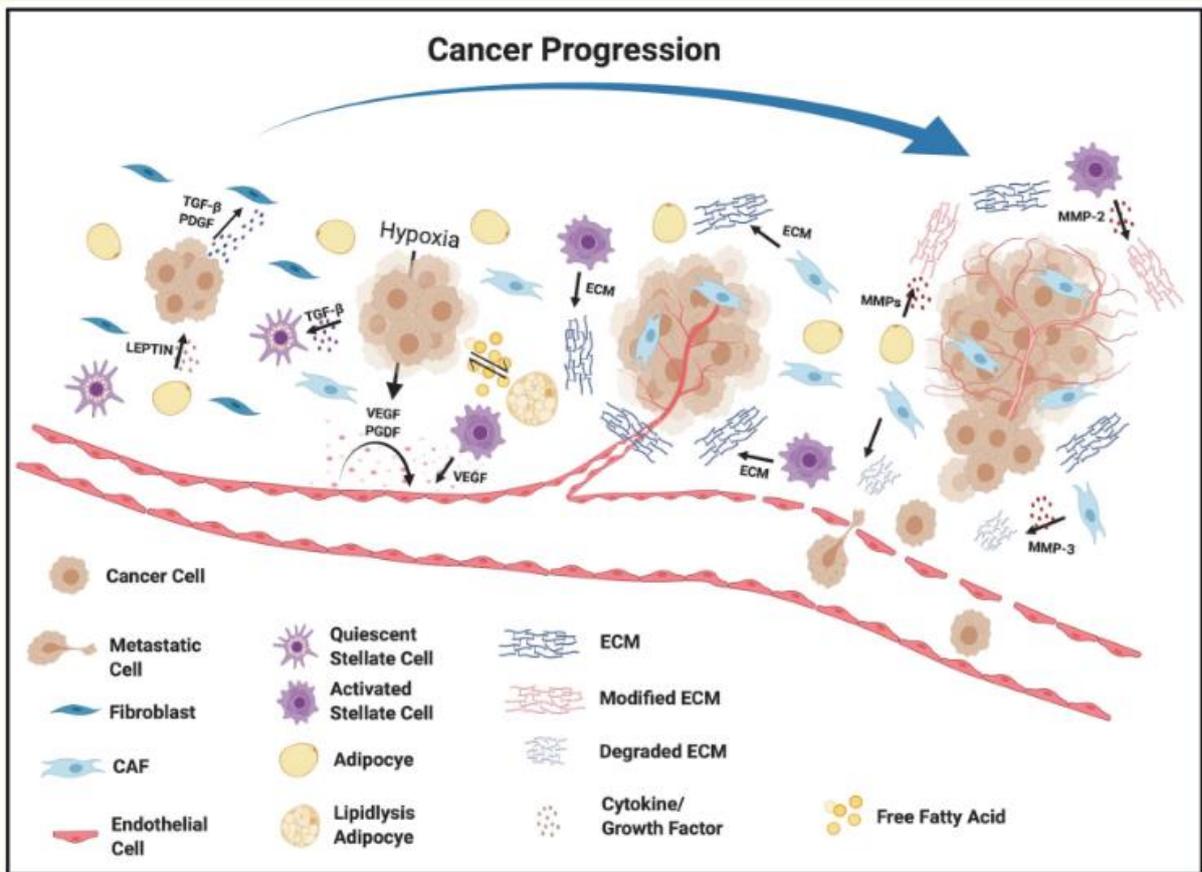


Figura 2 - Microambiente tumoral e progressão do câncer

Os tumores em geral são formados de células imunes inflamatórias, células estromais, vasos sanguíneos e matriz extracelular (MEC). As células estromais incluem: células endoteliais vasculares (CEs), fibroblastos, adipócitos e células estelares. Uma vez recrutadas para o MAT, as células do estroma secretam muitos fatores que influenciam a angiogênese, proliferação, invasão e metástase. Fibroblastos associados ao câncer (CAF); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Células endoteliais mesenquimais (ECM); Fator de crescimento transformador beta (TGF-b); fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDE) e metaloprotease da matriz (MMP). Fonte: Anderson (2020).

A metástase, migração das células cancerosas de seu local de origem para colonizar novos locais no corpo, é o aspecto mais preocupante e letal do câncer, sendo ainda pouco compreendido (TAN et al., 2022). Estima-se que cerca de 90% das mortes sejam associadas a ela (PRIESTLEY et al., 2019; YIN et al., 2021). Quando o câncer se torna invasivo pelo corpo, sua erradicação fica impossibilitada, seja por cirurgia ou radioterapia local.

A metástase é um processo complexo de muitas etapas: as células devem desprender-se do tumor primário, invadir o tecido local e os vasos (vasos sanguíneos e linfáticos), mover-se ao longo da circulação, deixar os vasos e, então, estabelecer uma nova colônia em locais distantes (TAN et al., 2022). Pequenos aglomerados de células cancerosas podem ficar presos nos linfonodos, dando origem a metástases nos linfonodos, por exemplo.

Apesar de os mecanismos moleculares envolvidos na metástase ainda serem obscuros, atualmente, compreende-se que a migração ou transição epitelial-para mesenquimal requer a ruptura de adesão entre as células vizinhas e, entre as mesmas e à matriz extracelular (TAN et al., 2022).

Quando o diagnóstico do câncer precede a formação de colônias metastáticas há chances de cura após a remoção do tumor primário. Todavia, uma micrometástase não detectada continuará silenciosa por muitos anos, até que se forme um tumor secundário evidente mediante um grande crescimento. Por infortúnio, pessoas que são consideradas clinicamente livres da doença após o tratamento do câncer podem carregar milhares de células tumorais disseminadas (MALLADI et al., 2016).

Entende-se que os cânceres são causados por mutações em um número limitado de genes críticos, ou seja, de oncogenes hiperativos e genes supressores tumorais, cuja hiperatividade e perda de função, respectivamente, são decorrentes de mutações ou de alterações epigenéticas (BASU, 2018; GERSTUNG et al., 2020; WANG et al, 2018). Genes críticos são aqueles cujas alterações contribuem para gerar ou desenvolver um câncer ao longo da tumorigênese; apenas 1% do genoma humano se constitui deles (KONTOMANOLIS et al., 2020).

O oncogene MYC (também conhecido como c-MYC) faz parte de uma superfamília de genes com produtos que estão entre os mais comumente ativados em cânceres humanos. Sua superativação produz efeitos como: 1) aumento da atividade da telomerase favorecendo assim a imortalidade celular; 2) instabilidade genômica por meio de substituição de pontos de controle do ciclo celular (como a repressão transcricional de p21) e o bloqueio do reparo de quebra de fita dupla do DNA, promovendo quebras de DNA, translocações cromossômicas, ganhos ou perdas cromossômicas, aneuploidia e poliploidia; 3) dormência para superar ambientes com poucos nutrientes, levando eventualmente à recidiva do tumor; 4) aumento da angiogênese, promovendo a progressão do tumor e 5) inibição ou escape da vigilância imunológica para garantir a sobrevivência das células cancerígenas. Todas essas características reguladas pelo MYC trabalham em uníssono para impulsionar a progressão do câncer (DHANASEKARAN et al., 2022).

Todavia, células que superproduzem apenas a proteína Myc dificilmente desenvolvem tumores malignos. No entanto, quando associadas com outras mutações, por exemplo, mutações cooperativas no gene Ras^D, formam o câncer (DHANASEKARAN et al., 2022; LODISH et al., 2014). Pesquisas demonstraram que muitos genes de células cancerosas possuem alteração em vários genes críticos (PRIESTLEY et al., 2019).

Os genes Ras estão entre os mais importantes de todos os genes críticos para o câncer. Cerca de 30% de todos os cânceres humanos contém um ou mais dos três membros da família Ras humana mutado (HUMBERT et al., 2022). O oncogene ras^D, é a versão dominante mutada de um gene celular normal, o proto-oncogene o ras (KONTOMANOLIS et al., 2020; PRIESTLEY et al., 2019).

As proteínas RAS são desativadas se estiverem ligadas ao difosfato de guanosina (GDP) e ativadas quando estiverem ligadas ao GTP (PATELLI et al., 2021). Os oncogenes ras isolados de tumores humanos contêm mutações pontuais que criam uma hiperatividade nas proteínas ras^D mutada, que acumula-se no estado ativo, enviando um sinal de estimulação do crescimento ao núcleo, mesmo na ausência dos hormônios normalmente necessários à ativação da sua função sinalizadora (LODISH et al., 2014, p. 1153).

Outro gene importante para a origem oncogênica é o do retinoblastoma (Rb), que codifica a proteína Rb, reguladora universal do ciclo celular presente em quase todas as células do organismo (RAJABI et al., 2022). O gene Rb age como um dos principais interruptores do progresso da divisão celular, e sua perda pode ocasionar o desenvolvimento de um ou mais tumores na infância, podendo ser um olho ou nos dois olhos (ALBERTS et al., 2017).

Além da proteína Rb, uma reguladora universal do ciclo celular, a P53 também é uma proteína supressora de tumor que protege as células por regulação da divisão celular e também induz apoptose: mecanismo de morte celular programada vital para a eliminação de células malignas, hiperplasia e progressão tumoral (ALIMBETOV et al., 2018; BARABUTIS; SCHALLY; SIEJKA, 2018). Estima-se que mais de 50% de tipos de câncer apresentam mutação nesse gene crítico para a malignidade (ALBERT et al., 2017).

A superprodução de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular ou mesmo a inativação de genes envolvidos na supressão tumoral afeta diretamente a regulação do ciclo celular, o qual desregulado, promove muito mais divisão do que deveria, além de não efetuar a correção e continuar ciclos sucessivos de divisão de células contendo genes defeituosos (DHANASEKARAN et al., 2022; RAJABI et al. 2022; SHI et al., 2022;).

O câncer depende não apenas de uma perda dos controles de progressão do ciclo celular, mas também de uma falha no controle de crescimento celular (ANDERSON, 2020). É possível encontrar mutações em genomas de células malignas que interrompem cada um dos três controles fundamentais: o controle do crescimento celular, o controle da divisão celular e o controle do dano ao DNA. O glioblastoma é um exemplo de câncer com alterações no genoma para esses três genes críticos (MONTELLA et al., 2022).

Muito se tem avançado ao longo dos anos no tratamento do câncer (YIN et al., 2021). Anos atrás, a expectativa de vida era muito baixa, muito disso correspondeu aos altos índices de pessoas com câncer. Os tratamentos eram precários e as pesquisas sobre a temática eram muito limitadas em virtude da falta de conhecimento sobre aspectos genéticos e moleculares que se relacionavam à doença.

Com as descobertas a nível molecular foi possível verificar diferenças entre as células normais e as cancerígenas e eventos mutantes associados a diferenciação entre elas, permitindo uma maior especialização e tratamento em alvos chave que promovem a proliferação celular anormal. Nessa razão, uma contribuição substancial tem sido a utilização de produtos naturais com fins quimioterapêuticos. Ressalta-se que a pesquisa básica abre espaço para pesquisas mais aplicadas e específicas e de maior possibilidade de aplicação na prática clínica.

2.3 Terapêutica oncológica e suas limitações

O câncer consiste no processo de múltiplos estágios de iniciação, promoção, transformação maligna e progressão (COPUR; MANAPURAM, 2019). Os agentes quimiopreventivos, os quais podem ser produtos farmacológicos ou naturais, podem atuar como inibidores da carcinogênese em qualquer um desses estágios. Podem bloquear a incidência de tumores em células saudáveis por meio de: inibição de mutagênese, modulação de cascatas de sinalização celular, regulação do sistema imunológico, aumento do nível antioxidante e inibição de angiogênese. Além do mais, a invasão e a metástase, podem ser prevenidas por meio da ativação de genes anti-metastáticos e modulares como moléculas de adesão celular (IQBAL et al., 2019).

Os tratamentos para eliminar células cancerígenas ou inibir sua proliferação consistem principalmente em cirurgia, quimioterapia e radioterapia, juntamente com imunoterapia recentemente desenvolvida (COPUR; MANAPURAM, 2019; YIN et al., 2021). Apesar de grandes esforços para desenvolver novas abordagens de intervenção terapêutica, a taxa de insucesso permanece alta (YIN et al., 2021). Há dois motivos principais que justificam esse insucesso e referem-se a resistência adquirida pelas células tumorais, em virtude de sua instabilidade genômica frente aos antineoplásicos e os efeitos adversos relacionados às terapias (LABRIE et al., 22; YIN et al., 2021), que inclusive limitam o aumento de dosagens e/ou aplicações, sendo necessário, por vezes, a interrupção do tratamento, ocasionando piora do paciente oncológico (BJÖRN et al., 2020).

As altas doses de radiação durante a radioterapia estão associadas a segundos cânceres, entre eles, leucemia aguda, leucemia mieloide crônica, mama, pulmão, tireoide e câncer de pele não melanoma. A associação entre alguns agentes quimioterápicos alquilantes e o risco de desenvolver leucemia aguda, em geral, normalmente dentro de 10 anos do tratamento, está bem estabelecida. Além disso, inibidores da topoisomerase II, antraciclinas e terapias à base de platina, também ocasionam a leucemia (COPUR; MANAPURAM, 2019).

As terapias sistêmicas são, em sua maioria, referidas como agentes citotóxicos, causando uma infinidade de efeitos colaterais (DASARI et al., 2022) (Figura 3). Geralmente, os tratamentos de longo prazo podem levar o paciente a uma enorme toxicidade, causando danos graves ou falência de múltiplos órgãos (ANAND et al., 2022; YIN et al., 2021). Além disso, revelam-se incapazes de curar tumores metastáticos (YIN et al., 2021). Isso pode levar a um enorme estresse fisiológico e psicológico aos pacientes sob medicação quimioterápica (ANAND et al., 2022).

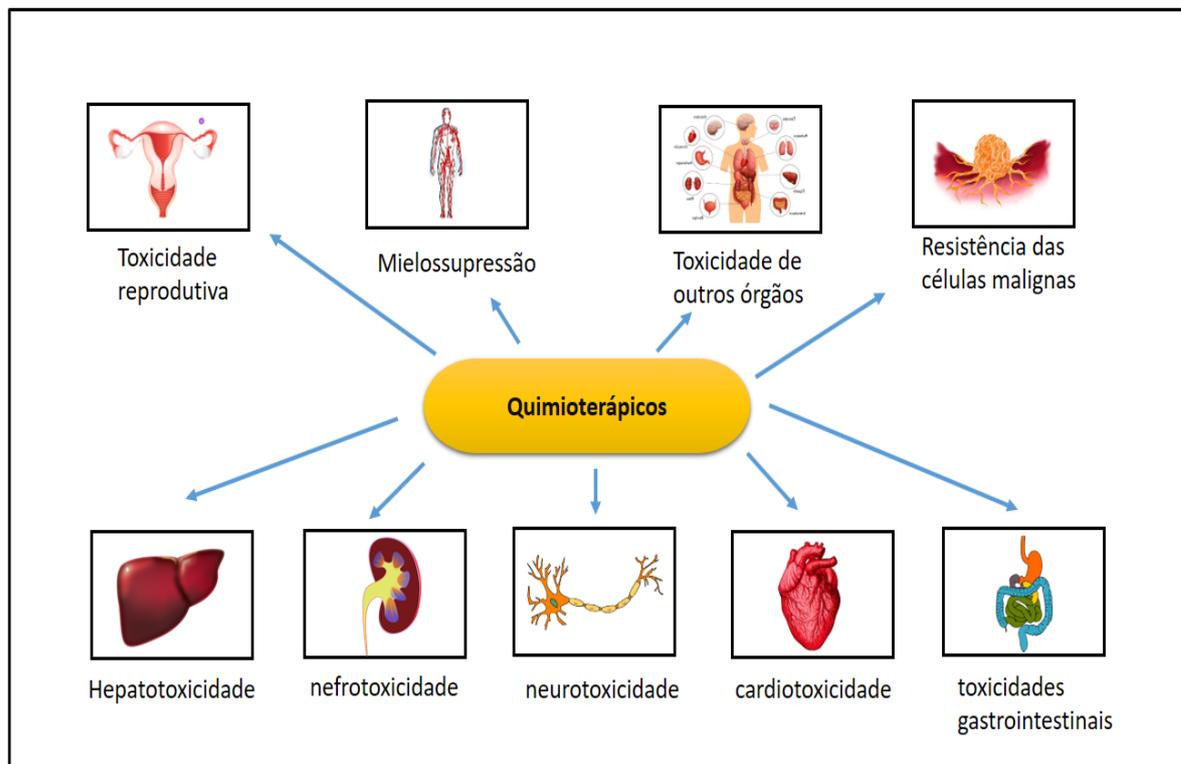


Figura 3 - O entendimento atual referente a toxicidade induzida por muitos quimioterápicos e resistência adquirida pelas células tumorais aos fármacos disponíveis. Fonte: adaptado de Dassari et al. (2022).

Os antineoplásicos podem lesionar a medula óssea e reduzir drasticamente a produção de células sanguíneas, expondo os pacientes a imunossupressão, tornando-os mais suscetíveis a infecções. A trombocitopenia ou número reduzido de plaquetas, que desencadeia a uma condição de sangramento, é observada na administração de agentes alquilantes e/ou antimetabólitos (ANAND et al., 2022).

Os quimioterápicos como a Gencitabina e Carboplatina comumente induzem mielossupressão grave, expressa principalmente na forma de neutropenia, leucopenia e trombocitopenia que pode levar a tratamentos não ideais em função de adiamento, redução ou interrupção (BJÖRN et al., 2020).

A radiação e uma variedade de fármacos quimioterápicos são prevalentes em causar toxicidades gastrointestinais. A sintomatologia, em geral, se manifesta como náusea, constipação, vômito, diarreia, dor abdominal, perda de peso e ulcerações na mucosa. O efeito adverso mais comum relatado com a administração sistêmica de 5-Fluorouracil (5-FU) é a diarreia (AKBARALI et al., 2022), além de mucosite, neutropenia e síndrome mão-pé (KNIKMAN et al., 2020) e mielossupressão (ARSHAD et al., 2020).

A diarreia induzida pelo 5-FU por exemplo, consiste de uma falha na retenção de líquidos e eletrólitos (ex: sódio e cloreto), resultando em desidratação grave, desnutrição ou disfunção renal e cardíaca, que podem levar à hospitalização e, em casos graves, à morte. Pode também ser desencadeada em razão de uma contratilidade aumentada da função do músculo liso gastrointestinal regulada pelo sistema nervoso entérico (AKBARALI et al., 2022).

Pertencente à classe dos antimetabólitos, o 5-FU é comumente usado em combinação com outras drogas antineoplásicas e com radioterapia. As combinações são uma estratégia na busca de um perfil de baixa toxicidade e aumento da taxa de resposta e sobrevida livre de progressão (ARSHAD et al., 2020). Tem sido utilizado no tratamento do câncer colorretal e pancreático (5-FU, ácido folínico, oxaliplatina e irinotecano); câncer de esôfago (5-FU e ciplastina), além de câncer de mama, câncer de cabeça e câncer de pescoço (ARSHAD et al., 2020; KNIKMAN et al., 2020).

Dado o número considerável de pacientes oncológicos sendo tratados com quimioterapia em todo o mundo todos os anos e a toxicidade grave relacionada aos fármacos, o monitoramento de drogas é valioso para alcançar toxicidade grave mínima. Isso pode ser feito por meio de biomarcadores que possam prever e prevenir toxicidade grave de quimioterápicos (ARSHAD et al., 2020; KNIKMAN et al., 2020).

Para além dos efeitos citotóxicos, ocasionado pela terapia oncogênica, as células malignas do câncer podem se proteger das toxinas e mudar constantemente seus fenótipos para sobreviver em condições adversas (YIN et al., 2021). A capacidade dessas células para desregular vias de morte celular desempenha papéis críticos na resistência terapêutica. As células tumorais desenvolvem meios compensatórios e vias de mitigação de estresse quimioterápico que mudam o equilíbrio das vias de morte celular para a sobrevivência celular. Em relação a apoptose, por exemplo, esses programas envolvem a indução de proteínas antiapoptóticas, por exemplo, proteínas da família BCL2, como BCL2, BCLxL, MCL1 e inativação de proteínas pró-apoptóticas, por exemplo, p53 (LABRIE et al., 22).

Comumente, terapias anticâncer podem levar a uma redução substancial do tamanho do tumor, com todas as células tumorais detectáveis aparentemente desaparecendo. Contudo, meses ou anos depois, verifica-se a falha no tratamento inicial, com o reaparecimento evidente do câncer, que chega mais resistente e mais agressivo (MALLADI et al., 2016). Isso ocorre devido às células estarem em um ambiente protegido, ou terem sofrido mudanças epigenéticas ou mutações de proteção (DHANASEKARAN et al., 2022; GERSTUNG et al., 2020).

As células tumorais podem adquirir resistência a múltiplas drogas, incluindo fármacos aos quais elas nunca foram expostas. A multirresistência está associada, via de regra, com a amplificação de uma parte do genoma que contém o gene chamado Mdr1 ou Abcb1 (SETHY et al., 2021). Nessa batalha para frente e para trás entre o avanço do câncer metastático e a terapia, o câncer costuma vencer.

O estresse terapêutico intrínseco do tumor e os processos de mitigação do estresse envolvidos pelo ecossistema do tumor fornecem estratégias terapêuticas para aumentar a eficácia contra o câncer, que podem ser de três maneiras: a) interromper as vias de mitigação do estresse que favorecem a sobrevivência para induzir a morte de células malignas, b) intensificar o estresse existente e, assim, sobrecarregar as estratégias de mitigação resultando em destruição celular, c) explorar vulnerabilidades emergentes no ecossistema tumoral (LABRIE et al., 2022).

As terapias contra o câncer podem induzir diretamente o dano ao DNA, estimulando respostas celulares de morte contra células tumorais com altos níveis de dano ao DNA (LABRIE et al., 22). O 5-FU, usado no tratamento de uma variedade de malignidades, por exemplo, impede a replicação e o reparo do DNA. Além de o produto de seu metabolismo servir como um análogo de pirimidina incorporando no lugar de uracil ou timina. Essa inibição da maquinaria de reparo do DNA resulta na morte celular (AKBARALI et al., 2022).

As células malignas comumente apresentam alto estresse oxidativo decorrentes da interrupção do equilíbrio redox que inclui aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) resultantes de fontes intrínsecas e extrínsecas e redução de níveis antioxidantes endógenos (AGGARWAL et al., 2019). Para manter um equilíbrio adequado de EROs, as células tumorais desenvolveram mecanismos para aumentar a expressão de proteínas antioxidantes celulares e eliminar peróxido (peroxidases) que controlam os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reduzindo H_2O_2 a H_2O (WEINBERG et al., 2019).

Apesar das EROs desempenharem um papel importante na tumorigênese promovendo, por exemplo, proliferação celular, instabilidade genômica, inflamação e resistência à apoptose, altos níveis de EROs podem ter efeitos deletérios. Em concentração moderada, EROs ativam a cascata de sinalização de sobrevivência de células cancerígenas. Por outro lado, em altas concentrações, as EROs podem causar apoptose de células cancerígenas (AGGARWAL et al., 2019). A maioria das quimioterapias (antraciclinas, complexos de coordenação de platina, inibidores da topoisomerase, etc.) aumentam EROs/ERNs através de alterações no transporte de elétrons mitocondriais e redução em sistemas antioxidantes como glutathione, peroxidases, superóxido dismutases e outros (LABRIE et al., 2022).

A interrupção ou inibição de enzimas antioxidantes celulares aumenta a produção de EROs que desencadeiam a apoptose em células malignas. Além disso, os fármacos antitumorais que atuam nesse sentido, auxiliam na superação do fenômeno de resistência quimioterápica, pois níveis elevados de antioxidantes celulares também estão diretamente envolvidos no desenvolvimento de quimiorresistência em células malignas (AGGARWAL et al., 2019). Além disso, várias quimioterapias induzem estresse metabólico, incluindo inibidores da via Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) que diminuem a absorção de glicose e aminoácidos ou inibidores BRAF que afetam a glicólise prejudicando a sobrevivência das células neoplásicas (LABRIE et al., 22).

Embora o tempo de sobrevivência de pacientes com câncer tenha sido prolongado após esses tratamentos, uma grande proporção de pacientes não consegue obter uma sobrevida de longo prazo (YIN et al., 2021). Nesse sentido, o desafio é encontrar uma estratégia terapêutica anticâncer sem toxicidade aumentada e sem impacto negativo no resultado geral. Não há diretrizes bem estabelecidas e baseadas em evidências nesse cenário (COPUR; MANAPURAM, 2019).

2.3.1 A família Lamiaceae na terapêutica oncológica

Diversos trabalhos disponíveis na literatura científica demonstram que muitas plantas medicinais contêm compostos bioativos que são candidatos promissores para o tratamento de doenças humanas e, portanto, representam uma excelente fonte para a descoberta de novos fármacos (BOUKHATEM et al., 2020; DASARI et al., 2022; SPYRIDOPOULOU et al., 2019).

Estima-se que das drogas disponíveis atualmente, cerca de 30% sejam oriundas de plantas e os produtos naturais continuarão a ter grande importância na medicina humana. Drogas anticancerígenas, antibióticos, anti-inflamatórios e imunomoduladores estão entre as drogas de origem vegetal mais importantes (TAFRIHI et al., 2021).

As plantas medicinais têm sido utilizadas na atenção primária no tratamento de doenças e várias delas também são empregadas na medicina herbal para o alívio do câncer (SPYRIDOPOULOU et al., 2019). Embora algumas drogas anticancerígenas de origem vegetal, incluindo vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina, estramustina, paclitaxel e colchicina sejam usadas na clínica, ainda assim, considera-se poucos os fármacos anticâncer existentes diante da progressão e dificuldade de tratamento da doença (TAFRIHI et al., 2021).

Especificamente, os OEs de plantas medicinais têm atraído cada vez mais atenção nos últimos anos por suas atividades biológicas multifacetadas e diversas composições químicas (SPYRIDOPOULOU et al., 2019). São compostos de baixa polaridade com propriedades hidrofóbicas e enriquecidos de terpenos (compostos derivados de unidades de isopreno), os quais conferem suas principais características físico-químicas e farmacológicas (BESERRA-FILHO et al., 2019; MELO et al., 2020).

Plantas da família Lamiaceae, ricas em OEs, têm valores significativos na medicina natural e farmacológica. Atividades biológicas de seus extratos e OEs como antitumoral, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória têm sido investigadas há tempos (BOUKHATEM et al., 2020; SUN et al., 2022).

Algumas espécies de Lamiaceae foram estudadas quanto à caracterização fitoquímica de seus OEs bem como as bioatividades antitumorais *in vivo* e *in vitro* (BOUKHATEM et al., 2020; FAHMY et al., 2022; SPYRIDOPOULOU et al., 2019; SUN et al., 2022).

Sun et al. (2022) analisaram as composições químicas e atividades biológicas de OEs extraídos de *Pogostemon cablin* (PCEO), *Perilla frutescens* (PFE0), *Salvia japonica* Thunb. (SJEO), *Rosmarinus officinalis* (ROEO), *Lavandula angustifolia* Mill. (LAEO) e *Agastache rugosa* (AREO) pertencentes à família Lamiaceae. A atividade antitumoral foi avaliada *in vitro* em linhagens celulares de câncer de próstata humano (LNCap) e de melanoma (B16) de

camundongo. Os valores de CI_{50} (concentração inibitória média de 50%) dos seis OEs nas células LNCap ficaram entre 116,41 e 189,63 $\mu\text{g/mL}$; em células B16, variaram de 86,91 a 228,91 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com os autores, a atividade citotóxica, frente às linhagens testadas, pode ser decorrente dos compostos químicos identificados nos OEs os quais variaram bastante em perfis, marcando diferenças entre eles e na sua eficiência na atividade antiproliferativa. Dentre eles identificou-se os majoritários: álcool de patchouli (43,04%) em PCEO; linalol (67,65%) em PFE0; chavibetol (17,72%) em ROEO; acetato de terpenil (10,52%) em SJEO; linalol (29,84%) em LAEO; patchouli álcool (45,70%) em AREO.

