



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

ISABELA BORGES DA MOTA SILVEIRA

**TRIAGEM PARA ATIVIDADE ANTICÂNCER E TOXICIDADE DE EXTRATOS DE
TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Campomanesia***

CAMPO GRANDE – MS

ABRIL-2023

ISABELA BORGES DA MOTA SILVEIRA

**TRIAGEM PARA ATIVIDADE ANTICÂNCER E TOXICIDADE DE EXTRATOS DE
TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Campomanesia***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof^ª Dra. Renata Trentin Perdomo

CAMPO GRANDE – MS

ABRIL-2023

TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELA BORGES DA MOTA SILVEIRA

TRIAGEM PARA ATIVIDADE ANTICÂNCER E TOXICIDADE DE EXTRATOS DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Campomanesia*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

10 de março de 2023

Comissão Examinadora:

Prof^a Dra. Renata Trentin Perdomo – (Orientadora)

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof^a. Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS)

Prof^a Dra. Ana Tereza Gomes Guerrero

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Ficha Catalográfica
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Biblioteca Central

S588t Silveira, Isabela Borges da Mota.
TRIAGEM PARA ATIVIDADE ANTICÂNCER E TOXICIDADE DE EXTRATOS DE TRÊS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Campomanesia* / Isabela Borges da Mota Silveira. – 2023.
58 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de
Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Campo
Grande, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo.

1. Campomanesia. 2. Câncer. 3. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 572

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os momentos de aprendizado e por ter colocado no meu caminho pessoas que fizeram diferença nesses anos de pesquisa.

Obrigada Professora Dra. Renata Trentin Perdomo, por ter me aceitado e acreditado na minha força de vontade e dedicação. Por ser paciente em momentos difíceis, e por incentivar todas as nossas ideias e experimentos.

Ao meu trio de pesquisa, Emilly Areco e Melquisedeque Mateus, meus amigos que sempre estavam comigo, ajudando com opiniões e discussões sobre experimentos e resultados. A minha mãe, Ana Paula, e minha vó, Risolete, duas pessoas essenciais nessa trajetória, dia a dia me dando forças com palavras de amor, encorajamento, me mostrando o quanto sou capaz de melhorar e crescer todos os dias. Aos meus padrinhos, Maria Helena e Rogério, muito obrigada pelo carinho, toda torcida e palavras de apoio.

Ao meu namorado e companheiro de todos os dias, Alexandre, que sempre incentiva minhas ideias, as inúmeras vezes em que falo de pesquisa, agradeço por tanto amor e carinho, por estar presente sempre!

Agradeço a todo apoio do laboratório de cultura, a Dra. Giovana Bicudo por ter me ensinado tudo que sei na prática e por todos conhecimentos passados.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), e ao Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) pelo suporte acadêmico, financeiro, todo conhecimento obtido e pela oportunidade de obter o título de Mestre.

A todos que passaram pela minha vida nesses dois preciosos anos tornando meus dias melhores e que colaboraram de uma maneira para minha pesquisa, muito obrigada!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 FITOTERAPIA CONTEMPORÂNEA / PRODUTOS NATURAIS	16
2.2 GÊNERO <i>CAMPOMANESIA</i>	18
2.3 ESPÉCIES <i>C. ADAMANTIUM</i> , <i>C. PUBESCENS</i> E <i>C. SESSILIFLORA</i>	18
2.3.1 <i>Campomanesia adamantium</i>	18
2.3.2 <i>Campomanesia pubescens</i>	21
2.3.3 <i>Campomanesia sessiliflora</i>	24
2.4 CÂNCER	25
2.4.1 TRATAMENTO ANTICANCER	26
2.5 APOPTOSE	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	30
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	31
4.2.2 NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS:	31
4.3 TESTES BIOLÓGICOS	31
4.3.1 <i>LINHAGENS CELULARES</i>	31
4.3.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	32
□ <i>Definições e termos usados na avaliação da citotoxicidade:</i>	32
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	32

4.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM SRB (SULFORROFAMINA B) EM MODELO DE CULTURA CELULAR EM MONOCAMADA	32
4.6 FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO EM MODELO 2D – (AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA)	34
4.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5. RESULTADOS	35
5.1 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA FRENTE A LINHAGENS TUMORAIS E LINHAGEM NÃO TUMORAL	35
5.1.1 <i>CAMPOMANESIA ADAMANTIUM</i>	35
5.1.2 <i>CAMPOMANESIA PUBESCENS</i>	37
5.1.3 <i>CAMPOMANESIA SESSILIFLORA</i>	38
5.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE	40
5.3 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA EM 2D COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO	41
5.3.1 <i>CAMPOMANESIA ADAMANTIUM</i> – FLUORESCÊNCIA PARA LINHAGEM 786-0 E MDA-MB-231	42
5.3.2 <i>CAMPOMANESIA PUBESCENS</i> – FLUORESCÊNCIA PARA LINHAGEM 786-0 E MDA-MB-231	44
5.3.3 <i>CAMPOMANESIA SESSILIFLORA</i> – FLUORESCÊNCIA PARA LINHAGEM 786-0 E MDA-MB-231	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO.....	54
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Campomanesia adamantium</i> : a) Frutos de <i>C. adamantium</i> ; b) Flor de <i>C. adamantium</i> ; c) gabirobeira.....	19
Figura 2 – <i>Campomanesia pubescens</i> : a) Flor <i>C. pubescens</i> ; b) Gabirobeira; c) folhas de <i>C. pubescens</i>	22
Figura 3 – Folhas e flores de <i>Campomanesia sessiliflora</i>	24
Figura 4 – Mecanismos da apoptose: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose;	29
Figura 5 - Gráfico de atividade antiproliferativa de CA2% e CAET2% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml testado com SRB.	37
Figura 6 - Gráfico de atividade antiproliferativa de CP2% e CPET2% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml testado com SRB.	38
Figura 7 – Gráfico de atividade antiproliferativa de CS2% e CSET2% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml testado com SRB.	39
Figura 8 - Controle negativo e positivo de 786-0.....	41
Figura 9 - Controle negativo e positivo de MDA-MB-231.....	42
Figura 10 – Efeito de CA2% e CAET2% em células tumorais de 786-0 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.....	43
Figura 11 – Efeito de CA2% e CAET2% em células tumorais de MDA-MB-231 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.....	44
Figura 12 – Efeito de CP2% e CPET2% em células tumorais de 786-0 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.	45
Figura 13 - Efeito de CP2% e CPET2% em células tumorais de MDA-MB-231 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.....	46
Figura 14 - Efeito de CS2% e CSET2% em células tumorais de 786-0 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.....	47
Figura 15 - Efeito de CS2% e CSET2% em células tumorais de MDA-MB-231 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Artigos selecionados de <i>Campomanesia adamantium</i>	20
Tabela 2 – Artigos selecionados de <i>Campomanesia pubescens</i>	23
Tabela 3 – Artigos selecionados de <i>Campomanesia sessiliflora</i>	25
Tabela 4 – Tipos de câncer mais frequentes em mulheres e em homens	26
Tabela 5 – Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das amostras da espécie de <i>C. adamantium</i> nas linhagens celulares	36
Tabela 6 – Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das amostras da espécie de <i>C. pubescens</i> nas linhagens celulares	37
Tabela 7 – Valores de GI ₅₀ (µg/mL) das amostras da espécie de <i>C. sessiliflora</i> nas linhagens celulares	39
Tabela 8 - Índice de seletividade para extratos aquosos e etanólicos de <i>C. adamantium</i> , <i>C. pubescens</i> e <i>C. sessiliflora</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Célsius
µL	Microlitro
µg	Micrograma
2D	bidimensional
786-0	Adenocarcinoma renal
ALT	alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartato aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção Cultura Tipo Americana)
BA	Bahia
CA2%	<i>Campomanesia adamantium</i> a 2% (extrato aquoso)
CAET2%	<i>Campomanesia adamantium</i> a 2% (extrato etanólico)
cel	Célula
CN	Controle Negativo
CP2%	<i>Campomanesia pubescens</i> a 2% (extrato aquoso)
CPET2%	<i>Campomanesia pubescens</i> a 2% (extrato etanólico)
CS2%	<i>Campomanesia sessiliflora</i> a 2% (extrato aquoso)
CSET2%	<i>Campomanesia sessiliflora</i> a 2% (extrato etanólico)
DOXO	Doxorrubicina
D.O	Densidade Óptica
DAMPs	Damage-associated molecular pattern (Padrão molecular associado a danos)
DF	Distrito Federal
dl	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido

EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
GI	Growth Inhibition (Inibição de Crescimento)
GI₅₀	Growth Inhibition 50 (concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular)
Globocan	Global Cancer Observatory (Observatório Global do Câncer)
HEPES-Na	4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanossulfonato de ácido sódico
HEPG2	Carcinoma (Hepatocelular)
HT-29	Adenocarcinoma (Cólon)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de Seletividade
LC₅₀	Concentração letal média
MA	Manaus
MCF-7	Adenocarcinoma (mama)
MDA-MB-231	Adenocarcinoma (mama)
MG	Minas Gerais
miRNA	Micro Ácido Ribonucleico
mL	Mililitros
mg	Miligramas
mM	Micromolar
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio

NIH/3T3	Fibroblasto (Murino);
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PC-03	Adenocarcinoma (Próstata)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Piauí
RDC	Regime Diferenciado de Contratações Públicas
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
SP	São Paulo
SRB	Sulforrodamina B
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
T0	Tempo Zero
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Total growth inhibition (Concentração que inibe 100% o Crescimento Celular)
TNF	Tumor necrosis factor (Fator de Necrose Tumoral)
TNFR	Tumor necrosis factor receptor (Receptor do Fator de Necrose Tumoral)
TO	Tocantins
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados

RESUMO

Plantas do gênero *Campomanesia ssp*, pertencem a família *Myrtaceae*, possuindo 36 espécies conhecidas, sendo 31 delas na flora brasileira e são produtoras de substâncias com propriedades biológicas importantes tais como anti-inflamatória, antidiarreica, antimicrobiana e apresentam também atividades antioxidantes. Selecionamos três espécies do gênero *Campomanesia ssp*, *C.adamantium*; *C. pubescens* e *C. sessiliflora*, mais frequentes no Cerrado do MS, para estudos de toxicidade e atividade anticâncer. Desta forma, realizou-se a triagem da atividade anticâncer e toxicidade de extratos aquosos e etanólicos de folhas das espécies *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora*, usando modelo de cultura celular em monocamada em linhagens neoplásicas humanas e não neoplásicas: 786-0 (adenocarcinoma renal), HEP-G2 (hepatocarcinoma – fígado), HT-29 (adenocarcinoma cólon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB- 231 (adenocarcinoma de mama triplonegativo) e NIH-3T3 (fibroblasto murino), pelo método de sulforrodamina B, e a atividade apoptótica foi avaliada pela marcação com corantes fluorescentes. Foram selecionadas duas linhagens para avaliação de apoptose com brometo de etídio e laranja de acridina (786-0 e MDA-MB-231). O extrato etanólico da *C. adamantium* apresentou efeito antiproliferativo e estímulo a apoptose na maior concentração testada em ambas as linhagens celulares enquanto o extrato aquoso se mostrou inativo. A espécie *C. pubescens* apresentou atividade citotóxica contra as células de câncer, com extrato aquoso: 786-0 (69,18 µg/mL), MDA-MB-231 (66,65 µg/mL) e HEPG2 (69,43 µg/mL), sem toxicidade contra as células NIH/3T3 (158,02 µg/mL) , porém sem atividade de estímulo a apoptose para os extratos aquosos e etanólicos. A espécie *C. sessiliflora*, extrato etanólico, apresentou maior destaque com estímulo a apoptose contra as células de câncer de 786-0 (116,25 µg/mL) e MDA-MB-231 (196,42 µg/mL) apresentando relativa toxicidade frente às células não tumorais. Estes resultados demonstram a heterogeneidade de compostos entre os extratos aquosos e etanólicos e entre as espécies, com indicação de causar dano celular com estímulo de apoptose. As espécies estudadas apresentam potencial para continuidade dos estudos a fim de elucidar a toxicidade a atividade anticâncer.

Palavras-chave: *Campomanesia*, câncer, citotoxicidade

ABSTRACT

Plants of the genus *Campomanesia ssp* belong to the Myrtaceae family, with 36 known species, 31 of them in the Brazilian flora and are producers of substances with important biological properties such as anti-inflammatory, antidiarrheal, antimicrobial and also antioxidant activities. We selected three species of the genus *Campomanesia ssp*, *C. adamantium*; *C. pubescens* and *C. sessiliflora*, which are more frequent in the Cerrado of MS, for toxicity and anticancer activity studies. Thus, the anticancer activity and toxicity screening of aqueous and ethanolic extracts of leaves from *C. adamantium*, *C. pubescens* and *C. sessiliflora* species was performed using monolayer cell culture model in human neoplastic and non-neoplastic cell lines: 786-0 (renal adenocarcinoma), HEP-G2 (hepatocarcinoma - liver), HT-29 (colon adenocarcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), MDA-MB- 231 (triple-negative breast adenocarcinoma) and NIH-3T3 (murine fibroblast), by sulforhodamine B method, and apoptotic activity was evaluated by fluorescent dye labeling. Two strains were selected for apoptosis evaluation with ethidium bromide and acridine orange (786-0 and MDA-MB-231). The ethanolic extract of *C. adamantium* showed antiproliferative effect and apoptosis stimulation at the highest concentration tested in both cell lines while the aqueous extract was inactive. The species *C. pubescens* showed cytotoxic activity against cancer cells, with aqueous extract: 786-0 (69.18 $\mu\text{g/mL}$), MDA-MB-231 (66.65 $\mu\text{g/mL}$) and HEPG2 (69.43 $\mu\text{g/mL}$), without toxicity against NIH/3T3 cells (158.02 $\mu\text{g/mL}$) , but without apoptosis stimulating activity for aqueous and ethanolic extracts. The species *C. sessiliflora*, ethanolic extract, showed more prominence with apoptosis stimulation against 786-0 (116.25 $\mu\text{g/mL}$) and MDA-MB-231 (196.42 $\mu\text{g/mL}$) cancer cells, presenting relative toxicity against non-tumor cells. These results demonstrate the heterogeneity of compounds among the aqueous and ethanolic extracts and among the species, with indication of causing cellular damage with apoptosis stimulation. The species studied present potential for further studies to elucidate the toxicity and anticancer activity.

Keywords: *Campomanesia*, cancer, cytotoxicity

1. INTRODUÇÃO

O patrimônio natural brasileiro de grande relevância mundial é caracterizado pela extensão continental e variedade ecossistêmica dos biomas através da diversidade e endemismo das espécies biológicas (ASSUNÇÃO; FELFILI, 2004). Dentre esses biomas, a riqueza da flora do Cerrado brasileiro é considerada como a segunda maior reserva genética de espécies nativas do País. Essa característica contribui para estudos voltados a produtos naturais com atividade biológica para o uso de plantas na medicina tradicional e para uso comercial na produção de produtos fitoterápicos (KLINK; MACHADO, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2018).

Produtos naturais tem se demonstrado como potencial terapêutico ao longo dos anos. Nos últimos 30 anos, de 1328 medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), 24% deles são feitos a partir de produtos naturais ou derivados destes, e o número cresce em relação às drogas anticancerígenas, onde 49% das 174 drogas disponíveis no mercado são obtidas através de protótipos de produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Plantas do gênero *Campomanesia ssp*, pertencem a família *Myrtaceae*, possuindo 36 espécies conhecidas, sendo 31 delas na flora brasileira e são produtoras de substâncias com propriedades biológicas importantes tais como anti-inflamatória, antidiarreica, antimicrobiana (BRANDELLI *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2014; RODRIGUES; CARVALHO, 2001) e apresentam também atividades antioxidantes (COUTINHO *et al.*, 2008; PASCOAL *et al.*, 2011; RAMOS; CARDOSO, 2007), que são atribuídas principalmente à presença de compostos fenólicos, flavonóides, chalconas, carotenóides e vitaminas (COUTINHO *et al.*, 2009).

No Mato Grosso do Sul o fruto da espécie *Campomanesia spp.* (guavira) foi declarada como símbolo do Estado (Lei Estadual Nº 5.082, 07 de novembro de 2017) uma vez que é uma espécie que tem contexto histórico regional pela importância cultural dos guavirais e do consumo da fruta, bem como de produtos originados desta. Desta forma o estudo desta espécie vem sendo estimulado nos Seminários Estaduais da Guavira, de forma que possa gerar produto e renda. As folhas e frutos de *C. adamantium* têm efeito anti-inflamatório, antidiarreico e antisséptico para o trato urinário. A infusão das folhas pode ser usada para obter efeito antirreumático e para diminuição de colesterol no sangue (BIAVATTI *et al.*, 2004).

A *Campomanesia pubescens*, é um arbusto frutífero cujos frutos apresentam polpa suculenta de sabor característico (LORENZI, 2006) e são muito consumidos *in natura* ou na forma de bebidas alcoólicas e doces. (ALICE, 1995). O uso das folhas e cascas do caule na

medicina popular são utilizadas na forma de decocção ou infusão, no tratamento de infecções urinárias e gastrointestinais (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

A *Campomanesia sessiliflora*, é uma planta com poucos estudos sobre suas atividades farmacológicas (ALICE, 1995; DE CASTRO *et al.*, 2020), conhecida como guabirobeira-verde (LORENZI, 2006). Estudos com extratos etanólicos das folhas de *C. sessiliflora* demonstraram atividade fotoprotetora (CATELAN *et al.*, 2019).

Neste contexto, selecionamos três espécies do gênero *Campomanesia ssp*, *C. adamantium*; *C. pubescens* e *C. sessiliflora*, por serem espécies bastante utilizada na medicina popular e na fruticultura, além de serem as mais encontradas no Cerrado do MS. São necessários mais estudos quanto à sua toxicidade e atividades biológicas. Este estudo tem a proposta de investigar a toxicidade, a atividade anticâncer de extratos aquosos e etanólicos de folhas das espécies do gênero *Campomanesia* (*C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora*) em cultura de células de linhagens neoplásicas humanas e não neoplásicas como: 786-0 (adenocarcinoma renal), HEP-G2 (hepatocarcinoma), HT-29 (adenocarcinoma cólon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB- 231 (adenocarcinoma de mama triplonegativo) e NIH-3T3 (fibroblasto murino).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FITOTERAPIA CONTEMPORÂNEA / PRODUTOS NATURAIS

As plantas como uso popular recorrem de influências de culturas orientais e ocidentais pelo uso das plantas *in natura* ou secas sob a forma de infusões, decoctos, macerados de forma aleatória e sem padronização (TYLER *et al.*, 1981). A partir destes conhecimentos e dos incentivos de políticas de uso de plantas, estudos de eficácia e segurança foram sendo desenvolvidos e novos produtos sendo registrados em órgãos reguladores como a Agência Nacional de Vigilância sanitária no Brasil e assim comercializados como fitoterápicos. Desde a criação da ANVISA, 1.185 fitoterápicos foram registrados. Em 2021, apenas 336 (28%) estavam com registros válidos. Uma das explicações é que a maioria destes registros eram de produtos de espécies exóticas. Assim, constata-se que há poucos estudos científicos sobre as plantas nativas, evidenciando uma área que precisa ter maior estudo (BRASIL, 2014b).

O conhecimento sobre as terapias de origem natural tem evoluído de forma gradual e paralela à evolução da história humana. São muitos exemplos de espécies utilizadas na prática tradicional que favorecem a farmacologia com o uso de princípios ativos, uma ciência chamada etnofarmacologia (DE SOUZA *et al.*, 2017).

Com essa concepção, os estudos etnofarmacológicos são usados para delineamento experimental, que tem como objetivo o estudo da espécie como um fármaco em potencial, demonstrando qual ação farmacológica tem maior potencial que validem sua indicação (ALMEIDA, 2011).

Como estratégia para estimular o uso da medicina tradicional e a medicina complementar alternativa, em maio de 2005 a *Política Nacional de Medicina Tradicional e Regulamentação de Medicamentos Fitoterápicos*, discutiu a situação mundial a respeito dos fitoterápicos no Brasil. A inclusão deveu-se do fato do país ter a maior diversidade genética vegetal do planeta, 6 biomas com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies, dentre as quais 30% têm potencial para produção de medicamentos e também, por ter a tradição do uso de plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular (EMBRAPA, 2021; MING *et al.*, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006 disponibilizou opções terapêuticas e preventivas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), dentre elas o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos além de afirmar,

baseado em levantamento realizado em 2004, que 116 municípios de 22 estados brasileiros fazem uso da fitoterapia, e para aumentar o uso de produtos naturais como fitoterápico é preciso estudos acerca de atividades farmacológicas das espécies (BRASIL, 2006).

É importante destacar os termos que referenciam o uso de plantas medicinais, pois as regulamentações são específicas. Sendo assim, de acordo com a RDC n. 14, publicada em 05 de abril de 2010, assume as definições dos termos: 1. derivado vegetal: é “produto da extração de planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros derivados”. 2. Matéria-prima vegetal: “compreende a planta medicinal, a droga vegetal ou o derivado vegetal”. 3. fitoterápico: produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (RDC 26/2014);

Quando a planta medicinal é industrializada, é necessário o conhecimento da mesma e saber como prepara-la para obter o resultado fitoterápico. O processo de industrialização deve padronizar protocolos onde se evita as contaminações por microrganismos, substâncias estranhas e agrotóxicos, além de demonstrar a quantidade e forma correta que deve ser utilizada, permitindo maior segurança de uso (BRASIL, 2014a).

No Brasil, a política pública vigente recomenda a popularização de uso de plantas medicinais e a fitoterapia na atenção primária, tendo a eficácia e a segurança de práticas na conservação da biodiversidade medicinal. Um dos principais fatores que contribui com essa questão no País é a geração de conhecimento sobre princípios ativos de matéria prima nos diversos biomas e seus ecossistemas, devido à grande extensão territorial e as plantas de várias localidades (VILEGAS *et al.*, 2009).

O Cerrado é um bioma brasileiro com 12 mil espécies vegetais, localizado nos estados de Goiás (GO), Tocantins (TO), Maranhão (MA), Piauí (PI), Bahia (BA), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG) , São Paulo (SP) e Distrito Federal (DF) (EMBRAPA, 2021). No MS o Cerrado é propício para espécies com atividades biológicas, seja para preparo de chás para enfermidades cotidianas e tratamentos longos, tintura, xaropes e banhos (CUNHA; BORTOLOTTI, 2011). Dessa forma, produtos de origem natural são de grande interesse para pesquisas e isso se dá por conta da presença de substâncias farmacologicamente ativas, com propriedades biológicas (flavonoides, alcaloides, taninos,

saponinas e terpenóides) que são pesquisadas para ter entendimento dos seus efeitos (KOOTI *et al.*, 2017; SAHREEN *et al.*, 2015).

2.2 GÊNERO *Campomanesia*

Estudo sobre características e propriedades biológicas de plantas do Cerrado demonstraram um aumento considerável do uso da mesma, entre eles, estão as espécies do gênero *Campomanesia*, pertencente à família *Myrtaceae* (DE ANDRADE SILVA; FONSECA, 2016). O Estado de Mato Grosso do Sul detém uma grande diversidade da família *Myrtaceae*, que se apresenta entre as mais importantes, possuindo aproximadamente 133 gêneros e mais de 4000 espécies (GHANNADI; DEZFULY, 2011).

Em novembro de 2017, pela lei 5.082, o fruto da guavira (*Campomanesia ssp.*) foi considerada o símbolo do estado de Mato Grosso do Sul. Plantas do gênero *Campomanesia*, são conhecidas como gabirola, guabirola, guavirola ou guavira, essas plantas tem produção comercial e artesanal, consumidas como frutas, doces, bebidas e na culinária em geral (MATO GROSSO DO SUL (MS), 2017).

Pesquisas com plantas do gênero demonstram a utilização pela população para tratamento de inúmeras enfermidades (ALICE, 1995; DE SOUZA DUARTE *et al.*, 2020) cada espécie apresenta diferentes atividades biológicas como antioxidante (COUTINHO *et al.*, 2008), antidiabética (VINAGRE *et al.*, 2010), anti-inflamatória (VISCARDI, 2017), antimicrobiana (CARDOSO, C. A. L. *et al.*, 2010), antiproliferativa (CARDOSO *et al.*, 2013; PASCOAL, A. C. *et al.*, 2014) e entre outros. É importante ressaltar que além desses efeitos benéficos citados em literaturas, é necessário avaliar sua toxicidade (CATELAN, T. *et al.*, 2018).

2.3 ESPÉCIES *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora*

2.3.1 *Campomanesia adamantium*

A guavira é nome popular da espécie *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. É uma planta frutífera muito comercializada nos campos e Cerrados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina cuja o fruto é conhecido com o nome de guavira e possui propriedades biológicas. Seu cultivo, além de fornecer contribuições para a inserção no

mercado a partir de implantação de agriculturas comerciais, oferece também renda para os pequenos fruticultores, pois tem uma forte presença no cardápio regional da população (DOUSSEAU *et al.*, 2011). A mesma se encontra em populações agrupadas, com frutificação anual, floresce por pouco tempo, nos meses de agosto a novembro, e o os frutos amadurecem entre os meses de novembro a dezembro (**Figura 1**) (VIEIRA *et al.*, 2010).



Figura 1 – *Campomanesia adamantium* : a) Frutos de *C. adamantium*; b) Flor de *C. adamantium*; c) gabirobeira.

Fonte: Vieira et al, 2018.

- **Atividades farmacológicas da *Campomanesia adamantium***

Analisamos 9 artigos publicados, que abordam atividades farmacológicas das flhas da espécie de *C. adamantium* (**Tabela 1**). Destes, 6 destacam o uso apenas de folhas, para extrato etanólico com evidente potencial de toxicidade contra o agente biológico *Artemia salina* (JUNIOR *et al.*, 2022; MARTELLO *et al.*, 2016), atividade antiproliferativa (ALVES *et al.*, 2020) antioxidante, fotoprotetor (COUTINHO *et al.*, 2008; DE CASTRO *et al.*, 2023), efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios (FERREIRA *et al.*, 2013). Os outros 3 artigos utilizaram folhas e flores/ folhas e frutos e folhas e raízes separadamente (extrato etanólico) com atividade antibacteriana, antifúngica (SÁ *et al.*, 2018), antiproliferativa (PASCOAL, A. C. *et al.*, 2014) e antileucêmica (extrato aquoso) (CAMPOS *et al.*, 2017).

Tabela 1 – Artigos selecionados de *Campomanesia adamantium*

Parte da planta	Extrato	Material biológico para estudo	Fitoquímica	Resultados	Tipo de estudo	Referências
Folhas secas	extrato hidroetanólico / extrato foi administrado em combinação com ciclofosfamida	Camundongos swiss.	-	-Efeitos clastogênicos/ aneugênicos leves - Aumentou de fagocitose e apoptose esplênica no fígado, baço e rins/ com a combinação a frequência de micronúcleos e a apoptose diminuíram.	<i>in vivo</i>	Martello, et al. 2016.
Folhas / frutos secos	extrato etanólico	PC-3 (Câncer de próstata)	chalcona (cardamonina)	-Atividade antiproliferativa de extratos de frutos e folhas de <i>C. adamantium</i> e a concentração de cardamonina para câncer de próstata e indução de apoptose.	<i>in vitro</i>	Pascoal, et al. 2014.
Folhas e flores	extrato etanólico	Bactérias gram positivas e negativas	Os principais constituintes foram verbeneno (13,91%), β -funebre (12,05%), limoneno, α -guaieiro (6,33%), linalol (4,91%) e espatulenol (3,86%)	A avaliação da atividade antimicrobiana revelou alto potencial antibacteriano (fração hexânica) e antifúngico (fração aquosa, fração aquosa concentrada de taninos e ácido valônico). A atividade antifúngica do CAqTF está associada ao ácido valônico. Esses resultados podem explicar o uso popular de <i>C. adamantium</i> .	<i>in vitro</i>	SÁ, Stone et al., 2018.
Folhas frescas	extrato etanólico 20%	<i>Artemia salina</i>	flavonoides e taninos	Evidente o potencial de toxicidade	<i>in vitro</i>	Junior, et al. 2022.
Folhas secas e em pó	extrato etanólico	-	chalconas	antioxidante	<i>in vitro</i>	Coutinho, et al. 2008.
Folhas secas	extrato aquoso e acetato de etila	Camundongos	flavonóis isolados: miricitrina e miricetina.	O acetato etílico e extratos aquosos da <i>Campomanesia adamantium</i> mostraram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios	<i>in vivo</i>	Ferreira, et al. 2013.

				apoiando o uso da planta na medicina popular.		
Folhas e raízes	extrato aquoso	Células mononucleares de sangue periférico humano e células Jurkat (leucemia linfocítica T aguda humana).	-	- atividade antileucêmica via apoptose tardia, diminuindo o potencial de membrana mitocondrial, aumentando a ativação das caspases-9 e 3 e os níveis de cálcio intracelular.	<i>in vitro</i>	Campos, <i>et al.</i> 2017.
Folhas	extrato etanólico	-	compostos fenólicos e flavonoides.	- Potencial antioxidante; - Fotoprotetor.	<i>in vitro</i>	De Castro, <i>et al.</i> 2023.

2.3.2 *Campomanesia pubescens*

A *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg é nativa do Brasil, sendo encontrada no Cerrado das regiões Sudeste e Centro-Oeste (**Figura 2**), bem como em outros países da América do Sul (DOUSSEAU *et al.*, 2011). Seus frutos têm polpa carnuda e quando maduros apresentam um alto teor de vitamina C e de compostos fenólicos. As folhas possuem alta concentração de fenólicos e proantocianidinas, como sesquiterpenos do tipo germacrene-D, eucaliptol, e hidrato de trans-sabineno. (CHANG *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2009; PAVAN *et al.*, 2009). Esta espécie apresenta-se como arbusto de tamanho variável, dependendo da qualidade do solo. Folhas, caules, flores e frutos de *C. pubescens* exalam um aroma característico da planta. Seus frutos são utilizados para fabricação de licores, sucos e doces (BIAVATTI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2004).



Figura 2 – *Campomanesia pubescens*: a) Flor *C. pubescens*; b) Gabirobeira; c) folhas de *C. pubescens*. Fonte: Plantas do gênero *Campomanesia*: potenciais medicinal e nutracêutico, 2021.

- **Atividades farmacológicas da *Campomanesia pubescens***

Analizamos 7 artigos (**Tabela 2**) que contemplam resultados de atividades farmacológicas da espécie de *C. pubescens*, onde 5 utilizaram folhas (extrato etanólico e aquoso) com potencial anti-inflamatório, livre de toxicidade renal (GUERRERO, 2013), atividade antioxidante (CATELAN, T. *et al.*, 2018; PRADO, 2013), cicatrizante (PRADELLA *et al.*, 2021) antifúngico (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2022). E um artigo utilizou folhas e frutos (extrato etanólico) não apresentando toxicidade para *Artemia salina* (BRUM; CARDOSO, 2009).