O óleo essencial de *Lavandula officinalis* (LOEO) foi testado em seis linhagens celulares de câncer humano, ou seja, carcinoma hepatocelular (HepG2), próstata (PC-3), carcinoma pulmonar (A549), câncer de pele (A431), câncer de cólon (HCT-116) e câncer de mama (MCF-7) para determinar sua ação antiproliferativa. Os resultados indicaram que o LOEO foi altamente citotóxico nas linhagens de células HepG2 e A549 com CI_{50} de 67,8 e 12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além disso, a pré-administração oral de LOEO em camundongos teve a capacidade de reduzir micronúcleos, aberrações cromossômicas e danos ao DNA induzidos pelo quimioterápico ciclofosfamida, exercendo um potente efeito antimutagênico (FAHMY et al., 2022).

O óleo essencial de *Lavandula stoechas* da Argélia (LSEO) foi testado *in vitro* contra diferentes linhagens de células cancerígenas: carcinoma de mama humano (MDA-MB-231), câncer gástrico humano (AGS) e melanoma humano (MV3). O LSEO apresentou citotoxicidade seletiva em células AGS, MV3 e MDA-MB-231. O 1,8-cineol (61,36%) foi o principal composto identificado, seguido pelo β -pineno (13,83%) e α -pineno (4,75%) (BOUKHATEM et al., 2020).

A composição química do óleo essencial de *Origanum onites* (OOEO) foi investigada, assim como seus potenciais efeitos anticancerígenos *in vitro* e *in vivo*. O efeito antiproliferativo mais forte (menor valor de CI_{50} por 72 h) foi observado na linhagem celular de câncer de cólon (HT-29) seguida por células de melanoma (A375), MCF-7 e HepG2 com valores de CI_{50} variando de 0,35 a 23,0 $\mu\text{g/mL}$. No estudo *in vivo*, a administração oral profilática do OOEO em um modelo experimental de camundongo inibiu o crescimento de tumores de cólon CT26 singênicos. O fitoquímico mais abundante identificado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) no OOEO foi o carvacrol (47,99%) (SPYRIDOPOULOU et al., 2019).

O OE de *Mesosphaerum sidifolium* (100 e 150 mg/kg) e seu principal componente, fenchona (60 mg/kg) reduziram a massa tumoral da cavidade peritoneal de camundongos Swiss no modelo de carcinoma de ascite de Ehrlich se assemelhando a droga padrão (5-FU, 25 mg/kg). Os principais componentes do óleo de *M. sidifolium* foram fenchone (24,8%), cubebol (6,9%), limoneno (5,4%), espatulenol (4,5%), β -cariofileno (4,6%) e α -cadinol (4,7%) (ROLIM et al., 2017). O limoneno e o β -cariofileno são descritos na literatura como tendo significativa atividade antitumoral (ROLIM et al., 2017).

O OE de *T. vulgaris* foi continuamente administrado em dosagens de (1 g/kg) e (10 g/kg) na dieta em um modelo de carcinoma mamário (4T1) de camundongo. Ambas as doses reduziram os tumores em 85% (1 g/kg) e 84% (10 g/kg). O p-cimeno (43%) e o timol (39%) foram identificados como constituintes majoritários; além deles, α -pineno (2,8%), eucaliptol (0,9%) e β -pineno (0,6%) estavam dentre os 13 principais compostos (KUBATKA et al., 2019).

As atividades antitumorais *in vitro* e *in vivo* do OE de *Lavandula angustifolia* foram investigadas na linhagem celular PC-3, usada para estabelecer tumores subcutâneos de xenoenxerto em camundongos. O OE e o linalol, seu composto majoritário (30%), administrados na dose de 200 mg/kg suprimiram significativamente o crescimento do tumor (ZHAO et al., 2017).

A partir do referencial teórico apresentado nesta seção, nota-se que as espécies de Lamiaceae são importantes fontes de fitoquímicos com potenciais antiproliferativos e antitumorais e podem exercer importantes papéis no que diz respeito à busca por novos fármacos anticâncer.

2.4 *Eplingiella fruticosa*

A subtribo Hyptidinae, família Lamiaceae, contém aproximadamente 400 espécies aceitas distribuídas em 19 gêneros, dentre os quais *Hyptis* e *Eplingiella* fazem parte (BRIDI; MEIRELLES; POSER, 2021). Pertencem a subtribo, ervas e arbustos com pequenas folhas xeromórficas e flores com pedicelos curtos distribuídos na América tropical (HARLEY, 2014; HARLEY; PASTORE, 2012).

As espécies Hyptidinae parecem promissoras como fontes alternativas de lignanas do tipo podofilotoxina, que são os principais compostos para a semissíntese de teniposídeo e etoposídeo, importantes agentes antineoplásicos (BRIDI; MEIRELLES; POSER, 2021; PICKING et al., 2013; PINHEIRO et al., 2015).

O gênero *Eplingiella* surgiu de uma reclassificação taxonômica de algumas espécies de *Hyptis*: *Eplingiella brightoniae*, *Eplingiella cuniloides* e *Eplingiella fruticosa* são as espécies antigamente contidas em *Hyptis* e revisadas para o gênero *Eplingiella* (HARLEY, 2014, SILVA, 2017).

A *E. fruticosa* (como basônimo: *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth.), popularmente conhecida como 'alecrim de tabuleiro', é amplamente distribuída na região nordeste do Brasil (SILVA et al., 2017)(Figura 4). A infusão de suas folhas é utilizada pela população local para tratamento de dores em geral, distúrbios gastrointestinais, infecções de pele, processos inflamatórios como cicatrização de feridas, congestão nasal, cólicas, febres e bronquites (COSTA, 2013; MENEZES et al., 2007; SILVA et al., 2006). Frutos e folhas também são citados no tratamento de gripes, resfriados e asma (AGRA et al., 2008).

Apesar de sua finalidade terapêutica no conhecimento popular, assim como o gênero *Hyptis*, há poucos trabalhos na literatura que explorem suas atividades biológicas e análise fitoquímica de seus extratos e frações. Ainda, a literatura sobre a sua bioatividade, especialmente anticancerígena, é escassa. Estudos anteriores mostraram que seus extratos possuem propriedade antinociceptiva (SILVA et al., 2006), vasorrelaxante (MOREIRA et al., 2010), anti-inflamatória (ANDRADE et al., 2010), antioxidante (LIMA et al., 2013), antimicrobiana (SANTOS, 2016) e antitumoral (LIMA et al., 2020).

Os OEs da *E. fruticosa* apresentam atividade formicida (SILVA et al., 2019); larvicida (SILVA et al., 2008), analgésica (SILVA et al., 2006), tripanocida e imunomoduladora (SOUZA, 2017); neuroprotetora (BESERRA-FILHO et al., 2019), antinociceptiva (FRANCO et al., 2011a; MENEZES et al., 2007), antimicrobiana (SANTOS, 2016) e efeito anti-hiperalgésico (MELO et al., 2020). Tais atividades estão associadas à diversidade de compostos presentes nos OEs.

A fitoquímica dos OEs de quatro genótipos de *E. fruticosa* foi identificada e os compostos presentes nos genótipos EFRU01 e EFRU02 consistiram em mais de 40% de monoterpenos cada, sendo 1,8-cineol e cânfora os compostos majoritários, respectivamente. Os genótipos EFRU03 e EFRU04 consistiram em 80,5% e 84,7% de sesquiterpenos, respectivamente, com β -cariofileno e óxido de cariofileno como compostos principais (SILVA, D. et al., 2019).

Em síntese, a literatura comumente apresenta o 1,8-cineol, cânfora, β -cariofileno, óxido de cariofileno, biclogermacreno, E-cariofileno, α -pineno, β -pineno e espatulenol como os principais compostos presentes nos OEs de *E. fruticosa* (ALVES et al., 2006; BESERRA-

FILHO et al., 2019; FRANCO et al., 2011a, 2011b; MELO et al., 2020; MENEZES et al., 2007; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2019) (BOUKHATEM et al., 2020).

Quanto à composição química de extratos e frações da *E. fruticosa*, os estudos ainda são incipientes. Ainda, análises de identificação fitoquímica por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta ou espectrometria de massa (CLAE/UV e CLAE/EM, respectivamente) não estão disponíveis na literatura, apenas de seus óleos essenciais. No geral, os estudos qualitativos de extratos dessa planta apontam que eles são ricos em flavonoides (ABEDINI et al., 2013), monoterpenos e sesquiterpenos (SOUZA, 2017).

Informações acerca da atividade biológica e dos constituintes químicos dos OEs de diferentes partes da *E. fruticosa* podem ser vistas no Quadro 3.

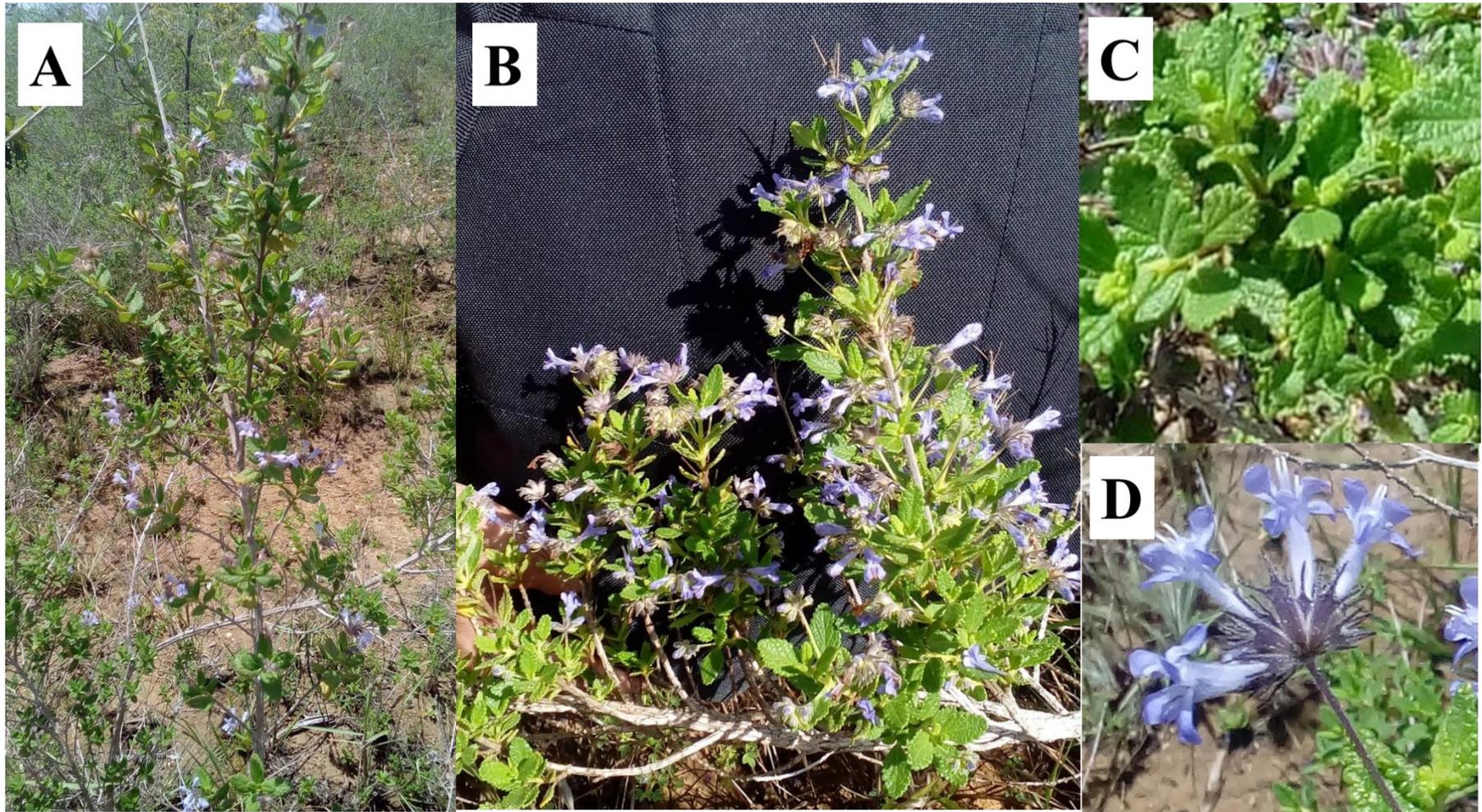


Figura 4 - Espécime de *Eplingiella fruticosa*, um arbusto alto, de coloração verde-musgo, com flores azul-lilás. A) arbusto inteiro, B) folhas e flores distribuídas pelos ramos, C) folhas, D) flores. Fonte: Souza (2023).

Quadro 3 - Estudos que descrevem efeitos biológicos de óleos essenciais de *Eplingiella fruticosa* e seus compostos majoritários

Preparação	Constituintes majoritários	Propriedades biológicas	Referências
Óleo essencial de quatro genótipos	EPF303: cânfora (11.4%) e 1,8-cineol (9%); EPF1103 : cânfora (9.3 %) e 1,8-cineol (15.5 %); EPF202: óxido de cariofileno (8.7 %) e β -cariofileno (10.9 %) e EPF901:óxido de cariofileno (8.0%) e β -cariofileno (13%)	formicida	Silva et al. (2019)
Óleo essencial	trans-cariofileno (15,24%), biciclogermacreno (7,33%) e cis-calameneno (7,15%).	tripanocida, citotóxica e imunomoduladora	Souza (2017)
Óleo essencial	a-pineno (11,32%), 1,8-cineol (16,86%), biciclogermacreno (12,32%) e b-cariofileno (8,82%).	analgésico	Alves et al. (2006)
Óleo essencial	Flores: α -pineno (5,27-20,51%) e β -pineno (6,59–13,64%); folhas; 1,8-cineol (4,75-18,70%)	antinociceptiva	Franco et al. (2011a)

Óleo essencial	Bicyclogermacrene (12.32%), 1,8-cineole (16.86%), α -pinene (11.32%), and β -caryophyllene (8.82%)	antinociceptiva	Menezes et al. (2007)
Óleo essencial	1,8-cineol (15.79%), espatulenol (10.23%), β -cariofileno (9.79%), biciclogermacreno (8.57%) e cânfora (8.12%)	Larvicida	Silva et al. (2008)
Óleo complexado com β -ciclodextrina	β -cariofileno (14,78), biciclogermacreno (14,15), 1,8-cineol (12,09), α -pineno (5,74) e β -pineno (4.47)	neuroprotetora e antioxidante	Beserra-filho et al. (2019)
Óleo complexado com β -ciclodextrin	(E) –cariofileno (14.16%), biciclogermacreno (12.68%), 1,8-cineol (11.03%), α -pineno(6.79%), β -pineno (5.10%)	efeito anti-hiperalgésico	Melo et al. (2020)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e a toxicidade do óleo essencial das folhas da *E. fruticosa*.

3.2 Específicos

- Identificar os constituintes químicos bioativos do óleo essencial das folhas da *E. fruticosa*;
- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial das folhas da *E. fruticosa* frente a linhagens de células tumorais humanas;
- Avaliar o efeito do óleo essencial das folhas da *E. fruticosa* sobre o crescimento tumoral de camundongos transplantados com tumor S180;
- Verificar o efeito do óleo essencial das folhas da *E. fruticosa* sobre aspectos toxicológicos em camundongos transplantados com tumor S180.

4 MÉTODO

4.1 Coleta e identificação da *E. fruticosa*

A coleta das folhas da *E. fruticosa* foi realizada no povoado Feijão, município de São Cristóvão, Sergipe (Figura 5). As amostras foliares foram acondicionadas em sacos de plástico, transportadas até o laboratório; um espécime coletado foi direcionado ao Herbário da UFS localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe para depósito, identificação e registro do número ASE 39257. Além disso, foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) A6AC079.



Figura 5 - População natural de *Eplingiella fruticosa* localizada no município de São Cristóvão, Sergipe, 12°06'S; 41°58'O. Fonte: Souza (2023).

4.2 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial de *E. fruticosa* (OEEF) foi feita de acordo com Melo et al. (2020), com adaptações. Para isto, 760 g de folhas em 3 L de água deionizada foram processadas por 3 h no aparato de clewenger, sob uma temperatura de 45 °C. O óleo foi separado por densidade e armazenado a -4°C em um frasco de vidro hermeticamente fechado sob proteção da luz até a realização da análise da composição química e demais experimentos. O rendimento

do conteúdo foi calculado com base no peso seco do material da planta e expresso por meio da relação volume de óleo obtido (mL)/peso de material vegetal fresco (Kg).

4.3 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Narendra Narain, coordenador do Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas da UFS. A análise do óleo essencial foi realizada por meio do cromatógrafo a gás (7820A, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) acoplado a espectrômetro de massa (5975C, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada HP-5MS (0,25 µm de espessura de filme); hélio (99.999%) como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL/min⁻¹; a temperatura do injetor foi de 280 °C e o volume da amostra injetada foi de 1 µL no modo Split (10:1); a temperatura foi programada mantendo 60 °C por 4 min, seguindo de um aumento de 3 °C/min⁻¹ até atingir 220 °C, depois a 20 °C/min⁻¹ até atingir 280 °C; a temperatura do detector (ou interface) de 285 °C, e a ionização realizada com impacto de 70 eV com varredura de 40 a 550m/z.

A identificação do OEEF foi feita com base no índice de retenção experimental (IR) calculado com referência à série padrão *de n -alcenos* ($C_7 - C_{30}$), e os tempos de retenção (TR) relatados na literatura sob condições semelhantes experimentais de cromatografia gasosa (CG). Além disso, a identificação dos compostos foi realizada com base em seu tempo de retenção e comparações com as bibliotecas espectrais de massa (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, NIST-Web Book e NIST- MS Search v.2.2). As porcentagens relativas dos constituintes foram calculadas a partir da área sob o pico obtido do cromatograma de detector de ionização por chama (CG/DIC) (MOHAMMED et al., 2021).

4.4 Estudo citotóxico da *E. fruticosa*

A citotoxicidade do OEEF foi observada por meio do teste de viabilidade frente a quatro linhagens de células tumorais, cedidas pelo instituto nacional do câncer (EUA): HCT-116, PC-3, Leucemia promielocítica (HL-60) e Glioblastoma (SNB-19). A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) a formazan. De acordo com esse ensaio, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células, mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) em garrafas de cultura celular em estufa com

atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, foram plaqueadas (100 µL/poço) nas concentrações de 0,7 x 10⁵ células/mL (HCT-116), 0,3 x 10⁶ células/mL (HL-60) e 0,1 x 10⁶ células/mL (SNB-19 e PC-3) em placa com 96 poços, incubada por 24h. O OEEF foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e testado inicialmente na concentração única de 20 µg/mL em triplicata. As placas foram incubadas por 72h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C.

No final da incubação, as placas foram centrifugadas (15 g/15 min) a 4°C e os sobrenadantes removidos. Foram adicionados 100 µL da solução de MTT a cada poço (0,5 mg/mL) e as placas foram incubadas por 3h. Após esse intervalo, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min) a 4°C, os sobrenadantes descartados e os precipitados ressuspensos em 100 µL de DMSO. A absorbância foi lida usando leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc., Packard, ON, Canadá) a 595 nm para quantificação de formazan. Todos os valores foram convertidos para percentual de inibição de proliferação celular (% IPC) de acordo com a equação:

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

em que:

T = absorbância da amostra

CN = absorbância do controle negativo (DMSO).

O OEEF também foi analisado pelo teste de MTT para determinar a concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo. À vista disso, realizou-se diluições seriadas a partir das concentrações de 4,5 µg/mL.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da % IPC. A determinação da CI₅₀ foi realizada a partir de regressão não linear e intervalo de confiança (IC 95%), a partir dos valores de absorbâncias. As amostras teste foram avaliadas em três repetições, e as análises foram elaboradas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.1.

4.5 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

4.5.1 Animais

Para avaliação da atividade antitumoral do OEEF foram utilizados camundongos machos *Swiss (Mus musculus)* com 6 a 8 semanas de vida e massa corporal de 25 – 35 g, requeridos do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da UFS. Os animais foram selecionados aleatoriamente e mantidos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Dor,

no Departamento de Fisiologia/UFS, sob temperatura controlada ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro escuro de 12h (luzes acesas das 6:00 às 18:00h), livre acesso à alimentação e água. Foram alojados dentro de gaiolas para roedores (30,0 cm de comprimento, 19,0 cm largura e 13,0 cm altura) com grades metálicas apropriada em pequenos grupos de 05 camundongos do mesmo sexo (QI et al., 2018). Os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFS, nº de protocolo: 1610191119.

A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios foram minimizados. Os animais que mostraram sinais intensos e persistentes de dor e sofrimento em decorrência do tumor ou por qualquer outro motivo (reação anormal à manipulação, movimentos anormais ou relutância em mover-se, feridas abertas ou ulceração da pele, dificuldades na respiração, alteração do aspecto externo ou grave sangramento) foram eutanasiados, seguindo os princípios éticos de experimentação animal da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.5.2 Obtenção e manutenção das células do tumor S180

Para o estudo da atividade antitumoral *in vivo* foi utilizado o tumor experimental transplantável chamado de tumor S180 ou tumor de Crocker. As células do tumor S180 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas na sua forma ascítica na cavidade abdominal de camundongos. Para tanto, os camundongos com tumor ascítico (animais da manutenção do tumor) foram previamente anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical. Após a desinfecção e incisão do abdome as ascites foram extraídas. Foi feita uma suspensão de células com 0,5 mL do tumor ascítico, 5 mL de ringer lactato e 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL). Uma alíquota de 50 μL de Azul de tripan foi adicionada a 50 μL da suspensão das ascites para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. As células inviáveis coram de azul e as viáveis ficam sem coloração. Aproximadamente 0,5 mL da suspensão das ascites (4×10^6 células) foi inoculada nos camundongos por via intraperitoneal.

A transferência das células tumorais acíticas do animal da manutenção com tumor para os animais da manutenção sem tumor foi feita a cada 15 dias, sacrificando o animal doador das células tumorais e mantendo o animal receptor dessas células vivas. De acordo com as etapas descritas anteriormente.

4.5.3 Planejamento experimental

Os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram divididos em seis grupos (n=11) conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos de animais para avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

Grupos	Dose (mg/kg/dia)	Tumor (S180)	n
VEI	-	Não	11
CTRL	-	4 x 10 ⁶ céls/ 0,5 mL	11
OEEF	25	4 x 10 ⁶ céls/ 0,5 mL	11
OEEF	50	4 x 10 ⁶ céls/ 0,5 mL	11
OEEF	100	4 x 10 ⁶ céls/ 0,5 mL	11
5-FU	25	4 x 10 ⁶ céls/ 0,5 mL	11
TOTAL	-	-	66

VEI: grupo de animais saudáveis. CTRL: grupo de animais com tumor. OEEF: grupos tratados com o óleo essencial das folhas da *Eplingiella fruticosa*. 5-FU: grupo tratado com 5-Fluorouracil. S180: Sarcoma 180. n= número de animais por grupo.

4.5.4 Determinação do efeito antitumoral

A ação antitumoral *in vivo* do OEEF sobre o crescimento tumoral S180 seguiu o protocolo previamente descrito por Amaral et al. (2015). Os animais foram previamente anestesiados com Ketamina e Xilazina. Sob o efeito do anestésico, foram inoculados 0,5 mL de células do S180 (4 x 10⁶/ mL) de 10 dias de idade nos camundongos, por via subcutânea, na região axilar dianteira esquerda do animal e no grupo veículo de animais saudáveis (VEI), 0,5 mL de solução de Ringer (cloreto de sódio + cloreto de potássio + cloreto de cálcio di-hidratado).

Após 24h da inoculação, iniciou-se os tratamentos (amostras diluídas em DMSO a 5%) via intraperitoneal (i.p.), durante sete dias consecutivos. No 8º dia da inoculação do tumor, os animais foram submetidos à anestesia transitória com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela). Sob efeito anestésico, realizou-se a coleta de sangue da região orbicular do olho com auxílio de cânula heparinizada. O sangue foi acondicionado para a análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos (MOURA et al., 2016; XAVIER et al., 2015).

Seguidamente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo o tumor, baço, cérebro, coração, estômago, fígado e rins retirados, pesados e armazenados em formol 10% (AMARAL et al., 2015; ANDRADE et al., 2016a; DÓRIA et al., 2016). O percentual de inibição do crescimento tumoral (% IT) foi calculado pela fórmula, conforme WANG et al. (2006):

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

em que:

% IT = Percentual de inibição de crescimento tumoral

A = média da massa do tumor no grupo controle negativo

B = média da massa do tumor nos animais tratados.

O descarte biológico seguiu conforme legislação vigente. As carcaças dos animais foram identificadas como material infectante e direcionadas ao Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia/UFS até o dia da coleta seletiva de lixo biológico.

4.5.5 Avaliação dos parâmetros toxicológicos

A variação de peso corporal, a alteração dos pesos dos órgãos e as análises hematológicas e bioquímicas foram determinadas para a avaliação antitumoral, conforme descrito anteriormente por Moura et al. (2016).

4.5.5.1 Determinação da massa corporal

Todos os dias os animais eram pesados. A massa corporal dos animais foi analisada quanto à sua variação do primeiro dia (dia da inoculação) até o penúltimo dia (último dia do tratamento), diminuindo o valor da massa do tumor; conforme a fórmula:

$$\Delta m = (m - m_0) - m_t$$

em que:

Δm = variação da massa corporal

m_f = massa corporal final

m_0 = massa corporal inicial

m_t = massa do tumor

As massas corporais foram expressas pela média (g) \pm erro padrão da média (EPM).

4.5.5.2 Determinação da massa do tumor e dos órgãos

As massas dos órgãos foram aferidas em balança analítica de precisão e acondicionadas em frascos contendo formol a 10% para análise histológica posterior. As massas dos órgãos (baço, cérebro, coração, estômago, fígado e rins) foram convertidas na proporção de massa de órgão a cada 100 g de massa corporal do animal.

4.5.5.3 Análises hematológicas

A partir do sangue periférico coletado, avaliou-se os parâmetros hematológicos eritrocitários (hemácia, hemoglobina e hematócrito) e também, leucocitários totais e diferencial (eosinófilo, linfócitos, monócitos e neutrófilos). Para isso, 20 μL de sangue foi diluído em 380 μL de Turk; em seguida, 10 μL da suspensão foi colocado na câmara de Neubauer e contabilizado o teor de leucócitos totais. A contagem diferencial leucocitária de esfregaço sanguíneo corado com substâncias panóticas (Instant- Prov[®]) foi feita através de microscópio óptico a partir da contagem de 100 células leucocitárias.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos eritrocitários (hemácia, hemoglobina e hematócrito), o sangue foi colocado em tubo contendo o anticoagulante EDTA para avaliação em analisador automatizado (BC5380, Mindray).

4.5.5.4 Análises bioquímicas

Para a avaliação do funcionamento hepático, foram dosados alanina aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST); e para análise do funcionamento renal foram dosados os níveis de ureia e creatinina. As amostras foram submetidas à centrifugação 3500 rpm/10 min a 25°C para a obtenção do soro. O procedimento dos exames foi realizado seguindo as metodologias descritas pelo fabricante dos kits da biotécnica.

4.5.5.5 Análises histopatológicas

Depois de pesados e fixados em 10% de formaldeído, tumores, baços, corações e fígados foram desidratados em álcool, diafanizados em xileno, embebidos em parafina, cortados em pequenos pedaços. Posteriormente, cortes histológicos de 5 μm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina. Posteriormente à confecção das lâminas, as análises histológicas foram realizadas por microscopia óptica. As lâminas foram avaliadas qualitativamente em cada grupo estudado (n= 3) que apresentou uma alteração na média da massa, para examinar possíveis alterações histológicas.