Tabela 2 – Artigos selecionados de *Campomanesia pubescens*

Parte da planta	Extrato	Material biológico para estudo	Fitoquímica	Resultados	Tipo de estudo	Referências
Folhas secas	extrato etanólico	Ratos (Wistar adultos)	-	-Redução do número de monócitos (potencial anti-inflamatório); -Diminuição dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas (ALT e AST) sem toxicidade renal.	<i>in vivo</i>	Guerrero, et al. 2013
Folhas secas	Extrato etanólico	<i>Allium cepa</i>	7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona, 5,7-dihidroxi-6-metilflavanona, 5,7-dihidroxi-8-metilflavanona, 2',4'-dihidroxi-6'-metoxicalcona, 5,7-dihidroxi-6,8-dimetilflavanona, 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxicalcona e 2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxicalcona.	-Atividade antioxidante; -Efeito citotóxico na divisão celular e aumento das alterações cromossômicas	<i>in vitro</i>	Catelan, et al. 2018
Folhas secas	Extrato etanólico	-Ratos e <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-Extrato etanólico de <i>C. pubescens</i> foi capaz de acelerar o processo de cura de feridas cutâneas em ratos infectados com <i>S. aureus</i>)	<i>in vivo</i>	Pradella, et al. 2021
Folhas	Extrato etanólico e aquoso	Bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos	-	-Atividade antifúngica	<i>in vitro</i>	Dos Santos Silva, et al. 2022.
Folhas e frutos	Extrato etanólico	<i>Artemia salina</i>	Compostos fenólicos e flavonoides	-Não apresentou toxicidade	<i>In vitro</i>	Brum & Cardoso, 2009.
Folhas	Extrato aquoso	Camundongos Swiss	Compostos fenólicos, flavonoides e taninos	- O extrato aquoso não foi	<i>In vivo</i>	Prado, 2013.

				capaz de proteger a mucosa gástrica		
				- antioxidante		

2.3.3 *Campomanesia sessiliflora*

A *Campomanesia sessiliflora* O. Berg, mais conhecida como “Guariroba-verde”, encontrada em Cerrados e Campos do Brasil (**Figura 3**), nos Estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rio grande do Sul (KATAOKA; CARDOSO, 2013), possui um potencial terapêutico com ação antioxidante e fotoprotetora, podendo ser utilizada em diversos produtos multifuncionais (CARDOSO, 2021; CATELAN *et al.*, 2019).



Figura 3 – Folhas e flores de *Campomanesia sessiliflora*. Fonte: Plantas do gênero *Campomanesia*: potenciais medicinal e nutracêutico, 2021.

- **Atividades farmacológicas da *Campomanesia sessiliflora***

Analisamos quatro artigos (**Tabela 3**) que abordaram atividades farmacológicas da espécie de *C. sessiliflora*, utilizando apenas folhas, sendo extrato aquoso e extrato etanólico com potencial de média a baixa toxicidade, ação antioxidante e atividade fotoprotetora (AGUAYO-DE-CASTRO *et al.*, 2021; JUNIOR *et al.*, 2022; KATAOKA; CARDOSO, 2013), além de potencial antiproliferativo (DE CASTRO *et al.*, 2020).

Tabela 3 – Artigos selecionados de *Campomanesia sessiliflora*

Parte da planta	Extrato	Material biológico para estudo	Fitoquímica	Resultados	Tipo de estudo	Referências
Folhas secas	Extrato etanólico 20%	<i>Artemia salina</i>	flavonoides e taninos	-Potencial de toxicidade	<i>in vitro</i>	Junior, et al. 2022
Folhas	Extrato aquoso	<i>Artemia salina</i>	flavonóides e compostos fenólicos	-Atividade fotoprotetora e antioxidante e também apresentam baixa toxicidade no teste de A. salina	<i>in vitro</i>	Aguayo-de-Castro, et al. 2021
Folhas	Extrato aquoso	<i>Allium cepa</i>	Compostos fenólicos, flavonóides e taninos	Antiproliferativo	<i>in vitro</i>	De Castro, et al. 2020
Folhas	Extrato aquoso	-	flavonóides e compostos fenólicos	Antioxidante	<i>in vitro</i>	Kataoka; Cardoso, 2013.

2.4 CÂNCER

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos. Isso ocorre, pois, as células neoplásicas se dividem de forma rápida, agressiva e incontrolável, espalhando-se para outras regiões do corpo – acarretando transtornos funcionais (INCA, 2021).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2020) o câncer é a segunda principal causa de morte nas Américas, depois das doenças cardiovasculares (OPAS, 2020). O Observatório Global do Câncer (Globocan), revelou dados de 2020 onde 4 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer e 1,4 milhão morreram. Se nenhuma ação for tomada em prol de prevenção, estima-se que mais de 6,2 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com câncer até 2040 (GLOBOCAN, 2020).

Para as mulheres, o câncer de mama vem sendo, há mais de uma década, o tipo de câncer mais diagnosticado e estimava-se que o risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida era de 8% (BARATA *et al.*, 2009). Em 2021, o câncer de mama continuou sendo o câncer mais frequente em mulheres (**Tabela 4**). Estima-se que em cada ano do triênio 2023 – 2025 ocorram, no Brasil, cerca de 704 mil novos casos de câncer de mama (INCA, 2022) .

Para os homens, dados do INCA demonstraram que entre 2020 e 2022, houve 65.840 novos casos de câncer de próstata a cada ano. A taxa de mortalidade bruta vem demonstrando crescimento e passando de 3,73/100.000 homens para 8,93/100.000 homens, o que representa uma variação percentual de 139%.

Tabela 4 – Tipos de câncer mais frequentes em mulheres e em homens

Mulheres	
TIPOS DE CÂNCER	PORCENTAGEM
Câncer de mama	29,7%
Cólon e reto	9,2%
Colo do útero	7,5%
Pulmão	5,6%
Tireoide	5,4%
Homens	
Câncer de próstata	29,2%
Cólon e reto	9,1%
Pulmão	7,9%
Estômago	5,9%
Cavidade oral	5,0%

Fonte: adaptado de INCA, 2021

Devido ao desenvolvimento de métodos diagnósticos e melhor acesso da população, a caracterização das lesões malignas tem sido observada precocemente, o que é um fato de grande relevância quando nos referimos a este tipo de patologia (FERNANDES; MELLO, 2010).

2.4.1 TRATAMENTO ANTICÂNCER

O tratamento contra o câncer tem como principais objetivos a cura e tempo de sobrevivência, bem como a melhoria da qualidade de vida do indivíduo. Desde o início dos tempos da radioterapia e da quimioterapia tem se investido em estratégias e pesquisas que levem a cura do câncer. Diversos tipos de fármacos promissores têm sido desenvolvidos como alvos terapêuticos, entre eles alguns fármacos de produtos naturais, sintéticos (ALVARENGA *et al.*,

2014). Podemos citar também o uso da imunoterapia, cujo fármacos tem alvo direto no sistema imunológico a fim de controlar a imunogenicidade e carga tumoral o que difere dos demais fármacos que tem o alvo na célula tumoral. Os quimioterápicos da classe dos imunobiológicos são os mais novos fármacos desenvolvidos contra o câncer e são utilizados com ações específicas, como por exemplo o anti-PD1/PD1L (*programmed death*) que exerce sua função imunorreguladora no receptor do linfócito T (JORGE, 2019) tendo o Nivolumabe, o primeiro fármaco anti-PD1 lançada, usada no tratamento de melanoma metastático, outro fármaco utilizado é o Pembrolizumabe como terapia de *checkpoint* imunológico em câncer e entre outros (ROSENBERG *et al.*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2019).

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas em algumas situações se torna ineficaz, tendo seu uso muito restrito (SLEEMAN; STEEG, 2010). Segundo Brasil (2015) a combinação de drogas na quimioterapia tem como objetivo atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, podendo diminuir a resistência às drogas administradas. De acordo com as suas finalidades, a quimioterapia pode ser classificada em:

- Curativa – quando é utilizada para controle completo do tumor;
- Adjuvante – quando se segue o tratamento curativo para eliminar células residuais, diminuindo a incidência de metástases a distância;
- Neoadjuvante - indicada para redução parcial do tumor, sendo um complemento terapêutico;
- Paliativa não tendo finalidade curativa e sim melhorar a qualidade de vida do paciente.

Independente da origem, os quimioterápicos afetam por diferentes mecanismos de ação a proliferação celular, devido as semelhanças entre as células tumorais e normais, causando uma grande dificuldade de encontrar alvos de ação seletivos, ou seja, que atinjam apenas células neoplásicas (SAHREEN *et al.*, 2015; STEEG; THEODORESCU, 2008).

Outros estudos em alvos de tratamentos anticâncer, focados em fármacos associados a indução de apoptose, com as características biológicas da morte programada bem definidas, têm demonstrado um aumento considerável na procura de respostas terapêuticas (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; MARTELLO *et al.*, 2016; SU *et al.*, 2016).

2.5 APOPTOSE

A apoptose (morte programada), acontece normalmente como desenvolvimento e envelhecimento celular e para manter o mecanismo homeostático das células nos tecidos. Esse processo participa de diversas funções, como no embrião em desenvolvimento, eliminação de células aberrantes e a remoção de células infectadas (BRILL *et al.*, 1999; NAINU *et al.*, 2017). A apoptose pode ocorrer também nos mecanismos de defesa, como reações autoimunes ou por danos às células por agentes nocivos ou por doenças (NORBURY; HICKSON, 2001).

O processo de apoptose, por sua complexidade, envolve muitas vias de sinalização, sendo desencadeada em células por vias extrínsecas ou intrínsecas por mediação de caspases (**Figura 4**). Ambas as vias tendem a ativar as caspases apoptóticas efetoras, levando a alterações celulares morfológicas e bioquímicas, caracterizando a apoptose (WONG, 2011). A via extrínseca de apoptose, é dependente do seu receptor de morte celular, logo é iniciada pela interação de receptores de morte expressos na superfície celular, que pertencem à uma grande família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), com seus ligantes relacionados da família TNF de proteínas (GUICCIARDI; GORES, 2009). Já a via apoptótica intrínseca, é desencadeada por sinais de estresse, procedentes do interior da própria célula. Podem ser em resposta a radiação, ausência de fatores de crescimento, falta de nutrientes, níveis altos de espécies reativas de oxigênio (EROS) e também em resposta a medicamentos como os corticoesteróides e quimioterápicos. Os sinais desencadeados, são detectados pelas mitocôndrias as quais se tornam as responsáveis pelas reações de morte celular ou regeneração celular (GRIVICICH *et al.*, 2007; PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011).

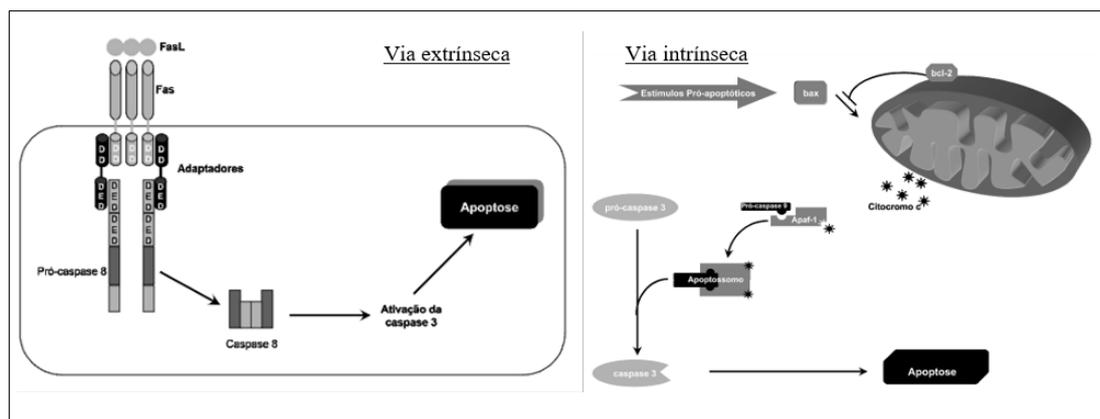


Figura 4 – Mecanismos da apoptose: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose; DD=domínio de morte; DED=efetor do domínio de morte; Apaf-1=fator de ativação de protease associada à apoptose. Fonte: adaptado de Grivicich, p. 339, 2007.

No caso dos quimioterápicos, terapias anticâncer padrão ativam diferentes vias de estímulo de morte, como mecanismos pró-apoptóticos, para eliminar células tumorais altamente proliferativas. No entanto as células cancerígenas desenvolvem mecanismos de evasão da apoptose que em geral envolvem desequilíbrio entre fatores pró-apoptótico e proteínas anti-apoptóticas, inativação de caspases e diminuição da expressão de receptores de morte, sendo esta última a principal forma de quimioresistência aos agentes anticâncer, (BRILL *et al.*, 1999; NAINU *et al.*, 2017).

Como exemplo, tem-se que linhagens de células cancerígenas de mama, como MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam resistência a drogas quimioterápicos que agem na inibição do fuso mitótico (como docetaxel ou vincristina), devido a expressão elevada de miRNA-34-141 e a anulação da apoptose (HSU *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2007).

Outra via de morte celular, entre outras, a necrose é causada pelas respostas a tensões, como trauma e inflamação e isso pode levar a liberação de componentes imunoestimuladores como os padrões moleculares associados aos danos (DAMPs). É observado o inchaço celular e a perda de membrana plasmática na necrose celular, que estimulam intenso processo inflamatório. Desta forma, a morte celular por necrose não é um mecanismo desejado como mecanismos de ação a gentes quimioterápicos (SACHET *et al.*, 2017; ZONG *et al.*, 2004). Por estas razões, o estudo do poder de indução de apoptose por um agente anticâncer deve ser realizada ainda na etapa de triagem.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anticâncer *in vitro* dos extratos aquosos e etanólicos das espécies *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora* usando modelo de cultura celular convencional (2D).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o potencial citotóxico dos extratos aquosos e etanólicos das folhas das espécies *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora* frente as linhagens neoplásicas de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), cólon (HT-29), rim (786-0), hepatocarcinoma (HEP-G2) e não neoplásico fibroblasto murino (NIH/3T3);
- b) Determinar o índice de seletividade;
- c) Avaliar citotoxicidade dos extratos (atividades citocida e citostática);
- d) Avaliar a indução de apoptose e dano de membrana celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas (órgão vegetal) das plantas do gênero *Campomanesia* foram identificadas e as exsiccatas de *Campomanesia sessiliflora* (registro 2193), *Campomanesia adamantium* (registro 2192) e *Campomanesia pubescens* O.Berg (registro 839) foram depositadas no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados-MS, Brasil. A coleta das folhas foi feita pela Dra. Claudia Cardoso e Dra. Maria do Carmo Vieira, com as coordenadas (Latitude: -22.2218, Longitude: -54.8064 22° 13' 18" Sul, 54° 48' 23" Oeste), realizada no Horto de Plantas Medicinais da UFGD. As plantas foram catalogadas no Horto e também confirmadas com as exsiccatas pelos pesquisadores que efetuaram a coleta comparadas com as amostras depositadas no herbário. A coleta foi registrada no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético) e Conhecimentos Tradicionais Associados do governo brasileiro sob o código A055721.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As plantas foram coletadas e as folhas foram lavadas em água corrente. Após isso, as amostras foram secas em estufa de secagem a 37°C por 6 horas, e em seguida foram moídas em moinho de facas e submetidas tamisação com malha de 10 *mesh* (CARDOSO, C. A. L. *et al.*, 2010).

Para a obtenção do extrato aquoso a 2% de planta, 20 g das folhas de cada espécie vegetal foram colocados separadamente em contato com água (100 mL) a uma temperatura inicial entre 95-100 °C por um período de 30 minutos em recipiente fechado. Após esse período as amostras foram filtradas e liofilizadas, obtendo-se os extratos aquosos secos, os quais foram armazenados a -20 °C.

Para obtenção do extrato etanólico a 2% de planta foi usado 20 g das folhas de cada espécie vegetal foram colocadas separadamente em contato com água:etanol 30:70 v:v (100 mL), por um período de 24 horas. Após o período as amostras foram filtradas e liofilizadas, obtendo-se os extratos secos, os quais foram armazenados a -20 °C.

4.2.2 NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS:

Os extratos aquosos e etanólicos foram denominados da seguinte forma:

- *C. adamantium* : CA2% (extrato aquoso a 2% de planta) e CAET2% (extrato etanólico a 2% de planta);

- *C. pubescens*: CP2% (extrato aquoso a 2% de planta) e CPET2% (extrato etanólico a 2% de planta);

- *C. sessiliflora*: CS2% (extrato aquoso a 2% de planta) e CSET2% (extrato etanólico a 2% de planta).

4.3 TESTES BIOLÓGICOS

4.3.1 LINHAGENS CELULARES

Para avaliação da atividade antiproliferativa foram utilizadas as linhagens de células neoplásicas humanas: 786-0 (ATCC-CEL-1932- adenocarcinoma de rim), MDA-MB-231 (HTB-26, adenocarcinoma de mama triplo negativo), MCF-7 (ATCC-HTB-22, adenocarcinoma de mama), e para a determinação do índice seletividade a linhagem não

tumoral NIH/3T3 (ATCC-CRL-1658, fibroblasto murino). As células neoplásicas e não neoplásicas foram obtidas pelo banco de células Americanos (ATCC) e pelo banco de células do Rio de Janeiro (NIH/3T3 – 0191/ ATCC-CRL-1658), mantidas em nitrogênio líquido. Para realização dos testes de citotoxicidade as linhagens foram descongeladas e cultivadas em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ (FRESHNEY, 2005).

4.3.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

- **Definições e termos usados na avaliação da citotoxicidade:**

Os testes de citotoxicidade *in vitro* envolvem avaliação de viabilidade e proliferação celular após as células serem expostas a qualquer xenobiótico (FRESHNEY, 2005). Esta avaliação pode ser realizada por contagem de células viáveis e inviáveis e pela obtenção de concentrações de inibição de crescimento parcial (GI₅₀ growth inhibitions – Concentração para inibir crescimento de 50% das células) ou total (TGI total growth inhibition – Concentração para inibir crescimento de 100% das células) ou ainda, de morte celular (LC₅₀ – Letal Concentration – concentração para matar 50% das células) (HOUGHTON *et al.*, 2007). O ensaio de citotoxicidade é eficiente como *screening* de substâncias ativas em células neoplásicas. É possível observar atividade citostática e citocida. (MONKS *et al.*, 1991).

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras-teste, de extrato aquoso e etanólico de *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora* foram ressuspendidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL e diluídas em meio de cultura no momento do experimento. A maior diluição apresenta concentração de DMSO menor que 0,4%, evitando a citotoxicidade pelo DMSO para obtenção das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL.

4.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM SRB (Sulforrofamina B) EM MODELO DE CULTURA CELULAR EM MONOCAMADA

As células foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) a pH 7,2, contendo 2 mM L-Glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/L de NaHCO₃, 100 U/mL

de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen) a 10% em ambiente a 37 °C , 5% de CO₂ e umidade relativa a 95%.

As células foram mantidas até atingirem suas devidas confluências (80%) em garrafas de cultura celular de 25mm². Com a densidade celular adequada para o ensaio, considerando a característica de crescimento de cada linhagem, as células foram retiradas por ação química, via tripsina/EDTA 0,25%. Para o teste de exclusão de células não viáveis, foi usado o corante azul de Tripán que evidencia de azul as células inviáveis, uma vez que o corante permanece no interior das células demonstrando alteração de membrana.

Para o teste de citotoxicidade, foi realizado o método de coloração por SRB que é aplicado pela afinidade do corante pelas proteínas básicas nas células íntegras, fixadas pelo ácido tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990). Para iniciar o experimento, é realizada uma suspensão celular (5x10⁴ cel/mL). Foram preparadas duas placas de 96 poços, sendo uma denominada placa zero (T0) com triplicata de suspensão celular e triplicata de meio de cultura para o controle de experimento(branco), como controle de crescimento celular até o momento do tratamento; e a outra placa denominada placa teste, para avaliar o efeito dos tratamentos com as amostras de interesse (suspensão celular e amostras), banco da amostra (apenas meio de cultura e amostras), controles positivo (doxorubicina) e negativo (suspensão celular sem tratamento).

Após 24h de crescimento celular, a placa T0 foi corada e à placa teste foi adicionado os tratamentos em triplicata nas concentrações de 0,25, 2,5 , 25, 250 µg/mL. O controle positivo foi adicionado em concentração 10x menor. Em seguida, foram mantidas na incubadora durante 48h para posterior leitura. O primeiro passo é a fixação das células por adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (4°C) em cada poço, seguido de incubação a 4°C durante 30 minutos. As placas foram lavadas com água corrente cinco vezes e deixadas secar, em seguida foram coradas pela adição de solução de SRB 50 µL (1mg/mL em ácido acético a 1%) em todos os poços. Trinta minutos após a coloração, as placas foram lavadas com ácido acético a 1% para remover o corante não ligado e deixado secar. O corante ligado foi solubilizado com 10 nM de Tris base (pH 10,5, Sigma Chemical Co.) antes da leitura e colocado no agitador por 10 minutos e então foi obtida a densidade óptica (D.O) em 540 nm. A partir da (D.O) obtida e as fórmulas segundo Monks *et al.*, 1991, foi obtida a porcentagem de crescimento em cada concentração. Estas foram aplicadas em programa estatístico pelo Softmax 6.0, Origin versão 6.0 para obtenção das métricas (GI₅₀/TGI e LC₅₀).

4.6 FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO EM MODELO 2D – (Avaliação de apoptose e integridade de membrana)

Para avaliar a viabilidade celular e triagem de apoptose, foi usado a coloração por laranja de acridina e brometo de etídio. O experimento foi realizado em placa de 6 poços com lamínulas acopladas. A suspensão de células MDA-MB-231 e 786-0 em fase de crescimento logarítmico foram distribuídas 3×10^6 células por poço adicionada sobre a lamínula de 18mm e incubadas por 24 horas, logo após foram tratadas com amostras teste com as concentrações de GI_{50} e novamente incubadas por 48 horas. Após incubação os poços foram lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e as lamínulas foram destacadas e colocadas em lâminas para coloração com uma solução de Laranja de acridina 1 μ L e de Brometo de etídio μ L em volume final 20 μ L de PBS. Em seguida as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41), aumento 400X. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina.

4.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela relação entre a GI_{50} da linhagem celular não-tumoral (NIH/3T3) e a GI_{50} das células tumorais (786-0, Hep-G2, HT-29, MCF-7 e MDA-MB-231) indicando o quanto a amostra tem maior efeito antiproliferativo contra células cancerígenas, comparado ao efeito contra as células não tumorais (BADISA *et al.*, 2009; SUFFNESS, 1990).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Softmax 6,0, Origin versão 6.0, compusyn. Para calcular os valores de GI_{50} , TGI_{50} e LC_{50} , foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes. Para comparar os valores *in vitro* foi usado o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey's. Em todos os métodos, as diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p obtido for menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa frente a linhagens tumorais e linhagem não tumoral

Na triagem inicial dos extratos aquosos e etanólicos das folhas das espécies vegetais estudadas, verificou-se que algumas amostras se apresentaram biologicamente ativas em reduzir a proliferação celular e pode-se calcular a concentração capaz de inibir o crescimento das células em 50% (GI₅₀) nas culturas celulares estudadas (**Tabelas 5, 6 e 7**). A avaliação da proliferação celular foi realizada pelo método da coloração por SRB, que cora as proteínas de celulares. O tratamento das células foi realizado por 48 horas em 4 concentrações (0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL) que permitiu a obtenção das absorbâncias, % de crescimento e a obtenção das métricas (GI₅₀, TGI e LC₅₀). Consideramos as atividades das amostras da seguinte forma: fracamente ativas, GI₅₀ de 101 a 250 µg/mL; moderada atividade GI₅₀ de 50 a 100 µg/mL e forte atividade até 50 µg/mL. Inativas com GI₅₀ maior de 250 µg/mL.

A células humanas testadas foram MCF-7 (câncer de mama), MDA-MB231 (câncer de mama triplo resistente), HT-29 (câncer de cólon), 786-0 (adenocarcinoma renal) HEPG2 (hepatocelular) e 1 não neoplásica, NIH/3T3 (fibroblasto murino).

As amostras testadas são extratos aquosos e etanólicos de 3 espécies do gênero *Campomanesia*: *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora*. Os resultados serão abordados por espécie.

5.1.1 *Campomanesia adamantium*

Esta espécie foi testada na forma de extrato aquoso e extrato etanólico a 2% das folhas. Estas apresentações foram escolhidas para mimetizar o uso dos chás medicinais e das tinturas e as folhas por serem de fácil acesso sem sazonalidade, como são os frutos.

Portanto, foi possível observar que os extratos aquosos a 2% de *C. adamantium* foram inativos contra as células de fígado e apresentaram fraca atividade antiproliferativa contra demais linhagens celulares tumorais testadas. Por outro lado, apresentou toxicidade para as células não tumorais (**Tabela 5**). O extrato alcoólico apresentou fraca a moderada atividade contra as células de rim e toxicidade para as células não tumorais.

Tabela 5 – Valores de GI50 ($\mu\text{g/mL}$) das amostras da espécie de *C. adamantium* nas linhagens celulares

Amostras	Linhagens Celulares					
	786-0	HEP-G2	MDA-MB-231	MCF-7	HT-29	NIH/3T3
CA-2%	154,47	>250	188,11	220,88	245	43,78
CAET2%	96,40	>250	241,47	173,20	249	26,02
Doxo	1,423	0,22	0,25	0,02	0,25	0,02

CA2%= extrato aquoso 2%; CAET2%= extrato etanólico 2%; Doxo= Doxorrubicina; 786-0 = adenocarcinoma rim; HEP-G2= câncer de fígado; MDA-MB-231= câncer de mama (triplo negativo); MCF-7= câncer de mama; HT-29= câncer de colón; NIH/3T3= célula não neoplásica (fibroblasto murino);

A resposta celular ao tratamento pode se apresentar com perfis citostático e citocida, dependendo da concentração de tratamento. Além disso, pode estimular ou inibir a proliferação celular. Os resultados da atividade antiproliferativa demonstrando os perfis citostático e citocida em células tumorais e não tumorais dos extratos serão apresentados graficamente.

No geral, o efeito foi citostático até 25 $\mu\text{g/mL}$ para a maioria das linhagens, ou seja, as concentrações de 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, ficam acima da linha de TGI (Concentração que inibe 100% do crescimento celular).

Os extratos (aquoso e etanólico) apresentaram estímulo de proliferação das células tumorais e não tumorais, ou seja, após o tratamento de 48h, observa-se no gráfico que houve crescimento acima dos 100% (este representa a densidade celular do controle negativo). Mas em maior concentração o extrato aquoso de *C. adamantium* (CA2%) para as linhagens 786-0 e MCF-7 teve ação citocida, ou seja (quando ocorre morte celular) que está graficamente representada abaixo da linha de TGI com concentração entre 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$. O teste com extrato etanólico demonstrou que CAET2% também teve ação citocida (representadas abaixo da linha de TGI) com concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 5**). Para as demais linhagens as amostras não tiveram atividade.

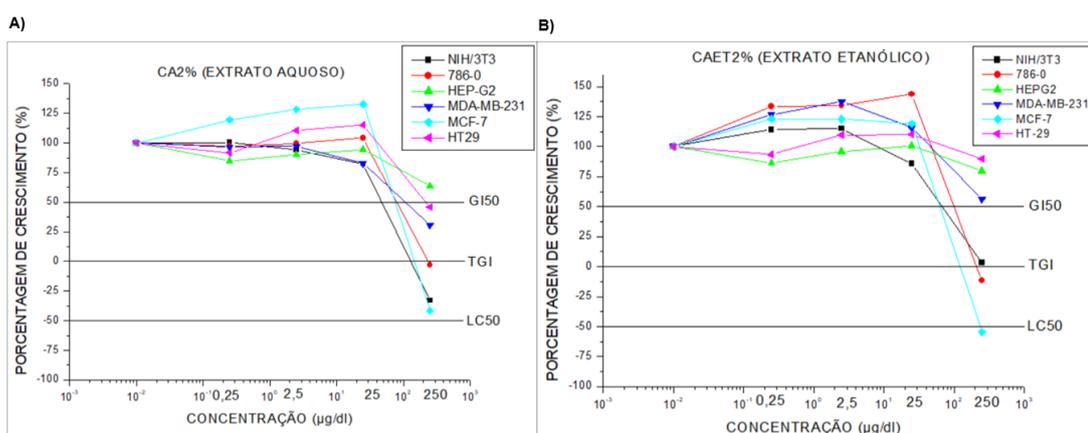


Figura 5 - Gráfico de atividade antiproliferativa de CA2% e CAET2% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml testado com SRB. A) células de (NIH/3T3, 786-0, HEP-G2, MDA-MB- 231, MCF-7 e HT-29) submetidas a tratamento com extrato aquoso de CA2%). B) células de (NIH/3T3, 786-0, HEP-G2, MDA-MB- 231, MCF-7 e HT-29) submetidas a tratamento com extrato aquoso de CAET2%). GI50 (inibição de 50% das células), TGI (inibição de 100% das células e LC50 (morte de 50% das células).

5.1.2 *Campomanesia pubescens*

O extrato aquoso da espécie *C. pubescens* apresentou moderada atividade antiproliferativa contra as células de câncer de rim (786-0/GI₅₀ 69,18 µg/mL) e fígado (HepG2/GI₅₀ 69,43 µg/mL). Entre as linhagens de câncer de mama apresentou melhor atividade contra a linhagem resistente a múltiplas drogas. Não apresentou atividade antiproliferativa contra as células não tumorais. O extrato etanólico, apresentou fraca atividade apenas contra as células de rim, para as demais, foi inativa (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Valores de GI₅₀ (µg/mL) das amostras da espécie de *C. pubescens* nas linhagens celulares

Amostras	Linhagens Celulares					
	786-0	HEP-G2	MDA-MB231	MCF-7	HT-29	NIH/3T3
CP2%	69,18	69,43	66,65	99,13	240,07	158,02
CPET2%	110,34	>250	>250	211,59	>250	>250
Doxo	1,42	0,22	0,25	0,02	0,25	0,02

CP2%= extrato aquoso 2%; CPET2%= extrato etanólico 2%; Doxo= Doxorubicina; 786-0 = adenocarcinoma rim; HEP-G2= câncer de fígado; MDA-MB-231= câncer de mama (triplonegativo); MCF-7= câncer de mama; HT-29= câncer de colon; NIH/3T3= célula não neoplásico fibroblasto murino rim;

Os extratos (aquoso e etanólico) de *C. pubescens* também apresentaram estímulo de proliferação das células tumorais e não tumorais, observa-se no gráfico que houve crescimento acima dos 100% (este representa a densidade celular do controle negativo). Para CP2% (extrato aquoso) apresentou atividade citostática em todas as concentrações, inclusive a maior, apenas para HT-29, o restante foi citocida na maior concentração (250 µg/mL). E CPET2% se mostrou menos ativa, pois até mesmo a maior concentração não estimulo morte celular, exceto para a MCF-7. (Figura 6).