A gradação histológica do percentual de necrose coagulativa em relação ao tecido tumoral foi realizada pelo sistema semiquantitativo proposto por Hew et al. (1994), categorizado em Grau 1 (< 50% de necrose), grau 2 (50-80% de necrose) e grau 3 (> 80% de necrose). Cada pontuação em cada caso foi estimada a partir da análise dos dois cortes histológicos obtidos de cada tumor. Para cada secção, foram selecionados 05 campos histológicos por casualização sistemática (ampliação de 100x). Nesse sistema, para cada campo selecionado, seguiram-se dois campos desprezados até que o total de campos fosse atingido. Cada campo recebeu um escore, e depois foi determinada a média de cada grupo, somando-se os escores pontuados e dividindo o resultado pelo número de campos avaliados.

Para determinar o índice mitótico, 10 campos histológicos (ampliação de 400x) foram selecionados por randomização sistemática (para cada campo selecionado, seguiram-se dois campos descartados) até que o total de 10 campos fosse devidamente selecionado. As figuras mitóticas foram contadas para determinar o número médio de mitoses por caso e depois por grupo. A identificação das figuras mitóticas típicas e atípicas foi realizada de acordo com os critérios morfológicos descritos por Lashen et al. (2022).

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão da média, tratados estatisticamente e as diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Para todos os procedimentos foi utilizado o GraphPad Prisma versão 6.0 (GraphPad, Software, San Diego, CA., E.U.A.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do óleo essencial

Ao todo foram coletados 10,6 kg de amostras foliares da *E. fruticosa*. O rendimento das extrações do OEEF foi de 1,8 mL/kg de folhas frescas, com média de 1,4 mL de óleo/extração, sendo realizadas 14 extrações. No geral, houve um rendimento total de 0,162% de óleo. O OEEF apresentou uma alta fluidez, aparência líquida límpida e incolor, com odor fresco e aromático e sua densidade simples foi de $0,864 \pm 0,002$ g/mL. Alguns estudos observaram o rendimento de OEs das folhas da *E. fruticosa* e os valores observados foram de 0,741% por Melo et al. (2020); 1,1% por Alves et al. (2006); 2,0%, por Silva et al. (2008); 0,46% por Franco et al. (2011b) além de 0,11% (flores) e 0,25% (sementes).

É importante trabalhos acadêmicos descreverem o rendimento das amostras obtidas com fins de esclarecer ou trazer mais exatidão no que diz respeito a quantidade de material necessário a ser utilizado, até mesmo para fins de exploração mais consciente do material vegetal; principalmente considerando, a *E. fruticosa*, uma planta com característica xeromórficas, adaptadas a ambientes com condições extremas de nutrientes e água, cujas folhas são bastante necessárias à população local para fins medicinais.

5.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo

Realizou-se o perfil fitoquímico dos metabólitos secundários do OEEF usado neste estudo com base em uma análise de CG/EM que mostrou sua composição. A análise identificou 80 compostos, a maioria sesquiterpenos e monoterpênicos. Dentre eles, 21 compostos foram considerados componentes majoritários: 1,8-cineol (17,07%), Cânfora (9,36%), β -Cariofileno (8,96%), α -pineno (6,97%), β -pineno (4,72%), δ -Eiemene (4,62%), Espatuleno (3,60%), Bicyclogermacreno (3,14%), Borneol (2,97%), α -Copaene (2,88%), viridifloreno (2,43%), α -Cubebene (2,10%), cis-murola-3,5-dieno (1,95%), α -Cadineno (1,85%), α -Cariofileno (1,68%), Calameneno (1,65%), δ -Cadineno (1,58%), Cubeneno (1,36%), D-Germacreno (1,30%), γ -Muuroleno (1,25%), α -Cadinol (1,04). Esses e outros compostos em menor preparação, seus índices de retenção e composição percentual estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF) obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM-DIC)

Compostos	TR	IR ^a	IRlit	OEEF (%)
(E)-2-Hexenal	4.77	849	848	0.01 ± 0.00
(Z)-3-Hexen-1-ol	4.81	851	851	0.02 ± 0.00
α-pineno	6.79	932	931	6.97 ± 0.17
Canfeno	7.30	948	949	0.18 ± 0.01
β-pineno	8.22	977	976	4.72 ± 0.14
1-Octen-3-ol	8.33	980	980	0.17 ± 0.01
β-Mirceno	8.61	989	989	0.10 ± 0.00
α-Felandreno	9.24	1007	1007	0.08 ± 0.00
3-δ-Careno	9.31	1008	1008	0.10 ± 0.01
1,8-Cineol	10.3	1033	1032	17.07 ± 0.70
γ-Terpineno	11.28	1057	1056	0.82 ± 0.04
hidrato de trans -sabineno	11.81	1070	1070	0.08 ± 0.00
α-Terpinoleno	12.14	1078	1084	0.30 ± 0.01
p - Cimeneno	12.63	1090	1090	0.41 ± 0.01
β-Linalol	13.11	1101	1092	0.61 ± 0.01
(4E,6E)-Alocimeno	14.14	1124	1123	0.22 ± 0.01
Cânfora	15.16	1147	1146	9.36 ± 0.10
Borneol	16.26	1172	1171	2.97 ± 0.06
4-Terpineol	16.6	1180	1195	0.74 ± 0.01
α-Terpineol	17.28	1195	1195	0.44 ± 0.01
Formato de Bornil	17.65	1200	1199	0.12 ± 0.01
3-5 - Dimetoxi Tolueno	20.39	1264	1264	0.07 ± 0.00
Acetato de Bornila	21.13	1281	1281	0.17 ± 0.01
Panaxeno	22.71	1318	1314	0.65 ± 0.02
δ-EIemene	23.18	1328	1329	4.62 ± 0.08
α-Cubebene	23.84	1344	1345	2.10 ± 0.05
Ciclosativeno	24.73	1364	1363	0.11 ± 0.00
α-Copaene	25.06	1372	1372	2.88 ± 0.08
β-Bourbonene	25.35	1379	1379	0.43 ± 0.01
β-Cubebene	25.57	1384	1384	0.96 ± 0.04
β-Elemeno	25.67	1386	1386	0.64 ± 0.03
Cipereno	26.3	1401	1399	0.19 ± 0.02
α-Gurjunene	26.59	1408	1408	0.23 ± 0.01
β-Cariofileno	26.91	1416	1416	8.96 ± 0.22
β-Copaeno	27.28	1425	1426	0.79 ± 0.03
Aromandendreno	27.61	1433	1436	0.44 ± 0.01
1,1,7,7a-Tetrametil-1a,2,6,7,7a,7				
b-Hexahidro-1H-				
ciclopropa[a]naftaleno	27.75	1436	1440	0.15 ± 0.01
(-)-Isogermacreno D	27.87	1439	1445	0.56 ± 0.01
cis-murola-3,5-dieno	28.09	1444	1444	1.95 ± 0.03
α- Cariofileno	28.34	1450	1450	1.68 ± 0.04

Óxido de Aloaromadendreno	28.49	1454	1454	0.39 ± 0.01
Cis-Muuro-la-4(15),5-Dieno	28.61	1457	1455	0.52 ± 0.01
Cadina-1(6),4-dieno	29.05	1467	1463	0.30 ± 0.00
γ-Muuroleño	29.16	1470	1469	1.25 ± 0.02
D-Germacreño	29.41	1476	1476	1.30 ± 0.03
β-Guaieno	29.57	1480	1478	0.06 ± 0.00
β-Selineno	29.68	1483	1481	0.15 ± 0.01
Viridifloreño	29.81	1486	1487	2.43 ± 0.10
Biclogermacreño	30.02	1491	1491	3.14 ± 0.01
α-Muuroleño	30.16	1494	1494	0.70 ± 0.01
(Z)-α-Bisaboleno	30.31	1498	1498	0.29 ± 0.00
Cupareño	30.5	1503	1502	0.07 ± 0.00
β-Bisaboleno	30.6	1505	1500	0.06 ± 0.00
γ-Cadineno	30.71	1508	1507	0.21 ± 0.00
β-Cadineno	30.84	1511	1508	0.43 ± 0.02
δ-Cadineno	30.97	1515	1515	1.58 ± 0.03
Calameneno	31.10	1518	1518	1.65 ± 0.03
Cubeneno	31.49	1528	1529	1.36 ± 0.03
α-Cadineno	31.67	1533	1534	1.85 ± 0.10
α-Calacoreño	31.82	1536	1538	0.08 ± 0.01
Elemol	32.17	1545	1547	0.13 ± 0.00
β-Calacoreño	32.63	1557	1566	0.12 ± 0.01
β-Vatireneo	32.9	1564	1563	0.20 ± 0.01
Espatuleno	33.25	1573	1574	3.60 ± 0.19
β-Epóxido de cariofileño	33.39	1577	1576	0.91 ± 0.07
β-Copaen-4α-ol	33.65	1583	1584	0.39 ± 0.01
Epi-cubenol	34.68	1610	1610	0.19 ± 0.00
Cubenol	35.17	1623	1623	0.56 ± 0.00
τ-Cadinol	35.71	1638	1634	0.49 ± 0.02
α-Cadinol	36.22	1651	1652	1.04 ± 0.02
Óxido de Aromadendreno-(1)	36.68	1664	1672	0.18 ± 0.00
Valerenol	36.97	1671	1699	0.30 ± 0.00
Zizanal	37.21	1678	1680	0.27 ± 0.01
Ylangenal	37.45	1684	1675	0.11 ± 0.00
Selin-7(11)-en-4-ol	37.71	1691	1692	0.19 ± 0.01
Óxido de Manol	48.24	2001	2003	0.23 ± 0.01
Kaur-16-ene	49.09	2029	2031	0.06 ± 0.00
Esclareol	55.01	2227	2220	0.09 ± 0.00

Identificado pelo NIST Web Book e/ou NIST MS Search v2.2; TR: tempo de retenção (minutos); IRa: Índice de retenção calculado (calculado a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos (C7-C30) em uma coluna capilar HP-5MS de 30m); IRb: Índice de retenção da Literatura (webbook.nist.gov); (%): porcentagem do componente.

Semelhanças quanto aos compostos majoritários encontrados neste trabalho relacionados aos OEs da *E. fruticosa* podem ser vistos no trabalho de Melo et al. (2020), com presença majoritária de biciclogermacreno (12,68%), 1,8-cineol (11,03%), α -pineno (6,79%) e β -pineno (5,10%) dentre os vinte e seis compostos identificados. De acordo com os autores, os sesquiterpenos representaram o grupo principal (65,7%), seguidos pelos monoterpenos (33,23%).

Da mesma maneira, Franco et al. (2011a) encontraram dentre os componentes majoritários de seis amostras de óleos essenciais extraídos de folhas, flores e sementes de diferentes plantas da *E. fruticosa*: 1,8-cineol (6,10-25,55%); α -pineno (4,52-21,21%); β -pineno (4,76-14,25%), Cânfora (2,13-7,40%), além de outros constituintes principais, por exemplo, β -cariofileno (4,77-8,79%) e biciclogermacreno (1,93-9,30%). Os sesquiterpenos representaram o grupo principal, seguidos pelos monoterpenos.

Alves et al. (2006), por sua vez, identificaram a presença de 29 componentes no óleo essencial das folhas da *E. fruticosa*. Dentre os compostos mais abundantes identificados estavam o α -pineno (11,32%) e 1,8-cineol (16,86%), Assemelhando-se ainda com os constituintes identificados nesse estudo, Menezes et al. (2007) caracterizaram no OE das folhas de *E. fruticosa* Bicyclogermacreno (12.32%), 1,8-cineol (16.86%), α -pineno (11.32%) e β -cariofileno (8.82%).

Silva et al. (2008) reconheceram 59 compostos a partir do óleo essencial das folhas de *E. fruticosa*, dentre os majoritários 1,8-cineol (15,79%), espatulenol (10,23%), β -cariofileno (9,79%), biciclogermacreno (8,57%) e cânfora (8,12%).

Em síntese, a literatura comumente apresenta o 1,8-cineol, cânfora, β -cariofileno, óxido de cariofileno, biciclogermacreno, E-cariofileno, α -pineno, β -pineno e espatulenol como os principais compostos presentes nos OEs de *E. fruticosa*, resultados que se assemelham aos deste estudo quanto aos constituintes verificados. Vale ressaltar que parte deles já foram evidenciados na literatura por seus efeitos antiproliferativos e antitumorais.

O 1,8-cineol ou Eucaliptol, um óxido terpenoide, além de seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em várias doenças parece ser um agente anticancerígeno promissor com atividades anti-metastáticas e antiproliferativas (BOUKHATEM et al., 2020). Sabe-se que a inflamação é um componente sério do crescimento e progressão do câncer. As células inflamatórias presentes no MAT têm participação efetiva no processo neoplásico, promovendo proliferação, sobrevivência e migração (ANDERSON, 2020; BRAUMÜLLER et al., 2022).

A cânfora, um importante monoterpenóide, tem sido usada como material de partida para síntese de compostos derivados com propriedades biológicas diversas e, inclusive, anticâncer. Alguns novos derivados de pirimidina à base de cânfora apresentaram atividade inibitória interessante contra três linhas celulares malignas humanas: A549, MDA-MB-231 e mieloma múltiplo (RPMI-8226) (ZHANG et al., 2019).

O β -cariofileno (BCP) é um sesquiterpeno encontrado nos vegetais e está presente nos óleos essenciais de muitas plantas, inclusive da família Lamiaceae (FIDYT et al., 2016). Isoladamente ou como componente de OEs de plantas, o BCP demonstrou apresentar propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias (DAHAM et al., 2015).

O α - e β -pineno estão entre os representantes mais conhecidos de uma ampla família de monoterpenos. Esses dois fitoquímicos apresentam diversas atividades biológicas, levando-os a diversas aplicações e usos. Além disso, descobriu-se que α e β -pineno têm efeitos inibitórios no câncer de mama e na leucemia (SALEHI et al., 2019).

5.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

A avaliação citotóxica *in vitro* foi realizada frente a quatro linhagens de células tumorais humanas, as mesmas consistiram em: HCT-116, PC-3, HL60 e SNB-19, em ordem da maior para menor incidência; os dois primeiros são câncer de alta incidência e os dois últimos de baixa ou rara (glioblastoma) incidência (GLOBOCAM, 2020). A partir dos dados apresentados na Tabela 3, verificou-se que o tratamento com o OEEF foi promissor contra todas as linhagens avaliadas, apresentando um % IPC acima de 89%.

Tabela 3 - Percentual de inibição do crescimento (% IPC) e desvio padrão (DP) do óleo essencial das folhas da *Eplingiella fruticosa* frente à quatro linhagens de células tumorais

Amostras/Linhagens	HCT-116	SNB-19	PC-3	HL-60
	% IPC \pm DP			
OEEF	89,3 \pm 3,2	90,1 \pm 0,6	90,3 \pm 1,6	94,8 \pm 1,2

HCT-116: Carcinoma de cólon; SNB-19: Glioblastoma; PC-3: Carcinoma de próstata e HL-60: Leucemia promielocítica. O óleo essencial da *Eplingiella fruticosa* (OEEF) foi testado na concentração de 4,5 μ g/mL.

Com base nos resultados de citotoxicidade de concentração única do OEEF acima apresentados, seguiu-se para o teste de CI₅₀, no qual avalia-se a concentração necessária para inibição de 50% do crescimento celular. Para tanto, os efeitos sobre três linhagens celulares de câncer humano, HCT-116, SNB-19 e PC-3, foram avaliados.

Os resultados exibidos na Tabela 4 indicaram que o OEEF tem um efeito altamente citotóxico nas linhagens de células testadas em intervalos de confiança (ICs) extremamente baixos: Verificou-se menor viabilidade celular de HCT-116, seguidamente de PC-3 e SNB-19, diante da exposição das células ao OEEF. É possível que estes resultados se devam ao conteúdo de 1,8-cineol (17,07%), Cânfora (9,36%) e β -Cariofileno (8,96) já descritos por suas bioatividades terapêuticas, ou o conjunto de compostos presentes no óleo atuam de maneira sinérgica.

Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% do óleo essencial das folhas da *Eplingiella fruticosa* frente a três linhagens de células tumorais

Amostras	HCT-116	SNB-19	PC-3
Identificação	CI ₅₀ (IC) μ g/mL	CI ₅₀ (IC) μ g/mL	CI ₅₀ (IC) μ g/mL
OEEF	0,002 (0,017 - 0,04)	0,260 (0,219 - 0,308)	0,218 (0,189 - 0,252)

HCT-116: Carcinoma de cólon; SNB-19: Glioblastoma; PC-3: Carcinoma de próstata; IC: intervalo de confiança e OEEF: óleo essencial da *Eplingiella fruticosa*.

Alguns estudos de Lamiaceae sustentam essa relação estrutura-atividade anticancerígena. Por exemplo, os constituintes químicos do OE de *Lavandula officinalis* e atividades anticancerígenas contra linhagens celulares de câncer humano: PC-3, HCT-116 e outras foram investigadas. A partir da citotoxicidade, pelo método de MTT, verificou-se que a atividade antiproliferativa nessas linhagens celulares foi fraca na concentração de 100 μ g/mL com um % IPC de 32,1 em PC-3 e 35,6 em HCT-116 (FAHMY et al, 2022). Verificou-se, especialmente, a presença de linalol (38,59%), acetato de linalila (37,04%), triacetina (6,93%) e D-limoneno (5,22%), 1,8-cineol (3,29%) e cânfora (2,91%).

O OE de *Lavandula pedunculata* foi testado contra três linhagens de células de glioblastoma: U87 (glioblastoma semelhante ao cérebro), A172 (glioblastoma) e H4 (neuroglioma). Os valores de CI₅₀ obtidos foram de 0,6 μ L/mL para células U87, 0,7 μ L/mL para células A172 e 0,8 μ L/mL para células H4. Os autores associaram este efeito antiproliferativo *in vitro* à sua composição rica em cânfora (39%) e 1,8-cineol (10,9%) (MARQUES et al., 2023).

Os OEs das folhas de *Vitex agnus-castus* e *Ocimum campechianum* e de inflorescências frescas de *Ocimum carnosum* foram analisados. As células humanas de HL-60 foram sensíveis a todos os OEs testados pelo ensaio de MTT. Verificou-se o maior % IPC para o OE de *V. agnus-castus* com CI_{50} de 3,8 (1,7-8,2), provavelmente, por sua maior composição de 1,8-cineol (47,9%) (RICARTE et al., 2020).

O óleo essencial de *Lavandula stoechas* foi testado *in vitro* quanto ao seu potencial efeito inibidor do crescimento de células tumorais humanas: MDA-MB-231, AGS e MV3, usando o ensaio MTT. O LSEO apresentou um potente efeito antiproliferativo em células AGS com valor de CI_{50} de 0,035 $\mu\text{L/mL}$. Este potente efeito antitumoral *in vitro* também foi demonstrado nos ensaios de células MV3 e MDA-MB-231, com CI_{50} de 0,06 e 0,259 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. Os autores sugerem que a citotoxicidade pode ser decorrente do alto teor de eucaliptol (1,8-cineol), o composto majoritário presente no óleo (BOUKHATEM et al., 2020).

Investigou-se a composição e atividades biológicas hepatoprotetoras e anticancerígenas dos óleos essenciais de *Salvia officinalis* L. Os constituintes quimiotípicos nos OEs de ervas secas foram α -pineno, β -pineno, mirceno, 1,8-cineol e cânfora. Além de atividade hepatoprotetora *in vivo* (provavelmente pela presença de cânfora, segundo os autores), os OEs de *Salvia* apresentaram citotoxicidade moderada contra linhagens de células cancerígenas HepG-2, carcinoma cervical (HeLa) e MCF-7 (MOHAMMED et al., 2021).

O OE de *Meriandra dianthera* foi estudado, a cânfora (54,3%) foi o composto majoritário, seguido por 1,8-cineol (12,2%) e canfeno (10,4%). Demonstrou-se uma atividade citotóxica interessante do OE de *Meriandra* contra as linhagens de células cancerígenas, especialmente contra MCF-7 com CI_{50} de 83,6 a 91,2 $\mu\text{g/mL}$ (MOTHANA et al., 2019).

O Eucaliptol (13,902%) e β -pineno (11,230%) foram verificados dentre os constituintes majoritários no OE de *Salvia officinalis* L. o qual exibiu atividade antiproliferativa *in vitro* frente ao melanoma humano A375 e ao melanoma de camundongo B164A5 (ALEXA et al., 2018).

É provável que a atividade antiproliferativa da *E. fruticosa* seja em decorrência do 1,8-cineol, composto majoritário neste estudo. Apesar de evidências que induzem a concepção desse achado, como por exemplo, o fato de este composto isolado mostrar capacidade antiproliferativa contra linhagens cancerígenas (GREINER et al., 2013), faz-se necessárias mais investigações, sobretudo com relação ao composto isolado. Na verdade, os fitoquímicos armazenados na planta podem atuar de forma sinérgica para obter um efeito biológico final (CATANZARO et al., 2018).

5.4 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada em camundongos (n=11) que tiveram o S180 transplantado e tratados com o OEEF nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia durante sete dias, com base em estudos anteriores (AMARAL et al., 2015; MOURA et al., 2016; XAVIER et al., 2015). A análise dos tumores revelou que as menores doses testadas do OEEF reduziram significativamente a massa do tumor em relação ao grupo CTRL com 91,2% e 87,7% de inibição tumoral nos grupos tratados com 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente (Figura 6). O 5-FU, droga padrão utilizada neste estudo, na dose de 25 mg/kg/dia apresentou uma inibição de 93,4% em relação ao grupo CTRL e os grupos OEEF25 e OEEF50 foram semelhantes a ele na estatística. Entretanto, o grupo tratado com o OEEF100 foi estatisticamente igual ao grupo CTRL e, diferente dos demais, apresentando inibição tumoral de apenas 13%.

Verifica-se, neste trabalho, que a redução foi significativa nos tumores nas menores doses avaliadas do OEEF quando comparadas com o controle. Isso reflete em resultados excelentes de inibição de células tumorais, pois altas doses de quimioterápicos, em geral, estão associadas a efeitos colaterais e toxicidade, além da possibilidade de redução da eficácia. Vale ressaltar que esses, são alguns dos fatores limitantes na terapêutica contra o câncer o que torna este estudo promissor no tratamento da doença. É possível, que a dose de 100 mg/kg/dia do OEEF seja tóxica aos animais, e assim impeça ou diminua as tentativas de restabelecer os mecanismos de defesa na batalha contra as células malignas presentes no MAT. De fato, verificou-se que o OEEF ocasionou uma diminuição na massa corporal dos animais, linfocitose e trombocitopenia (ver próximas seções).

Os efeitos de óleos essenciais e extratos de espécies da família Lamiaceae no modelo experimental de S180 *in vivo* e *in vitro* são escassos. Assim, esta discussão também aborda o efeito antitumoral de espécies de outras famílias botânicas frente às células de S180. Observa-se a partir das referências acessadas, que a maior parte das pesquisas apresentaram os maiores efeitos inibitórios contra células tumorais nas maiores doses testadas.

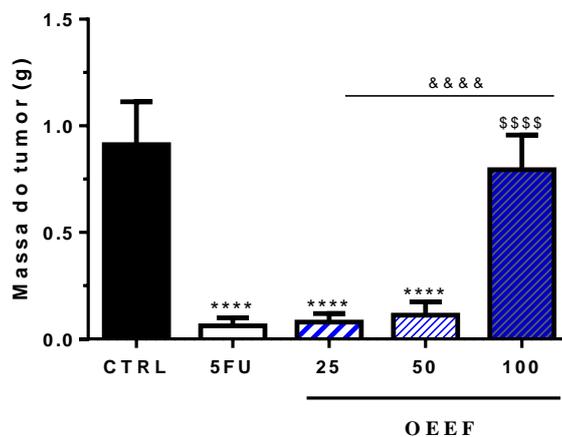


Figura 6 - Média da massa (g) de tumores removidos de animais com Sarcoma 180 tratados com óleo essencial das folhas da *E. fruticosa* (OEEF), (doses em mg/kg/dia, i.p.)

CTRL: controle tratado com Tween80 em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. ****p<0,0001; quando comparado ao CTRL. \$\$\$\$ p<0,0001; quando comparado ao 5-FU. &&&& p<0,0001; quando comparado intragrupo.

Ferraz et al. (2013) investigaram a composição química bem como, a atividade antitumoral *in vivo* do OE de folhas de *Xylopiya frutescens* (Annonaceae) em camundongos portadores de S180. O tratamento nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, durante sete dias por via intraperitoneal, inibiu o crescimento do tumor em 31,0 % e 37,5 %, respectivamente. O 5-FU (25 mg/kg/dia) apresentou uma inibição de 62,3%. Os autores concluíram que OE de *X. Frutescens* possui alguma atividade anticancerígena interessante. Os principais compostos identificados foram (E)-cariofileno (31,48%), biciclogermacreno (15,13%), D-germacreno (9,66%), δ -cadineno (5,44%), viridifloreno (5,09%) e α -copaeno (4,35%).

Xavier et al. (2015) demonstraram que o OE das folhas de *Lippia microphylla* (Verbenaceae), após sete dias de tratamento por via intraperitoneal, conseguiu inibir o crescimento do S180 em 38% e 60%, nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. Enquanto o 5-FU (50 mg/kg) causou 86% de inibição. De acordo com os autores, o OE tem atividade antitumoral *in vivo* significativa Os principais constituintes do óleo foram timol (46,5%), carvacrol (31,7%), p-cimeno (9%) e γ -terpineno (2,9%).

Moura et al. (2016) demonstraram que OE das folhas de *Xylopiya langsdorffiana* (Annonaceae), após sete dias de tratamento por via intraperitoneal, conseguiu inibir o crescimento do S180 em 38% e 54%, nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. O 5-FU (25 mg/kg/dia) apresentou uma inibição de 70,16%. Os pesquisadores concluíram que

houve uma redução significativa no peso do tumor em ambos os grupos, em comparação com o grupo controle do tumor. Os principais componentes do OE foram α -pineno (34,57%) e limoneno (31,75%).

Graça (2023) constatou que OE das folhas da *Schinus Terebinthifolia Raddi* (Anacardiaceae), após sete dias de tratamento por via intraperitoneal, conseguiu inibir o crescimento do S180 em 89,8 % e 69,1 %, nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. O 5-FU (25 mg/kg/dia) apresentou uma inibição de 80,3 %. Concluiu-se que o OE possui atividade antitumoral *in vivo*. Os principais componentes do OE foram α -pineno (39,60%) e 3-careno (35,27%). Os mesmos foram avaliados *in vivo*, o 3-careno inibiu o crescimento do tumor em 49,3% e 66,7% nas doses de 25 e 50 mg/kg (i.p.), O α -pineno não apresentou diferença estatística com o CTRL.

Amaral et al. (2015), por sua vez, demonstraram que OE das folhas de *Mentha x villosa* (Lamiaceae) conseguiu inibir o crescimento do S180 em 29,4 e 40,5% no tratamento por administração intraperitoneal nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. O controle positivo 5-FU (25 mg/kg/dia) apresentou uma inibição de 69,5%. Na administração oral, também por sete dias consecutivos, houve inibição tumoral de 25,0 e 45,2% nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia do óleo, respectivamente. O controle positivo ciclofosfamida (10 mg/kg/dia) reduziu a massa tumoral em 59,5%. Em ambas as vias de administração, houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas doses em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). O principal componente do OE foi a rotundifolona (70,96 %), no entanto, esta apresentou citotoxicidade fraca no teste *in vitro*.

Além dos efeitos isolados de OEs na atividade antitumoral *in vivo*, têm sido cada vez mais frequente os estudos de amostras vegetais em combinação com drogas padrões anticancerígenas, visando a diminuição dos efeitos adversos e toxicológicos, e/ou de doses administradas de um antineoplásico isolado.

Amaral et al. (2016) determinaram os efeitos do OE das folhas de *M. villosa* (Lamiaceae) em combinação de 5-FU. A combinação do óleo (50 e 100 mg/kg/dia) com 5-FU (10 mg/kg/dia) levou a uma maior taxa de inibição do crescimento tumoral de S180 (58,9% e 65,7%, respectivamente) quando comparada com 5-FU sozinho (30,2%) na dose de (10 mg/kg/dia). Quando a combinação foi comparada ao 5-FU sozinho em maior dose (25 mg/kg /dia) a taxa de inibição foi semelhante, todavia com leucopenia menos grave. Os autores concluíram que o OE de *M. villosa* pode aumentar a eficácia terapêutica dos quimioterápicos.