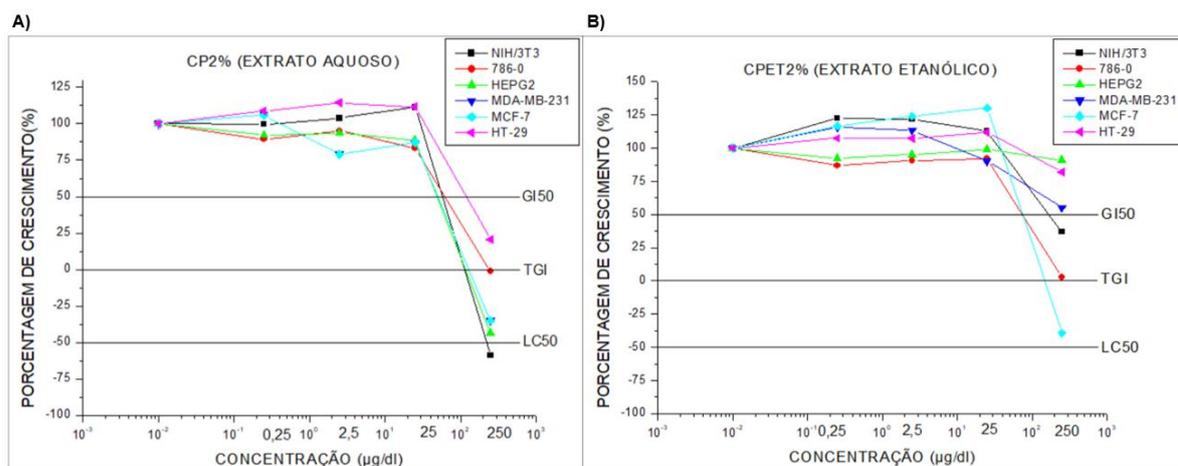


Figura 6 - Gráfico de atividade antiproliferativa de CP2% e CPET2% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml testado com SRB. A) células de (NIH/3T3, 786-0, HEP-G2, MDA-MB- 231, MCF-7 e HT-29) submetidas a tratamento com extrato etanólico de CAP2%) B) células de (NIH/3T3, 786-0, HEP-G2, MDA-MB- 231, MCF-7 e HT-29) submetidas a tratamento com extrato etanólico de CPET2%). GI50 (inibição de 50% das células), TGI (inibição de 100% das células e LC50 (morte de 50% das células).

5.1.3 *Campomanesia sessiliflora*

O extrato aquoso da espécie *C. sessiliflora* apresentou forte atividade para a linhagem 786-0, fracamente ativa para HEP-G2 (fígado) e inativa para HT-29 (cólón). As células cancerígenas de mama apresentaram sensibilidade ao tratamento com os extratos de *C. sessiliflora*, com forte atividade para ambas linhagens (MCF-7 e MDA-MB-231). Porém se mostrou fortemente ativa para NIH/3T3, o que demonstra toxicidade para células não tumorais (Tabela 7).

O extrato etanólico, apresentou atividade moderada contra as células de rim (786-0), mama (MCF7) e mama triplonegativa (MDA-MB-231). Para as demais, foi inativa.

Tabela 7 – Valores de GI₅₀ (µg/mL) das amostras da espécie de *C. sessiliflora* nas linhagens celulares

Amostras	Linhagens Celulares					
	786-0	HEP-G2	MDA-MB231	MCF-7	HT-29	NIH/3T3
CS2%	49,14	210,12	37,90	25,02	245,61	25,57
CSET2%	116,25	>250	196,42	72,77	247	116,25
Doxo	1,42463	0,2268	0,25902	0,0234	0,2505	0,02693

CS2%= extrato aquoso 2%; CSET2%= extrato etanólico 2%; Doxo= Doxorubicina; 786-0 = adenocarcinoma rim; HEP-G2= câncer de fígado; MDA-MB-231= câncer de mama (triplonegativo); MCF-7= câncer de mama; HT-29= câncer de colon; NIH/3T3= célula não neoplásica fibroblasto murino rim;

O extrato aquoso de *C. sessiliflora* estimulou o crescimento apenas da linhagem de mama na concentração de 2,5 µg/mL, obteve efeito citocida para as linhagens neoplásicas 786-0 e MCF-7 e não neoplásica NIH/3T3. O extrato etanólico para linhagem hepatocelular, HT-29 e MDA-MB-231 apresentou atividade citostática. Para as demais podemos observar atividade citocida apresentadas na (Figura 7).

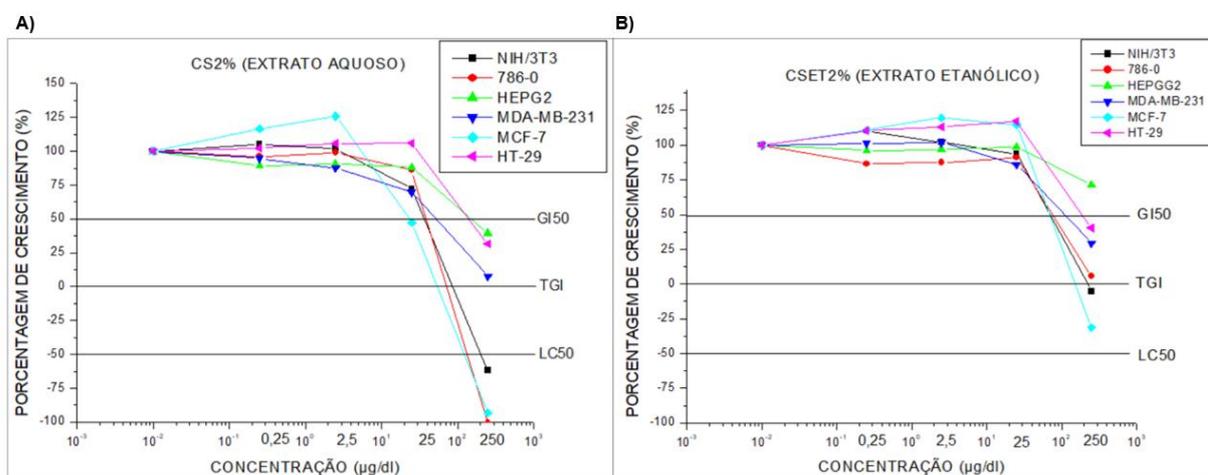


Figura 7 – Gráfico de atividade antiproliferativa de CS2% e CSET2% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml testado com SRB. A) células de (NIH/3T3, 786-0, HEP-G2, MDA-MB-231, MCF-7 e HT-29) submetidas a tratamento com extrato aquoso de CS2%; B) células de (NIH/3T3, 786-0, HEP-G2, MDA-MB-231, MCF-7 e HT-29) submetidas a tratamento com extrato etanólico de CSET2%). GI₅₀ (inibição de 50% das células), TGI (inibição de 100% das células e LC50 (morte de 50% das células).

5.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Foi realizado um ensaio de SRB para o índice de seletividade em uma linhagem não neoplásica NIH/3T3 (fibroblasto murino) em que foram testadas as amostras CA2%, CAET2% (*C. adamantium*), CP2%, CPET2% (*C. pubescens*) e CS2%, CSET2% (*C. sessiliflora*). Nas linhagens neoplásicas de mama (MCF-7), mama triplonegativa (MDA-MB-231) e de adenocarcinoma renal (786-0). Foi observada a seletividade apenas para *C. pubescens* (extrato aquoso e etanólico) com IS > 2,0. Os demais não apresentam seletividade para células neoplásicas (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Índice de seletividade para extratos aquosos e etanólicos de *C. adamantium*, *C. pubescens* e *C. sessiliflora*.

AMOSTRA	MDA-MB-231	MCF7	786-0
CA2%			
GI ₅₀ (µg)	118,11	220,88	245
IS	0,23	0,19	0,28
CAET2%			
GI ₅₀ (µg)	241,47	173,20	96,40
IS	0,10	0,15	0,26
CP2%			
GI ₅₀ (µg)	66,65	99,13	69,18
IS	2,37	1,59	2,26
CPET2%			
GI ₅₀ (µg)	>250	211,59	110,34
IS	1	1,18	2,26
CS2%			
GI ₅₀ (µg)	25,02	37,90	49,14
IS	1,02	0,67	0,52
CSET2%			
GI ₅₀ (µg)	72,77	196,42	116,25
IS	1,59	0,59	1

IS= Índice de Seletividade; GI₅₀ (inibição de 50% das células); CA2%= extrato aquoso 2% de *C. adamantium*; CAET2%= extrato etanólico 2% de *C. adamantium*; CP2%= extrato aquoso 2% de *C. pubescens*; CPET2%= extrato etanólico 2% de *C. pubescens*; CS2%= extrato aquoso 2% de *C. sessiliflora*; CSET2%= extrato etanólico 2% de *C. sessiliflora*;

5.3 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA EM 2D COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO

Duas linhagens de interesse, por serem mais sensíveis aos tratamentos, foram selecionadas para o ensaio de fluorescência com a finalidade de avaliar viabilidade e estímulo a apoptose. Foram usadas as 10 amostras teste para o ensaio de fluorescência nas linhagens 786-0 e MDA-MB-231. As linhagens foram tratadas com a GI_{50} por 48 horas de crescimento, o ensaio foi feito o controle negativo (livre de tratamento), controle positivo (doxorubicina) e o tratamento com as amostras teste. A laranja de acridina é um corante vital que cora tanto as células viáveis, quanto as inviáveis (verde fluorescente), enquanto o brometo de etídio, um intercalante da dupla fita do DNA, cora apenas as células que perderam a integridade da membrana (laranja e vermelho) (CINIGLIA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2015). Para fins de conhecimento sobre a morfologia das células sem intervenção e das tratadas com quimioterápico padrão, apresentamos o controle negativo e o controle positivo, respectivamente nas linhagens 786-0 e MDA-MB-231 (**Figura 8 e 9**).

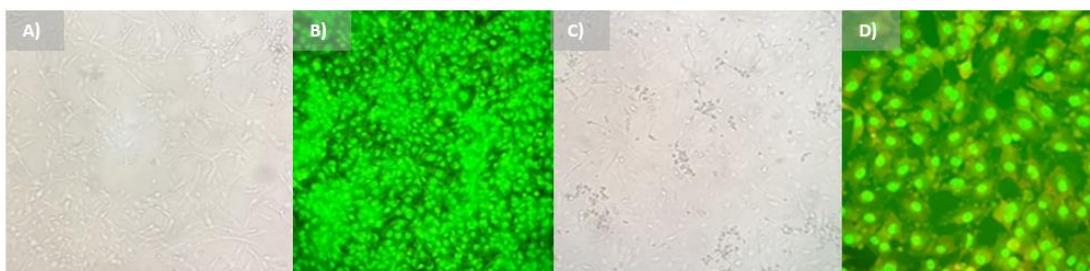


Figura 8- Controle negativo e positivo de 786-0. A) controle negativo de 48 horas, foto a fresco com objetiva de 10x; B) controle negativo de 48 horas, foto fluorescência com objetiva de 10x. Controle positivo com doxorubicina em 786-0. C) doxorubicina, foto a fresco com objetiva de 10x; D) doxorubicina, foto fluorescência com objetiva de 10x.

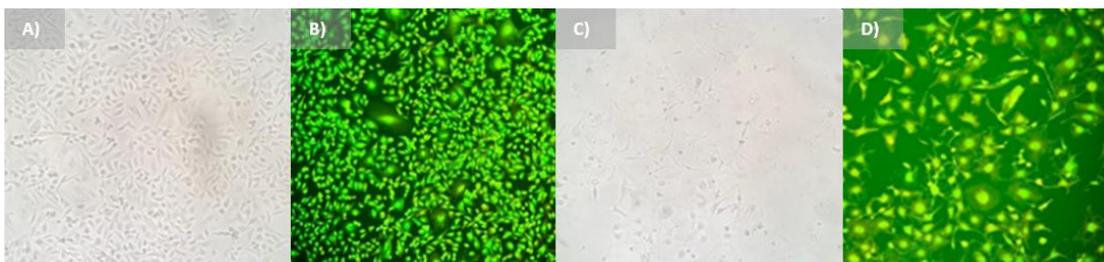


Figura 9- Controle negativo e positivo de MDA-MB-231. A) controle negativo de 48 horas, foto a fresco com objetiva de 10x; B) controle negativo de 48 horas, foto fluorescência com objetiva de 10x. Controle positivo com doxorubicina em 786-0. C) doxorubicina, foto a fresco com objetiva de 10x; D) doxorubicina, foto fluorescência com objetiva de 10x.

5.3.1 *Campomanesia adamantium* – fluorescência para linhagem 786-0 e MDA-MB-231

Com o teste realizado com as amostras de extrato aquoso de *C. adamantium*, foi possível observar dano celular em 786-0. A amostra CA2% não demonstrou danos mantendo a integridade celular. O extrato etanólico (CAET2%) também demonstrou dano celular. Nas células a fresco (**Figura 10 A e C**) observamos o espaçamento entre as células que representa a citotoxicidade dos extratos (**Figura 10 C**). Nas células coradas (**Figura 10 B e D**) avaliamos suas características morfológicas, onde mesmo aderidas, estão em processo de injúria, representado pela coloração alaranjada, pois caso as células estivessem íntegras, conseguiriam fazer o efluxo do corante.

O CAET2% apresentou menor atividade antiproliferativa uma vez que observa-se o menor número de células quando tratadas com CAET2%.

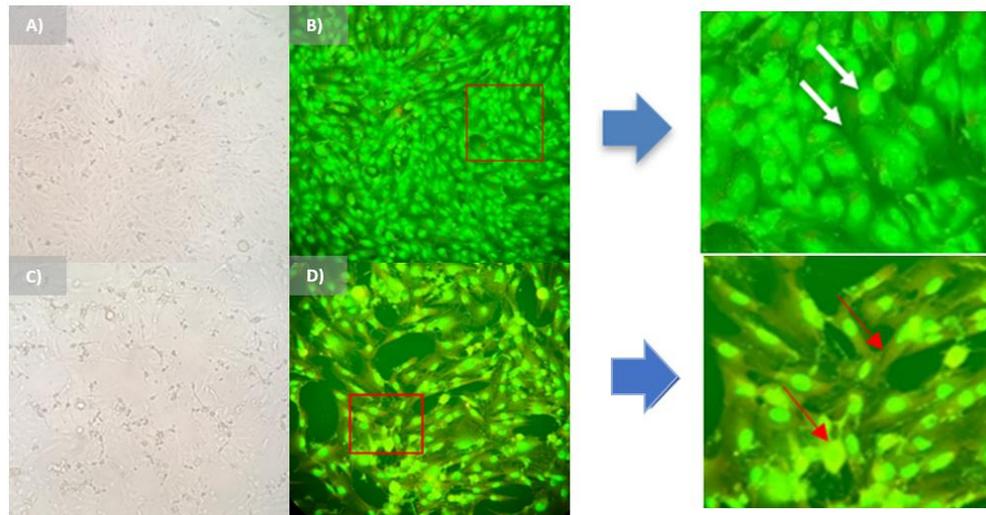


Figura 10 – Efeito de CA2% e CAET2% em células tumorais de 786-0 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina. A) CA2% (extrato aquoso) concentração 154,47 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; B) CA2% (extrato aquoso) concentração 154,47 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 10-B não apresentou danos consideráveis (seta branca). C) CAET2% (extrato etanólico) concentração 96,40 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; D) CAET2% (extrato etanólico) concentração 96,40 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 10-D apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável.

Para linhagem de mama triplonegativa, o extrato aquoso de *C. adamantium* a 2% (CA2%) obteve baixa aderência celular (**Figura 11 A e B**). O extrato etanólico CAET2% apresentou alta aderência celular, podendo observar poucos danos (**Figura 11 C e D**).