Santos et al. (2023) avaliaram os efeitos da combinação do antineoplásico 5-FU com o extrato de flores de *Matricaria recutita* (Asteraceae) para o tratamento de camundongos transplantados com S180. O 5-FU isolado, 5-FU+ extrato 100 mg/kg/dia e 5-FU+ extrato 200 mg/kg/dia reduziram significativamente a massa tumoral ($p < 0,05$) com inibição tumoral de 64,3%, 66,7% e 87,7%, respectivamente. No entanto, o 5-FU+extrato 200 mg/kg/dia mostrou uma redução tumoral mais significativa quando comparado ao 5-FU sozinho. O extrato isolado, por sua vez, nas doses de 100 e 200 mg/kg/ dia não apresentou atividade antitumoral significativa. Os autores concluíram que a administração do extrato a 200 mg/kg/dia com o 5-FU potencializou acentuadamente a ação antitumoral da droga.

Apesar de o objetivo deste trabalho não ser avaliação da combinação do OE com quimioterápicos, verifica-se a possibilidade dessa pesquisa no futuro a partir do OEEF, o qual se mostrou eficaz na atividade antitumoral *in vivo* frente ao S180 nas doses 25 e 50 mg/kg/dia.

5.4.1 Avaliação dos parâmetros toxicológicos

Sabe-se que um dos grandes desafios quanto ao tratamento do câncer refere-se aos inúmeros efeitos adversos que os antineoplásicos podem produzir. Nesse sentido, as buscas por novos tratamentos com efeitos colaterais menos severos são fundamentais. A esse respeito, faz-se necessário a análise de possíveis alterações da homeostase do organismo exposto à candidatos antitumorais. O tratamento com o OEEF, bem como o antineoplásico 5-FU durante sete dias permite avaliar e comparar os efeitos produzidos por eles no organismo de animais com o S180 (ROLIM et al., 2017).

Dessa forma, parâmetros toxicológicos sistêmicos, tais como variação de massa corporal e de órgãos (baço, cérebro, coração, estômago, fígado e rins), e parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos foram examinados em camundongos tratados com o OEEF de acordo protocolo experimental já descrito.

5.4.1.1 Determinação da massa corporal

O ensaio revelou redução de massa corporal no grupo CTRL, decorrente da presença das células do tumor S180 em comparação com o veículo ($p < 0,05$). Adicionalmente, não houve diferenças entre os grupos tratados com o OEEF nas doses 25 e 50 mg/kg/dia em relação ao CTRL, indicando que estas doses além de terem apresentado diminuição tumoral excelente (taxas de inibição de 91%, 87% e 93%, para o OEEF25, OEEF50 e 5-FU, respectivamente) foram incapazes de causar alteração na massa corporal dos animais (Figura 7).

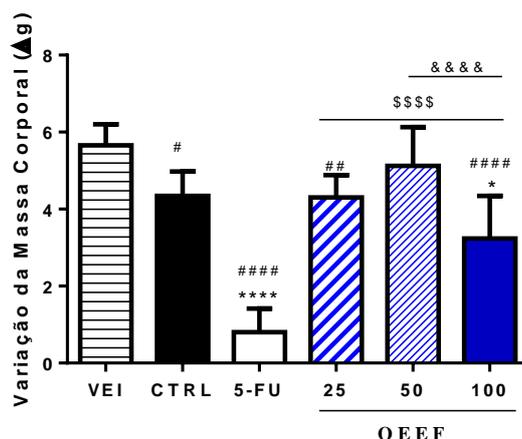


Figura 7 - Média da variação da massa (g) corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 11$. $****p < 0,001$ e $*p < 0,05$; quando comparado ao CTRL. $#####p < 0,0001$; $##p < 0,01$ e $#p < 0,05$; quando comparado ao VEI. $####p < 0,0001$; quando comparado ao 5-FU. $&&&&p < 0,0001$; quando comparado intragrupo.

Todos os grupos tratados com o OEEF tiveram um efeito de ganho de massa favorável diante da droga padrão ($p < 0,0001$), a qual reduziu de maneira significativa a massa corporal dos animais quando comparado ao CTRL e ao veículo ($p < 0,0001$). Observa-se também, uma leve tendência de melhores efeitos do OEEF50 no ganho de massa na comparação intragrupo. Verificou-se, por exemplo, que o mesmo foi semelhante ao VEI e ao CTRL. O OEEF100, por sua vez, reduziu a massa corporal quando comparado ao VEI e ao CTRL ($p < 0,05$).

É possível que os efeitos antitumorais nas menores doses do OEEF tenham se estabelecido por apresentarem perfis toxicológicos sistêmicos mais favoráveis. O tratamento com OEEF na dose de 100 mg/kg/dia induziu perda de peso nos camundongos quando comparados ao CTRL e, além disso, não apresentou efeito antitumoral (Figura 6). Todavia esse não parece ser um fator limitante para seu uso em pesquisas diversas, pois esse efeito de perda de massa pode ser decorrente da associação do tumor e não do OEEF100 isoladamente.

Diferente dos resultados deste trabalho para o OEEF, alguns OEs podem apresentar a perda de peso como efeito colateral. Rolim et al. (2017) documentaram que camundongos tratados com OE de *Mesosphaerum sidifolium*, nas doses de 100 e 150 mg/kg, apresentaram uma redução de peso. De forma similar, o 5-FU também ocasionou esse efeito;

Xavier et al. (2015) demonstraram que o OE das folhas de *Lippia microphylla* na dose de 100 mg/kg, administrado por via intraperitoneal, diminuiu o peso corporal de camundongos e também o consumo de água e ração após sete dias de tratamento. O mesmo verificou-se para o grupo tratado com 5-FU. Os autores associaram a perda de peso dos animais à toxicidade do óleo de *L. microphylla* para o sistema gastrointestinal, apesar disso houve inibição tumoral. De fato, esses efeitos são observados com a maioria das drogas anticancerígenas atualmente em uso.

O 5-FU é um antineoplásico comumente associado a efeitos colaterais relacionados a perda de peso, tais como: diarreia, vômitos, anorexia, falta de apetite e mucosite. Assim, como este trabalho, outras pesquisas constataram perda de massa corporal no grupo 5-FU (AMARAL et al., 2015; AMARAL et al., 2016; ROLIM et al., 2017). Felizmente, o OEEF apesar de não prevenir a perda de massa ocasionada pela presença do tumor S180, não acentuou esse efeito. Mesmo a dose mais alta, apresentou um perfil toxicológico de perda de massa mais favorável quando comparado ao 5-FU. É provável que o OEEF não tenha efeitos adversos relacionados ao sistema gastrointestinal comumente encontrados nos antineoplásicos, tais como o 5-FU.

Moura et al. (2016), assim como neste estudo, observaram que a própria implantação do tumor S180 em camundongos ocasionou uma diminuição na massa corporal deles. Associou-se esta diminuição, à diminuição na ingestão de ração, observada em todos os grupos transplantados em relação ao grupo saudável. Os autores avaliaram o OE de *Xylopija langsdorffiana* nas doses de 50 e 100 mg/kg e, apenas o tratamento com 100 mg/kg reduziu a ingestão de alimentos em comparação ao grupo controle com o tumor. Mesmo assim, apresentou redução significativa no peso do tumor. Diferentemente, o OEEF100 induziu uma queda na massa corporal em comparação ao CTRL e não apresentou atividade antitumoral.

Na presente pesquisa, ficou evidente que houve diferença estatística do OEEF em todas as doses avaliadas em comparação ao grupo 5-FU, indicando que o OEEF apresentou um perfil de ganho de massa favorável em comparação ao padrão. Nessa perspectiva, o presente estudo também abre caminho para a avaliação combinada do OEEF e 5-FU em trabalhos futuros. De fato, muitos OEs vegetais tem o potencial de amenizar efeitos adversos produzidos por medicamentos antitumorais comumente usados na prática clínica.

Amaral et al. (2015) também não observaram alterações significativas no ganho de massa corporal de animais com tumor S180 após a administração do OE de *M. Villosa* (Lamiaceae) por ambas as vias: oral (100 ou 200 mg/kg) e intraperitoneal (50 ou 100 mg/kg) ($p > 0,05$). Em contraste, o 5-FU reduziu a massa corporal.

Em outro estudo, Amaral et al. (2016) observaram que a combinação do 5-FU (10 mg/kg/dia) e OE de *M. Villosa* (50 e 100 mg/kg/dia) foi semelhante ao 5-FU sozinho (10 mg/kg/dia), havendo significativa redução na massa corporal de camundongos com tumor S180 submetidos a estes tratamentos. Todavia, a taxa foi menor que o 5-FU isolado na dose de 25 mg/kg/dia.

5.4.1.2 Avaliação da massa dos órgãos

No presente estudo, observou-se um aumento na massa do baço de grande parte dos grupos avaliados em comparação ao VEI, com exceção do grupo tratado com o 5-FU (Figura 8). Entretanto, a esplenomegalia foi associada à indução do câncer no organismo e não ao tratamento com o OEEF. Além disso, observou-se tendência de reversão dessa condição nos grupos tratados com o OEEF.

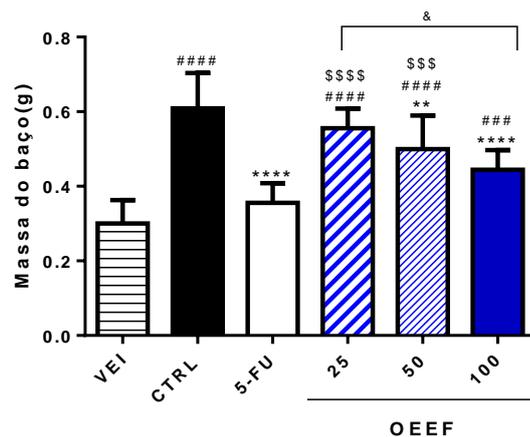


Figura 8 - Média da massa (g) do baço por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. ****p < 0,001; quando comparado ao CTRL. #####p < 0,0001 e ####p < 0,001; quando comparado ao VEI. \$\$\$p < 0,0001 e \$\$\$p < 0,01; quando comparado ao 5-FU. &p < 0,0001; quando comparado intragrupo.

A diminuição do baço em relação ao grupo CTRL parece ser dependente do aumento das doses do OEEF; nota-se que o OEEF50 (p < 0,01) e o OEEF100 (p < 0,0001) diminuíram gradualmente o tamanho do baço, enquanto o OEEF25 foi semelhante ao CTRL. O OEEF100 reduziu a massa do baço, assemelhando-se ao padrão, ao passo que diferenças significativas entre este último e os grupos OEEF25 (p < 0,0001) e OEEF50 (p < 0,001) foram encontradas. Houve diferença significativa entre o OEEF25 e o OEEF100.

Apesar de os grupos do OEEF diminuírem a expansão esplênica em comparação ao grupo CTRL, ainda assim, a massa do baço nesses grupos continuou aumentada em comparação com o veículo. Sugere-se que o tratamento de sete dias com o OEEF foi insuficiente para restabelecer o sistema de defesa imune para a normalidade e por isso o baço permaneceu reativo. A presença dos tumores nos grupos tratados com o OEEF pode estar estimulando a mielopoiese esplênica, mantendo a massa do baço aumentada.

O sistema imunológico protege o organismo envolvendo respostas imunes inatas e adaptativas por meio de células mieloides (granulócitos, macrófagos e monócitos) e células natural killer (NK) ou linfócitos e células dendríticas, respectivamente (BÉGAY et al., 2022). Existe uma estreita relação entre a ocorrência, crescimento e declínio de um tumor e o estado geral do sistema imunológico (BRAUMÜLLER et al., 2022; HANUS et al., 2021;). Sabe-se que as células imunes, infiltradas na massa tumoral crescente, desempenham um papel crucial na expansão ou erradicação das células cancerígenas (AGLIARI et al., 2014).

A progressão do tumor muitas vezes é paralela a uma expansão coordenada e acúmulo contínuo de células mieloides, como macrófagos e neutrófilos associados a tumores (ANDERSON, 2020; BRAUMÜLLER et al., 2022; HANUS et al., 2021; WU; HUA; ZHENG, 2020) e células mieloides imaturas (WU; HUA; ZHENG, 2020). Como essas células, geralmente têm vida curta, necessitam de renovação rápida e contínua a partir de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras; os tumores interferem na hematopoiese do hospedeiro, e particularmente, na esplênica, desviando o processo para a geração de células mieloides com propriedades promotoras de tumores (WU; HUA; ZHENG, 2020). Dessa forma, o aumento do baço pode resultar em reduções de outras células sanguíneas, sendo importante avaliar o teor de eritrócitos em casos de expansão esplênica (JI et al., 2022; WU; HUA; ZHENG, 2020).

Paralelamente, a superestimulação do baço em animais inoculados com células tumorais é uma reação comum de defesa do organismo contra as células malignas. O baço é um local de armazenamento de células sanguíneas bem como o maior órgão linfoide secundário do corpo humano (WU; HUA; ZHENG, 2020). Desempenha um papel crucial na filtragem de partículas antigênicas e células anormais do sangue; é um órgão importante para a diferenciação e ativação de células T e B e produção de anticorpos. Além disso, o baço serve como um importante reservatório de monócitos, plaquetas e células B de memória (JI et al., 2022; WU; HUA; ZHENG, 2020).

O tratamento com baixa dose de 5-FU pode reduzir a expansão esplênica de precursores comprometidos com alto potencial proliferativo e restaurar a imunidade antitumoral (WU; HUA; ZHENG, 2020). Neste trabalho, verificamos esse potencial do 5-FU (25mg.kg.dia).

Na pesquisa de Xavier et al. (2016), o índice do baço foi reduzido significativamente nos animais com S180 tratados com 100 mg/kg do OE das folhas de *Lippia microphylla* quando comparado com o índice do grupo CTRL com tumor, portanto, o aumento desse parâmetro causado pela inoculação do tumor foi revertido. O 5-FU (50 mg/kg) reduziu o índice do baço na comparação com o veículo e com o grupo do tumor.

De fato e, em paradoxo aos resultados obtidos neste trabalho, outras pesquisas demonstram que o 5-FU reduziu os índices do baço exercendo um potente efeito imunossupressor (XAVIER et al 2015; AMARAL et al., 2016). Entretanto, neste estudo, a redução demasiada do baço não foi observada para a droga; o 5-FU e o VEI foram semelhantes na estatística. Da mesma forma, o OEEF50 e OEEF100 reverteram a esplenomegalia em comparação ao CTRL e não causaram esse efeito. Ressalta-se que todas as doses do OEEF parecem ter um efeito mais comedido na redução da expansão esplênica quando comparados com 5-FU, isso pode ser positivo no sentido de prevenção de efeitos imunossupressores.

Diferentemente dos resultados obtidos para o OEEF, o aumento do baço foi visto em alguns OEs. Bezerra et al. (2009) documentaram que o óleo de folhas de *Croton regelianus*, nas doses de 50 e 100 mg/kg, apresentou este efeito colateral. Ainda, o mesmo foi observado no óleo de frutos de *Xylopija langsdorffiana*, na dose de 50 mg/kg (MOURA et al., 2016).

Em síntese, verificou-se que as doses mais elevadas do OEEF foram mais efetivas em diminuir o aumento da massa do baço causado pelo tumor. Todavia, é possível que OEEF100 tenha interferido negativamente na mielopoiese de células envolvidas no contexto antitumoral. O impacto do OEEF nos parâmetros sanguíneos de camundongos com esplenomegalia ocasionada por células tumorais de S180 pode ser verificado na avaliação dos índices hematológicos.

Observou-se aumento na massa cerebral dos animais do CTRL quando comparado ao veículo de animais saudáveis (Figura 9). Entretanto as doses do OEEF parecem restabelecer esse efeito para a normalidade; observa-se diferença estatística entre os grupos OEEF em comparação ao CTRL ($p < 0,0001$) e sem alterações na comparação com o VEI ($p > 0,05$). O 5-FU, por sua vez, apresenta tendência de diminuir os efeitos de aumento da massa cerebral, entretanto insignificante quando comparado ao CTRL ($p > 0,05$). Nesse sentido, verifica-se melhor potencial na restauração da massa cerebral no OEEF do que a apresentada pelo 5-FU.

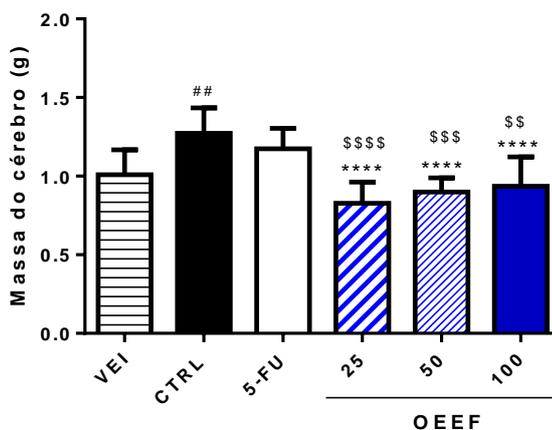


Figura 9 - Média da massa (g) do cérebro por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n= 11$. **** $p < 0,001$; quando comparado ao CTRL. ## $p < 0,01$; quando comparado ao VEI. \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ e \$\$\$\$ $p < 0,0001$; quando comparado ao 5FU.

Não houve alteração significativa na massa do coração nos grupos controle, 5-FU e OEEF25 em comparação ao veículo (Figura 10). Entretanto, uma queda na massa cardíaca ocorreu nos grupos OEEF50 e OEEF100 em comparação ao veículo, ao controle e ao grupo tratado com 5-FU. Além disso, o OEEF50 e o OEEF100 foram significativamente distintos em comparação ao OEEF25 ($p < 0,01$).

Outros trabalhos avaliaram a massa do coração em camundongos com S180 tratados com o extrato salino de folhas de *S. Terebinthifolia* (100 mg/kg) e seus isolados (1 e 5 mg/kg) e metrotrexato 1,5 mg/kg (droga padrão) (RAMOS et al., 2019); o extrato de flores de *Matricaria recutita* (200 mg/kg/dia), o 5-FU isolado (25 mg/kg/dia) e a combinação do 5-FU+ extrato 200 mg/kg/dia (SANTOS et al., 2023) no modelo de carcinoma de ascite de Ehrlich; o óleo essencial de *Mesosphaerum sidifolium* (50, 100 e 150 mg/kg), o 5-FU (25 mg/kg) e composto majoritário (fenchone 30 e 60 mg/kg) (ROLIM et al., 2017). Todavia, não houve alterações entre os grupos estudados nestas pesquisas para fins de mais discussão. Acredita-se que a análise histológica do órgão poderá esclarecer se houve efeitos toxicológicos no coração.

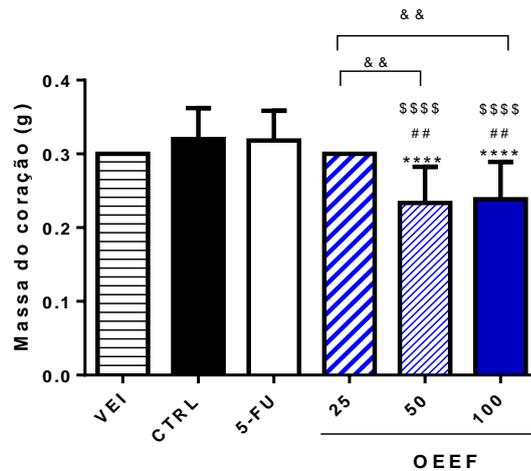


Figura 10 - Média da massa (g) do coração por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. ****p < 0,001; quando comparado ao CTRL; ##p < 0,01; quando comparado ao VEI; ####p < 0,0001; quando comparado ao 5FU. &&p < 0,01; quando comparado intragrupo.

Observou-se que não houve alteração na massa do estômago nos grupos CTRL, 5-FU, OEEF25 e OEEF100 (Figura 11). Uma diminuição na massa estomacal ocorreu no grupo OEEF50 em comparação ao CTRL e ao grupo tratado com 5-FU (p < 0,01); ainda assim, se manteve dentro da normalidade na comparação com o veículo (p < 0,01). Assim, considera-se que o OEEF não apresentou alterações no estômago.

De forma semelhante, não houve alterações nos índices do estômago de camundongos com S180 no trabalho de Ramos et al. (2019) entre os grupos avaliados: SHAM de animais saudáveis, extrato salino de folhas de *S. Terebinthifolia* (100 mg/ kg) e seus isolados (1 e 5 mg/ kg). Todavia, a droga padrão, metotrexato (1,5 mg/ kg) elevou a massa estomacal dos animais na comparação com o SHAM. Também não houve alteração na massa estomacal de camundongos nos grupos avaliados por Santos et al. (2023).

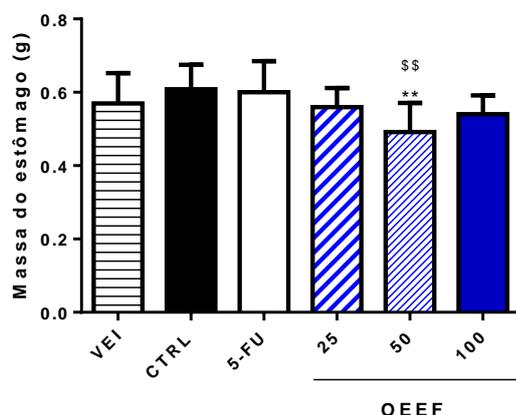


Figura 11- Média da massa (g) do estômago por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 11$. ** $p < 0,01$; quando comparado ao CTRL. \$\$ $p < 0,01$; quando comparado ao 5FU.

Averiguou-se elevação significativa na massa do fígado dos animais do grupo CTRL quando comparado ao veículo ($p < 0,0001$); os grupos tratados com 5-FU e o OEEF50 preveniram a hipertrofia hepática ocasionada pelo tumor S180; os mesmos diminuíram a massa do fígado em comparação ao grupo CTRL e foram semelhantes ao VEI (Figura 12). Em contraste, os grupos das doses de pontas do OEEF foram incapazes de restaurar a massa hepática; isso pode ser observado pela semelhança deles ao grupo CTRL, bem como aumento de massa hepática quando comparados ao grupo VEI: ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) para o OEEF25 e OEEF100, respectivamente.

Apesar de serem menos eficazes na prevenção da hipertrofia hepática do que o OEEF50, o OEEF25 e OEEF100 apresentaram tendência a diminuição do índice hepático. Além disso, todos os grupos tratados com o OEEF mostraram-se semelhantes ao 5-FU ($p > 0,05$). Indicando que o tratamento com o OEEF nas doses avaliadas apresentou resultados compatíveis com o do 5-FU neste parâmetro. A avaliação nos índices de AST e ALT, bem como a análise histológica do órgão poderá esclarecer os efeitos do OEEF nos hepatócitos.

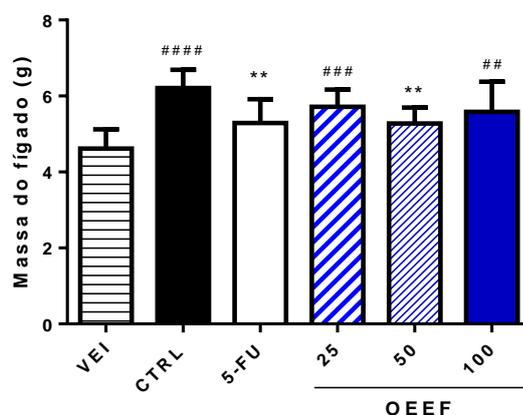


Figura 12 - Média da massa (g) do fígado por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. **p < 0,01; quando comparado ao CTRL. ##p < 0,01; ###p < 0,001 e ####p < 0,0001; quando comparado ao VEI.

O 5-FU é uma droga padrão muito utilizada na clínica oncológica e, além disso, tem sido empregado em diversas pesquisas em modelos animais com implantação de tumor, inclusive no modelo de S180 implantado em camundongos (AMARAL et al., 2015; AMARAL et al., 2016; FERRAZ et al., 2013; MOURA et al., 2016).

Algumas pesquisas encontraram resultados de aumento da massa hepática nos animais com tumor sem tratamento, com redução desse índice em grupos tratados com a droga padrão, óleo essencial ou extratos vegetais. O aumento da massa hepática tem sido relatado como uma resposta do fígado à implantação tumoral.

Rolim et al. (2017) observaram aumento do índice hepático no grupo controle tumoral, modelo de carcinoma de ascite de Ehrlich na cavidade peritoneal. No entanto, o OE de *Mesosphaerum sidifolium* (50, 100 e 150 mg/kg) e o 5-FU (25 mg/kg), mas não o composto majoritário (fenchone 30 e 60 mg/kg), induziram uma diminuição no índice hepático, restaurando a normalidade como animais saudáveis.

De maneira semelhante, Ramos et al. (2019) observaram elevação na massa hepática de animais do grupo controle negativo com S180 em comparação com o grupo SHAM de animais saudáveis. Observou-se que os tratamentos com o metotrexato 1,5 mg/kg (droga padrão), extrato salino de folhas de *S. Terebinthifolia* (100 mg/kg) e seus isolados (1 e 5 mg/kg) reverteram o aumento desse parâmetro causado pela inoculação do tumor.

Observou-se que nenhum grupo apresentou alteração na massa dos rins na comparação com o veículo ($p > 0,05$) (Figura 13). Todavia uma diminuição dose dependente ocorreu nos grupos OEEF25 ($p < 0,05$), OEEF50 ($p < 0,01$) e OEEF100 ($p < 0,0001$) em comparação ao CTRL. Parece que o controle tem uma leve tendência de aumentar a massa renal. Nesse sentido, o OEEF não causou toxicidade, assim como o padrão também não. A avaliação nos índices de ureia e creatinina poderão confirmar esses achados iniciais.

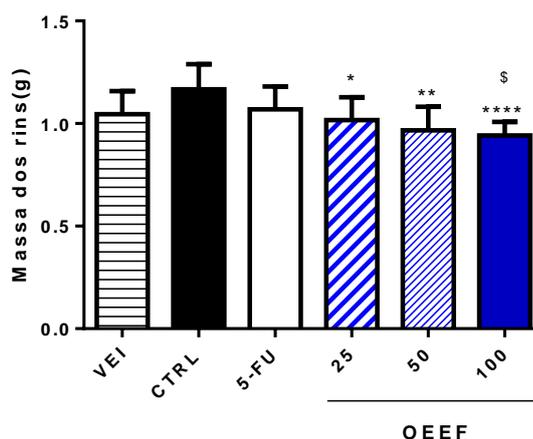


Figura 13 - Média da massa (g) dos rins por 100 (g) da massa corporal de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 11$. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$; quando comparado ao CTRL. \$ $p < 0,05$; quando comparado ao 5-FU.

5.5.1.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos leucocitários

Com relação aos parâmetros hematológicos leucocitários, observou-se que a implantação do tumor isoladamente foi capaz de induzir uma reação leucemoide nos animais transplantados (Figura 14) que pode ser observada pelo aumento de leucócitos totais em relação ao sadio ($p < 0,0001$). Esses dados corroboram com dados da literatura que descrevem esse tipo de efeito relacionado à presença do tumor (ROLIM et al., 2017).

Verificou-se que o OEEF em todas as doses testadas diminuiu o teor de leucócitos totais quando comparados ao CTRL. A reversão da reação leucemoide parece ter um efeito melhor no OEEF25, entretanto, não houve diferença entre os grupos do OEEF ($p > 0,05$). Adicionalmente, observa-se que todos os grupos do OEEF apresentaram uma diminuição de leucócitos aumentados pelo tumor menos acentuada que o 5-FU, ou seja, foram significativamente distintos da droga padrão, e além disso, em escala crescente de dose.