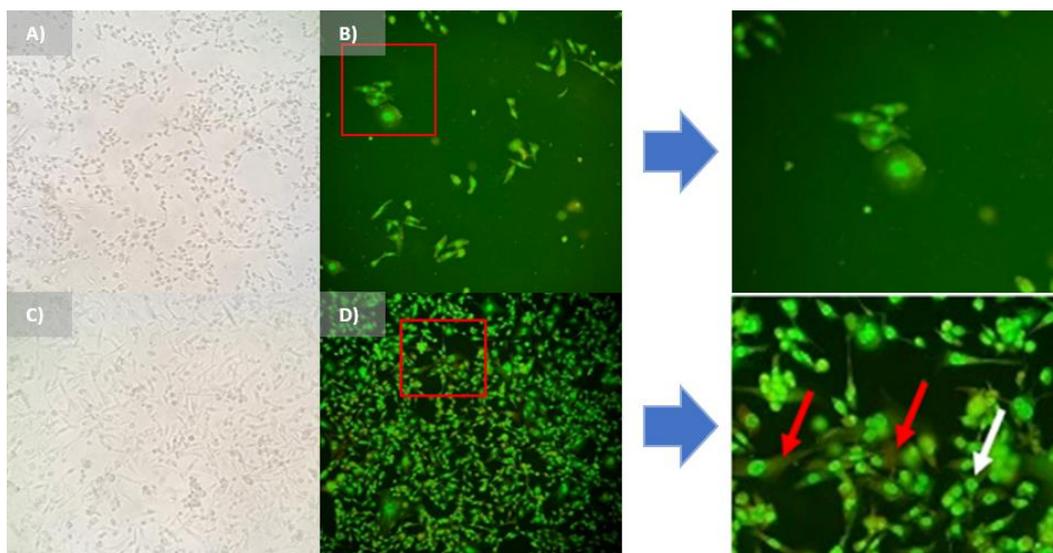


Figura 11 – Efeito de CA2% e CAET2% em células tumorais de MDA-MB-231 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina. A) Baixa aderência celular, apresentando uma imagem inconclusiva. B) Baixa aderência celular, apresentando uma imagem inconclusiva. C) CAET2% (extrato etanólico) concentração 241,47 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; D) CAET2% (extrato etanólico) concentração 241,47 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 11-D apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca).

5.3.2 *Campomanesia pubescens* – fluorescência para linhagem 786-0 e MDA-MB-231

Para *C. pubescens*, podemos observar em 786-0 a amostra CP2% não apresentou atividade pois a confluência celular foi mantida e as células não apresentam coloração alaranjada (**Figura 12 A e B**). Diferente do extrato aquoso, o extrato etanólico CAET2% demonstrou em dano celular em 786-0 (**Figura 12 C e D**).

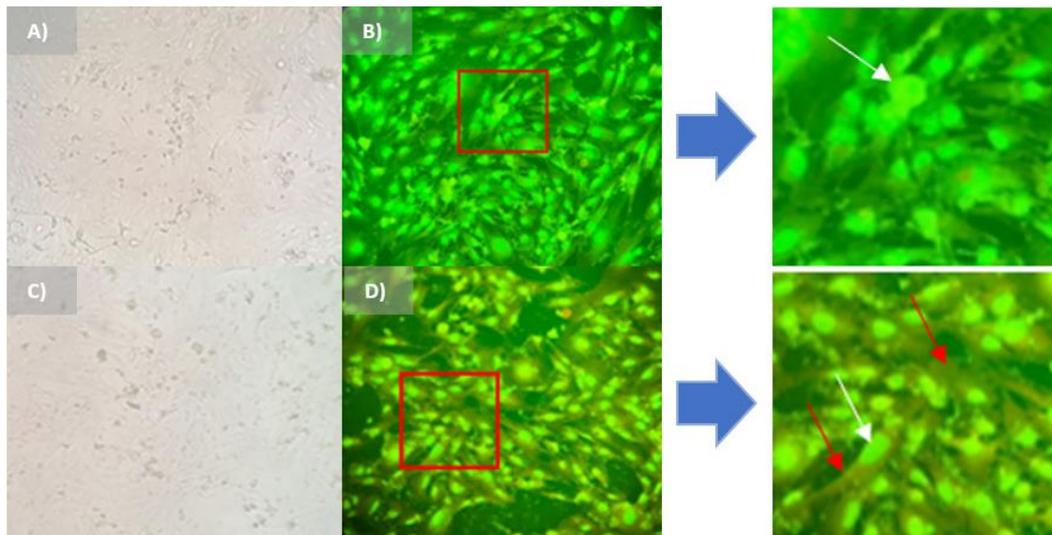


Figura 12 – Efeito de CP2% e CPET2% em células tumorais de 786-0 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina. A) CP2% (extrato aquoso) concentração 69,18 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; B) CP2% (extrato aquoso) concentração 69,18 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 12-B não apresentou dano celular e núcleo viável (seta branca). C) CPET2% (extrato etanólico) concentração 110,34 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; D) CPET2% (extrato etanólico) concentração 110,34 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 12-D apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca).

O extrato aquoso de *C. pubescens* (CP2%) e o extrato etanólico (CPET2%) não demonstraram danos em células da linhagem MDA-MB-231 mantendo a integridade celular (**Figura 13**).

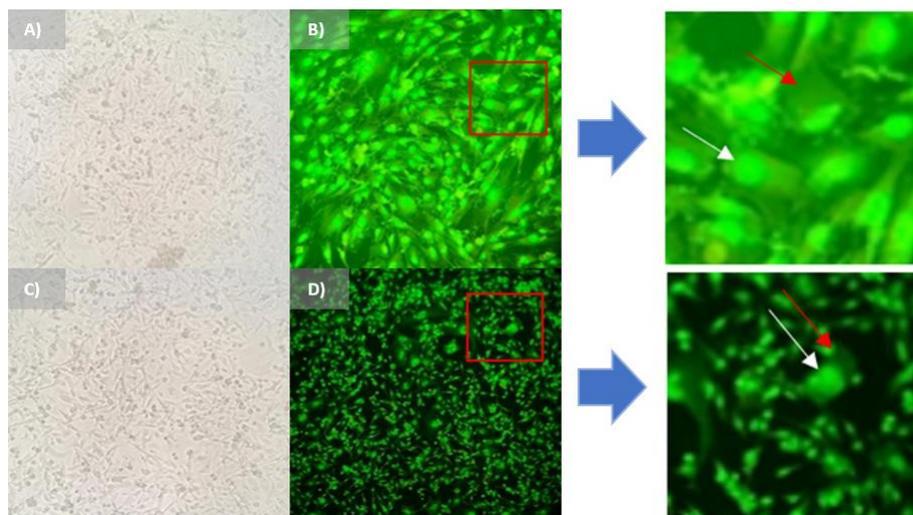


Figura 13- Efeito de CP2% e CPET2% em células tumorais de MDA-MB-231 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina. A) CP2% (extrato aquoso) concentração 66,65 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; B) CP2% (extrato aquoso) concentração 66,65 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 13-B não apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca). C) CPET2% (extrato etanólico) concentração 250 µg/ml, foto a fresco com objetiva de 10x; D) CPET2% (extrato etanólico) concentração 250 µg/ml, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 13-D não apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca).

5.3.3 *Campomanesia sessiliflora* – fluorescência para linhagem 786-0 e MDA-MB-231

Para *C. sessiliflora*, o extrato aquoso (CS2%) (**Figura 14 A e B**) e etanólico (CSET2%) (**Figura 14 C e D**) demonstraram pouquíssimos danos celulares em 786-0.

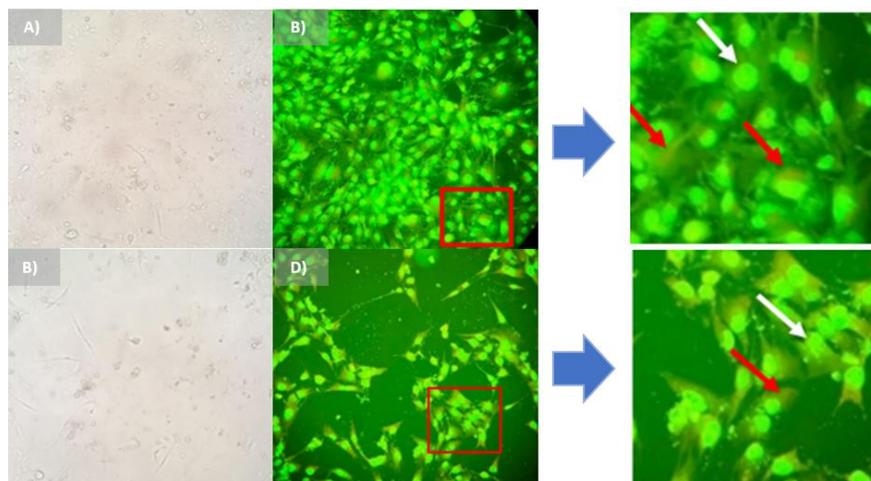


Figura 14 - Efeito de CS2% e CSET2% em células tumorais de 786-0 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina. A) CS2% (extrato aquoso) concentração 49,14 $\mu\text{g/ml}$, foto a fresco com objetiva de 10x; B) CS2% (extrato aquoso) concentração 49,14 $\mu\text{g/ml}$, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 14-B apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca). C) CSET2% (extrato etanólico) concentração 116,25 $\mu\text{g/ml}$, foto a fresco com objetiva de 10x; D) CSET2% (extrato etanólico) concentração 116,25 $\mu\text{g/ml}$, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 14-D apresentou danos de membrana celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca).

Para o extrato aquoso de *C. sessiliflora* (CS2%) não obtivemos danos celulares consideráveis (**Figura 15 A e B**). No entanto diferente de CS2%, o extrato etanólico CPET2% obteve destaque com dano celular.

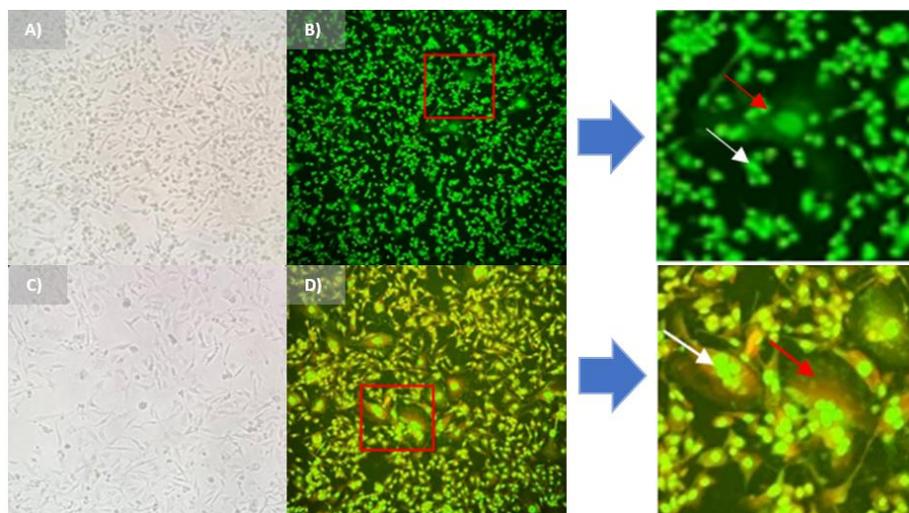


Figura 15- Efeito de CS2% e CSET2% em células tumorais de MDA-MB-231 coradas com brometo de etídio e laranja de acridina. A) CS2% (extrato aquoso) concentração 37,90 $\mu\text{g/ml}$, foto a fresco com objetiva de 10x; B) CS2% (extrato aquoso) concentração 37,90 $\mu\text{g/ml}$, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 15-B não apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca). C) CSET2% (extrato etanólico) concentração 196,42 $\mu\text{g/ml}$, foto a fresco com objetiva de 10x; D) CSET2% (extrato etanólico) concentração 196,42 $\mu\text{g/ml}$, foto fluorescência com objetiva de 10x; Imagem aumentada da Figura 15-D apresentou dano celular (seta vermelha) e núcleo viável (seta branca).

6. DISCUSSÃO

No nosso estudo o extrato etanólico das 3 espécies apresentou perfil de proliferação diferente de acordo com a concentração de tratamento. Nas concentrações menores as células responderam ao tratamento estimulando o crescimento, enquanto nas duas maiores concentrações (25µg/mL e 250µg/mL) houve inibição de crescimento. De acordo com o uso dos corantes brometo de etídio e laranja de acridina, o uso da GI₅₀ como tratamento para observar a morfologia celular nos mostrou que o extrato etanólico das 3 espécies tiveram maiores indícios indução a apoptose.

Os extratos aquosos podem apresentar mais ou menos ativos biológicos, pois o método extrativo e o tipo de solvente utilizado influenciam na concentração de compostos bioativos (PASCOAL, 2015). A maior eficiência de extração de compostos fenólicos por maceração pode estar associada à termossensibilidade dos mesmos, o efeito de inchaço das folhas que facilita a migração dos compostos para o solvente (DE CARVALHO RODRIGUES *et al.*, 2015). Por outro lado, é um extrato cujo solvente não apresenta toxicidade. Neste contexto, avaliamos o extrato aquoso a fim de fazer analogia ao uso de chá das folhas das espécies de *Campomanesia* que estudamos.

Para *C. adamantium*, o extrato aquoso apresentou menor atividade antiproliferativa (>GI₅₀) e menor toxicidade contra as células não tumorais, comparados ao extrato etanólico. Mas o destaque é que o extrato aquoso na maior concentração testada (250 µg/mL) induziu morte celular (efeito citocida) e o extrato etanólico na mesma concentração apresentou apenas efeito de inibição de crescimento para a NIH/3T3 (não tumoral). A atividade citocida é observada quando ocorre morte celular e a citostática quando ocorre inibição do crescimento celular (MONKS *et al.*, 1991). A toxicidade do extrato aquoso já foi observada em outros organismos que apresentam rápido ciclo de vida, como as *Plutella xylostella* (SOUZA *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos são os majoritários nos extratos aquosos e etanólicos de folhas de *C. adamantium* (DE CASTRO *et al.*, 2022). Os flavonoides são compostos com rica atividade antioxidante correlacionada com a atividade anticâncer (CARDOSO, C. L. *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2011; DE LIMA *et al.*, 2017) o que justifica esse potencial a ser explorado nos extratos de *C. adamantium*. Outro estudo que trabalhou com linhagens celulares revela um flavonol glicosilado, a miricitrina foi isolado de uma fração butanólica de folhas de *C. adamantium*, apresentou atividade antiproliferativa frente a linhagem de MCF-7 com GI₅₀ próxima a 50 µg/mL. E também um isolado flavonol glicosilado quercitrina apresentou

atividade para 786-0 e K562 com GI_{50} de 2 $\mu\text{g/mL}$ (PASCOAL, 2015). Apesar do nosso estudo apresentar atividade antiproliferativa com o uso do extrato aquoso, no ensaio de fluorescência não foi identificado indícios de quebra de integridade de membrana, demonstrando apenas a cor verde fluorescente para ambas linhagens testadas (786-0 e MDA-MB-231).

Em nosso estudo o extrato etanólico de *C. adamantium* apresentou perfil de proliferação diferente de acordo com a concentração de tratamento. Nas concentrações menores as células responderam ao tratamento estimulando o crescimento, enquanto nas duas maiores concentrações (25 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$) houve inibição de crescimento. Em estudos também com extrato etanólico desta espécie usando modelo *in vivo* com *Artemia salina* foi observado toxicidade apenas nas maiores concentrações (250 $\mu\text{g/mL}$), corroborando com nosso estudo (JUNIOR *et al.*, 2022). No entanto, em modelos com *Allium cepa*, identificaram genotoxicidade em concentrações mais baixas (81 $\mu\text{g/mL}$). A genotoxicidade pode não estar ocorrendo nos modelos animais, os processos de genotoxicidade quando não reparados levam a processos de mutagênese ou levam morte celular por apoptose (ARUOMA, 2003; VERRI *et al.*, 2017) e em nossos estudos de avaliação de apoptose encontramos indícios nas células testadas nesse processo em concentrações bem próximas em nosso ensaio de fluorescência como na linhagem de 786-0, com uma concentração de GI_{50} (96,40 $\mu\text{g/mL}$) apresentou indícios de alterações morfológicas nas células, como possíveis corpos apoptóticos, aumento de núcleo e cor alaranjada (LIU *et al.*, 2015; RIBBLE *et al.*, 2005).