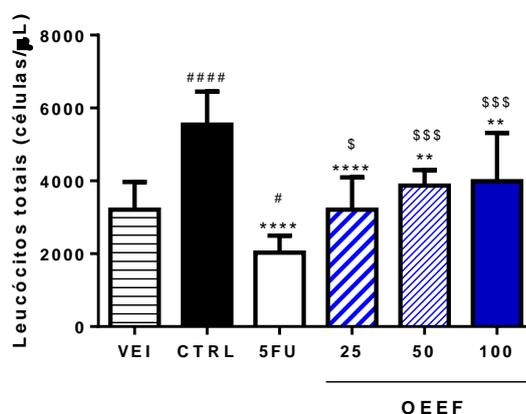


Figura 14 - Leucócitos totais presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 11$. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,0001$; quando comparado ao VEI. **** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,01$; quando comparado ao CTRL. \$\$\$ $p < 0,001$; quando comparado ao 5-FU.

É bem conhecido que o uso de agentes quimioterápicos clássicos está associado à indução de reações adversas consideráveis (BJÖRN et al., 2020). Este também é o caso do tratamento com 5-FU, que comumente induz mielossupressão grave, incluindo, neutropenia, leucopenia e trombocitopenia (ARSHAD et al., 2020; MOURA et al., 2016; ROLIM et al., 2017). Neste trabalho, contrariamente, verificou-se ausência de leucopenia associada ao número total de leucócitos nos grupos tratados com OEEF e os mesmos restabeleceram o teor de leucócitos totais para a normalidade; contrariamente, o 5-FU foi diferente na comparação com o veículo ($p < 0,05$), corroborando com outros trabalhos que verificaram resultados semelhantes (BASTOS, 2018; RAMOS et al., 2019).

Rolim et al. (2017) observaram para o OE de *Mesosphaerum sidifol*, seu isolado majoritário e também para o 5-FU efeito de imunossupressão associado à redução do número total de leucócitos. O efeito de imunossupressão é comum em muitos antineoplásicos (XAVIER et al 2015).

Amaral et al. (2016) verificaram que o 5-FU sozinho na dose de 25 mg/kg /dia induziu leucopenia em camundongos com S180. Todavia o OE das folhas de *M. Villosa* (50 e 100 mg/kg/dia) em combinação com 5-FU (10 mg/kg/dia) inibiu o crescimento tumoral semelhante ao 5-FU, com leucopenia menos grave.

Moura et al. (2016) observaram leucopenia acentuada com linfocitose e neutropenia, além de redução na contagem de monócitos no grupo 5-FU. Em contraste, o tratamento com 50 mg/kg de óleo de frutos de *Xylopi langsdorffiana* restaurou a contagem normal de leucócitos aos níveis obtidos para o grupo saudável.

O estudo de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos ganhou interesse em doenças oncológicas. Neste cenário, as contagens de leucócitos foram estudadas quanto ao seu potencial prognóstico e valor preditivo em vários tumores sólidos (SIBILLE et al., 2022). Nesta pesquisa, o aumento dos leucócitos totais no grupo CTRL foi atribuído a elevação nos índices de neutrófilos, eosinófilos e monócitos (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente). Não houve alteração de linfócitos nos animais do grupo controle quando comparado ao veículo, entretanto uma diminuição dessas células foi verificada para os grupos do OEEF nas doses mais altas (Figura 18).

Há um reconhecimento crescente dos neutrófilos como um componente importante das populações de células infiltrantes tumorais (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018; HANUS et al., 2021). São as células imunes inatas mais abundantes, com papel bem definido na proteção do hospedeiro contra diferentes patógenos e na remodelação tecidual. Entretanto, no cenário tumoral demonstraram um forte valor prognóstico negativo (HANUS et al., 2021; VEGLIA et al., 2021).

Dentro da variedade de neutrófilos, diversas dessas células exercem atividade imunossupressora no câncer. Elas suprimem as funções dos linfócitos T, linfócitos B e células assassinas naturais e também promovem a progressão tumoral e a metástase por meio de mecanismos não imunes (HANUS et al., 2021; VEGLIA et al., 2021). Sua presença em pacientes com câncer está associada a prognósticos e resultados terapêuticos ruins (VEGLIA et al., 2021).

No presente estudo, verificou-se no sangue periférico de camundongos portadores de S180 sem tratamento, um aumento do número de neutrófilos em comparação ao veículo ($p < 0,001$) (Figura 15). O 5-FU e o OEEF25 não apresentaram alterações quando comparados ao veículo ($P > 0,05$). É possível que os altos índices de inibição tumoral (93,4% e 91%, respectivamente) com estes tratamentos tenham restabelecido os níveis de neutrófilos para a normalidade.

Além disso, verificou-se que os efeitos sobre os neutrófilos de camundongos tratados com OEEF25 e OEEF50 se assemelham aos da droga padrão, amplamente utilizada na prática clínica, sem qualquer evidência de neutropenia, comumente presente nos antineoplásicos

convencionais. No sentido de elevação de neutrófilos, verificou-se semelhança entre OEEF50 e o CTRL e, entre este e o OEEF100, o qual foi diferente do veículo e do 5-FU.

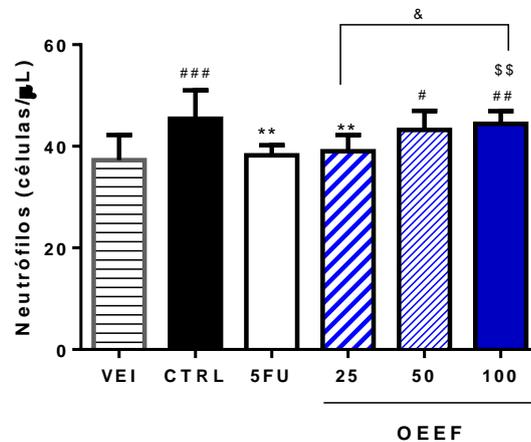


Figura 15 - Contagem de neutrófilos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: control. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. #p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001; quando comparado ao VEI. **p < 0,01; quando comparado ao CTRL. \$\$p < 0,01; quando comparado ao 5-FU. &p < 0,05; quando comparado intragrupo.

O OEEF100 (assim como o OEEF50) foi incapaz de diminuir o elevado índice de neutrófilos induzido pelo CTRL ($p > 0,05$). Além disso, não apresentou inibição significativa do S180 (inibição de apenas 13%). Sugere-se que o crescimento de células tumorais no OEEF100 e no CTRL tenha induzido a resposta imunológica primária para o recrutamento de neutrófilos. A imunovigilância refere-se ao papel do sistema imunológico em reconhecer antígenos de células transformadas, gerando assim células de memória e efetoras que buscam e controlam a geração de novas células tumorais (HANUS et al., 2021).

Todavia, ressalta-se que uma das maneiras de as células malignas se desenvolver é evitando respostas imunes (LIU et al., 2022; GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018); é possível que esse evento tenha ocorrido por meio de recrutamento de neutrófilos imunossupressores para o MAT. E nesse sentido, as células tumorais do OEEF100 mais resistentes tenham se multiplicado e diminuído sua imunogenicidade.

Em camundongos transplantados com adenoma de cólon, a supressão de células T é mediada pela ativação de metaloproteinase secretada por neutrófilos. Adicionalmente, estas células promovem o angiogênese e metástases hepáticas mediada pelo fator de crescimento de

fibroblastos 2 (FGF2). Além disso, um anticorpo antineutrófilo reduziu o número de tumores e a infiltração de neutrófilos, sugerindo que os Neutrófilos associados a tumores (NATs) promovem o desenvolvimento do tumor (HANUS et al., 2021). Além disso, os neutrófilos também exercem uma função tumoricida em camundongo com adenocarcinoma de pulmão; além disso, eles contribuem para a inflamação durante o início e a progressão do câncer (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

Apesar de os neutrófilos no contexto do câncer serem amplamente abordados por seus efeitos protumorigênicos, contrariamente, há estudos que defendem a proposta anticancerígena. Vale salientar que existe uma gama de neutrófilos tipicamente distintos com funções pró ou antitumorais (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018; VEGLIA et al., 2021). Nesse contexto, dificultou-se uma discussão a respeito disso, uma vez que elevados índices de neutrófilos no grupo OEEF50 parece não afetar sua inibição tumoral (87% de inibição).

Os eosinófilos representam uma minoria dos leucócitos do sangue periférico; estão envolvidos na resposta imune protetora contra helmintos, patógenos virais e bacterianos (VARRICCHI et al., 2017) e também em doenças alérgicas (GRISARU-TAL et al., 2020). No contexto tumoral, estudos relatam atividades anti e pró-tumorigênicas de eosinófilos (SIBILLE et al., 2022).

Neste ensaio, observou-se que o grupo controle induziu um aumento de eosinófilos quando comparado ao veículo (Figura 16). Nenhum dos tratamentos foi capaz de restaurar o índice dessas células para a normalidade. Além do mais, o OEEF100 intensificou o aumento de eosinófilos causados pelo controle ($p < 0,001$). Adicionalmente, parece haver uma tendência de elevação de eosinófilos com o aumento das doses do OEEF. Por exemplo, verificou-se diferença estatística entre o OEEF25 ($p < 0,0001$) e o OEEF100 e, entre este e o OEEF50 ($p < 0,05$). Além disso, o OEEF100 foi diferente do 5-FU no sentido de elevação de eosinófilos.

Quanto ao papel antitumoral, além de um efeito citotóxico direto nas células cancerígenas, os eosinófilos ativados recrutam, ativam e levam à maturação de várias células imunes promovendo a rejeição do tumor (SIBILLE et al., 2022). No entanto, eles também produzem muitos fatores de crescimento, com efeitos diretos no crescimento do tumor e na disseminação metastática (GRISARU-TAL et al., 2020).

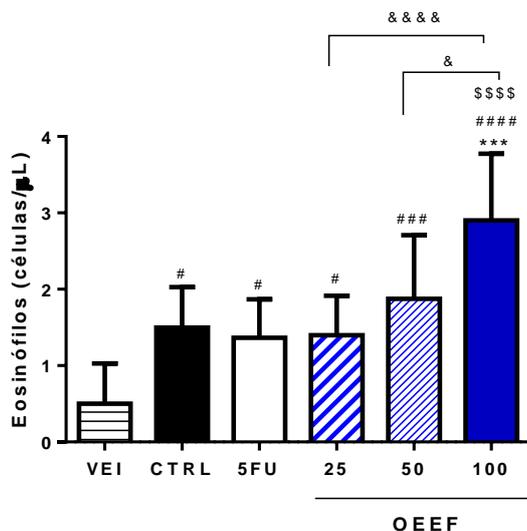


Figura 16 - Contagem de eosinófilos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. #p < 0,05; ###p < 0,001 e ****p < 0,0001; quando comparado ao VEI. ***p < 0,001; quando comparado ao CTRL. \$\$\$\$p < 0,0001; quando comparado ao 5-FU. &p < 0,05 e &&&&p < 0,0001; quando comparado intragrupo.

Esses achados dos eosinófilos refletem sua plasticidade funcional, segundo o contexto tumoral. Por exemplo, enquanto o IFN γ e a IL-33 desencadeiam um papel antitumoral dos eosinófilos, a IL-5 favorece sua função pró-tumorigênica (SIBILLE et al., 2022). Além disso, a função dos eosinófilos depende dos tipos de células malignas envolvidas. Desempenham um papel antitumorigênico no câncer de melanoma, câncer gástrico, colorretal, oral e de próstata. Em contraste, no linfoma de Hodgkin e carcinoma cervical, os eosinófilos têm sido associados a mau prognóstico, enquanto em outros ainda são um enigma (VARRICCHI et al., 2017).

É possível que o tratamento com o OEEF100, no modelo de S180 em camundongos, tenha propriedades co-estimulatórias de eosinófilos juntamente às células S180. Curiosamente, esse grupo não apresentou atividade antitumoral significativa, suspeita-se que os eosinófilos nesse grupo estejam principalmente envolvidos na protumorigênese. Ressalta-se que as menores doses do OEEF tiveram efeitos sobre a eosinofilia causada pelo tumor semelhante ao da droga padrão, sem potencial de restabelecer o teor de eosinófilos.

Os monócitos constituem 10% dos leucócitos no sangue humano e 4% dos leucócitos no sangue de camundongos. Parte deles sofrem diferenciação em macrófagos ou células

dendríticas. Os macrófagos têm sido fortemente associados a funções protumorigênica. As células dendríticas mostram mais flexibilidade de maneira dependente do contexto (JEONG; SUH Y; JUNG, 2019).

Os monócitos desempenham, por si, um papel significativo na condição homeostática do sistema imunológico, mas também na progressão do tumor. Geralmente, alta taxa de infiltração de monócitos no meio tumoral indica mau prognóstico clínico de cânceres (JEONG; SUH Y; JUNG, 2019).

Observou-se que houve elevação significativa no teor de monócitos nos grupos controle, 5-FU, OEEF50 e OEEF100 em comparação ao veículo (Figura 17). Relacionou-se este aumento à indução das células do S180 no CTRL. Nesse sentido, os tratamentos com o 5-FU ($p < 0,0001$), OEEF50 e OEEF100 ($p < 0,05$) foram incapazes de restaurar o número de monócitos para a normalidade. Além disso, foram semelhantes ao CTRL na estatística ($p > 0,05$). Ainda assim, nota-se uma tendência de redução de monócitos pelos OEEF50 e OEEF100, não observada no 5-FU. Contrariamente, o OEEF25 não apresentou alteração na comparação com o veículo, e ainda teve diferença na comparação com 5-FU ($p < 0,01$), o qual foi semelhante ao CTRL ($p > 0,05$); todavia, foi semelhante ao CTRL. Sugere-se que o tratamento com a menor dose do OEEF tem potencial na restauração de monócitos aumentados pelo controle.

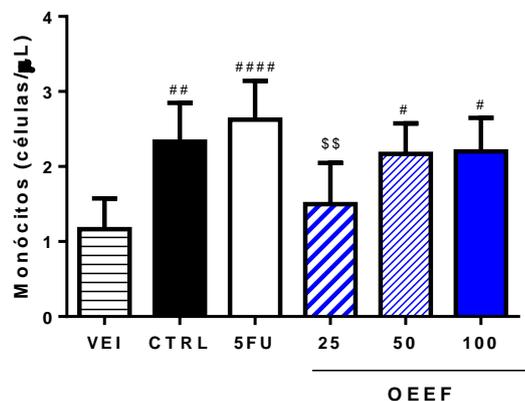


Figura 17 - Contagem de Monócitos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 11$. #### $p < 0,0001$; ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$; quando comparado ao VEI. \$\$ $p < 0,01$; quando comparado ao 5-FU.

Diferente dos dados obtidos neste estudo, Ramos et al. (2019) identificaram um aumento no número de monócitos circulantes periféricos em camundongos com S180 tratados com o

extrato salino de *Schinus terebinthifolia* Raddi (100 mg/kg) em comparação com o controle negativo. Os demais grupos: SHAM, controle negativo e metotrexato 1,5 mg/kg, não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

O aumento de monócitos também foi identificado na pesquisa de Bastos (2018) para o extrato aquoso de *Punica granatum* (25 mg/ kg) na comparação com o CTRL tratado com salina ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo 5-FU (100 mg/ kg) e o CTRL; o grupo de animais saudáveis não foi avaliado.

Não houve alteração de monócitos circulantes periféricos no trabalho de Amaral et al. (2020) entre os grupos avaliados: veículo, controle negativo, 5-FU (25 mg/kg/dia) e extrato da folha de *Passiflora alata* (100 e 150 mg/kg/dia) no modelo murino de S180.

Os linfócitos B e T são componentes do sistema imune adaptativo que expressam receptores altamente específicos para antígenos. São células-chave no MAT e, de acordo com seu perfil, têm diferentes funções na progressão do câncer: as células T CD8 e T CD4, por exemplo, lisam as células tumorais e liberam citocinas que aumentam as respostas citotóxicas dos linfócitos; as células B reconhecem antígenos tumorais e produzem anticorpos específicos contra o tumor com a cooperação de células T auxiliares, diminuindo a progressão do tumor (HANUS et al., 2021; LIU et al., 2022).

As células T são o segundo tipo de célula imune mais frequente encontrado em tumores humanos além dos macrófagos associados a tumores. Um alto nível de infiltração de células T em tumores está associado a um prognóstico favorável em diversos tipos de câncer: melanoma, pulmão, ovário, colorretal, renal, próstata e gástrico. O papel das células B na progressão do câncer é muito menos compreendido do que o das células T (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

A resposta das células T contra os antígenos derivados do tumor também controla a progressão do tumor por meio do recrutamento de células NK. Após a ativação, as células NK medeiam a morte das células tumorais principalmente pela liberação de perforina citotóxica e granzima, e também desencadeando vias apoptóticas através da produção de TNF α ou via contato direto célula-célula (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

As células NK são células linfoides do sistema imune inato. Conforme documentado em diversos estudos, elas podem distinguir células anormais das saudáveis, levando a citotoxicidade antitumoral mais específica e reduzindo complicações fora do alvo (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018; WU et al., 2020).

No presente estudo, observou-se que não houve alteração significativa no teor de linfócitos nos grupos controle, 5-FU e OEEF25 em comparação ao VEI (Figura 18). Entretanto, uma queda no número de linfócitos ocorreu nos grupos OEEF50 e OEEF100 em comparação ao VEI e ao grupo tratado com 5-FU. Além disso, o OEEF50 ($p < 0,05$) e o OEEF100 ($p < 0,0001$) foram significativamente distintos em comparação ao OEEF25.

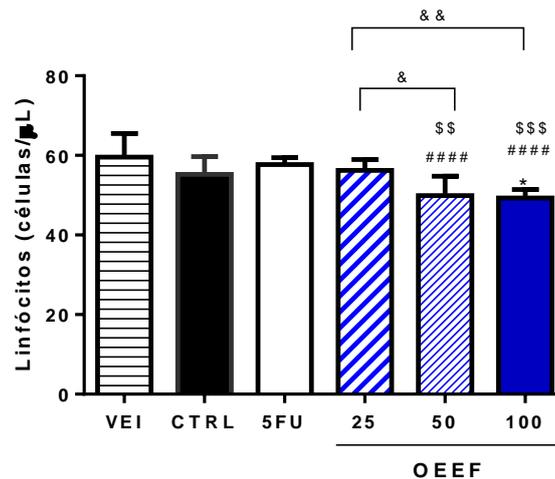


Figura 18 - Contagem de linfócitos presentes no sangue de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. VEI e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 11$. ##### $p < 0,0001$; quando comparado ao VEI. \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ e && $p < 0,01$; quando comparado intragrupo.

A desregulação do sistema imunológico é um fator crítico no câncer (BÉGAY et al., 2022). Em camundongos com adenoma de cólon induzível, a supressão de células T é mediada pela ativação de metaloproteinase secretada por neutrófilos (HANUS et al., 2021). Além disso, no câncer gástrico, os NATs induzem imunossupressão direta em células T (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018). e os neutrófilos suprimem as funções dos linfócitos B e células NK (VEGLIA et al., 2021). Neste trabalho, verificou alto teor de neutrófilos em circulação nos grupos OEEF50 e OEEF100 (Figura 16), ao passo que linfocitose foi identificada nestes grupos.

De acordo com Moura et al. (2016), a diminuição do percentual de linfócitos e o aumento do percentual de neutrófilos são alterações características nos casos de necrose tecidual e presença de tumores. Os autores observaram isso em todos os grupos transplantados, independentemente do tratamento, exceto no grupo 5-FU, em relação aos saudáveis grupos.

A queda no número de linfócitos não é exclusiva do OEEF; a literatura já demonstrou este efeito causado pelo OE de folhas do *Croton polyandrus* na dose de 150 mg.kg (MEIRELES et al., 2016), no OE da folha de *Xylopia frutescens* na dose de 50mg.kg (FERRAZ et al.,2013) e no extrato da folha de *Passiflora alata* nas 100 e 150 mg/kg/dia (AMARAL et al., 2020).

Curiosamente, Amaral et al. (2020) verificaram diminuição de linfócitos no sangue periférico de camundongos portadores de tumor S180 nos grupos controle negativo e grupos tratados com o extrato da folha de *Passiflora alata* nas doses de 100 e 150 mg/kg/dia na comparação com o veículo. Nesses mesmos grupos, verificou-se aumento de neutrófilos. Contrariamente, o grupo 5-FU aumentou linfócitos e diminuiu os neutrófilos.

De forma semelhante aos achados neste estudo, Ramos et al. (2019) não encontraram alteração de linfócitos na comparação entre os grupos SHAM de animais saudáveis, o controle com tumor e o controle com o padrão metotrexato (1,5 mg/kg/dia). O extrato salino de *Schinus terebinthifolia* Raddi (100 mg/ kg) e seu isolado (1 e 5 mg/kg), semelhante ao OEEF25, também não tiveram alterações.

Apesar de aqui o 5-FU não induzir linfocitose, esse efeito foi identificado no estudo de Moura et al. (2016). De fato, a imunossupressão ocasionada por quimioterápicos ou agentes candidatos antitumorais é muito comum na literatura (AMARAL et al., 2016; BJÖRN et al., 2020; ROLIM et al.,2017). Apesar de linfocitose observadas nos grupos OEEF50 e OEEF100, não houve imunossupressão relacionada ao número de leucócitos totais nos grupos tratados com o OEEF.

Como descrito previamente, as células tumorais no organismo comumente orquestram alterações na hematopoiese a favor do crescimento tumoral, e/ou este efeito pode ser decorrente da vigilância imunológica para combater o câncer. Tal evento induz alterações na produção de outras células sanguíneas que, a priori, não são tão requisitadas ou também são moduladas pelo uso de quimioterápicos (WU et al., 2020). Neste estudo, observou-se esplenomegalia no baço de animais inoculados com S180, indicando a presença de reatividade do órgão ao tumor. Comumente a esplenomegalia está associada a uma redução na contagem de eritrócitos, especialmente relacionada à trombocitopenia (JI et al., 2022). A este respeito e em complemento, analisou-se também, os efeitos do OEEF quanto aos aspectos hematológicos eritrocitários dos camundongos.

5.4.1.4 Avaliação dos parâmetros eritrocitários

Pequenas alterações foram observadas nos parâmetros hematológicos (Tabela 5). Com relação ao tratamento com o OEEF50, observou-se um aumento na contagem do Volume Corpuscular Médio (VCM) na comparação com o VEI ($p < 0,01$) e com o grupo tratado com o 5-FU ($p < 0,001$), bem como para o mesmo grupo na contagem da Média Corpuscular da Hemoglobina (HCM) na comparação com o CTRL ($p < 0,05$), com 5-FU ($p < 0,001$) e com o OEEF100 ($p < 0,01$); todavia, todos os grupos mantiveram os índices de HCM semelhantes ao VEI; Nesse sentido, os índices de HCM para o OEEF se mantiveram dentro da normalidade.

Adicionalmente, uma diminuição na contagem de plaquetas foi observada nas maiores doses do OEEF e também no 5-FU ($p < 0,0001$) na comparação com o VEI. O OEEF100 diminuiu drasticamente a contagem de plaquetas se assemelhando ao padrão na estatística ($p > 0,05$), o OEEF50 ocasionou trombocitopenia menos acentuada que o 5-FU ($p < 0,001$) e o OEEF100 ($p < 0,0001$). Destaca-se, o OEEF25 que não causou alteração nesse índice e foi significativamente distinto do 5-FU e do OEEF100 ($p < 0,0001$). A diminuição de plaquetas nos grupos OEEF parece se acentuar com o aumento das doses.

Em complemento, não existiu diferença entre os grupos quanto aos parâmetros de hemoglobinas (HB), eritrócito (HEM), hematócrito (HT) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Tabela 5 - Efeito do óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF) sobre parâmetros eritrocitários do sangue periférico de camundongos inoculados com tumor Sarcoma 180 (S180)

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	HB (g/dL)	HEM (106 U/L)	HT (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	PLT (103 dL)
VEI	DMSO 2%	13,8 ± 0,1	7,7 ± 0,1	42,9 ± 0,8	52,5 ± 0,7	17,8 ± 0,2	33,1 ± 0,5	836,2 ± 38,7
CTRL	DMSO 2%	13,4 ± 0,2	7,9 ± 0,1	41,6 ± 0,7	54,0 ± 0,0	17,1 ± 0,1	31,7 ± 0,2	737,3 ± 60,6
5-FU	25	13,6 ± 0,1	8,0 ± 0,2	41,7 ± 0,6	52,1 ± 0,3	16,8 ± 0,1	32,4 ± 0,3	299,0 ± 28,2**** ###
OEEF	25	13,1 ± 0,2	7,6 ± 0,2	40,7 ± 0,8	54,6 ± 2,4	17,6 ± 0,3	32,6 ± 0,4	730,8 ± 37,3\$\$\$\$&&&&
OEEF	50	13,3 ± 0,3	7,4 ± 0,2	40,1 ± 1,1	56,3 ± 1,1###\$\$\$	18,5 ± 0,6*\$\$\$&&	32,8 ± 0,6	538,9 ± 46,0###\$\$\$&&&&
OEEF	100	13,2 ± 0,1	7,8 ± 0,1	41,8 ± 0,8	54,3 ± 0,4	16,9 ± 0,2	31,7 ± 0,6	230 ± 30,7****#####

VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. 5-FU: 5-Fluorouracil. HB: hemoglobinas. HEM: eritrócito. HT: hematócrito. VCM: Volume Corpuscular Médio. HCM: Média Corpuscular da Hemoglobina. CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média. PLT: plaquetas. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 11. ****p < 0,001, quando comparado ao CTRL. #####p < 0,0001; ##p < 0,01 e #p < 0,05; quando comparado ao VEI. \$\$\$p < 0,0001; quando comparado ao 5-FU. &&&p < 0,0001; quando comparado ao OEEF na dose de 100mg.kg.dia.

A trombocitopenia é um efeito colateral comumente associado ao tratamento com o 5-FU (ARSHAD et al., 2020; SANTOS et al., 2023). É conhecido que a diminuição de plaquetas pode dificultar o tratamento, pois o indivíduo fica suscetível à hemorragia, todavia a maioria das drogas antineoplásicas induzem esse efeito (ANAND et al., 2022; JI et al., 2022). Neste estudo, o OEEF25 não causou trombocitopenia, o OEEF50 causou, entretanto, de forma menos prejudicial do que o 5-FU; e o OEEF100 se assemelhou ao 5-FU.

Algumas alterações nos parâmetros eritrocitários também foram elucidadas em pesquisas feitas com OE de plantas, inclusive no que diz respeito aos índices de VCM. O OE de *Croton polyandrus* (150 mg/kg), por exemplo, além de induzir um aumento significativo nos índices de VCM e HCM, diminuiu a contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito (MEIRELES et al., 2016). Moura et al. (2016) observaram que o OE de *Xylopiya langsdorffiana* (50 mg/kg) elevou o índice de VCM, além de aumentar hematócrito e CHCM na comparação com o veículo.

Além disso, foi relatado que o Sunitinib e outros medicamentos quimioterápicos utilizados na clínica oncológica, tais como Imatinib e Pazopanib estão associados a um aumento estatisticamente significativo no VCM dos eritrócitos (RIHACEK et al., 20022). Os índices eritrocitários VCM, HCM e MCHC são usados no diagnóstico de anemias, mas esse resultado particular não pode ser confirmado, uma vez que somente VCM foi alterado (XAVIER et al., 2015). Desta maneira, fica evidente que o OEEF não apresentou alterações relevantes nos parâmetros eritrocitários considerando a maioria dos agentes anticancerígenos.

5.4.1.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Parâmetros bioquímicos foram avaliados a fim de investigar a função renal e hepática (Figura 19). Observou-se que houve elevação significativa no teor de AST e diminuição de ALT no grupo CTRL em comparação ao VEI. Relacionou-se estas alterações a indução das células do S180 no CTRL. A este respeito, o OEEF e o 5-FU apresentaram potencial para restabelecer os índices de AST; todavia o mesmo não ocorreu com relação ao ALT para o OEEF na comparação com o CTRL.

Especificamente para a enzima AST (Figura 19A), observou-se que os tratamentos com o 5-FU e todas as doses do OEEF diminuíram a elevação desse índice na comparação com o CTRL. Todavia, ainda assim se mantiveram elevados em relação ao VEI. A diminuição de AST parece se intensificar com o aumento das doses. Essa análise ficou evidente quando as doses do OEEF são comparadas com o VEI. Não houve diferença estatística na comparação do OEEF

em relação ao 5-FU, demonstrando que eles exercem efeitos compatíveis na restauração do índice de AST.