No nosso estudo o extrato etanólico de folhas de *C. adamantium* demonstra perfil citotóxico e antiproliferativo, com melhor resultado contra as células de câncer de rim (786-0) comparado com as demais linhagens tumorais: HEPG2 (>250 $\mu\text{g/mL}$), MDA-MB-231 (241,47 $\mu\text{g/mL}$), MCF-7 (173,20 $\mu\text{g/mL}$) e HT-29 (249 $\mu\text{g/mL}$). Vários estudos, assim como o nosso estudo, encontraram compostos fenólicos, flavonoides e taninos como os principais constituintes dos extratos aquosos e etanólicos de *C. adamantium* (ALVES *et al.*, 2020; COUTINHO *et al.*, 2008; ESPINDOLA *et al.*, 2016). Em outro estudo, foi identificado uma chalcona intermediária na biossíntese dos flavonóides (cardamonina) e foi relacionado ao efeito citotóxico contra as células da linhagem PC-03 (câncer de próstata - GI_{50} 11,35 $\mu\text{g/mL}$). Este composto foi isolado das folhas e frutos (PASCOAL, A. C. R. F. *et al.*, 2014; RAHMAN, 2011). A Cardamonina recentemente foi relacionada a efeito citotóxico com estímulo da diminuição na viabilidade celular em linhagem de mama triplo negativa (MDA-MB-231), de forma concentração dependente, com valores de GI_{50} entre 3,12 μM a 200 μM . O mecanismo de ação

atribuído foi à diminuição dos valores da expressão de PD-L1 (gene ligante 1 da morte celular programada, encontrado em células tumorais) (MENDONCA *et al.*, 2022). Nós também avaliamos o extrato etanólico de folhas de *C. adamantium* no tratamento de células de mama triplo negativo (MDA-MB-231). A GI₅₀ foi elevada (241,47µg/mL), no entanto, nesta concentração foram observadas algumas células sensíveis ao tratamento, pois o citoplasma estava alaranjado, o que configura um indício de mecanismo de apoptose por perda de integridade de membrana (KASIBHATLA *et al.*, 2006). Se tratando de células resistentes a múltiplas drogas, este achado é de muita importância e nos estimula a seguir com testes mais aprofundados.

Quanto ao efeito tóxico em células não tumorais, em nosso estudo ficou evidenciado, pelo valor de GI₅₀ = 26 µg/ml que o extrato etanólico apresentou maior efeito antiproliferativo em células não tumorais comparado com as células tumorais. O estudo de letalidade com *Artemia salina* também demonstrou o poder de toxicidade do extrato etanólico das folhas de *C. adamantium* (JUNIOR *et al.*, 2022). Porém alguns estudos não demonstraram sinais clínicos de toxicidade após a administração do extrato etanólico em animais experimentais (MARTELLO *et al.*, 2016).

Para *C. pubescens* o extrato aquoso apresentou média atividade antiproliferativa (>GI₅₀) contra as células tumorais e baixa toxicidade contra células não tumorais. O extrato aquoso testado em 786-0 não apresentou mecanismo de indução de apoptose, com a GI₅₀ (69,18µg/mL) o que corroborou com a ação antiproliferativa, porém a concentração do extrato etanólico com a GI₅₀ (110,34µg/mL) é de quase o dobro do extrato aquoso e a variação de concentração de compostos fenólicos pode ter influenciado neste resultado. Para *C. pubescens* não há muitos estudos com extrato aquoso para atividade antiproliferativa, porém há diversos estudos com extrato etanólico que avaliam os efeitos de atividades farmacológicas. O extrato etanólico demonstrou maior efeito citotóxico e nenhuma toxicidade para células não tumorais (NIH-3T3 GI₅₀ >250µg/mL), em outros estudos com folhas e frutos de *C. pubescens* resultaram no isolamento de compostos fenólicos e identificaram atividade antioxidante que pode ser atribuída para efeitos citotóxicos e genotóxicos em *Allium cepa* (CATELAN, T. B. S. *et al.*, 2018). Em nosso estudo *in vitro* não foi identificada toxicidade em células não tumorais com o uso do extrato aquoso e etanólico de *C. pubescens* e em animais experimentais, mais precisamente ratos Wistar, foi revelado que o uso do extrato etílico de folhas de *C. pubescens*

se apresentou livre de toxicidade renal e hepática na concentração de 250 mg/kg quanto de 500 mg/kg (GUERRERO *et al.*, 2010).

Nos frutos foram encontradas chalconas (por maceração com hexano e acetato de etila), e apresentaram atividade antiproliferativa com efeito citocida para linhagens de células tumorais humanas UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (côlon) em comparação com célula normal VERO (célula epitelial de rim de macaco verde) (ANDREA L. C. *et al.*, 2013).

A espécie *C. sessiliflora* apresentou os melhores efeitos citotóxicos entre as três espécies de *Campomanesia*. A citotoxicidade contra as células de câncer de mama, tanto a MCF-7 quanto a MDA-MB-231 se mostrou mais sensível ao extrato aquoso do que ao extrato etanólico. O extrato aquoso também demonstrou ser mais tóxico, apresentando maior efeito contra as células não tumorais (CS-2%= 25,57µg/mL) em comparação com as outras duas espécies estudadas (CA-2%= 43,78µg/mL e CP-2%= 158,02µg/mL). Em nosso estudo usamos a fluorescência para identificar alterações morfológicas condizentes com o mecanismo de indução a apoptose. O extrato aquoso foi inativo contra as células avaliadas. Por outro lado, o extrato etanólico apresentou maiores valores de GI₅₀ contra as linhagens MDA-MB-231 (196,42µg/mL) e 786-0 (116,25µg/mL), estimulou corpos apoptóticos e células com possível mecanismo de apoptose tardia (indicando uma possível quebra da integridade de membrana) (KASIBHATLA *et al.*, 2006). Em apoptose, como consequência, acontece a alteração da integridade de membrana celular, aumentando seu volume e perda das funções metabólicas. Organismos multicelulares podem induzir a morte celular programada como resposta por estímulos intracelulares e extracelulares (GRIVICICH *et al.*, 2007; HENGARTNER, 2000). Observando esses possíveis indícios de alterações morfológicas em nosso estudo, é possível corroborar que o extrato etanólico de *C. sessiliflora* poderia ser utilizado como prática clínica na indução de apoptose, pois é um alvo em potencial para uso terapêutico da morte celular programada e para compreensão de diversos mecanismos que podem levar a resistência de quimioterápicos (NICHOLSON, 2000).

A citotoxicidade encontrada em nosso estudo está relacionada à concentração de flavonoides nos extratos aquosos (CATELAN, T. *et al.*, 2018; PASTORI *et al.*, 2013). Não apenas em extratos aquosos de folhas, mas de frutos também apresentaram toxicidade em células NIH/3T3 não tumorais (LIMA E SILVA *et al.*, 2018), demonstrando a necessidade de

mais estudos sobre o uso de infusões de partes de *Campomanesia sp*, uma vez que são utilizados como medicina tradicional. Com o potencial citostático demonstrado em nossa pesquisa dos extratos aquosos, é possível explorar a combinação de tratamentos como coadjuvantes em terapias contra o câncer. O uso de plantas e os extrativos vegetais na área farmacêutica, são de grande importância, utilizando substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos como matéria prima para obtenção de novos fármacos e também para obtenção de adjuvantes utilizados na formulação de medicamentos ou ainda de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais, como os fitoterápicos (SCHENKEL *et al.*, 2003). As combinações de substâncias químicas ainda que muito exploradas precisam de mais estudos, pois substâncias isoladas podem ser ineficientes em baixas concentrações e em altas podem ser tóxicas para o seu uso em tratamentos contra o câncer (VALDES, 2019).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram potencial citotóxico *in vitro* dos extratos aquosos e etanólicos. A espécie *C. adamantium*, extrato aquoso e etanólico se mostraram ativos para células neoplásicas (786-0, MDA-MB-231 e MCF-7) e inativos para (HEPG2 e HT-29). Ambos os extratos se mostraram inativos para HEPG2, não apresentando toxicidade para células hepáticas. A atividade citostática desta espécie foi representada pelo extrato aquoso pelas linhagens (786-0, MDA-MB-231 e MCF-7), extrato etanólico (786-0 e MCF-7) e a atividade citocida para ambos os extratos (786-0 e MCF-7). Para *C. pubescens*, o extrato aquoso foi ativo para células neoplásicas (786-0, MDA-MB-231, MCF-7 e HEPG2) e inativo para (HT-29). O extrato etanólico foi ativo apenas para (786-0 e MCF-7), demonstrando-se inativo para as demais. A atividade citostática desta espécie foi representada pelo extrato aquoso pelas linhagens (786-0, MDA-MB-231, MCF-7, HEPG2 e HT-29), extrato etanólico (786-0 e MCF-7) e atividade citocida para extrato aquoso (MCF-7 e HEPG2) e extrato etanólico apenas (MCF-7). E por fim *C. sessiliflora*, extrato aquoso foi ativo para (786-0, MDA-MB-231, MCF-7 e HEPG2) e inativo para (HT-29). O extrato etanólico foi ativo para (786-0, MDA-MB-231, MCF-7) e inativo para (HEPG2 e HT-29), logo, também não apresentou toxicidade para células hepáticas. A atividade citostática desta espécie foi representada pelo extrato aquoso para todas as linhagens testadas, e o extrato etanólico (786-0, MDA-MB-231, MCF-7 e HT-29), a atividade citocida para extrato aquoso (786-0 e MCF-7), para extrato etanólico apenas para (MCF-7). Assim, foi possível constatar que as células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e de rim (786-0) obtiveram destaque em citotoxicidade para ambas as espécies.

Foi observada uma certa toxicidade para célula não neoplásica NIH/3T3, pelas espécies *C. adamantium* e *C. sessiliflora* em ambos extratos testados. Logo, a espécie *C. pubescens* se mostrou livre de toxicidade para extrato aquoso e etanólico. Com isso, foi possível identificar a seletividade de *C. pubescens* (extrato aquoso e etanólico) com $IS = 2,26$. Os extratos aquosos e etanólicos de *C. adamantium* e *C. sessiliflora* não apresentaram seletividade para células neoplásicas.

Com o uso da fluorescência, foi possível observar o estímulo de apoptose e dano celular nas células selecionadas (786-0 e MDA-MB-231). Os extratos etanólicos das três espécies estudadas se mostraram mais ativas, com possível indução de apoptose demonstrando maior

dano celular em relação aos extratos aquosos. Tendo em vista a MDA-MB-231 ser uma linhagem resistente a múltiplas drogas, foi possível observar dano celular e estímulo a apoptose com extrato etanólico de *C. sessiliflora*, sendo de grande relevância para o estudo.

Estes resultados demonstram a heterogeneidade de compostos entre os extratos aquosos e etanólicos e entre as espécies. E também confirmam o potencial do gênero *Campomanesia* *ssp.* como fonte ativa anticâncer, para orientação da toxicidade em relação ao uso da população em geral como chás e macerações, pois, embora as plantas medicinais possam ter efeitos importantes no organismo humano, podem apresentar efeitos tóxicos em decorrência de eventual uso indiscriminado pela população, sendo importante dar a continuidade dos estudos a fim de elucidar a toxicidade a atividade anticâncer.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir deste trabalho, pode-se seguir com os estudos em novas abordagens tais como:

- Reprodutibilidade dos resultados (toxicidade e anticâncer) em modelos *in vivo*.
- Detalhamento das vias de morte celular *in vitro* em modelos 3D.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO-DE-CASTRO, T. L.; FERREIRA-DUARTE, B.; LIMA-CARDOSO, C. A. Photoprotective action, anti-oxidant activity, and toxicity of aqueous extracts of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg. **Revista Colombiana de Química**, 50, n. 3, p. 10-15, 2021.

ALICE, C. B. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Editora da ULBRA, 1995. 858569212X.

ALMEIDA, M. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: *Plantas Medicinais* [online]. . 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011, pp. 34-66. ISBN 978-85-232-1216-2., 2011.

ALVARENGA, É. C.; CAIRES, A.; LADEIRA, L. O.; GAMERO, E. J. *et al.* Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, 66, n. 1, p. 43-48, 2014.

ALVES, C. C. F.; OLIVEIRA, J. D.; ESTEVAM, E. B. B.; XAVIER, M. N. *et al.* Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). **Braz J Biol**, 80, n. 2, p. 290-294, Apr-Jun 2020.

ANDREA L. C., C.; JOSÉ SALVADOR, M.; ERNESTO CARVALHO, J.; GOMES CARVALHO, R. Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities in fruits of *Campomanesia pubescens*. **R. Inst. Adolfo Lutz**, p. 309-315, 2013.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research/Fundamental Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 523, p. 9-20, 2003.

ASSUNÇÃO, S. L.; FELFILI, J. M. Phytosociology of a cerrado sensu stricto fragment at the Paranoá Environmental Protection Area, DF, Brazil. **J Acta Botanica Brasilica**, 18, p. 903-909, 2004.

BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S. *et al.* Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer research**, 29, n. 8, p. 2993-2996, 2009.

BARATA, S.; SANTOS, P.; VALÉRIO, O.; SIMÕES, D. *et al.* Doença de Mondor e carcinoma da mama-caso clínico. **Acta Obstet Ginecol Port**, 3, n. 1, p. 60-62, 2009.

BIAVATTI, M.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) JF Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, 93, n. 2-3, p. 385-389, 2004.

BRANDELLI, C. L. C.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J.; CARLI, G. A. D. *et al.* Indigenous traditional medicine: plants for the treatment of diarrhea. *In: Nature Helps*: Springer, 2011. p. 1-18.

BRASIL. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde) 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos Fitoterápicos- Informações Gerais. <http://portal.anvisa.gov.br>. 2014a.

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de mai. 2014. (ANVISA), 2014b.

BRILL, A.; TORCHINSKY, A.; CARP, H.; TODER, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **Journal of assisted reproduction genetics**, 16, n. 10, p. 512-519, 1999.

BRUM, C. S.; CARDOSO, C. A. L. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO, DA TOXIDADE E DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE CAMPOMANESIA PUBESCENS. **ANAIS DO ENIC**, n. 1, 2009.

CAMPOS, J. F.; ESPINDOLA, P. P. d. T.; TORQUATO, H. F.; VITAL, W. D. *et al.* Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3. **Frontiers in Pharmacology**, 8, p. 466, 2017.

CARDOSO, C. A. L. **Plantas do gênero Campomanesia : potenciais medicinal e nutracêutico**. 2021. 978-65-89374-14-5.

CARDOSO, C. A. L.; SALMAZZO, G. R.; HONDA, N. K.; PRATES, C. B. *et al.* Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, 13, n. 5, p. 1273-1276, 2010.

CARDOSO, C. A. L.; SALVADOR, M. J.; CARVALHO, J. E.; CARVALHO, R. G. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 72, n. 4, p. 309-315, 2013.

CARDOSO, C. L.; KATAOKA, V. M.; RÉ-POPPI, N. Leaf oil of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, 22, n. 4, p. 303-304, 2010.

CATELAN, T.; BRUM, C.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; CRISPIM, B. A. *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity, antioxidant potential and chemical composition of leaves of *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 19, n. 5, p. 416-421, 2018.

CATELAN, T. B. S.; BRUM, C. C. S.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; CRISPIM, B. A. *et al.* Cytotoxicity, Genotoxicity, Antioxidant Potential and Chemical Composition of Leaves of

Campomanesia pubescens (Mart. ex DC.) O.Berg. **Curr Pharm Biotechnol**, 19, n. 5, p. 416-421, 2018.

CATELAN, T. B. S.; GAIOLA, L.; DUARTE, B. F.; CARDOSO, C. A. L. Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus Campomanesia. **Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology**, 197, p. 111500, 2019.

CHANG, R.; MORAIS, S.; NASCIMENTO, E.; CUNHA, L. C. *et al.* Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of Campomanesia pubescens O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. **Lat. Am. J. Pharm**, 30, n. 9, p. 1843-1848, 2011.

CINIGLIA, C.; PINTO, G.; SANSONE, C.; POLLIO, A. Acridine orange/Ethidium bromide double staining test: A simple In-vitro assay to detect apoptosis induced by phenolic compounds in plant cells. **Allelopathy J**, 26, n. 2, p. 301-308, 2010.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; RÉ-POPPI, N.; MELO, A. M. *et al.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 45, p. 767-776, 2009.

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V.; HONDA, N. K. *et al.* Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of Campomanesia adamantium leaves. **Ecletica química**, 33, p. 53-60, 2008.

CUNHA, S. A. d.; BORTOLOTTI, I. M. Etnobotânica de plantas medicinais no assentamento Monjolinho, município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 25, p. 685-698, 2011.

DE ANDRADE SILVA, C. A.; FONSECA, G. G. Brazilian savannah fruits: Characteristics, properties, and potential applications. **Food Science Biotechnology**, 25, n. 5, p. 1225-1232, 2016.

DE CARVALHO RODRIGUES, V.; DA SILVA, M. V.; DOS SANTOS, A. R.; ZIELINSKI, A. A. *et al.* Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. **International Journal of Food Science Technology**, 50, n. 9, p. 2038-2045, 2015.

DE CASTRO, T. L. A.; SOUZA, L. P.; CARDOSO, C. A. L. Potencial antioxidante e antimicrobiano das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. **Revista Cereus**, 14, n. 3, p. 183-195, 2022.

DE CASTRO, T. L. A.; SOUZA, L. P.; LIMA-JUNIOR, S. E.; CARDOSO, C. A. L. *et al.* Optimization of obtaining extracts with photoprotective and antioxidant potential from *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. **Sustainable Chemistry**, 31, p. 100945, 2023.

DE CASTRO, T. L. A.; VIANA, L. F.; SANTOS, M. S. M.; CARDOSO, C. A. L. Ação antiproliferativa e mutagenicidade da infusão das folhas de *Campomanesia sessiliflora* no modelo de *Allium cepa*. **Research Society Development**, 9, n. 7, p. e625974555-e625974555, 2020.

DE LIMA, N. V.; ARAKAKI, D. G.; TSCHINKEL, P. F. S.; DA SILVA, A. F. *et al.* Investigation of campomanesia components: a fruit of Brazilian Cerrado. *In: Active ingredients from aromatic and medicinal plants*: IntechOpen, 2017.

DE SOUZA DUARTE, L.; PEREIRA, M. T. M.; PASCOAL, V. D. Á. B.; PASCOAL, A. C. R. F. *Campomanesia* genus—a literature review of nonvolatile secondary metabolites, phytochemistry, popular use, biological activities, and toxicology. **Eclética Química**, 45, n. 2, p. 12-22, 2020.

DE SOUZA, J. C.; PICCINELLI, A. C.; AQUINO, D. F.; DE SOUZA, V. V. *et al.* Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional neuroscience**, 20, n. 1, p. 23-31, Jan 2017.

DE SOUZA, R. B.; FRANCO, C. R.; BOFF, M. I. C.; KOVALESKI, A. *et al.*, 2014, **Biologia de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em frutos de *Campomanesia***

xanthocarpa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 25., 2014, Goiânia, GO.

DOS SANTOS SILVA, P. H.; ABRÃO, F. Y.; DE PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of the crude ethanol extract, essential oil, and fractions from *Campomanesia pubescens* leaves. **Research, Society Development**, 11, n. 5, p. e56911528622-e56911528622, 2022.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. d.; GUIMARÃES, R. M.; LARA, T. S. *et al.* Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, 41, p. 1362-1368, 2011.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; DE MELO PEREIRA, G. V.; GERVÁSIO, I. M. *et al.* Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of industrial Microbiology Biotechnology**, 36, n. 4, p. 557-569, 2009.

EMBRAPA. **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA** 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/> Acesso em: 03/11/2022.

ESPINDOLA, P. P.; DA ROCHA PDOS, S.; CAROLLO, C. A.; SCHMITZ, W. O. *et al.* Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, p. 7910340, 2016.

FERNANDES, I. C.; MELLO, A. A. Entendendo e combatendo o câncer. **Revista Eletrônica de Ciências**, 7, n. 10/11, 2010.

FERREIRA, L. C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; DE PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, 145, n. 1, p. 100-108, 2013.

FRESHNEY, R. I. J. C. o. a. c. a. m. o. b. t. Culture of specific cell types. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 2005.

GHANNADI, A.; DEZFULY, N. Essential oil analysis of the leaves of Persian true myrtle. **International Journal of Medicinal Aromatic Plants**, 1, n. 2, p. 48-50, 2011.

GLOBOCAN. **International Agency for Research on Cancer. Cancer Today: Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, World, both sexes, all ages 2020.** Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUERRERO, F.; ZIMMERMAN, L.; CARDOSO, E.; DE LIMA, C. C. *et al.* Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. **Revista Fitos**, 5, n. 02, p. 64-72, 2010.

GUERRERO, F. M. G. e. a. Investigação da Toxicidade Crônica das Folhas de Guavira (*Campomanesia pubescens*) em Ratos Machos. . **Revista Fitos**, 2013.

GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Life and death by death receptors. **The FASEB Journal**, 23, n. 6, p. 1625-1637, 2009.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, 42, n. 4, p. 377-387, Aug 2007.

HSU, S.-K.; CHANG, W.-T.; LIN, I.-L.; CHEN, Y.-F. *et al.* The role of necroptosis in ROS-mediated cancer therapies and its promising applications. **Cancers**, 12, n. 8, p. 2185, 2020.

HU, X.; HAN, W.; LI, L. Targeting the weak point of cancer by induction of necroptosis. **Autophagy**, 3, n. 5, p. 490-492, 2007.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). **O que é câncer?** Instituto Nacional do Câncer, 2021. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA;** . 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>.

JORGE, J. J. J. A. A. I. Imunoterapia no tratamento do câncer. 3, n. 2, p. 133-138, 2019.

JUNIOR, J. C. R. M.; PRADEBON, V. P. O.; RICCI, A. P.; DE ALMEIDA, T. T. *et al.* Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg e Campomanesia sessiliflora (o. berg) mattos: estudo fitoquímico e toxicidade frente à Artemia salina l.(Crustacea) como indicadores preliminares na elaboração de produtos biotecnológicos: Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg and Campomanesia sessiliflora (o. berg) mattos: phytochemical study and toxicity against Artemia salina l.(Crustacea) as preliminary indicators in the preparation of biotechnological products. **Brazilian Journal of Health Review**, 5, n. 5, p. 18536-18549, 2022.

KASIBHATLA, S.; AMARANTE-MENDES, G. P.; FINUCANE, D.; BRUNNER, T. *et al.* Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2006, n. 3, p. pdb. prot4493, 2006.

KATAOKA, V.; CARDOSO, C. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies Campomanesia sessiliflora (O. Berg) Mattos e Campomanesia xanthocarpa O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15, p. 121-129, 2013.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental cell research**, 256, n. 1, p. 42-49, 2000.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KOOTI, W.; SERVATYARI, K.; BEHZADIFAR, M.; ASADI-SAMANI, M. *et al.* Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: review study. **Journal of evidence-based complementary alternative medicine**, 22, n. 4, p. 982-995, 2017.

LIMA E SILVA, M. C.; BOGO, D.; ALEXANDRINO, C. A.; PERDOMO, R. T. *et al.* Antiproliferative activity of extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and isolated compound dimethylchalcone against B16-F10 murine melanoma. **Journal of Medicinal Food**, 21, n. 10, p. 1024-1034, 2018.

LIU, K.; LIU, P.-c.; LIU, R.; WU, X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. **Medical science monitor basic research**, 21, p. 15, 2015.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 8586714232.

MARTELLO, M.; DAVID, N.; MATUO, R.; CARVALHO, P. *et al.* *Campomanesia adamantium* extract induces DNA damage, apoptosis, and affects cyclophosphamide metabolism. **Genet Mol Res**, 15, n. 2, p. 1-11, 2016.

MATO GROSSO DO SUL (MS). LEI Nº 5.081, DE 7 DE NOVEMBRO DE 2017. : Declara a guavira (*Campomanesia* spp.) como fruto símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul, e dá outras providências. 2017.

MENDONCA, P.; HILL, L.; SOLIMAN, K. F. Effects of Cardamonin on PD-1/PD-L1 Checkpoint in Triple-Negative Breast Cancer. **The FASEB Journal**, 36, 2022.

MING, L. C.; FERREIRA, M. I.; GONÇALVES, G. G. Pesquisas agronômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14, p. 131-137, 2012.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R. *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

NAINU, F.; SHIRATSUCHI, A.; NAKANISHI, Y. Induction of apoptosis and subsequent phagocytosis of virus-infected cells as an antiviral mechanism. **Frontiers in immunology**, 8, p. 1220, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, 407, n. 6805, p. 810-816, 2000.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annual review of pharmacology toxicology**, 41, n. 1, p. 367-401, 2001.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), Organização Mundial da Saúde (OMS). OPAS pede ampliação do acesso ao tratamento do câncer para salvar vidas. 2020.

PASCOAL, A. C.; EHRENFRIED, C. A.; LOPEZ, B. G.; DE ARAUJO, T. M. *et al.* Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**, 19, n. 2, p. 1843-1855, Feb 7 2014.

PASCOAL, A. C.; LOURENÇO, C. C.; SODEK, L.; TAMASHIRO, J. Y. *et al.* Essential oil from the leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk.(Myrtaceae): chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity. **Journal of Essential Oil Research**, 23, n. 5, p. 34-37, 2011.

PASCOAL, A. C. R. F. **Campomanesia adamantium e Campomanesia guaviroba: fitoquímica e estudo in vitro e in vivo visando a determinação da atividade biológica e toxicidade.** 2015. -, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia.

PASCOAL, A. C. R. F.; EHRENFRIED, C. A.; LOPEZ, B. G.-C.; DE ARAUJO, T. M. *et al.* Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**, 19, n. 2, p. 1843-1855, 2014.

PASTORI, T.; FLORES, F. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. *et al.* Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system. **Pharmaceutical Biology**, 51, n. 10, p. 1249-1255, 2013.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D. *et al.* Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, 32, p. 1222-1226, 2009.

PEREIRA, W. d. O.; AMARANTE-MENDES, G. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? **Scandinavian journal of immunology**, 73, n. 5, p. 401-407, 2011.

PRADELLA, L. C.; DOURADO, D. M.; SANTOS, C. H. M. d.; FERMIANO, M. H. *et al.* Evaluation of the scientific activity of the leaf of the species *Campomanesia pubescens* in wound model infected by *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Journal**, 37, 2021.

PRADO, L. C. d. S. Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. e *Campomanesia pubescens* O. Berg. 2013.

RAHMAN, M. Chalcone: A valuable insight into the recent advances and potential pharmacological activities. **Chemical Sciences Journal**, 2011.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, 5, n. S2, p. 774-776, 2007.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC biotechnology**, 5, n. 1, p. 1-7, 2005.

RODRIGUES, J. A.; VIOLA, M. R.; ALVARENGA, L. A.; DE MELLO, C. R. *et al.* Climate change impacts under representative concentration pathway scenarios on streamflow and droughts of basins in the Brazilian Cerrado biome. **International Journal of Climatology**, 40, n. 5, p. 2511-2526, 2020.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. d. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROSENBERG, J. E.; HOFFMAN-CENSITS, J.; POWLES, T.; VAN DER HEIJDEN, M. S. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **The Lancet**, 387, n. 10031, p. 1909-1920, 2016.

SÁ, S.; CHAUL, L. T.; ALVES, V. F.; FIUZA, T. S. *et al.* Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28, p. 303-311, 2018.

SACHET, M.; LIANG, Y. Y.; OEHLER, R. The immune response to secondary necrotic cells. **Apoptosis**, 22, n. 10, p. 1189-1204, 2017.

SAHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, R. A.; HADDA, T. B. J. B. c. Evaluation of phytochemical content, antimicrobial, cytotoxic and antitumor activities of extract from *Rumex hastatus* D. Don roots. **BMC complementary alternative medicine**, 15, n. 1, p. 1-6, 2015.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5, p. 371-400, 2003.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SLEEMAN, J.; STEEG, P. S. Cancer metastasis as a therapeutic target. **European journal of cancer**, 46, n. 7, p. 1177-1180, 2010.

SOUSA, J.; PEIXOTO, A.; TOLEDO, F.; REICHARDT, K. FILHO, JM Enciclopédia agrícola brasileira: EH. **Edition: illustrated, Publicado por EdUSP**, 2004.

SOUZA, S.; COUTO, I. F. S.; SILVA, M.; CARDOSO, C. A. *et al.* Aqueous extracts of species of the genus *Campomanesia* (Myrtaceae) affect biological characteristics of *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) Lepidoptera: Plutellidae. **Journal of Agricultural Science**, 11, n. 5, p. 20-28, 2019.

STEEG, P. S.; THEODORESCU, D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. **Nature clinical practice Oncology**, 5, n. 4, p. 206-219, 2008.

SU, Z.; YANG, Z.; XIE, L.; DEWITT, J. P. *et al.* Cancer therapy in the necroptosis era. **Cell Death Differ**, 23, n. 5, p. 748-756, May 2016.

SUFFNESS, M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**, 6, p. 71-133, 1990.

TEIXEIRA, H. C.; DA SILVA DIAS, L.; MENÃO, T. L.; DE OLIVEIRA, E. E. Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. **HU Revista**, 45, n. 3, p. 325-333, 2019.

TYLER, V.; BRADY, L.; ROBBERS, J. J. L. *Pharmacognosy*, 8th eds. **Lea Febiger, Philadelphia**, p. 157-158, 1981.

VALDES, T. A. **Avaliação do efeito citostático e citotóxico na terapia combinada de antineoplásicos em linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231), fígado (HepG2) E PRÓSTATA (PC-3 E DU 145)**. 2019. -, Universidade de São Paulo.

VERRI, A. M.; MOURA, A. D. A.; DE MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Uningá Review**, 30, n. 1, 2017.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. d. S.; SILVA, D. d.; SANO, S. M. *et al.* **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica Brasília, DF, 2010. 857383482X.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORANDIN, L.; VIEIRA, R. F. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2018., 2018. 8577383091.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. Q.; YUNES, R.; CECHINEL FILHO, V. AEP Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, 2, 2009.

VINAGRE, A. S.; RÖNNAU, Â. D. S. R. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U. d. *et al.* Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 46, p. 169-177, 2010.

VISCARDI, D. Z. **Investigação da atividade anti-inflamatória, antidepressiva e análise toxicológica de óleo essencial e da polpa microencapsulada de *Campomanesia adamantium***. 2017. -.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental clinical cancer research**, 30, n. 1, p. 1-14, 2011.

ZONG, W.-X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z.-Q. *et al.* Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes development**, 18, n. 11, p. 1272-1282, 2004.