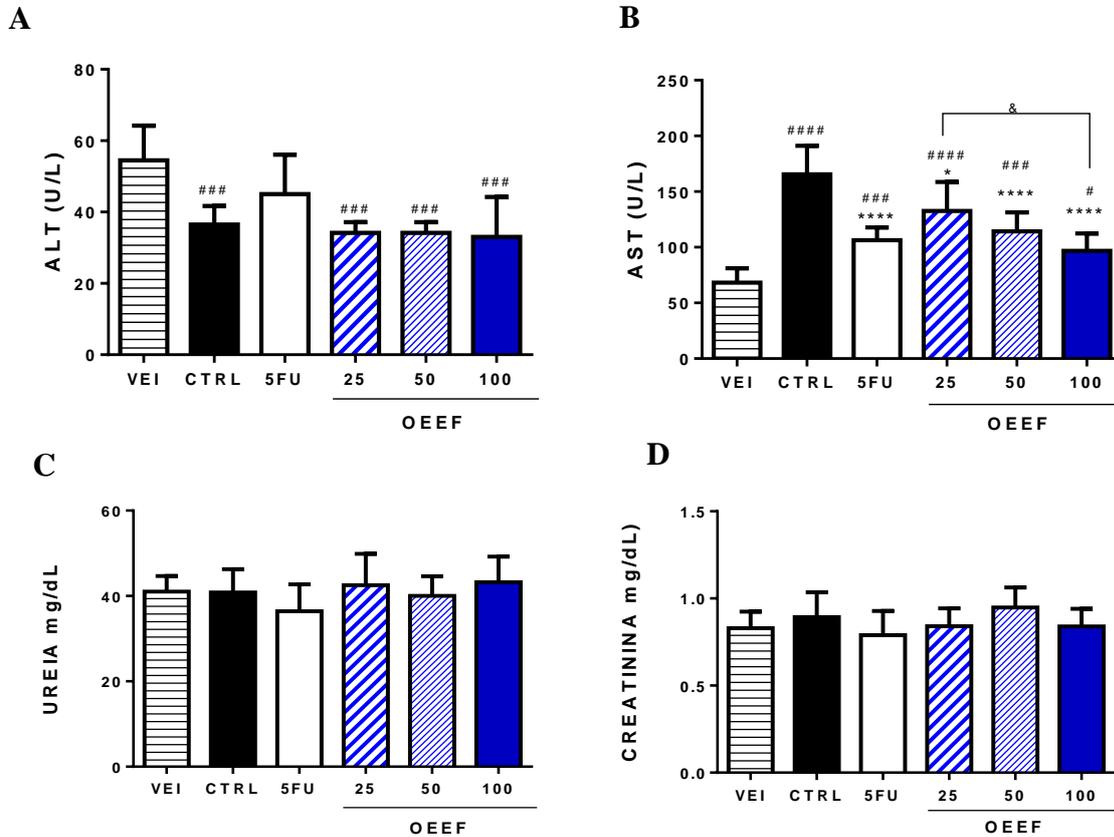


Figura 19 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos presentes no soro sanguíneo de animais, em modelo de Sarcoma 180, tratados com óleo essencial de folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), (dose em mg/kg/dia, i.p.)

Em (A) Aspartato aminotransferase - AST, (B) Alanina aminotransferase - ALT, (C) Ureia e (D) Creatinina. VEI: animais sem tumor tratados com veículo. CTRL: controle. AS e CTRL foram tratados com tween80 5% em salina 0,9%. 5-FU: 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia, i.p.). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, n= 9.

Para a enzima ALT (Figura 19B), verificou-se que o OEEF em todas as doses foi incapaz de aumentar a queda desse índice induzida pelo CTRL, sendo semelhante a ele ($p > 0,05$). Adicionalmente, o teor de ALT nos grupos do OEEF estava baixo na comparação com o VEI ($p < 0,001$). O 5-FU, por sua vez, parece ser mais eficaz em aumentar ALT do que o OEEF; percebe-se uma tendência de o 5-FU aumentar ALT. No entanto, ainda assim foi semelhante ao CTRL.

Alterações dos níveis de ALT e AST têm sido comumente relatadas em estudos não clínicos. O nível sérico de AST em camundongos com S180 aumentou no grupo tratado com o extrato salino de *Schinus terebinthifolia* (100 mg/kg) e ALT não foi avaliado (RAMOS et al.,

2019). Em contraste, Santos et al. (2023) verificaram diminuição de AST nos grupos 5-FU isolado e associado ao extrato de flores de *Matricaria recutita* (200 mg/kg/dia). Ainda, Bastos et al. (2018) verificaram aumento nos níveis séricos de ALT no grupo tratado com 50 mg/kg de extrato aquoso de *Punica granatum* em comparação com o grupo tratado com solução salina ($p < 0,001$).

As transaminases são enzimas fundamentais nas vias de gliconeogênese e glicólise e existem em muitos órgãos e tecidos que têm altas atividades metabólicas relacionadas. Nesse sentido, a atividade da transaminase no sangue é modificada não apenas no caso de uso de medicamentos, mas também na alteração das condições nutricionais ou hormonais, ou em caso de doenças que interferem nesses fatores (KONTOMANOLIS et al., 2020).

Coincidentemente, foi observado que o grupo CTRL por si, perdeu peso de maneira significativa (Figura 7), possivelmente devido a uma diminuição no consumo de água e de ração; isso pode ter afetado a atividade dessas enzimas no grupo CTRL. Além disso, as alterações encontradas neste estudo não foram sugestivas de toxicidade hepática induzida por medicamento uma vez que houve elevação de AST e diminuição de ALT.

Em animais e humanos, os níveis de ALT (atividade por g de tecido) são maiores no fígado do que em outros órgãos e tecidos enquanto a atividade de AST no músculo e no coração é comparável ou superior à do fígado (KOBAYASHI et al., 2020). Dessa maneira, o aumento ou diminuição dessas enzimas deve levar em consideração a possibilidade de lesão de qualquer um dos órgãos onde reside (fígado, rins, intestino, cérebro, pâncreas, eritrócitos músculo cardíaco e músculo esquelético) (KOBAYASHI et al., 2020; XAVIER et al., 2015). O músculo esquelético é uma das prováveis fontes, devido ao trauma mecânico causado por um tumor que invadiu a região subaxilar.

Quando os resultados não são claramente sugestivos de hepatotoxicidade, a avaliação de outros marcadores como níveis de fosfatase alcalina sanguínea (ALP), lactato desidrogenase (LDH) e bilirrubina total (T-BIL) ou histologia tecidual são necessários para uma avaliação mais precisa (KOBAYASHI et al., 2020). Nesse sentido, a análise histológica do órgão poderá confirmar se houve toxicidade hepática no grupo controle, bem como esclarecer os efeitos do OEEF nos hepatócitos dos grupos avaliados.

Sugere-se que as alterações nos níveis de ALT e AST sejam decorrentes de danos ocasionados pelo tumor e não do tratamento com o OEEF. Ainda, este teve potencial de aproximar os índices de AST alterados pelo controle, mas não de ALT, a normalidade.

Não foram observadas alterações nos níveis de ureia e creatinina (Figura 19C e 19D, respectivamente), sugerindo ausência de toxicidade renal, o que corrobora com os dados da massa renal que não apresentou alteração em nenhum grupo após o tratamento com o OEEF. O aumento nos níveis sanguíneos de substâncias nitrogenadas como ureia e creatinina é comumente associado à perda da função renal, uma vez que essas substâncias são excretadas pelos rins, indicando desta maneira toxicidade renal (XAVIER et al., 2015).

Parece que a toxicidade renal é um evento raro de acontecer no tratamento com o antineoplásico 5-FU, e também, com amostras vegetais analisadas em camundongos, uma vez que não foram observadas alterações nos índices de ureia e creatinina em diversas pesquisas (AMARAL et al., 2016; AMARAL et al., 2020; RAMOS et al., 2019; ROLIM et al., 2017; SANTOS et al., 2023; XAVIER et al., 2015). Entretanto, uma diminuição nos níveis de creatinina foi observada na pesquisa de Bastos et al. (2018) para o extrato aquoso de *Punica granatum* nas doses de 25 mg/kg ($p < 0,001$) e 50 mg/kg ($p < 0,01$) em comparação ao controle tumoral tratado com salina, todavia, com base em dados de apoio, concluiu-se que essas diferenças estavam dentro da normalidade.

5.4.1.6 Avaliação histopatológica

Os tumores presentes nos animais do grupo CTRL, que foram apenas tratados com o VEI (DMSO 5%), exibiram células tumorais atípicas, predominantemente redondas, ovoides e poligonais, mas eventualmente exibindo morfologia fusiforme. As células exibiam contornos relativamente nítidos, citoplasma abundante e eosinofílico e núcleos ora hipercromáticos, ora com cromatina fina e dispersa. As células apresentavam pleomorfismo moderado, por vezes assumindo morfologia notadamente grande e disforme (células gigantes tumorais (Figura 20).

Ainda, as células tumorais estavam dispostas em lençóis sólidos, ora compactos e densos, ora formando pequenos aglomerados irregulares que apresentam degeneração central, com perda da coesão celular, resultando aspecto pseudoalveolar. Em algumas áreas foi possível observar edema tissular importante e intensa exsudação fibrinosa, nas quais as células tumorais se dispunham de maneira extremamente frouxa. As áreas de necrose coagulativa, formando blocos e trabéculas irregulares em meios aos lençóis de células tumorais, eram bastante extensas (Figura 21).

Adicionalmente, os tumores exibiam comportamento bastante invasivo, infiltrando, dissociando o tecido hipodérmico muscular estriado esquelético e adiposo adjacente. Algumas vezes a intensa dissociação e destruição de tecidos hipodérmicos promovia a formação de

blocos irregulares de tecido adiposo e muscular remanescente em meio à massa tumoral, conferindo aspecto pseudolobular. Além disso, a invasão perineural foi um achado frequente, enquanto a invasão de canais vasculares (embolização tumoral) foi um achado raro (Figura 22).

A atividade mitótica era intensa e figuras típicas foram encontradas em todas as fases do processo de mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Figuras atípicas foram identificadas, embora tenham sido incomuns (Figura 23). Portanto, os tumores removidos dos animais grupo CTRL exibiram características histológicas que eram compatíveis com a agressividade clínica neoplásica.

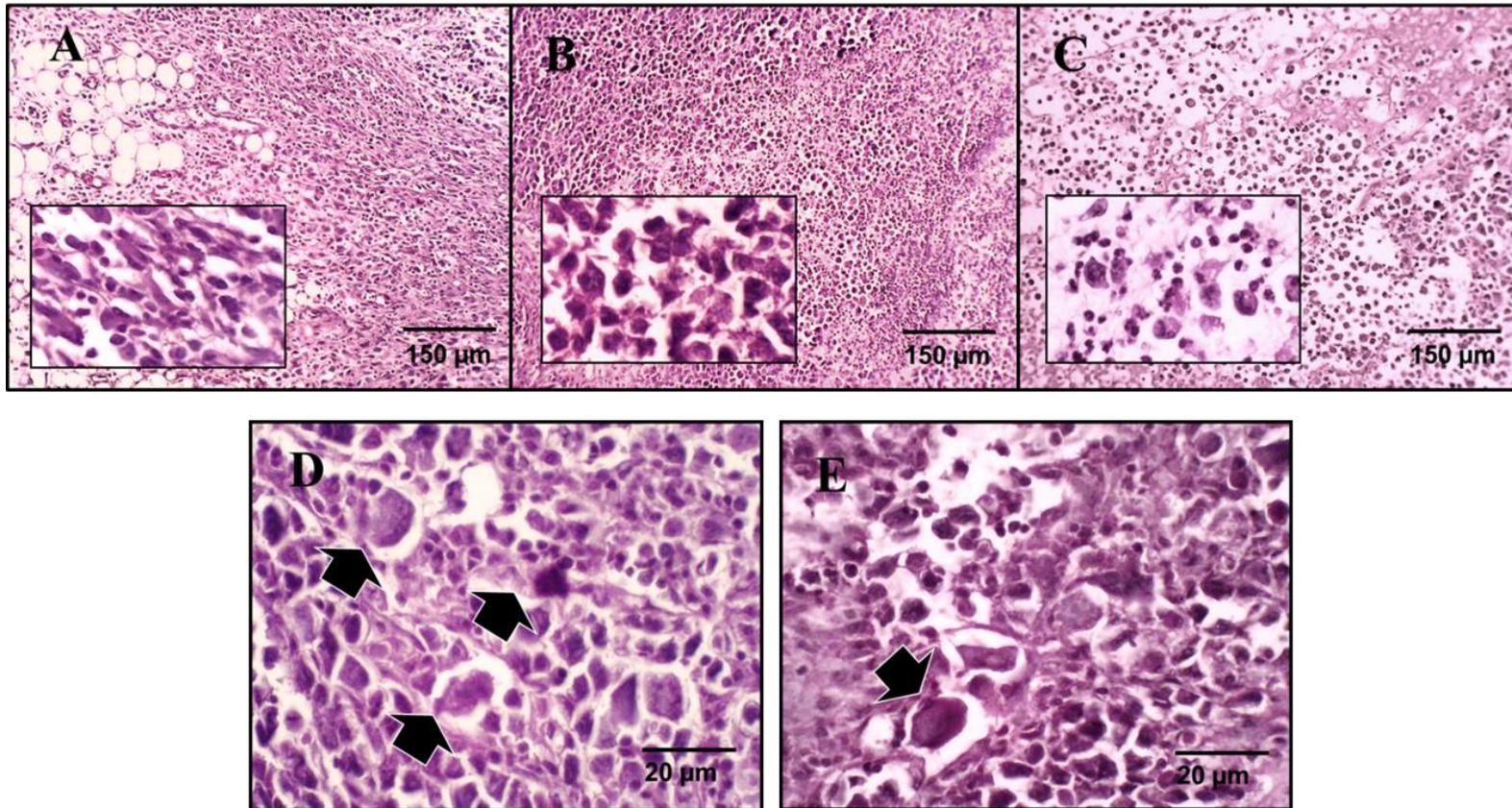


Figura 20 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque para a morfologia atípica celular neste

(A) Células neoplásicas atípicas predominantemente fusiformes em arranjo fascicular; (B) Células neoplásicas atípicas predominantemente redondas/ovoides e poligonais em arranjo compacto; (C) Células neoplásicas atípicas predominantemente redondas/ovoides e poligonais em arranjo frouxo (edema e exsudação fibrinosa). (100x); (D e E) Células gigantes tumorais de morfologia bizarra (setas) são achados relativamente frequentes (400x).

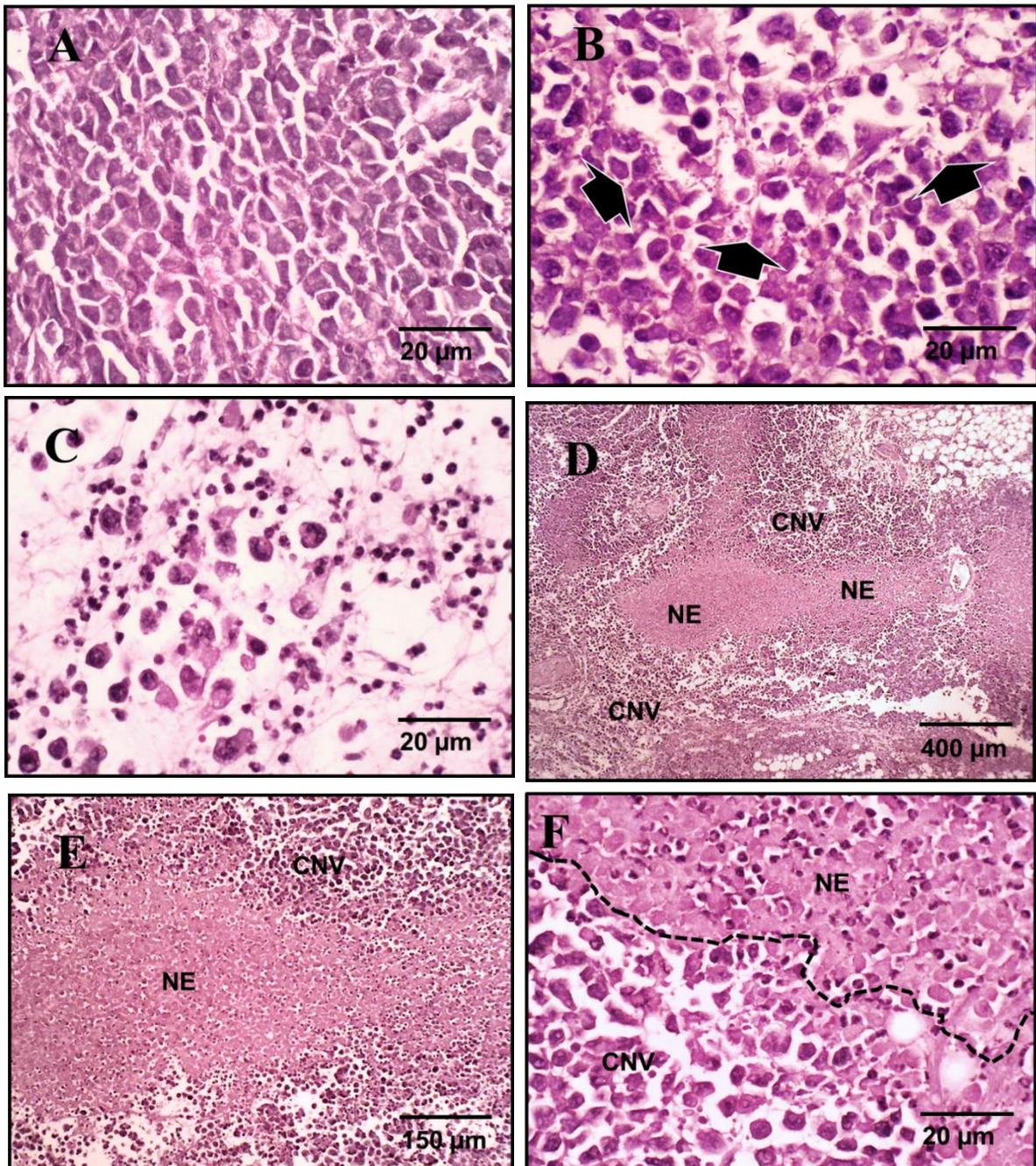


Figura 21 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque nos achados de necrose presentes neste grupo

(A) Células dispostas em lençóis sólidos e compactos; (B) Células formando aglomerados com aspecto pseudoalveolar (setas); (C) Células frouxamente dispostas em meio a um estroma intensamente edemaciado e apresentando infiltração inflamatória rica em neutrófilos polimorfonucleares. (400x); (D/E e F) Extensas áreas de necrose coagulativa em meio ao parênquima de células neoplásicas aviáveis (40,100 e 400x). Legendas: CNV – células neoplásicas aviáveis; NE – necrose;

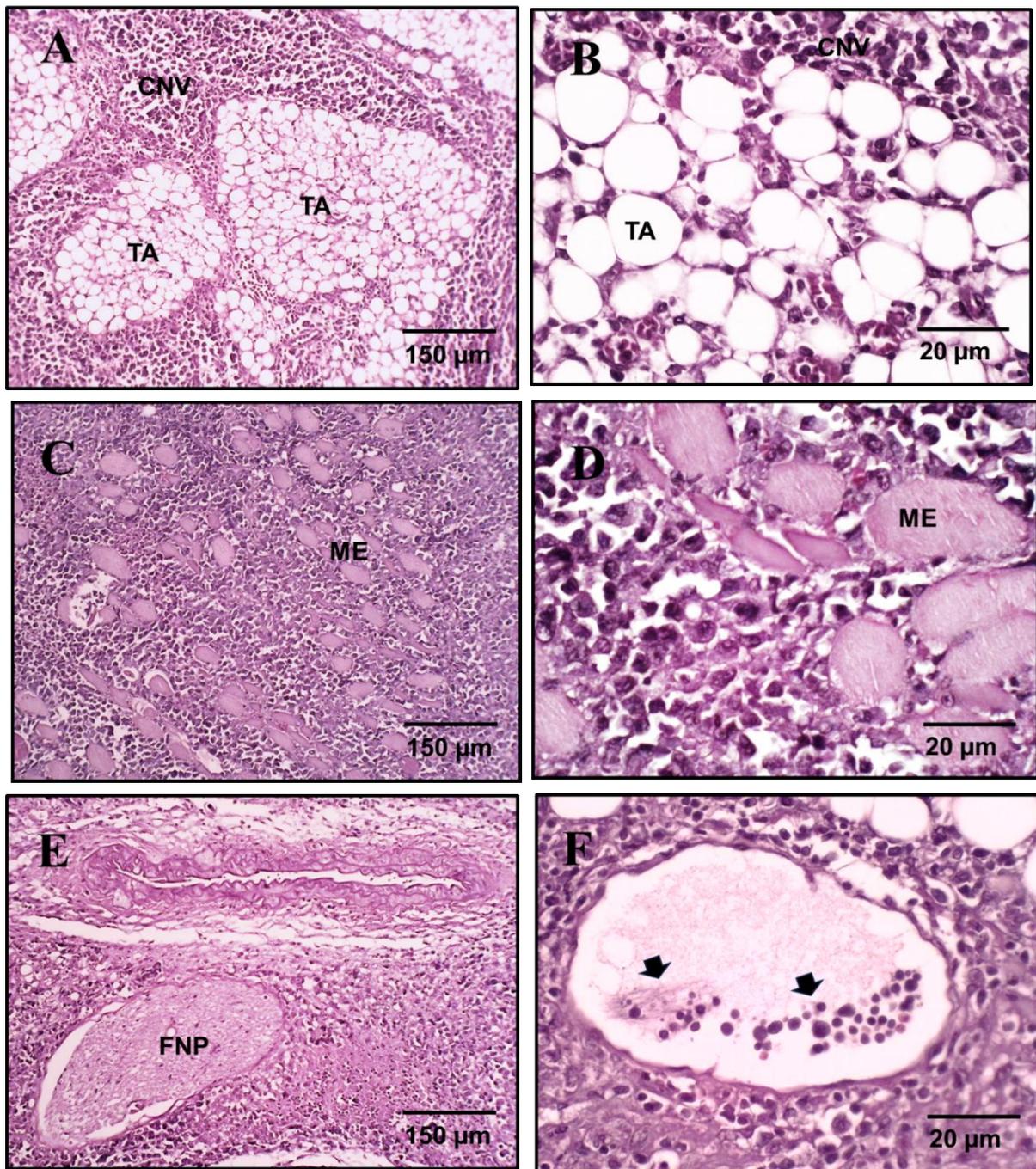


Figura 22 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque nos achados de invasão tumoral no tecido adiposo, muscular, vasos linfáticos e fibras nervosas presentes neste grupo

Os achados para invasão tumoral no tecido adiposo e muscular nos tumores do OEEF100 foram idênticos aos do grupo CTRL e por isso não foram representadas. (A/B) Células neoplásicas invadindo, dissociando e destruindo o tecido adiposo hipodérmico (100x e 400x, respectivamente); (C/D) Células neoplásicas invadindo, dissociando e destruindo o tecido muscular estriado esquelético hipodérmico (100x e 400x, respectivamente). (E) Células tumorais invadindo a bainha perineural de fibras nervosas periféricas (100x). (F) Células neoplásicas invadindo a luz de canais vasculares (vênulas), formando êmbolos tumorais potencialmente metastáticos (400x). Legendas: CNV – células neoplásicas viáveis; TA – tecido adiposo; ME – tecido muscular estriado esquelético; FNP– fibras nervosas periféricas.

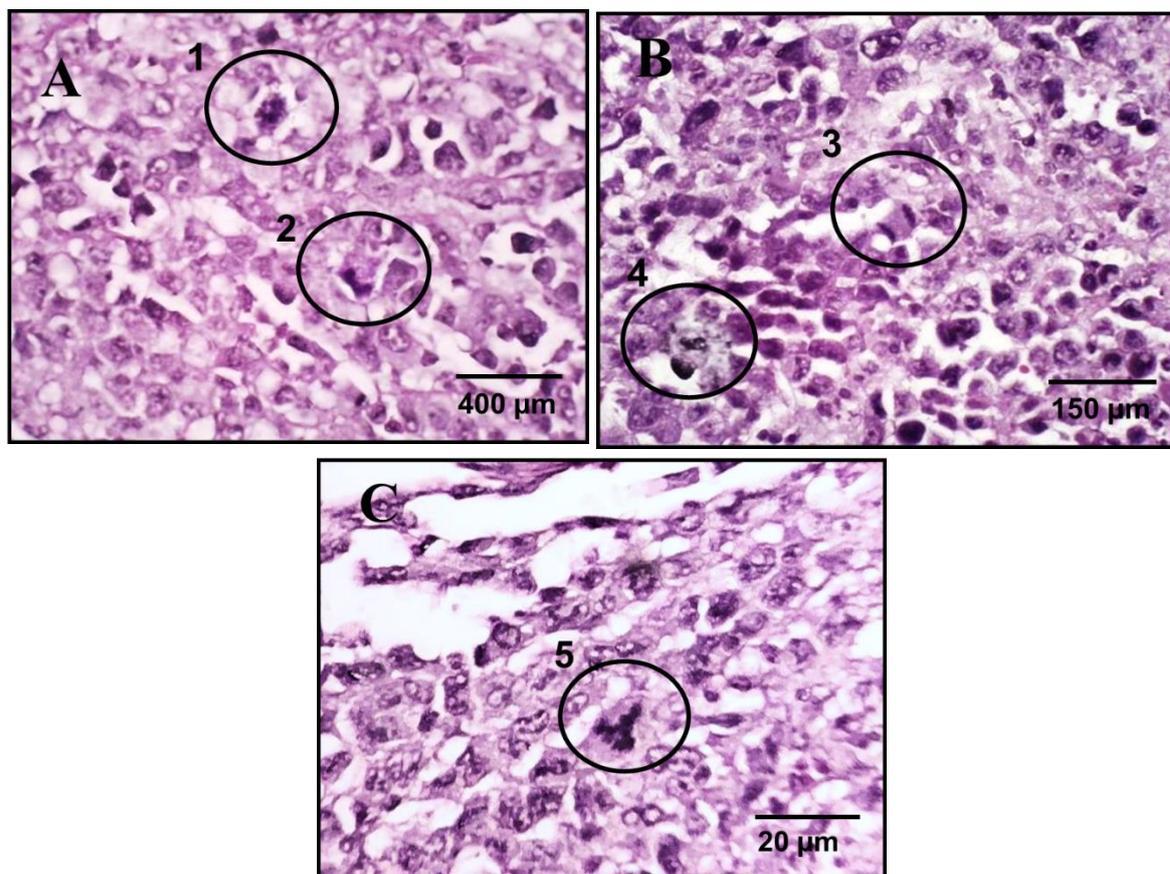


Figura 23 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais do grupo controle, coradas em HE, com destaque nas fases de mitose com e sem atipia celular (40x, 100x e 400x, respectivamente para A, B e C)

Figuras típicas de mitose: (1) Prófase; (2) metáfase; (3) anáfase e (4) telófase. (5) mitose atípica.

Os tumores desenvolvidos no grupo OEEF100 apresentaram características histopatológicas indistinguíveis do grupo CTRL (tratado apenas com veículo – DMSO 5%). Assim, as células neoplásicas se arranjaram em blocos sólidos bastante amplos, dos quais menos de 15% do tecido excisado e processado histologicamente estava representado por tecido adiposo maduro e, em menor escala, tecido muscular estriado esquelético, livres de neoplasia. Os tumores exibiram bordas e margens pouco definidas.

Não raro, o parênquima neoplásico adentrava profundamente o tecido adiposo, formando septos irregulares de tecido conjuntivo rico em células neoplásicas que destruía o panículo adiposo e conferia aspecto “lobular” ao tecido remanescente (Figura 22A). No tecido muscular estriado esquelético, as células tumorais promoviam intensa dissociação e destruição (Figura 22D). Quando bem visualizadas, as margens tumorais adjacentes ao tecido adiposo hipodérmico se mostravam bastante irregulares (Figura 24).

O grupo 5-FU formou tumores pequenos, de modo que dos espécimes excisados e processados histologicamente, aproximadamente 50% estava representado por tecido adiposo maduro e tecido muscular estriado esquelético, livres de neoplasia. Os tumores exibiam margens regulares em relação ao tecido muscular e adiposo hipodérmico. As áreas de invasão, quando visíveis, não costumam ultrapassar 250 μm no tecido adjacente (Figura 24).

Os grupos OEEF25 e OEEF50 formaram tumores pequenos (embora histologicamente maiores que o 5-FU). Do material excisado e processado, aproximadamente 40 a 45% estavam representados por tecido adiposo e muscular marginal. Os tumores exibiram margens bem menos regulares em relação ao tecido muscular e adiposo hipodérmico, muitas vezes exibindo aspecto “festionado”. As áreas de infiltração foram mais fáceis de observar que em 5-FU, mas bem menos abundantes que no CTRL e OEEF100, e chegaram a invadir em torno de 400 μm no tecido adiposo adjacente (Figura 25).

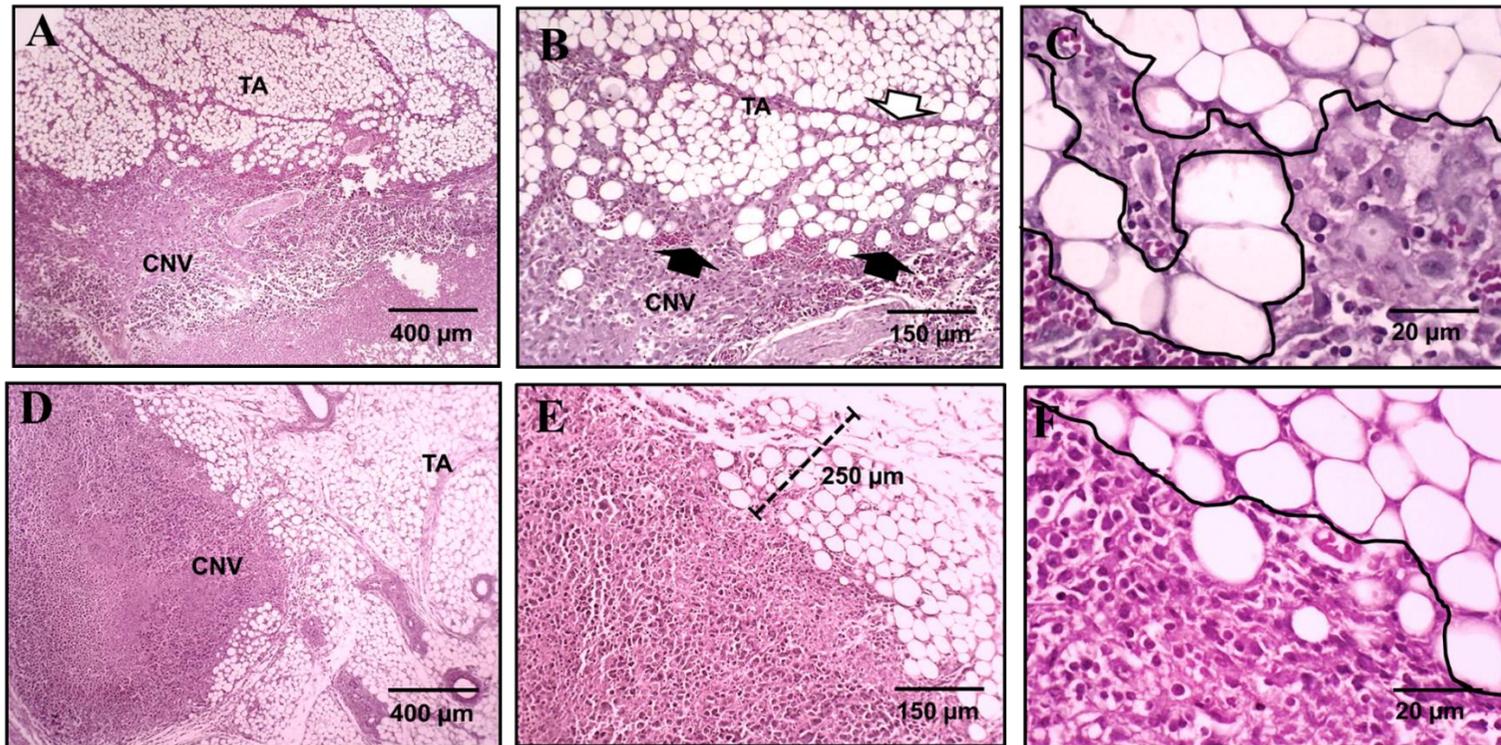


Figura 24 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais tratados, coradas em HE, com destaque para margens e limites tumorais (40x, 100x e 400x)

(A/B e C) tratamento com óleo essencial da *Eplingiella fruticosa* a 100 mg/kg (OEEF100): Tumores grandes, de bordos e margens pouco definidas; quando bem visualizadas, as margens tumorais adjacentes ao tecido adiposo hipodérmico se mostravam bastante irregulares com marcante infiltração periférica (Linha preta contínua); Essas características foram indistinguíveis das observadas para o CTRL, não mostradas. (D/E e F) tratamento com o 5-fluorouracil a 25 mg/kg (5-FU): Tumores de diâmetro pequeno (até 1.4 mm), exibindo margens regulares em relação tecido muscular e adiposo hipodérmico. As áreas de invasão, quando visíveis, não ultrapassam 250 µm no tecido adjacente (Linha tracejada preta); a margem tumoral com o tecido adiposo é bastante regular e bem definida (Linha preta contínua) (400x). Legendas: CNV – células neoplásicas viáveis; TA – tecido adiposo; Setas negras – áreas de infiltração tumoral importante no tecido adiposo; Seta branca – área de microinfiltração no tecido adiposo;

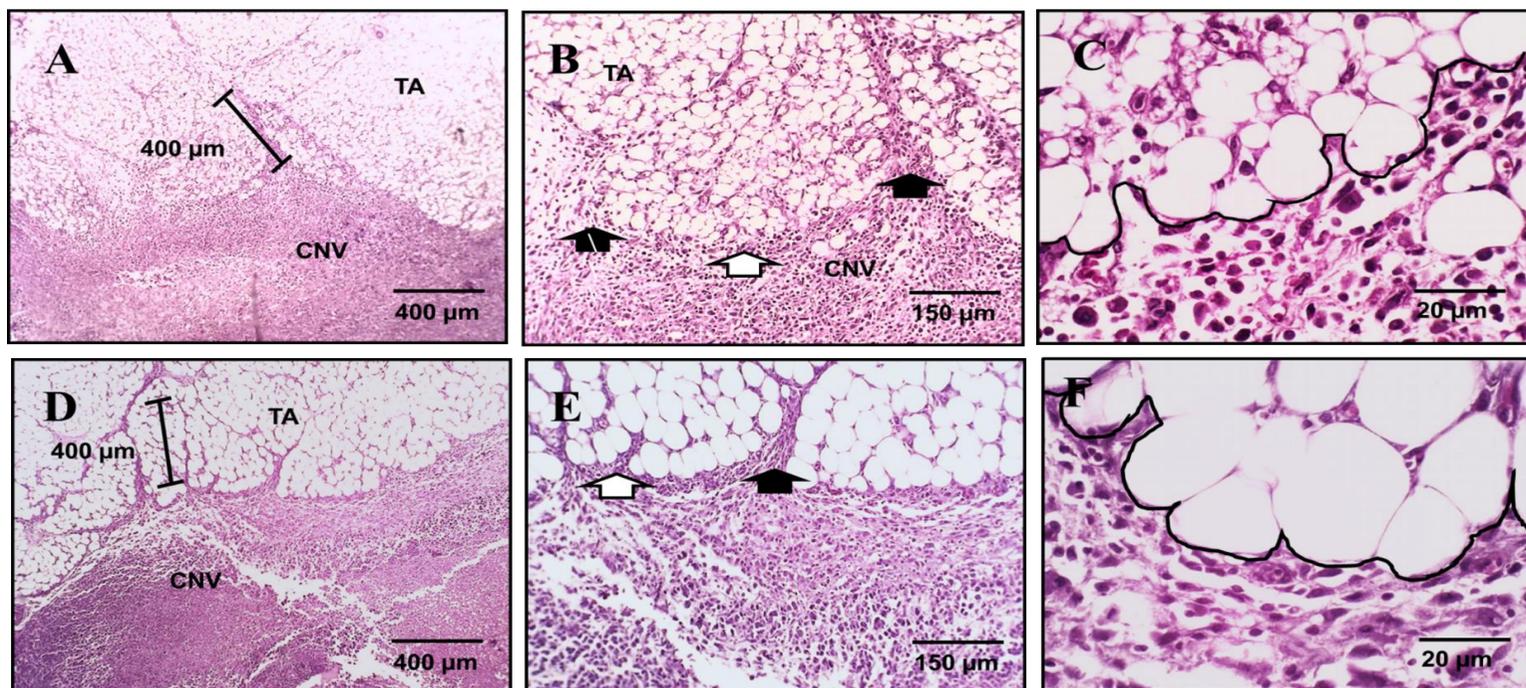


Figura 25 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais tratados com óleo essencial da *Eplingiella fruticosa* a 25 e 50 mg/kg, coradas em HE, com destaque para margens e limites tumorais (40x,100x e 400x)

Os tumores dos grupos OEEF25 (A/B e C) e OEEF50 (D/E e F) se apresentaram muito semelhantes: tumores ainda pequenos (mas com diâmetro maior que 2,5 mm em média) exibindo margens bem menos regulares em relação tecido muscular e adiposo hipodérmico, muitas vezes exibindo aspecto “festonado”. As áreas de infiltração são mais fáceis de observar e chegam a invadir 400 µm ou mais no tecido adiposo adjacente. Legendas: CNV – células neoplásicas viáveis; TA – tecido adiposo; Setas negras – áreas de infiltração tumoral importante no tecido adiposo; Setas brancas – área de microinfiltração no tecido adiposo; Linhas pretas contínua – margem tumoral com o tecido adiposo exibindo aspecto “festonado”.

A invasão ou infiltração tumoral perineural foi vista com facilidade e em grande quantidade de fibras nervosas periféricas no grupo CTRL. Contrariamente, não foram identificados sinais morfológicos de invasão perineural nos grupos 5-FU e OEEF25. Em OEEF50 e OEEF100 as áreas de invasão perineural foram identificadas em todas as amostras, mas esses achados focais foram bem menos evidentes que em CTRL (Figura 26).

Eventualmente foram observadas células tumorais formando êmbolos não aderidos à parede vascular no interior de vênulas e vasos linfáticos. Contudo, esses achados só foram observados em um dos tumores do grupo CTRL, não tendo ocorrido nas demais neoplasias analisadas (Figura 22F).

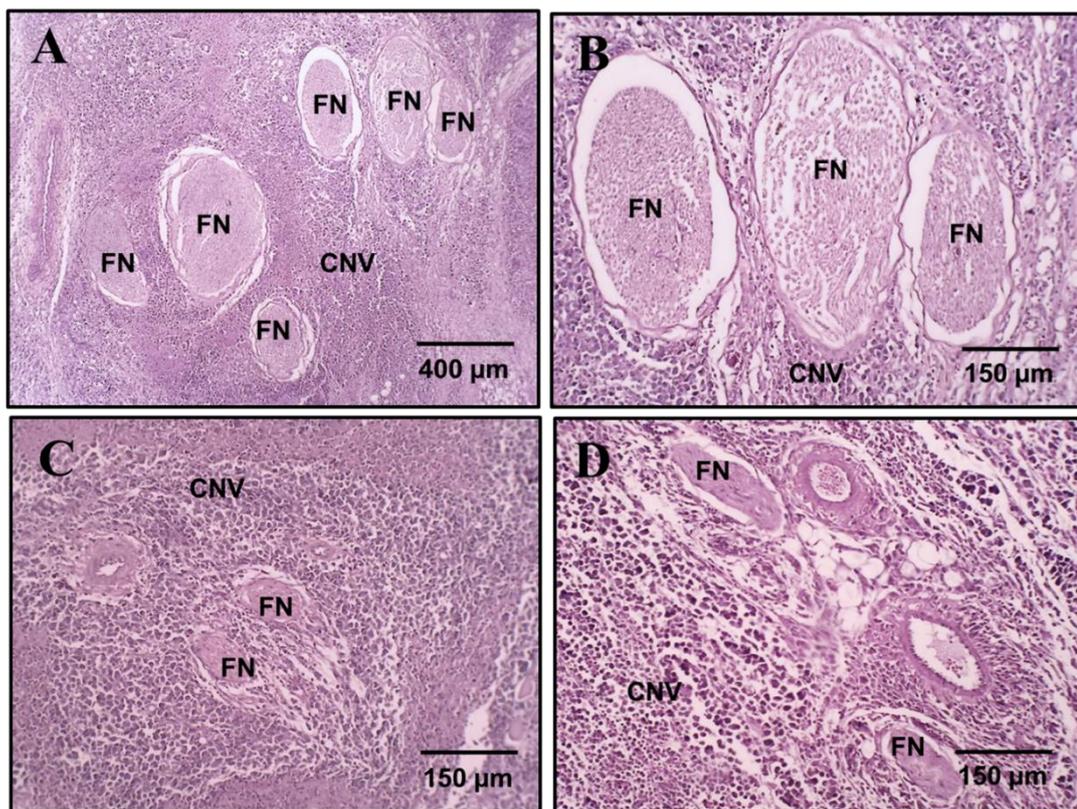


Figura 26 - Secções histológicas de tumores Sarcoma 180 de animais submetidos a diferentes tratamentos, coradas em HE, com destaque para Infiltração tumoral nas bainhas dos nervos periféricos

(A/B) tumores do grupo controle tratados com veículo (DMSO 5%); (C) tumores tratados com óleo essencial da *Eplingiella fruticosa* a 50 mg/kg (OEEF50); (D) tumores tratados com óleo essencial da *Eplingiella fruticosa* a 100 mg/kg (OEEF100). A invasão ou infiltração tumoral perineural foi vista com facilidade e em grande quantidade de fibras nervosas periféricas no grupo CTRL. Não foram evidenciadas áreas de invasão perineural nos grupos 5-FU e OEEF25 (não mostrado). Em OEEF50 e OEEF100 as áreas de invasão perineural foram escassas e focais. CNV – células neoplásicas viáveis; FN – fibra nervosa.

Desta maneira, ficou claro que os grupos tratados com o OEEF25 e OEEF50 foram histologicamente favoráveis com relação ao grupo CTRL. Houve uma nítida redução de invasão perineural, não foram observados embolização tumoral no interior de vênulas e vasos linfáticos. Além disso, os tumores apresentaram margens mais regulares e mais bem definidas. A atipia citológica variou entre leve e moderada e a atividade mitótica foi sensivelmente mais baixa que no grupo CTRL.

Com relação a análise dos outros órgãos (baço, coração e fígado) foi constatado que o tratamento com o OEEF não induziu alterações. Na maioria dos grupos analisados, observou-se que o baço apresentou arquitetura morfológica clássica, constituída de nódulos linfoides de 250 a 500 μm em seus maiores diâmetros, representando a polpa branca, e áreas perinodulares contendo uma rede de sinusoides esplênicos revestidos por células endoteliais alongadas, sustentados por estroma de tecido conjuntivo fibroso frouxo e de aspecto delicado, constituindo a polpa vermelha (Figura 27).

Em contraste, identificou-se atrofia da polpa branca no grupo 5-FU expressa por redução considerável dos folículos ou nódulos linfoides (exibindo entre 50 e 250 μm). Esses achados corroboram com os dados de leucopenia significativa no leucograma (Figura 14) e podem estar relacionados a quadros de imunossupressão importante.

Os espécimes cardíacos exibiram características histológicas similares, e compatíveis com a normalidade. As fibras musculares cardíacas estavam organizadas em grupos de feixes constituídos por células alongadas e ramificadas que apresentam estriações transversais, apresentando um ou dois núcleos localizados no centro da fibra muscular. Não foram observadas alterações degenerativas, inflamatórias ou necróticas em nenhum dos grupos analisados (Figura 28).

O parênquima hepático estava constituído por hepatócitos de formato poliédrico com citoplasma eosinofílico discretamente granular, dispostos em placas celulares que se direcionavam da periferia para o centro do lóbulo hepático. O espaço entre essas placas celulares continha diminutos vasos sinusoides (capilares compostos de uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas) que corriam radialmente, convergindo para o centro do lóbulo para formar a veia centro lobular. Na periferia dos lóbulos, observou-se o espaço porta, constituído de área de tecido conjuntivo fibroso apresentando ramos da artéria hepática, da veia porta, dos ductos biliares e vasos linfáticos. Desta maneira, conclui-se que os espécimes hepáticos exibiram características histológicas similares entre os grupos, e compatíveis com a normalidade (Figura 29).

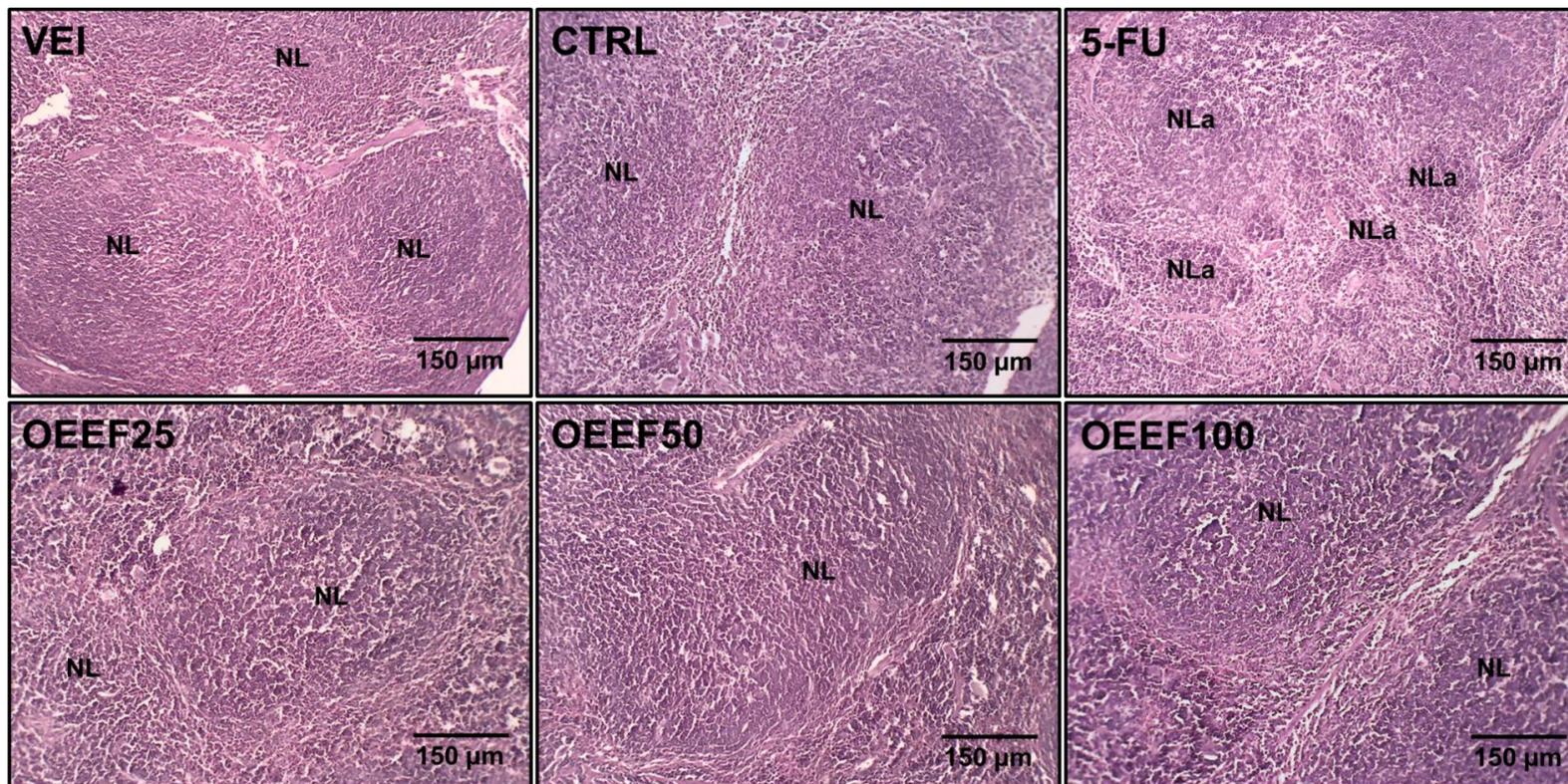


Figura 27 - Secções histológicas de baços removidos de animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais, coradas em HE (100x)

Destaque para a polpa branca constituída de nódulos ou folículos linfóides de diâmetro variável. Observar folículos linfóides na maior parte da polpa branca no grupo 5-FU. Legendas: NL – nódulo linfóide compondo a polpa branca do baço; NLa – nódulo linfóide exibindo atrofia (atrofia da polpa branca do baço).

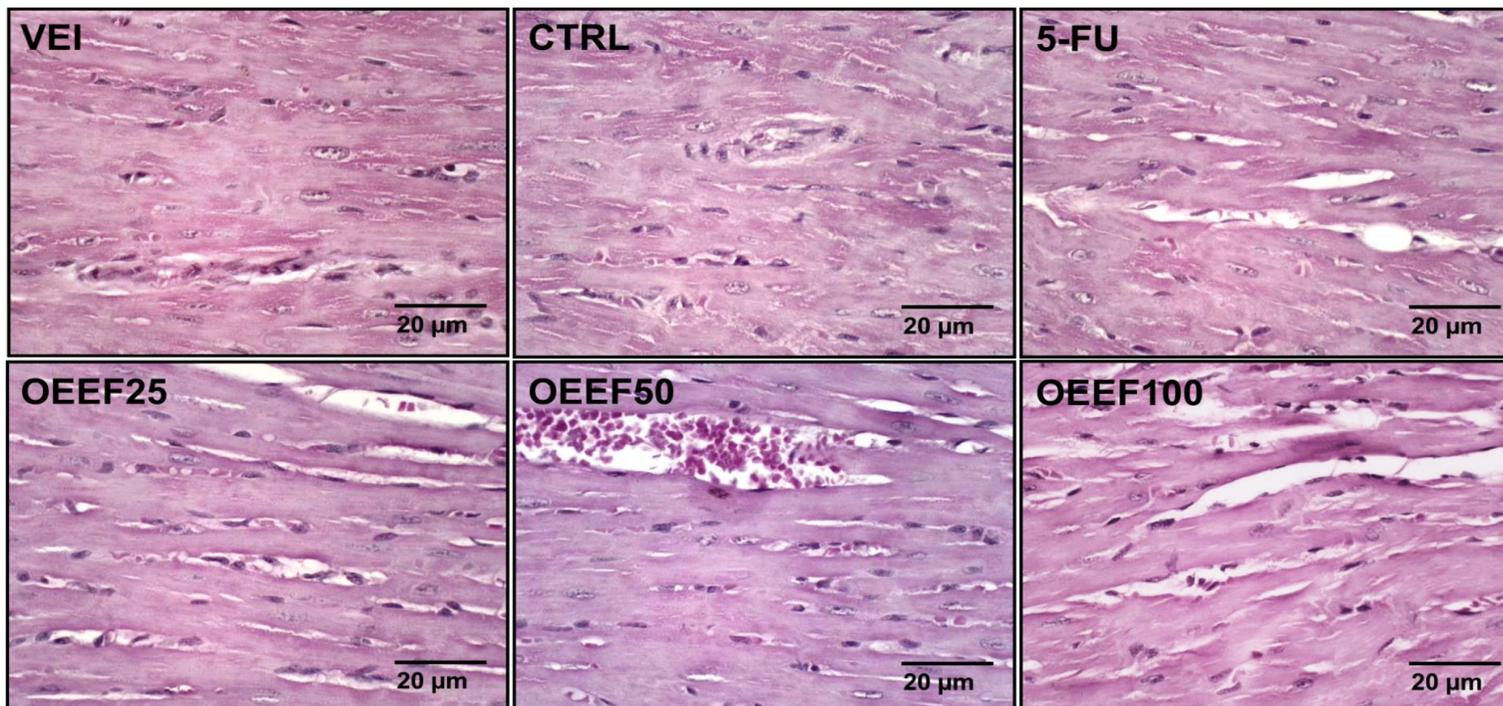


Figura 28 - Secções histológicas de corações removidos de animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais, coradas em HE (400x). Destaque para o miocárdio com características morfológicas usuais constituído por células musculares estriadas cardíacas com formato alongado, citoplasma fortemente eosinofílico e discretamente granular, e núcleos claros periféricos.

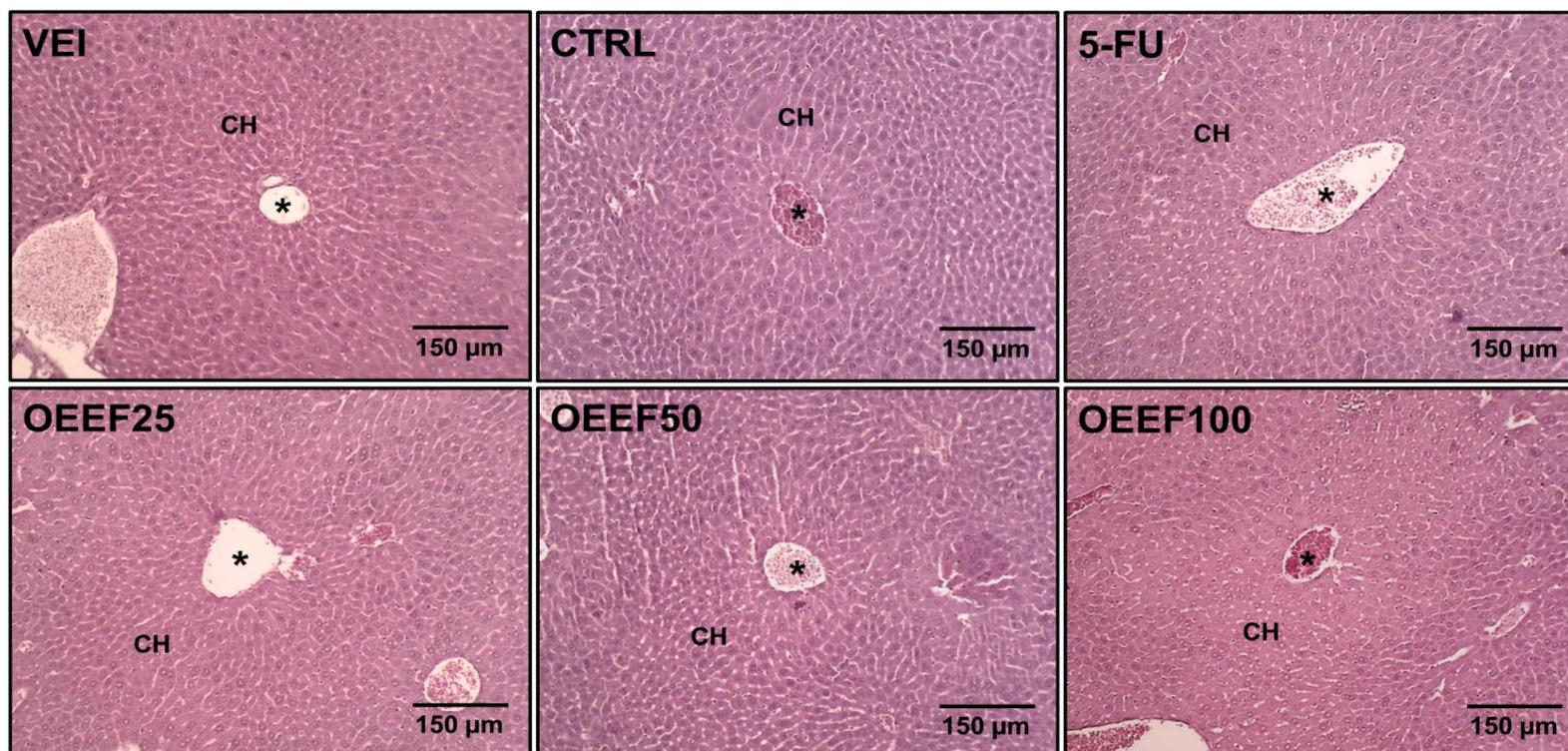


Figura 29 - Secções histológicas de fígados removidos de animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais, coradas em HE (100x)

Destaque para o hepatócito com características morfológicas usuais constituído de citoplasma eosinofílico disposto em placas celulares que se direcionavam da periferia para o centro do lóbulo hepático. (*) veia centrolobular; CH – cordões de hepatócitos em distribuição radial convergindo para a veia centrolobular.

6 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, verifica-se que o óleo essencial extraído das folhas da *Eplingiella fruticosa*, além de apresentar um perfil citotóxico *in vitro* frente às linhagens tumorais avaliadas, também apresentou atividade antitumoral *in vivo*, nas menores doses avaliadas.

É possível que o efeito bem-sucedido de inibição tumoral *in vivo* do OEEF25 e OEEF50 seja, em especial fator, decorrente de seus constituintes majoritários: 1,8-cineol (17,7%), Cânfora (9,36%), β -Cariofileno (8,96 %), além de α -pineno (6,97%), β -pineno (4,72%) e δ -Eiemene (4,62%). As menores doses do OEEF tiveram mais de 87% de inibição tumoral. Em contradição, não houve atividade antitumoral no tratamento com o OEEF100, possivelmente devido a efeitos toxicológicos.

O tratamento com o OEEF teve o potencial de reverter algumas alterações ocasionados no grupo CTRL (possivelmente, decorrentes de danos ocasionados pelo tumor) e além disso, apresentou perfil toxicológico semelhante ao 5-FU ou mais satisfatório, a depender da dose. Adicionalmente, o OEEF25 e OEEF50 foram incapazes de causar alterações na massa corporal e de órgãos: baço, cérebro, fígado e rins. Destaca-se, uma diminuição na massa cardíaca nos grupos OEEF50 e OEEF100, todavia, os dados histológicos do coração foram compatíveis com padrões de normalidade.

Dentre os efeitos adversos observados nos animais com tumor S180 submetidos aos diferentes tratamentos, identificou-se perda de massa corporal (OEEF100 e 5-FU); trombocitopenia (OEEF50, OEEF100 e 5-FU); linfocitose (OEEF50 e OEEF100) e leucopenia (5-FU); o OEEF25 não apresentou toxicidade nos camundongos em nenhum dos parâmetros avaliados;

Desta maneira, conclui-se que o tratamento com as menores doses do OEEF apresentou potencial antitumoral significativo sem evidências de toxicidade nos parâmetros avaliados para o OEEF25.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI, A. et al. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

AGGARWAL, V. et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 735, 2019.

AGLIARI, E. et al. Cancer-driven dynamics of immune cells in a microfluidic environment. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6639, 2014.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AIELLO, P. et al. Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Colon Cancer. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, 2075614.

AKBARALI, H. I. et al. Chemotherapy induced gastrointestinal toxicities. **Advances in Cancer Research**, v. 155, p. 131-166, 2022.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

ALEXA, E. et al. Synergistic Antifungal, Allelopathic and Anti-Proliferative Potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 185, 2018.

ALIMBETOV, D. et al. Pharmacological targeting of cell cycle, apoptotic and cell adhesion signaling pathways implicated in chemoresistance of cancer cells. **international journal of molecular sciences**. Astana, v. 19, n. 6, p. 1690, 2018.

ALVES, P. B. et al. Efeito analgésico do óleo essencial de *Hyptis fruticosa* Salzm. ex. Benth. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2006. Aracaju. **Anais**[...]. Aracaju: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2017. p. 1-2

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

AMARAL, R. G. et al. Cytotoxic, Antitumor and Toxicological Profile of *Passiflora alata* Leaf Extract. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4814, 2020.

AMARAL, R. G. et al. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 8, p. 1100-1106, 2015.

AMAWI, H.; ASHBY, C. R.; TIWARI, A. K. Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting?. **Chinese Journal of Cancer**, Ohio, v. 36, n. 1, p. 50, 2017.

ANAND, U. et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1367-1401, 2022.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. R921-R925, 2020.

ANDRADE, A. M. et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962–968, 2010.

ANDRADE, L. N. et al. In vivo anti-tumor activity and toxicological evaluations of perillaldehyde 8,9-epoxide, a derivative of perillyl alcohol. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 1, p. 32, 2016a.

ARSHAD, U. et al. Prediction of exposure-driven myelotoxicity of continuous infusion 5-fluorouracil by a semi-physiological pharmacokinetic-pharmacodynamic model in gastrointestinal cancer patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 85, n. 4, p. 711-722, 2020.

BARABUTIS, N.; SCHALLY, A. V.; SIEJKA, A. P53, GHRH, inflammation and cancer. **EBioMedicine**, v. 32, p. 1-2, 2018.

BASTOS, T. S. et al. In vivo antitumor effect of the aqueous extract of *Punica granatum* in the Sarcoma 180 murine model. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 26, p. 415-426, 2018.

BASU. A. K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **Int J Mol Sci**, v.19, n.4, p. 970, 2018.

BÉGAY, V. et al. Immune competence and spleen size scale with colony status in the naked mole-rat. **Open Biology**, v. 12, n. 4, p. 210292, 2022.

BESERRA-FILHO, J. I. A. et al. *Eplingiella fruticosa* leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 17-29, 2019.

BEZERRA, D. P. et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224–1231, 2009.

BILTEKIN, S. N. et al. In Vitro Anti-Inflammatory and Anticancer Evaluation of *Mentha spicata* L. and *Matricaria chamomilla* L. Essential Oils. **American Chemical Society Omega**, v. 8, n. 19, p. 17143-17150, 2023.

BJÖRN, N. et al. Whole-genome sequencing and gene network modules predict gemcitabine/carboplatin-induced myelosuppression in non-small cell lung cancer patients. **NPJ Systems Biology and Applications**, v. 6, n. 1, p. 25, 2020.

- BOUKHATEM, M. N. et al. A New Eucalyptol-Rich Lavender (*Lavandula stoechas* L.) Essential Oil: Emerging Potential for Therapy against Inflammation and Cancer. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3671, 2020.
- BRAUMÜLLER, H. et al. The Cytokine Network in Colorectal Cancer: Implications for New Treatment Strategies. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 138, 2022.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRIDI, H.; MEIRELLES, G. C.; POSER, G. L. Subtribe Hyptidinae (Lamiaceae): A promising source of bioactive metabolites. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113225, 2021.
- CATANZARO, E. et al. Natural products to fight cancer: A focus on *Juglans regia*. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 469, 2018.
- CHALMERS, Z. R. et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. **Genome Medicine**. [s. l.], v. 9, n. 1, p. 34, 2017.
- CHHIKARA, B. S.; PARANG, K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. **Chemical Biology Letters**, v. 10, n. 1, p. 451, 2023.
- COPUR, M. S.; MANAPURAM, S. Multiple Primary Tumors Over a Lifetime. **Oncology**, Williston Park, [s. l.] v. 33, n. 7, p. 629-384, 2019.
- DAHAM, S. S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-29, 2015.
- DASARI, S. et al. Pharmacological Effects of Cisplatin Combination with Natural Products in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular**, v. 23, n. 3, p. 1532, 2022.

DEHELEAN, C. A. et al. Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1109, 2021.

DEO, S. V. S.; SHARMA, J.; KUMAR, S. Relatório GLOBOCAN 2020 sobre a carga global do câncer: desafios e oportunidades para oncologistas cirúrgicos, 900., Lyon. **Anais [...]**. Lyon: international agency for research on cancer. **Oncologia Cirúrgica**, v. 29, n. 11, p. 6497-6500, 2022.

DHANASEKARAN, R. et al. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 23-36, 2022.

DIETLEIN, F. et al. Genome-wide analysis of somatic noncoding mutation patterns in cancer. **Science**, [s. l.], v. 376, n. 6589, p. eabg5601, 2022.

DÓRIA, G. A. A. et al. In vivo antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) extracts. **Phytomedicine**, v. 23, n. 9, p. 914-922, 2016.

FAHMY, M. A. et al. Evaluation of the Anti-Cancer/Anti-Mutagenic Efficiency of *Lavandula officinalis* Essential Oil. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 4, p. 1215-1222, 2022.

FIDYT, K. et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FRANCO, C. R. P. et al. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 11, p. 1693-1699, 2011a.

FRANCO, C. R. P. et al. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 24-32, 2011b.

GERSTUNG, M. et al. The evolutionary history of 2,658 cancers. **Nature**, [s. l.], v. 578, n. 7793, p. 122-128, 2020.

GLOBOCAN. **Observatório Global do Câncer (GCO). 2020.** Lyon: Cancer Today.
Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/#>. Acesso em: 15 ago. 2021.

GONZALEZ, H.; HAGERLINGC.; WERB Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes & Development**, v. 32, n. 19-20, p. 1267-1284, 2018.

GRAÇA, A. S. **Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de folhas de *Schinus terebinthifolia raddi* (Anacardiaceae).** 2023. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão-SE, 2023.

GREINER, J. F. W. et al. 1, 8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF- κ B p65 and NF- κ B-dependent transcriptional activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 2866-2878, 2013

GRISARU-TAL, S. et al. A new dawn for eosinophils in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 10, p. 594-607, 2020

HANUS, M. et al. Immune System, Microbiota, and Microbial Metabolites: The Unresolved Triad in Colorectal Cancer Microenvironment. **Frontiers in Immunology** Santiago, v. 12, p. 612826, 2021.

HARLEY, R. M. *Eplingiella brightoniae*, a new species of Hyptidinae (Lamiaceae: Ocimeae) from Northern Bahia, Brazil. **Kew Bull**, [S.l.], v. 69, n. 4, p. 6, 2014.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p. 1-55, 2012.

HEW, L. et al. Histological necrosis in soft tissue sarcoma following preoperative irradiation. **Journal of Surgical Oncology**, v. 57, n. 2, p. 111-114, 1994.

HUH, D. A. et al. Disease Latency according to Asbestos Exposure Characteristics among Malignant Mesothelioma and Asbestos-Related Lung Cancer Cases in South Korea. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Republic of Korea, v. 19, n. 23, p. 15934, 2022.

HUMBERT, P. O. et al. TSPAN6 is a suppressor of Ras-driven cancer. **Oncogene**, [s. l.], v. 41, n. 14, p. 2095-2105, 2022.

INCA. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: 2019

IQBAL, J. et al. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, p. 1381-1393, 2019.

IQBAL, J. et al. Potential phytochemicals for developing breast cancer therapeutics: Nature's healing touch. **European journal of pharmacology**, v. 827, p. 125-148, 2018.

JEONG, J.; SUH Y.; JUNG K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1817, 2019.

JI, R. et al. Splenomegaly during oxaliplatin-based chemotherapy: impact on blood parameters and anti-neoplastic treatment. **Translational Cancer Research**, v. 11, n. 7, p. 1880-1888, 2022.

JUANOLA, O. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Madrid v. 18, n. 10, p. 5227, 2021.

KHALIFA, S. A. M. et al.. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. **Mar Drugs**, v. 17, n. 9, p. 491, 23.

KNIKMAN, J. E. et al. Individualized Dosing of Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy to Prevent Severe Fluoropyrimidine-Related Toxicity: What Are the Options? **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.] v. 109, n. 3, p. 591-604, 2020.

KOBAYASHI, A. et al. Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 45, n. 9, p. 515-537, 2020.

KONTOMANOLIS, E.N.; et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. **Anticancer Research**. [s. l.], v. 40, n. 11, p. 6009-6015, 2020.

KUBATKA, P. et al. Anticancer Activities of *Thymus vulgaris* L. in Experimental Breast Carcinoma *in vivo* and *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1749, 2019.

LABRIE, M. et al. Therapy resistance: opportunities created by adaptive responses to targeted therapies in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 6, p. 323-339, 2022.

LASHEN, A. et al. The characteristics and clinical significance of atypical mitosis in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 35, n. 10, p. 1341-1348, 2022

LIMA, A. C. B. et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 192-197, 2013

LIMA, A.C.B et al. **Formulação contendo folhas da planta *Hyptis* preferencialmente da espécie fruticosa para atividade antitumoral**. Disponível na base de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPE) sob número de processo BR10 2019 002065 2, 2020a.

LIMA, R.M.T. et al. Antitumoral effects of [6]-gingerol [(S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone] in sarcoma 180 cells through cytogenetic mechanisms. **Biomed Pharmacother**. v.126:110004, 2020b. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110004.

- LIU, D. et al. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in cholangiocarcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 127, 2022.
- LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- MACHADO, T.Q. et al. A Narrative Review of the Antitumor Activity of Monoterpenes from Essential Oils: An Update. **Biomed Res Int**, 2022, 6317201.
- MALLADI, S. et al. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. **Cell**, [s. 1.] v. 165, n. 1, p. 45-60, 2016.
- MANDRICH, L; CAPUTO, E. Brassicaceae-derived anticancer agents: Towards a green approach to beat cancer. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 868, 2020.
- MARQUES, M. P. et al. Essential Oils from *Côa valley* Lamiaceae Species: Cytotoxicity and Antiproliferative Effect on Glioblastoma Cells. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 341, 2023.
- MEIRELES, D. R. P. et al. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. . **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 751-758, 2016.
- MELO, A. J.O et al. *Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) essential oil complexed with β -cyclodextrin improves its anti-hyperalgesic effect in a chronic widespread non-inflammatory muscle pain animal model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110940, 2020.
- MENEZES, I. A. C. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 192-195, 2007.
- MOHAMMED, H. A. et al. Sage, *Salvia officinalis* L., Constituents, Hepatoprotective Activity, and Cytotoxicity Evaluations of the Essential Oils Obtained from Fresh and Differently Timed Dried Herbs: A Comparative Analysis. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5757, 2021.

MONTELLA, L. et al. Looking Beyond the Glioblastoma Mask: Is Genomics the Right Path? **Frontiers in Oncology**, [S.l.], v. 12, p. 926967, 2022.

MOREIRA, Í. J. A. et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 762-765, 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTHANA, R. A. et al. Analysis of Chemical Composition and Assessment of Cytotoxic, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Meriandra dianthera* Growing in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2647, 2019.

MOURA, A. P. G. et al. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093-3102, 2016.

NEGANOVA, M. et al. Therapeutic Influence on Important Targets Associated with Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Cancer Treatment. **Cancers**, Basel, [s. l.], v. 13, n. 23, p. 6062, 2021.

PATELLI, G. et al. Strategies to tackle RAS-mutated metastatic colorectal cancer. **European Society for Medical Oncology Open**, Milan, v. 6, n. 3, p. 100156, 2021.

PICKING, D. et al. *Hyptis verticillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 16-41, 2013.

PINHEIRO, B. G. et al. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 123-130, 2015.

POTTER, J. W.; JONES, K. B.; BARROTT, J. J. Sarcoma - The standard-bearer in cancer discovery. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 126, p. 1-5, . 2018.

PRIESTLEY, P. et al. Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. **Nature**, [s. l.] , v. 575, n. 7781, p. 210-216, 2019.

RAIMONDI, S.; SUPPA, M.; GANDINI, S. Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. **Acta Dermatology and Venereology**, [s. l.], v. 100, n. 11, p. adv00136, 2020.

RAJABI, S. et al. Looking at Thyroid Cancer from the Tumor-Suppressor Genes Point of View. **Cancers**, Basel, v. 14, n. 10, p. 2461, 2022.

RAMOS, D. B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 148-157, 2019.

RICARTE, L. P. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Vitex-agnus castus*, *Ocimum campechianum* and *Ocimum carnosum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 1, p. e20180569, 2020.

RIHACEK, M. et al. Sunitinib-Induced Elevation of Mean Corpuscular Volume (MCV)- Exploring Its Possible Clinical Relevance in Cancer Patients. **Current Oncology**, v. 29, n. 6, p. 4138-4147, 2022.

RINGEL, A. E. et al. Obesity Shapes Metabolism in the Tumor Microenvironment to Suppress Anti-Tumor Immunity. **Cell**, v. 183, n. 7, p. 1848-1866.e26, 2020.

ROLIM, T. L. et al. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 347, 2017.

SAGINALA, K. et al. Epidemiology of Melanoma. **Medical Sciences**, Basel, v. 9, n. 4, p. 63, 2021.

SALEHI, B. et al. Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 738, 2019.

SANNINO, G. et al. Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Mesenchymal Tumors: A Paradox in Sarcomas? Paradox of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Sarcoma. **Cancer Research**, v. 77, n. 17, p. 4556-4561, 2017.

SANTOS, S. A. et al. Antitumor Profile of Combined Matricaria recutita Flower Extract and 5-Fluorouracil Chemotherapy in Sarcoma 180 In Vivo Model. **Toxics**, v. 11, n. 4, p. 375, 2023.

SANTOS, U. S. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eplingiella fruticosa*, *Gymneia platanifolia* e *Medusantha martiusii* (Lamiaceae) contra micro-organismo de interesse agrícola**. 2016. Dissertação (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

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

SHI, W. W. et al. Integrative transcriptional characterization of cell cycle checkpoint genes promotes clinical management and precision medicine in bladder carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 915662, 2022.

SIBILLE, A. et al. Eosinophils and Lung Cancer: From Bench to Bedside. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5066, 2022.

SILVA, A. B. L. et al. Evaluation of the analgesic effect and acute toxicity of the aqueous extract of *Hyptis fruticosa* (Salmz. ex Benth.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 475-479, 2006.

SILVA, D. C. **Diversidade química, genética e estudo do potencial formicida de óleos essenciais de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. Ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore**. 2017. 70 f. Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2017.

SILVA, D. C. et al. Toxicity and behavioral alterations of essential oils of *Eplingiella fruticosa* genotypes and their major compounds to *Acromyrmex balzani*. **Crop Protection**, v. 116, p. 181-187, 2019.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SOUZA, L. I. O. **Avaliação in vitro do potencial tripanocida, citotóxico e imunomodulador de óleos essenciais de plantas da Caatinga**. 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

SPYRIDOPOULOU, K. et al. Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of *Origanum onites* L. Essential Oil. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2612, 2019.

SUN, J. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils from six lamiaceae folk medicinal plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 919294, 2022.

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. 71, n. 3, p. 209–249, 2021

TAFRIHI, M. et al. The Wonderful Activities of the Genus *Mentha*: Not Only Antioxidant Properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1118, 2021.

TAN, T. et al. Epigenetic modification regulates tumor progression and metastasis through EMT (Review). **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 70, 2022.

TEIXEIRA, A. M.; SOUSA, C. A Review on the Biological Activity of *Camellia* Species. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2178, 9 abr. 2021.

THOENEN, E.; CURL, A.; IWAKUMA, T. TP53 in bone and soft tissue sarcomas. *Pharmacol Ther*, v. 202, p. 149-164, 2019.

VARRICCHI, G. et al. Eosinophils: The unsung heroes in cancer? **Oncoimmunology**, v. 7, n. 2, p. e1393134, 2017.

VEGLIA, F. et al. Analysis of classical neutrophils and polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients and tumor-bearing mice. **J Exp Med**, v. 218, n. 4, e20201803, 2021.

WANG, L. H. et al. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Basel, v. 51, n. 6, p. 2647-2693, 2018.

WANG, W. et al. The anticancer activities of wogonin in murine Sarcoma S180 both in vitro and *in vivo*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 1132-7, 2006.

WEINBERG, F. et al. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 8, p. 1191, 2019.

WU, C.; HUA, Q.; ZHENG, L. Generation of Myeloid Cells in Cancer: The Spleen Matters. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1126, 2020.

WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, 2018.

WU, S. et al. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 43-47, 2016.

WU, S. Y. et al. Natural killer cells in cancer biology and therapy. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 120, 2020.

XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 70, n. 5-6, p. 129-137, 2015.

XIA, L. et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 28, 2021.

XIANG, F. Comparative analysis and morphemic-derivational features of the medical term "cancer" in chinese, english and russian. **Восточно-европейский научный журнал**, n. 2-1 (18), p. 65-67, 2017.

YIN, W. et al. Cancer and stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, [s. l.], v. 246, n. 16, p. 1791-1801, 2021.

ZHANG, X. et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. **Gut**, Hong Kong v. 70, n. 4, p. 761-774, 2021.

ZHANG, Y. et al. Novel camphor-based pyrimidine derivatives induced cancer cell death through a ROS-mediated mitochondrial apoptosis pathway. **RSC Adv**, v. 9, n. 51, p. 29711-29720, 2019 .

ZHAO, Y. et al. In Vitro and In Vivo Efficacy Studies of *Lavender angustifolia* Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. **Integr Cancer Ther**. v. 16, n.2, p. :215-226, 2017.

ANEXOS

Anexo 1 Certificado de aprovação de estudo envolvendo animais para fins de pesquisa científica emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal.



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DA *Eplingiella fruticosa*", protocolada sob o CEUA nº 1610191119 (ID 000272), sob a responsabilidade de **Charles dos Santos Estevam** e equipe; **RICARDO GUIMARÃES AMARAL**; **ARIEL DE SOUZA GRAÇA**; **JESICA BATISTA DE SOUZA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 15/06/2020.

We certify that the proposal "ANTI-TUMOR EVALUATION OF COMPOUNDS EXTRACTED FROM *Eplingiella fruticosa* LEAVES", utilizing 700 Heterogenics mice (700 males), protocol number CEUA 1610191119 (ID 000272), under the responsibility of **Charles dos Santos Estevam** and team; **RICARDO GUIMARÃES AMARAL**; **ARIEL DE SOUZA GRAÇA**; **JESICA BATISTA DE SOUZA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 06/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2020** a **06/2023** Área: **Fisiologia**

Origem:	Biotério da Universidade Federal de Sergipe		
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos
		idade:	6 a 8 semanas
		N:	700
Linhagem:	swiss	Peso:	20 a 22 g

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Dor (LAFID), no departamento de fisiologia

São Cristóvão, 14 de julho de 2020

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

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

Anexo 2- Material de divulgação científica para a sociedade



SE LIGA NA PESQUISA

Divulgação científica




SE LIGA NA PESQUISA

Título do trabalho:

ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA *Eplingiella fruticosa*

Discente: Jessica Batista de Souza
Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

<http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis>

O câncer é uma das doenças que mais acomete e causa óbito na população a nível mundial.




A pesquisa com plantas medicinais tem sido importante na busca de novos fármacos para tratar a doença. Mais de 60% dos medicamentos anticâncer usados atualmente são derivados de plantas (MANDRICH et al., 2020).



Espécies vegetais da família Lamiaceae têm apresentado efeitos consideráveis contra tumores malignos induzidos em animais de laboratório.




A *Eplingiella fruticosa* ou Alecrim do Tabuleiro (Lamiaceae), uma planta medicinal utilizada pela população principalmente para o alívio da dor, merece destaque na investigação contra o câncer.



Demonstrou-se que a fração clorofômica obtida de suas folhas possui propriedades antitumorais contra células de tumor S180 em camundongos (LIMA et al., 2020a). Todavia, não encontramos registro na literatura de atividade anticancerígena de seu óleo essencial.

Sendo assim, investigamos o potencial anticancerígeno do óleo essencial obtido das folhas da *Eplingiella fruticosa* (OEEF), bem como avaliamos possíveis efeitos colaterais causados.



Nossos objetivos específicos consistiram em:

1. Identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas do Alecrim do Tabuleiro;
2. Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial frente a linhagens de células tumorais humanas;
3. Avaliar se o óleo essencial diminuía o crescimento do tumor S180 de camundongos transplantados;
4. Verificar se o óleo essencial produzia efeitos adversos em camundongos com tumor o S180;




Coletamos as folhas da planta e no laboratório extraímos o seu óleo essencial. Além disso, os compostos químicos presentes no óleo foram identificados.



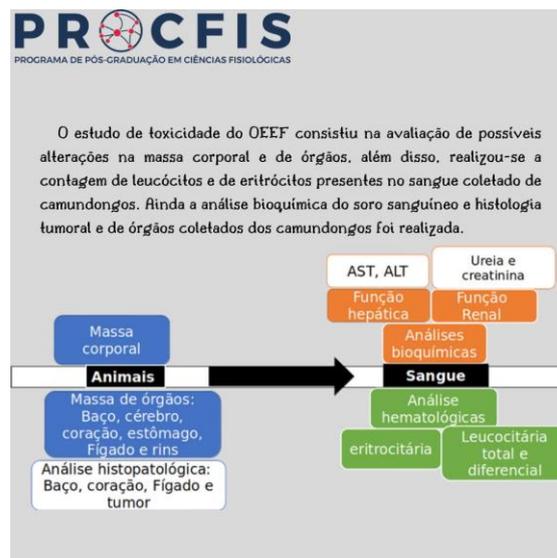
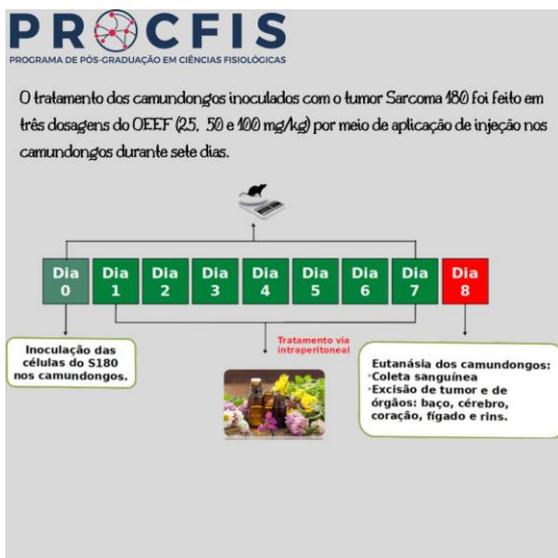


Figura 5 - População natural de *Eplingiella fruticosa* localizada no povoado Freixo município de São Cristóvão, Sergipe.

O OEEF foi testado em quatro tipos de células tumorais isoladas e também, em camundongos injetados com um outro tipo de célula cancerígena (Sarcoma 180) que levou à formação de um tumor neles.



In vivo *In vitro*



PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Neste estudo, foram identificados 80 compostos no OEEF, sendo 21 considerados majoritários, merecendo destaque 1,8-cineol (17,07%), Cânfora (9,36%), β -Cariofileno (8,96%) e α -pineno (6,97%).

No teste contra as células humanas isoladas, verificou-se que o OEEF diminuiu a proliferação celular de todos os tipos de câncer avaliados, como câncer de cólon retal, cerebral, de próstata e de leucemia.

Surpreendentemente, o OEEF nas menores dosagens apresentou um resultado excelente no tratamento dos camundongos doentes, pois reduziu em mais de 87% o tamanho dos tumores.

Quando avaliamos se o OEEF produzia efeitos prejudiciais nos animais, verificamos que o mesmo na dosagem de 25 mg/kg foi incapaz de piorar a saúde dos camundongos com câncer. Além disso, normalizou algumas alterações ocasionadas pela presença da doença.

O OEEF na dose de 25 mg/kg teve um resultado semelhante ao do medicamento 5-Fluorouracil (25 mg/kg) quanto a redução do tumor e, por ora, efeitos mais satisfatórios em outros parâmetros.

Como exemplo, observamos uma queda na imunidade e perda de peso nos camundongos tratados com o 5-FU, efeitos estes não observados para o tratamento com o OEEF25.

Efeitos adversos foram identificados nas maiores doses do OEEF, além disso, na dose de 100 mg/kg não houve redução dos tumores.

Concluimos que o tratamento com as menores doses do OEEF apresentou potencial antitumoral significativo sem evidências de efeitos adversos nos parâmetros avaliados com relação ao OEEF25.

